

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biotechnologie Agro-écologie

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master2

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

# Pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma* vis-à-vis quelques champignons phytopathogènes

Présenté par :

Date de soutenance : 20.07.2023

LABZOUZI AMIRA

Devant le jury composé de :

Nom	Grade / Lieu	Qualité
D.TOUA	MAA USDB1	Présidente
R.ZATOUTA.	MAB USDB1	Examinatrice
F. AMMAD.	MCA USDB1	Promotrice
Z.BOURAOU	Doct USDB1	CO-Promotrice

Année universitaire : 2022/2023

## **REMERCIEMENTS**

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à notre cher professeur et encadrante Mme F. Ammad pour son suivi et pour son énorme soutien, qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de la période du projet.

Je tiens également à remercier ma co-encadrante Mme Z. Bouraoui pour le temps qu'elle a consacré et pour les précieuses informations qu'elle m'a prodiguées avec intérêt et compréhension.

J'adresse aussi mes vifs remerciements aux membres des jurys Mme Toua et Mme Zatoute pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail.

# **DEDICACE**

Je dédie ce travail à

L'esprit de ma mère qui m'a toujours encouragé et motivé pour donner le mieux possible, que dieu te protèges.

à mon père qui a été à mes côtés du début jusqu'à la fin.

a tous mes médecins qui ont travaillé et ont insisté pour que je sois une personne réussisse malgré tous les problèmes de santé que j'ai traversés  
Dr F.Z hamouda , Dr A.Assia il ont été mon exemple depuis toute petite.

a tous mes amis, camarades et famille, ceux que les trouve quand j'avais besoin.

## Résumé

L'étude a porté en premier lieu sur l'évaluation de l'activité antagoniste de *Trichoderma sp* contre quelque champignons pathogènes étudiés à savoir : *Botryosphaeria dothidae*, *Fusarium sp* et *Alternaria sp* par les tests de confrontation direct, confrontation indirect et en seconde lieu sur l'évaluation des effets antifongique des métabolites secondaire de *Trichoderma sp* .

Les résultats liés au pouvoir antagoniste de *Trichoderma sp* ont révélé que cette souche est capable d'inhiber efficacement la croissance des champignons pathogènes testés par contact direct et contact indirect , nous avons enregistré des pourcentages d'inhibition sur l'ensemble des isolats traité par confrontation direct qui varient de 53 % et 73% , tandis que les pourcentages d'inhibition obtenus par confrontation indirect montrent des valeurs qui varient de 16% à 30.76% .Ces pourcentages varient selon l'interaction de l'agent antagoniste avec l'agent phytopathogène et le mode d'action appliqué.

La croissance mycélienne des souches des souches pathogènes a une moyenne de 12 % à une concentration 10% des métabolites secondaire dans le milieu.

**Mot clé :** Activité antagoniste- Champignons phytopathogènes- *Trichoderma* , Mode de confrontation

## Abstract

### **The antagonistic power of *Trichoderma sp* against some fungal pathogens**

The aim of this study is to evaluate the antagonistic activity of *Trichoderma sp* against some pathogenic fungi by direct contact tests, indirect contact tests and the evaluation of the antifungal effects of *Trichoderma* secondary metabolites, according to the results obtained the antagonistic power of *Trichoderma* is capable of effectively inhibiting pathogenic fungi in direct contact with different percentages ranging from 53% to 73% while the percentages obtained in indirect confrontation varied between 22% and 30, 76%, these percentages vary according to the interaction of the antagonistic agent with the phytopathogenic agent and the mode of action applied. Inhibition of the growth of pathogenic strains has an average of 12% at a concentration of 10% of secondary metabolites in the medium. *Alternaria* is the most sensitive species.

The next challenges for researchers will be to select strains that are antagonistic to phytopathogenic fungi through the evolution of their antagonistic activity, in order to reduce disease problems in the agricultural sector.

Key words: Secondary metabolites - Mode of action -Antagonist activity -Plant pathogenic fungi.

## المخلص :

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم قدرة الفطر شعريات الأدمة على تثبيط عمل وتطور الفطريات الممرضة التي تصيب النباتات وهي نوع من فطريات التربة تدعى باللغة الفرنسية *Trichoderma*. حيث أن يمكنها تنفيذ العديد من الآليات لإيقاف أو تثبيط نمو و تطور الفطريات وقد تم استعمال ثلاث طرق لتقييم هذه الخاصية وهي المواجهة المباشرة والغير مباشرة وكذلك التأثير بالمواد الثانوية المضادة المسؤولة على هذه الظاهرة بالنسبة لثلاث فطريات ممرضة تتمثل مصطلحاتها باللغة الفرنسية *ALternaria ; Botriyosphearia;Fusarium* حسب النتائج المتحصل عليها تبين ان فطريات شعريات الادمة يمكنها تثبيط الفطريات الممرضة بنسب مختلفة ;وهي حساسة الأكثر عند المواجهة المباشرة على عكس المواجهة الغير مباشرة يمكنها مقاومة التأثير المضاد وقد اتضح ان *Botriyosphearia* هو الأكثر حساسية لتأثير الغير مباشر من بين الفطريات الأخرى المختبرة قدرة *Trichoderma* على التثبيط الفعال للفطريات المسببة للأمراض عند الاتصال المباشر بنسب مختلفة تتراوح بين 53% و 73% بينما النسبة التي تم الحصول عليها في المواجهة غير المباشرة تراوحت بين 22% و30.76% ، وتختلف هذه النسبة باختلاف تفاعل العامل المضاد مع عامل المرض وطريقة العمل المطبقة. يبلغ متوسط تثبيط نمو السلالات المسببة للأمراض 12% عند تركيز 10% من نواتج الاستقلاب في الوسط. كانت السلالات الثلاثة أكثر حساسية للمواجهة المباشرة من المواجهة غير المباشرة للقوة العدائية حيث تعتبر، *Botriyosphearia* ، بنسبة 30.76% ، الأكثر حساسية للمواجهة غير المباشرة مقارنة مع

## الكلمات المفتاحية :

الفطريات الممرضة - نواتج الاستقلاب - العنصر المضاد - الفطريات الممرضة

## Table des matières

REMERCIEMENTS	
DEDICACE	
Résumé	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION.....	2
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES .....	4
CHAPITRE 01 : Généralités sur <i>Trichoderma</i> .....	5
I. Généralités sur les <i>Trichoderma</i> .....	5
1.1. La lutte biologique :.....	12
1.2. La lutte biologique par les champignons : .....	12
2.1. Les utilisations de <i>Trichoderma</i> dans la lutte biologique :.....	12
1.4. Mode d'action de <i>Trichoderma sp</i> .....	13
Matériels et méthodes.....	18
Chapitre II : Matériel et méthodes .....	19
I. Matériels .....	19
I.1. Matériel biologique : .....	19
I.3.Milieux de culture .....	20
I.4. Purification des champignons.....	20
I.5. Observations microscopiques .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
II.1.Co culture en confrontation directe : .....	21
Résultats et discussion.....	24
Chapitre III : Résultats et discussion .....	25
1. Etude macroscopique et microscopique des isolats .....	25
1.1. Caractérisation macroscopique de l'agent antagoniste: .....	25
1.2. Caractérisation microscopique :.....	26

1.3. Caractérisation macroscopique et microscopique des agents pathogènes .....	26
2. Confrontation directe sur milieu de culture entre les pathogènes et l'antagoniste. ....	26
2.1 Cas des <i>Botryosphaeria</i> .....	26
3. Confrontation indirecte sur milieu de culture entre les pathogènes et l'antagoniste. ...	30
3.1 Cas des <i>Botryosphaeria</i> .....	30
3.2 Cas de <i>Fusarium</i> : .....	30
3.3 Cas d' <i>Alternaria</i> :.....	30
Discussion .....	34
Conclusion .....	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE .....	41

## Liste des figures

Figure.1 : Les cinq sections de <i>Trichoderma</i> reconnus par Bissett (1991).....	8
Figure.2 :Colonies de champignons du genre <i>Trichoderma</i> .....	9
Figure.3 : Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichodermalongibarachiatum</i> : Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichodermalongibrachiatum</i> .....	11
Figure.4 : Les mécanismes d'induction de la résistance systémique par les souches de <i>Trichoderma</i> .....	16
Figure 5 : Mécanisme de mycoparasitisme des <i>Trichoderma</i> .....	18
Figure 6 : Schéma représentatif de la confrontation direct .....	22
Figure 7 : Schéma représentatif de la confortation indirect .....	23
Figure 8 :(a) La croissance de <i>Botryospheariadothidae</i> en présence de <i>Trichodermasp</i> en confrontation direct .....	28
Figure 8 :(b) Témoin <i>Botryospheariadothidae</i> non traite.....	28
Figure 09 : (c) croissance de <i>Fusarium</i> en presence de <i>Trichodermasp</i> en confrontation direct.....	30
Figure 10 : (d) <i>Fusariumsp</i> non traite .....	30
Figure 11 :(e) croissance de d' <i>Alternariaspen</i> presencede <i>Trichodermasp</i> en confrontation direct,.....	31
Figure :(f) : <i>Alternariasptemoin</i> non traite .....	31
Figure 12 : L'effet inhibiteur de <i>Trichodermasp</i> sur les champignons pathogène (Confrontation direct) après 7 jours d'incubation .....	32
Figure 13 : L'effet inhibiteur de <i>Trichodermasp</i> sur les champignons pathogène (Confrontation indirect) après 7 jours d'incubation .....	33
Figure14 : l'effet de filtrat de culture <i>Trichodermasp</i> sur la croissance de <i>Fusaruimsp</i> .....	34
Figure15 : Figure 15 : l'effet de filtrat de culteur <i>Trichodermasp</i> sur la coissance d' <i>Alternariasp</i> .....	34
Figure 16 : effets de filtrat de culteur <i>Trichoderma</i> sur la croissance mycélienne des souches fongiques pathogènes .....	35
Figure 13 : L'effet inhibiteur de <i>Trichodermasp</i> sur les champignons pathogène (confrontation indirect) après 7 jours d'incubation .....	33
Figure14 : l'effet de filtrat de culture <i>Trichodermasp</i> sur la croissance de <i>Fusaruimsp</i> .....	34

Figure 15 : l'effet de filtrat de cultureur <i>Trichoderma</i> sur la croissance d' <i>Alternaria</i> .....	34
Figure 16 : effets de filtrat de cultureur <i>Trichoderma</i> sur la croissance mycélienne des souches fongiques pathogènes .....	35

## Liste des tableaux

Tableau 1: Classification actuelle de *Trichoderma* ( Bisset 2004) .....9

Tableau 2: Caractéristiques des isolats fongiques testés..... **Erreur ! Signet non défini.**

## Liste des abréviations

**PDA** : Potato Dextrose Agar

*sp* : **specie plurimae (une seule espèce)**

**PDB**: PotatoDextrose Broth

**PGPF**: PlantGrowth-Promoting fungi

**PAP** : phosphatase acide pentose

# **INTRODUCTION**

## Introduction

L'utilisation des produits chimiques comme les pesticides et également d'autres formules chimiques dans le but de contrôler la majorité des agents pathogènes qui menacent les plantes est efficace, mais avec le temps, l'apparition de conséquences indésirables sur la chaîne alimentaire exprimées par multiples effets nocifs sur la santé humaine et sur l'environnement. Le développement des maladies dermatologiques, des problèmes gastro-intestinaux, des effets neurologiques, cancérogènes et endocriniens, de plus une exposition professionnelle, accidentelle ou intentionnelle élevée aux pesticides peut entraîner la mort. Les intrants chimiques ont contribué de manière significative à la pollution de l'environnement, sans oublier le problème de la bioaccumulation (Barman, S., et al 2021). Un autre problème qui commence à semer l'inquiétude chez les agriculteurs et les biologistes est le phénomène de l'apparition des souches résistantes chez les pathogènes (Ramírez et al 2021). Toutes ces limites de la méthode chimique de lutte obligent les agronomes de concentrer leurs efforts sur le développement d'intrants alternatifs à ces produits chimiques (Poveda, J. 2021).

La pourriture du collet du blé est une maladie du blé économiquement importante que l'on trouve couramment dans les régions productrices de blé du monde entier et qui entraîne non seulement une réduction du rendement, mais également une mauvaise qualité du grain (Kim et al, 2019) causée par plusieurs espèces complexes de *Fusarium* comprises *F. pseudograminearum* (Fpp), *F. culmorum* et *F. graminearum* (M.Elizondo, 2013). Dans le cas des conditions environnementales présentes sont une température froide ou une humidité (pluies, condensation sous une serre) on aura l'apparition de la maladie alternariose facilitée par ces conditions, les spores et le mycélium d'*Alternaria solani* engendrant chez la tomate des taches brun-noir (ADB, Guzzo, 2011).

Les dépérissements à *Botryosphaeria* (synonymes: chancres à *Botryosphaeria*, ou Black Dead arm) une maladie touche principalement le bois de la forme de nécroses sectorielles, elle se développe souvent à partir des blessures. Ces nécroses sont associées à la croissance de champignons appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae*. (P. Locmate, 2017).

Les cultures sont régulièrement menacées par des insectes ravageurs ou/et vecteurs de maladies. Leur présence en trop grand nombre cause d'importantes pertes de rendement (Shah, PA, & Pell, JK 2003 )

La lutte biologique consiste en l'utilisation d'organismes auxiliaires afin de contrôler d'autres organismes nuisibles présents sur les exploitations agricoles. Un auxiliaire est un organisme vivant qui va avoir une action régulatrice sur des ravageurs de cultures (Tingley *et al.*, 2017).

les espèces de genre *Trichoderma* sont largement utilisés dans le biocontrôle de différents phytopathogènes à leur caractéristique biologique : leurs aptitude de reproduction et de croissance, leurs mode d'action et la production des métabolites secondaires (Chaverri *et al.*, 2015; Degenkolb *et al.*, 2015; Waghunde *et al.*, 2016).

Plusieurs mécanismes d'action sont impliqués dans l'activité antifongique des *Trichodermaspp* telles que le mycoparasitisme, la compétition trophique ainsi que la production de composés non-volatiles et volatiles dont font partie les enzymes lytiques et d'autres métabolites secondaires fongiques toxiques (Reino *et al.*, 2008 ; Afzal *et al.*, 2013).

Dans ce contexte, la présente étude est réalisée dont l'objectif principal est d'évaluer le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* vis à vis de quelques champignons pathogènes et son mode d'action.

L'objectif de cette étude réside dans l'évaluation de l'efficacité d'un agent antagoniste : *Trichodermasp* vis à vis trois espèces fongiques pathogènes qui menacent la production agricole une espèce appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae*, pour cette raison nous avons essayé de répondre à la problématique suivante.

- Quel est l'effet de l'activité antagoniste *in vitro* de *Trichodermasp* vis-à-vis des champignons phytopathogènes
- Quel est le mode d'action de *Trichodermasp* le plus efficace contre les pathogènes testés ?
- Quels est l'effet des métabolites secondaires que possède cette souche antagoniste ?

**SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## CHAPITRE 01 : Généralités sur *Trichoderma*

### I. Généralités sur les *Trichoderma* :

De nombreuses études ont prouvé le potentiel des *Trichoderma spp* en tant qu'agents biologiques antagonistes utilisé dans la gestion des maladies des plantes (Akrami et yousfi ,2015). Ils sont des champignons filamenteux de la rhizosphère et implique différents types d'action avec d'autres microorganismes présents dans leur environnement (K.A. Abd-Elsalam et al., 2010).

Le genre *Trichoderma* est l'un des 3 prédominants. Il vient à la 3ème position après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. La présence des *Trichoderma sp.* en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (N.Geuye et al , 2016).

*Trichoderma* est un genre de champignons du sol qui peuvent être trouvés dans presque tous les types de sols à travers une grande variété d'écosystèmes. Les *Trichoderma* se nourrissent d'un assortiment d'autres champignons et s'épanouissent dans des sols à forte densité de racines de plantes, qu'ils peuvent coloniser (Widden et Abitrol, 1980 ; Kubicek et al.,2003). Il est difficile d'identifier et de classer correctement les espèces de *Trichoderma*, car elles présentent peu de différences morphologiques (et difficiles à identifier). En fait, *Trichoderma* a longtemps été considéré comme monotypique (ne contenant qu'une seule espèce) ; aujourd'hui, cependant, plusieurs espèces uniques de *Trichoderma* ont été identifiées (Druzhinina et Kubicek, 2005).

#### 1.2. La classification :

La biologie moléculaire nous révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se chevauchent. Grace aux travaux de Rifai en 1969 et les autres chercheurs qui ont modifié la classification de *Trichoderma* et avec les techniques de biologie moléculaire basées sur le polymorphisme de séquence d'ADN, ils ont pu proposer une classification phylogénique pour ce genre (figure 1).

Le genre *Trichoderma* (téléomorphe : *Hypocrea*) appartient au sous embranchement des Ascomycètes, classe des Sordariomycètes, Ordre des Hypocréales et la famille des Hypocraceae (Chaverrietal., 2015).

### 1.3. Approche morphologique :

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

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

#### Section *Trichoderma*

##### Section *Longibrachiatum* Bissett

- Section *Saturnisporum* Doi et al.
- Section *Pachybasium* Sacc.
- La section *Hypocreanum* sect. nov.

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

La forme téléomorphe des espèces de *Trichoderma* appartient à l'ordre des *Hypocreales*, au genre *Hypocrea*, mais certaines espèces de *Trichoderma* ont été rattachées au genre *Podostroma* P. Karst. Et *Sarawakus* Boedijn. Depuis 1860 plusieurs espèces du genre *Hypocrea* ont été cultivées et leur anamorphe *Trichoderma* sont décrits (Samuels, 1996) (Figure 1)

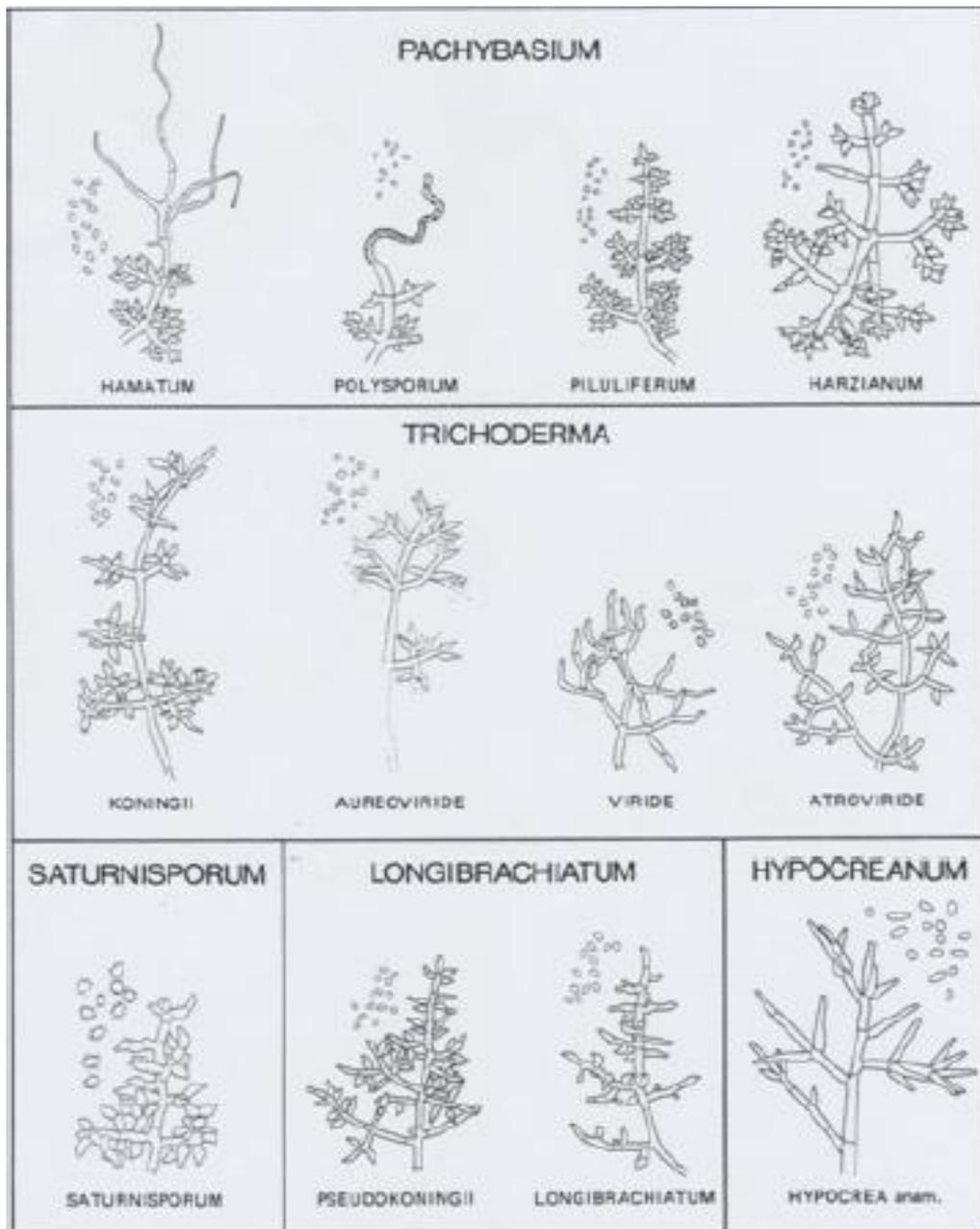


Figure 1: Les cinq sections de *Trichoderma* reconnus par Bissett (1991).

### 1.5. Approche moléculaire

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

La biologie moléculaire nous révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se chevauchent. Grace aux travaux de Rifai en 1969 et les autres chercheurs qui ont modifié la classification de *Trichoderma* et avec les techniques de biologie moléculaire basées sur le polymorphisme de séquence d'ADN, ils ont pu proposer une classification phylogénique pour ce genre (Figure.2) .



**Figure 2: Colonies de champignons du genre *Trichoderma* (Blaszczyk et al 2014)**

La taxonomie actuelle des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma* (Tableau.1). Près de 104 espèces composant ce genre, sont des champignons avec de rares formes téléomorphes et sont classées parmi les Ascomycètes du genre *Hypocrea* (Tan Siew Hui, 2013).

Tableau 1: Classification actuelle de *Trichoderma* ( Bisset 2004)

Règne	Fungi
Embranchement	Amastigomycota et/ou Eumycètes
Sous embranchement	Ascomycotina
Classe	Sordariomycètes
ordre	Hypocréales
Famille	Hypocraceae
Genre	<i>Hypocremitosporique</i> ( <i>Trichoderma</i> )

### 1.6. Morphologie :

Les isolats de *Trichoderma* sont identifiables grâce à leurs pigments conidiens verts typiques (conidies) ou blancs (phialides) et à leur structure de conidophores branchés, certaines espèces produisent une odeur de sucre ou de « noix de coco » due à un composé volatil biologiquement actif (6-pentyl- $\alpha$ -pyrone) (Yariv, 2016). Ils sont capables de se développer rapidement par l'utilisation d'une large gamme de substrats d'origines naturelle ou chimique bien que leurs besoins nutritionnels faibles (Domenico, 2011).

L'aspect macroscopique de *Trichoderma sp* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Petri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment

par la suite, et entre le 16ème et le 20ème jour un feutrage épais se superpose à la culture (Sadfi et al .,2008).

Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (Figure.3) ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001, Kubicek et al., 2003).

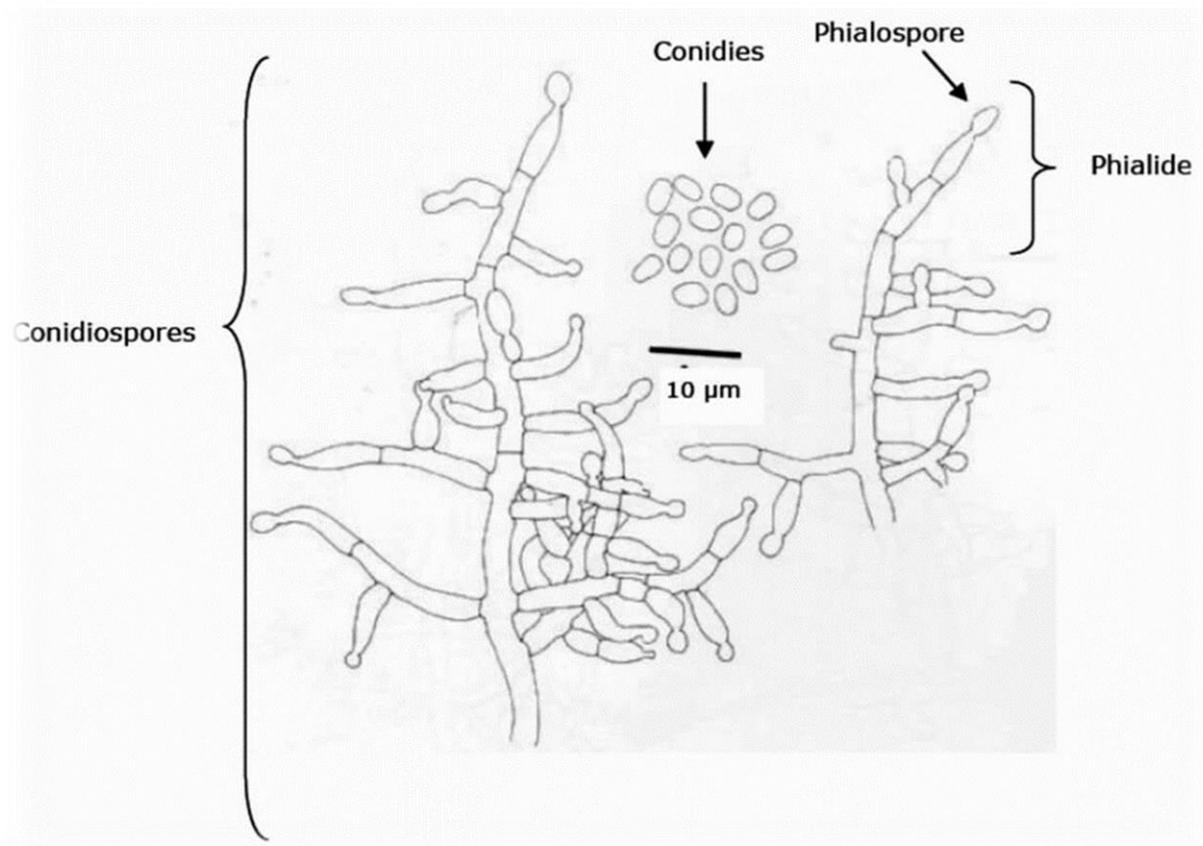


Figure 3: Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma longibarachiatum* (Samuels et al., 1994).

### 1.7. Ecologie et habitat :

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

nature concurrentielle des espèces de *Trichoderma* et à la possibilité de production de divers métabolites (Gams et Bissett 1998).

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

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

Les champignons, qui sont capables de coloniser la surface du système racinaire

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

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

Les *Trichoderma* sont omniprésents dans le sol, très remarquable par des besoins nutritionnels minimaux, une croissance rapide, une sporulation abondante et une capacité d'utiliser divers substrats. Les *Trichoderma* jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique, d'origine naturelle et xénobiotique, en attribuant une biofertilisation aux sols. Ils sont bien connus pour leur production

d'enzymes de dégradation comme les Chitinases et cellulases impliquées dans la lyse du mycélium de nombreux champignons.

Avec de telles qualités, les *Trichoderma* sont des agents de lutte biologique et stimulateurs de la croissance des plantes (Klein et Eveleigh, 1998).

### **2. La lutte biologique :**

Le terme lutte biologique » et son synonyme « bio-contrôle » signifient en phytopathologie, l'utilisation d'antagonistes microbiens comme méthode alternative d'origine naturelle pour lutter contre les maladies des plantes. Un organisme qui inhibe ou stoppe la croissance d'un parasite ou d'un pathogène est appelé agent de lutte biologique. La lutte biologique par des agents microbien est l'une des méthodes de lutte biologique qui visent à trouver un agent de lutte d'origine naturelle, respectueux de l'environnement, non offensif et efficace contre les maladies des plantes. (Cloud 2013).

#### **2. 1. La lutte biologique par les champignons :**

Le potentiel d'application d'agents de lutte biologique fongique contre les agents pathogènes des plantes a largement augmenté parce que les champignons ont un taux de reproduction relativement élevé (sexuellement et asexuellement), un temps de génération court et qu'ils sont spécifiques à une cible. De plus, en l'absence de l'hôte, ils peuvent survivre dans l'environnement en déplaçant leur mode de parasitisme vers le saprotrophisme, maintenant ainsi la durabilité. De nombreuses espèces fongiques possèdent des mécanismes qui leur permettent de protéger efficacement les plantes contre les maladies causées par les champignons phytopathogènes (Thambugala, 2020).

#### **2.2. Les utilisations de *Trichoderma* dans la lutte biologique :**

De nombreuses des souches de *Trichoderma* sont utilisées dans le biocontrôle des agents pathogènes, soit comme biofongicide soit comme biostimulant ou les deux en même temps. Certaines espèces et souches sont plus puissantes pour réaliser des symbioses au niveau de la rhizosphère (biostimulation) et d'autres plus capable de pénétrer l'entièreté de la plante en la protégeant des maladies fongiques (action antifongique), (M. Baltazar et al ,2021) .

Selon la réglementation de l'OEPP 'organisation oropienne pour la protection des plantes'

Un biostimulant végétal est "un produit stimulant les processus de nutrition des plantes indépendamment de la teneur en éléments nutritifs du produit. L'effet de biostimulant de *Trichoderma*. Dans le but d'améliorer l'absorption des nutriments par la plantes et leurs disponibilité également le développement de la résistance au condition abiotique. (M.Baltazar et al.,2021 ).

### 2.3. Mode d'action de *Trichoderma sp*

#### a) Antibiose

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

La production des métabolites secondaires par les espèces de *Trichoderma* est d'environ 180 métabolites appartenant à différentes classes de composés chimiques (Gams et Bisset 1998 ; Reino et al. 2008). Ces composés ont été caractérisés et qui peuvent être classés en trois catégories : des composés volatiles, des composés diffusibles et des peptaïboles (Ghisalberti et Sivasithamparam 1991).

L'antibiotique 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PAP) qui appartient au groupe métabolites volatiles est produit par certaines espèces de *Trichoderma*, à savoir *T. viride*, *T. harzianum* et *T. koningii*, qui jouent un rôle dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes tel que *Botryosphearina cinerea*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* (Jeleń et al. 2013 ; Błaszczyk et al., 2014).

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

Les *Trichoderma* peuvent aussi sécréter des peptaïboles (polypeptides) ayant des effets antifongiques, antibactériens (Gram +) et antiviraux. Les composés appartenant à cette classe comprennent : les viridines, trichotoxines A et B, trichorovines (synthétisées par *T. viride*) ; trichorzianines A et B, trichorzines (synthétisés par *T. harzianum*) ; koningine, acide koningique,

trichokonines (synthétisés par *T. koningii*) ; longibrachines (synthétisé par *T. longibrachiatum*) et autres (Vinale *et al.* 2006 ; Reino *et al.*, 2008 ; Andrabet *et al.* 2011).

### **b) Compétition pour les nutriments et l'espace**

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

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

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

### **c) Induction de la résistance systémique (ISR) :**

L'induction de la résistance systémique (Figure.4), dans les plantes par la synthèse de substances chimiques par *Trichoderma* a été démontré dans les années 90s (Elad, 1996 ; Enkerli *et al.*, 1999).

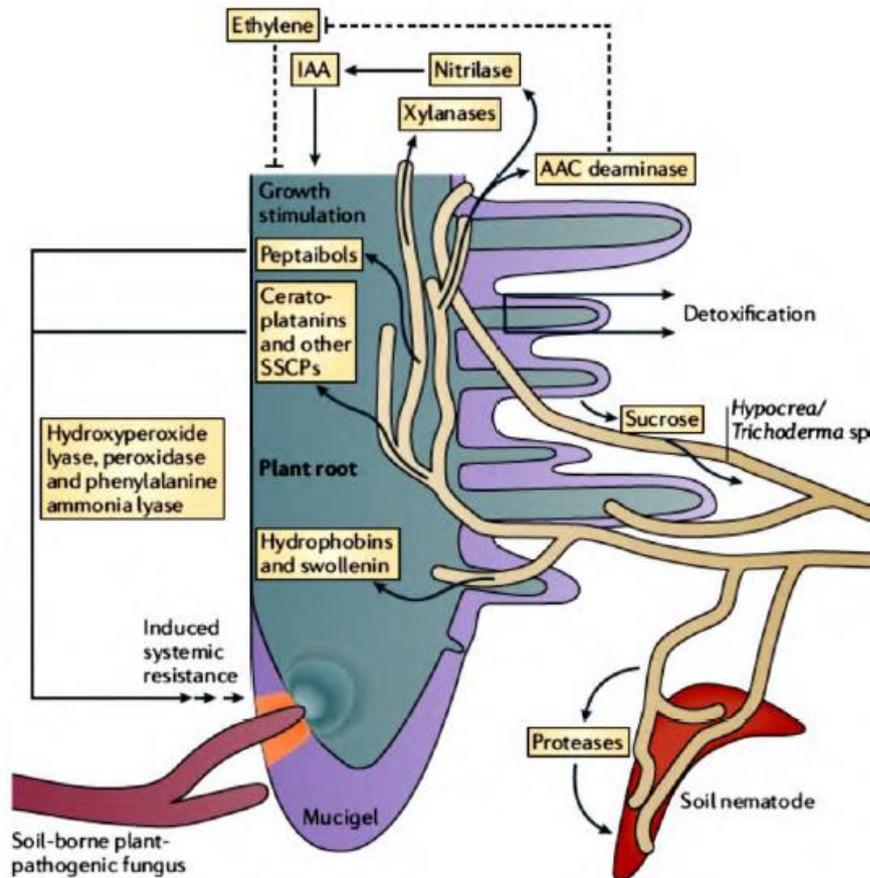


Figure 4: Les mécanismes d'induction de la résistance systémique par les souches de *Trichoderma*

(Irina et al., 2001).

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

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

Les *Trichoderma* sont des opportunistes qui vivent en association bénéfique avec des plantes. Certaines souches établissent une colonisation au niveau des surfaces

racinaires et pénètrent jusqu'à l'épiderme ce qui améliore la croissance racinaire, la productivité et la résistance au stress biotique et abiotique ainsi que l'assimilation et l'utilisation des nutriments (Harman *et al.*, 2004).

Les *Trichoderma* influencent sur la croissance des plantes en synthétisant des phytohormones comme l'AIA et en améliorant le contenu du sol en nutriments par la solubilisation du phosphate et d'autres éléments nutritifs comme le  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et  $Zn$  qui peuvent être non disponibles dans certains sols ou bien existent sous forme non assimilable pour les plantes (Altomare *et al.*, 1999 ; Rudresh *et al.*, 2005 ; Gravel *et al.*, 2007).

### **d) Le mycoparasitisme**

Le mycoparasitisme implique comme une première étape une reconnaissance de l'agent pathogène par l'agent de lutte. Le *Trichoderma* perçoit la présence de son hôte et commence à développer des hyphes en direction de ceux du pathogène par chimiotropisme. La reconnaissance se manifeste par une adhésion de *Trichoderma* aux parois de son hôte suivie par l'enroulement des hyphes du mycoparasite sur ceux de l'agent phytopathogène. Par la suite, une pénétration à l'intérieur des hyphes du pathogène se fait suite à des sécrétions d'enzymes de dégradation de la paroi de l'hôte comme les chitinases et les glucanases. Ce phénomène est suivi par une dissolution du cytoplasme. Le contenu cellulaire de l'hôte est rapidement lysé par la mise en jeu d'enzymes extracellulaires telles que la protéase et la lipase ( Figure.5) (Howell, 2003 ; Harman *et al.*, 2004 ; Dubey *et al.*, 2007).

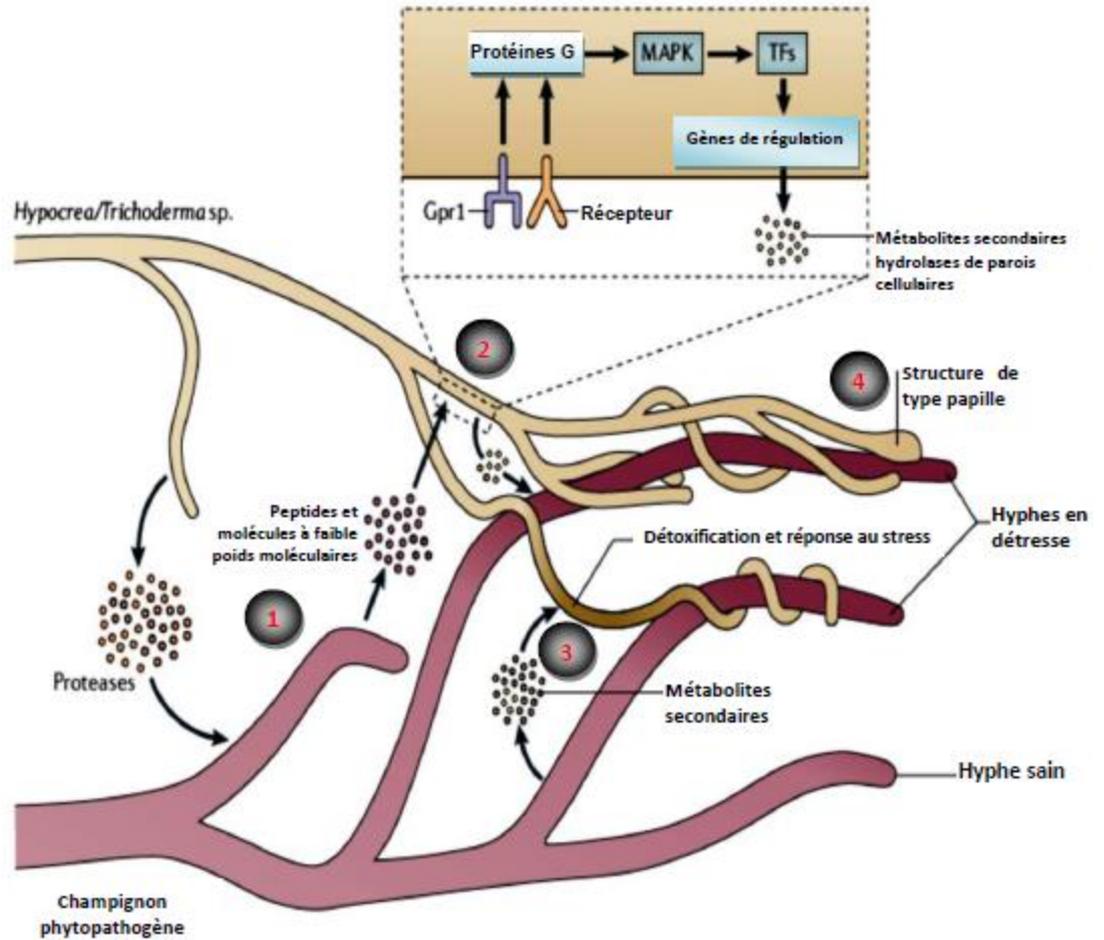


Figure 5: Mécanisme de mycoparasitisme des *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2011)

# **Matériel et méthodes**

## Chapitre II : Matériel et méthodes

L'intérêt de cette étude est porté sur l'évaluation de l'effet antagoniste de *Trichoderma sp* vis-à-vis quelques agents fongiques pathogènes qui menacent le patrimoine végétal (arboriculture fruitières et culture maraichères). Nous avons testé trois espèces fongiques phytopatogènes apparentant aux genres suivant : *Alternaria*, *Botriyosphaeria* et *Fusarium*

### I. Matériels

#### I.1. Matériel biologique :

##### I.1.1. Les champignons phytopathogènes.

- *Botriyosphaeria*: cette espèce est isolée a partir du bois nécrose de vigne, son identité a été confirmée sur la base des caractères morphologiques et culturales d'une clé d'identification (Phillips ,2002), et une analyse moléculaire en utilisant des amorces universels : Internal Transcribedspacer( ITS 1 et ITS 4): *Botriyosphaeria. dothidea* .En raison de l'absence des fructifications dans les cultures fongiques obtenues durant l'incubation de *B.dothidae* , nous avons utilisé des disques mycéliens âgés de 5 jours à partir des boites Pétri contenant le milieu PDA . Cette espèce est un agent responsable du dépérissement de la vigne et autres espèces arboricole dont les citrus (Tableau 2).
- *Alternaria* : cette espèce est isolée a partir du bois nécrose des Agrumes, son identité a été confirmée sur la base des caractères morphologiques et culturales d'une clé d'identification
- *Fusarium* : cette espèce est isolée a partir du bois nécrose des Agrumes, son identité a été confirmée sur la base des caractères morphologiques et culturales d'une clé d'identification

### I.2.2. Le champignon antagoniste.

Nous avons utilisé dans notre travail expérimental, une espèce fongique *Trichoderma sp*, cette espèce a subi une identification classique et moléculaire (Ammad, 2018) à fin d'étudier leurs activité antagonistes in vitro sur les trois espèces fongiques cités au dessus.

Espèces	Hôte	Auteurs	Provenance
<i>Botryosphaeria dothidae</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Ammad et al (2014)	Locale
<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Citrus sp</i>	Ammad et al (2018)	Locale
<i>Fusarium</i>	<i>Citrus sp</i>	Benzohra et al (2018)	Locale
<i>Alternaria sp</i>	<i>Citrus sp</i>	Benzohra et al (2018)	Locale

Tableau 2: l'origine des souches fongiques testes

### I.3.Milieux de culture

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

### I.4. Purification des champignons

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

## II. Activité antagoniste in vitro

Les essais d'antagonisme in vitro ont été effectués avec une souche fongique (*Trichoderma sp*), via à vis de trois souches phytopathogènes (*Botryosphaeria dothidae*, *Fusarium sp* et *Alternaria sp*). via trois techniques :

- La co-culture en confrontation directe
- La co-culture en confrontation indirect
- Un test de l'activité antifongique par le filtrat de *Trichoderma sp*.

### II.1. Co culture en confrontation directe :

Cette méthode a été appliquée selon Dabire et al. 2016, des pastilles gélosées 6 mm ont été prélevés à partir des cultures âgées 7 jours de chaque agent pathogène et antagoniste, ont été mises dans des boîtes de pétri de taille 90 mm contenant le milieu de coulture PDA, elles ont été déposées sur un même axe au centre de la boîte (Figure .6), avec une distance de 5 cm entre eux et trois répétions pour chaque couple antagoniste pathogène, ces boîtes, elles ont été incubées à 25 C pendant 7 jours.

Préparation des boîtes considère comme des boîtes témoins consistent à déposer un disque mycélien pathogène au centre de la boîte de pétri contient le milieu de culture PDA.

Les diamètres de croissance des agents pathogènes misent en co-culture avec l'agent antagoniste *Trichoderma* ont été mesurés pour calculer le pourcentage d'inhibition selon la formule :

$$A = (R_{\text{tem}} - R_{\text{test}}) / R_{\text{tem}} * 100$$

**R tem** : le rayon moyen des colonies témoins (souche de champignons pathogènes en croissance à l'absence de l'agent antagoniste).

**R test** : le rayon moyen des colonies en présence de l'agent antagoniste

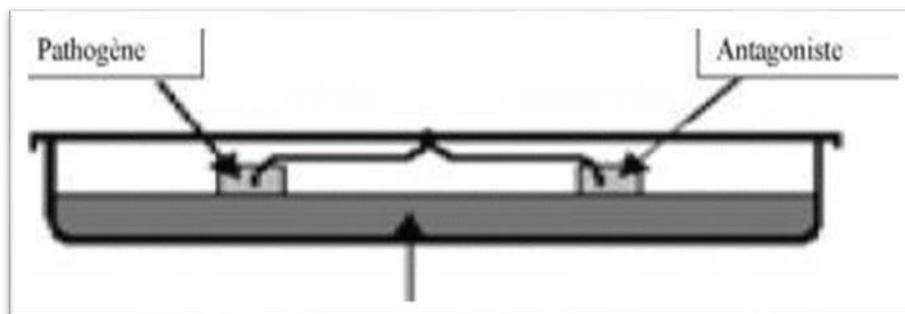


Figure 6: Présentation schématique de la confrontation directe.(K.Hiber et al 2004)

### II.3.2. Co culture en confrontation indirecte :

Deux pastilles, l'un est antagoniste et l'autre est pathogène de sept jours d'incubation, ont été déposées dans le centre de deux boîtes de pétri distinctes. Puis

un assemblage de ces deux boîtes a été réalisé par leur supposition, *Trichoderma* en bas et l'agent pathogène en haut. La jonction entre les boîtes était assurée par une couche de para filme, dans le but d'éviter la déperdition des substances volatiles (Figure.7) , avec incubation entre 22-25 C° pendant sept jours.

Préparation des boîtes utilisées comme boite témoin consiste à disposer dans une boîte une pastille de pathogènes et laisser la deuxième boîte contient que le milieu de culture PDA.

Après sept jours d'incubation, les diamètres de croissance des agents pathogènes en été mesurent pour calculer le pourcentage d'inhibition selon la même formule appliquée dans la méthode de confrontation directe.

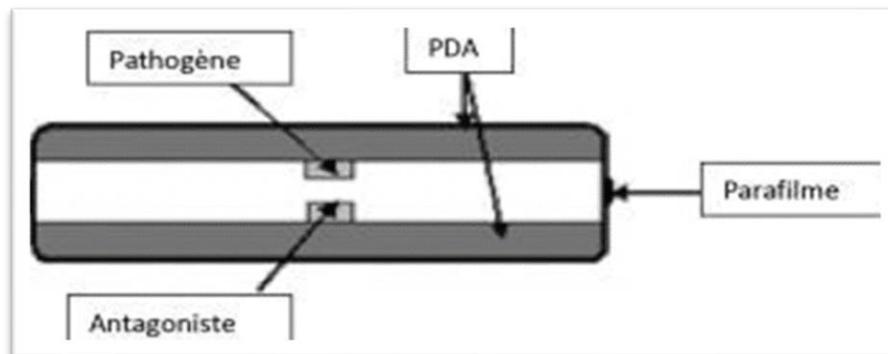


Figure 7: Confrontation indirecte (K.Hiber et al ,2004)

### **I.3.3. Effet de filtrat de culture 10% de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne des champignons pathogènes :**

Ce test est réalisé selon la méthode du Duby 2007 ,'il nécessite pour être appliquée des disques mycéliens prélevés des cultures âgés 7 jours de l'agent antagoniste étudié «*Trichoderma* » deux disques ont été ajoutés à 100 ml de milieu de culture PDB pour une incubation de 15 jours à température 25 C dans des flacons fermés.

Après cette période d'incubation, une filtration de solution a été réalisée par le papier wattman stérilisé, puis une autre fois par des microfiltres de 0,22  $\mu\text{m}$ , pour éliminer les spores. Des volumes de 10 ml de filtrat de culture de *Trichoderma* ont été

mélangés avec 90 ml de PDA stérile et tiède pour obtenir de concentration de 10% de filtrat de culture dans 100 ml de PDA.

Les disques mycéliens des agents pathogènes ont été déposés au centre de la boîte de pétri contenant PDA mélangé avec le filtrat de culture de *Trichoderma*, puis incubé pendant 7jours. Les témoins ont reçu le même volume de mélangé PDA tiède avec PDB sans filtrat de culture de *Trichoderma*.

# **Résultats et discussion**

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

Les ravageurs et les organismes phytopathogènes sont responsables de nombreux dégâts et maladies affectant les plantes ornementales, les cultures maraîchères et les arbres fruitiers et forestiers. L'utilisation des pesticides chimiques efficace contre les organismes a entraîné de multiples conséquences sur l'environnement. Il devient par conséquent, indispensable de contrôler biologiquement ces organismes.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation du pouvoir antagoniste de *Trichoderma sp* afin de mettre au point des méthodes de lutte intégrée, peu onéreuses, efficaces et aisément utilisables par les agriculteurs.

L'objectif mené tout au long de ce travail. Le premier : est de tenter de trouver un éventuel pouvoir fongicide *in vitro* de *Trichoderma sp* via deux méthodes de traitement (confrontation directe et confrontation indirecte) à l'égard d'une collection d'isolats de champignons phytopathogènes des cultures maraichères et cultures fruitières.

Les résultats qui vont être discutés suite aux résultats révélés par cette étude, concernent l'évaluation du pouvoir antifongique sur les champignons phytopathogènes; *Fusarium sp*, *Alternaria sp* et *Botryosphaeriadothidae* de *Trichodermasp*

### **1. Etude macroscopique et microscopique des isolats**

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

#### **1.1. Caractérisation macroscopique de l'agent antagoniste:**

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

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

### 1.2. 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.

### 1.3. Caractérisation macroscopique et microscopique des agents pathogènes

- Sur le milieu PDA, *Botryosphaeria* présente des colonies régulières d'un aspect cotonneux. Le mycélium est blanc au départ, quelques isolats ont viré vers le gris clair pour devenir gris très foncé à noirâtres vers un vert olive. Le mycélium est aérien avec présence de cordons, il devient très dense avec le temps et présente une croissance rapide. Sans utilisation de colorant l'observation microscopique montre que le mycélium jeune est hyalin, cloisonné, coloré d'un brun très foncé à noir.
- Sur le milieu PDA, *Alternaria* présente des colonies noires ont une texture épaisse poudreuse.
- Sur le milieu PDA, *Fusarium* il se développe rapidement et produit des colonies plates de texture laineuse cotonneuse

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

### 2.1 Cas des *Botryosphaeria*

Les résultats obtenus après un repiquage simultané de *Trichoderma* et *Botryosphaeria dothidae* ont montré ;

- L'espèce phytopathogène occupe une croissance diamétrale allant de 1 à 2,2 cm après six jours d'incubation ; ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne allant de 26,6 % à 66 %, selon l'espèce testée (**Figure 8**)
- Une croissance plus rapide de *Trichoderma* par rapport aux isolats testés (**Figure.8 .a et b**).

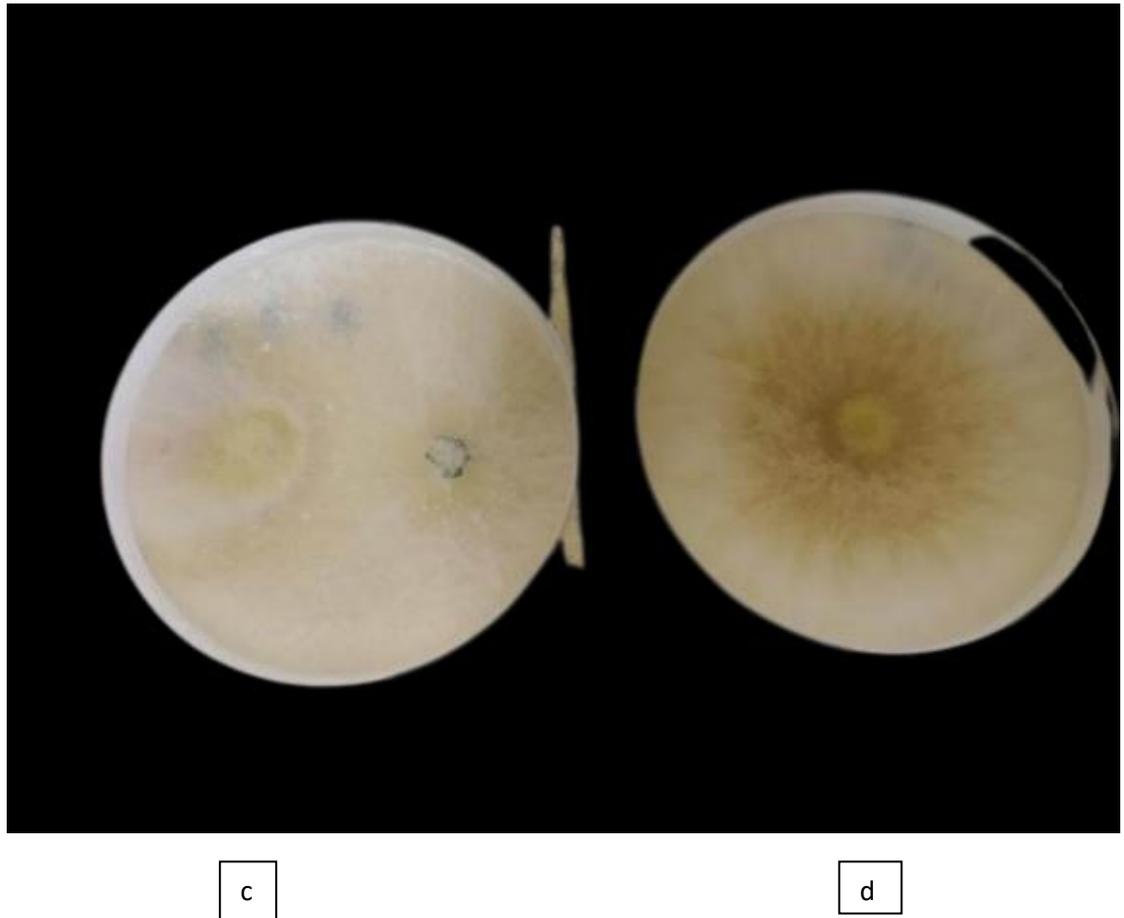


Figure 8: (a) La croissance de *Botryosphaeria dothidae* en présence de *Trichoderma* sp en confrontation direct , (b) témoin non traiter.

Un mycoparasitisme très net note (figure 9)

➤ **Cas de *Fusarium* :**

L'espèce phytopathogène a montré une croissance diamétrale allant de 3 à 3,5 cm après six jours d'incubation ; ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne allant de 46% à 53 %. (Figure10)



**Figure 10 :** (c) croissance de *Fusarium* en présence de *Trichoderma* confrontation direct ,(d) *Fusarium* témoin non traité

➤ **Cas d'*Alternaria* :**

L'espèce phytopathogène a montré une croissance diamétrale allant de 1,5 à 2,3 cm après six jours d'incubation ; ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne allant de 61% à 73 % (Figure 11).

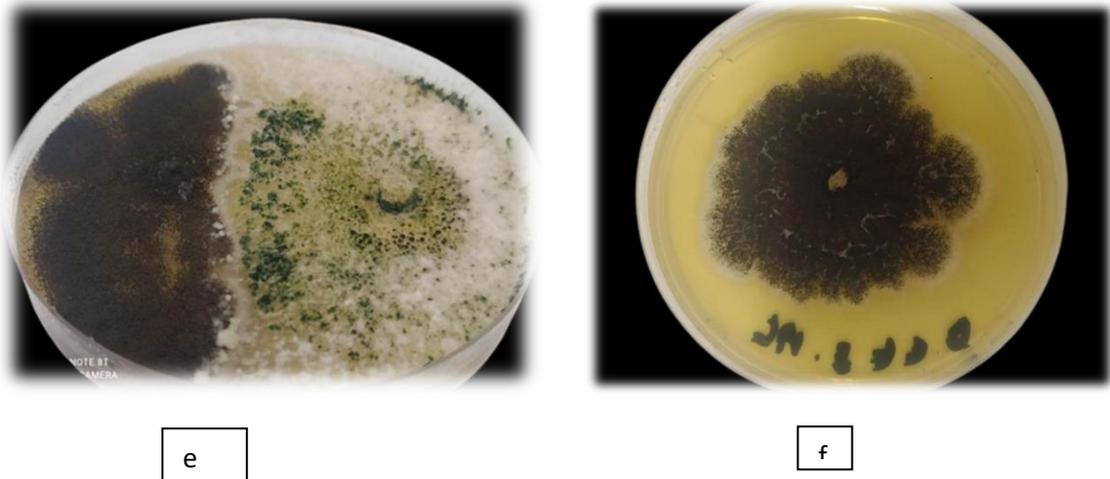


Figure 8:(e) La croissance de *Alternaria sp* en présence de *Trichoderma sp* en confrontation directe, (f) témoin non traité

Les résultats du pouvoir inhibiteur de *Trichoderma sp* par confrontation directe obtenus que *Alternaria* était la plus sensible à l'antagonisme de *Trichoderma* suivi par *Botryosphaeria* et *Fusarium* avec les valeurs suivants respectivement (73% , 66% et 53% ) après 7 jours d'inhibition à 25 C° (Figure 12).

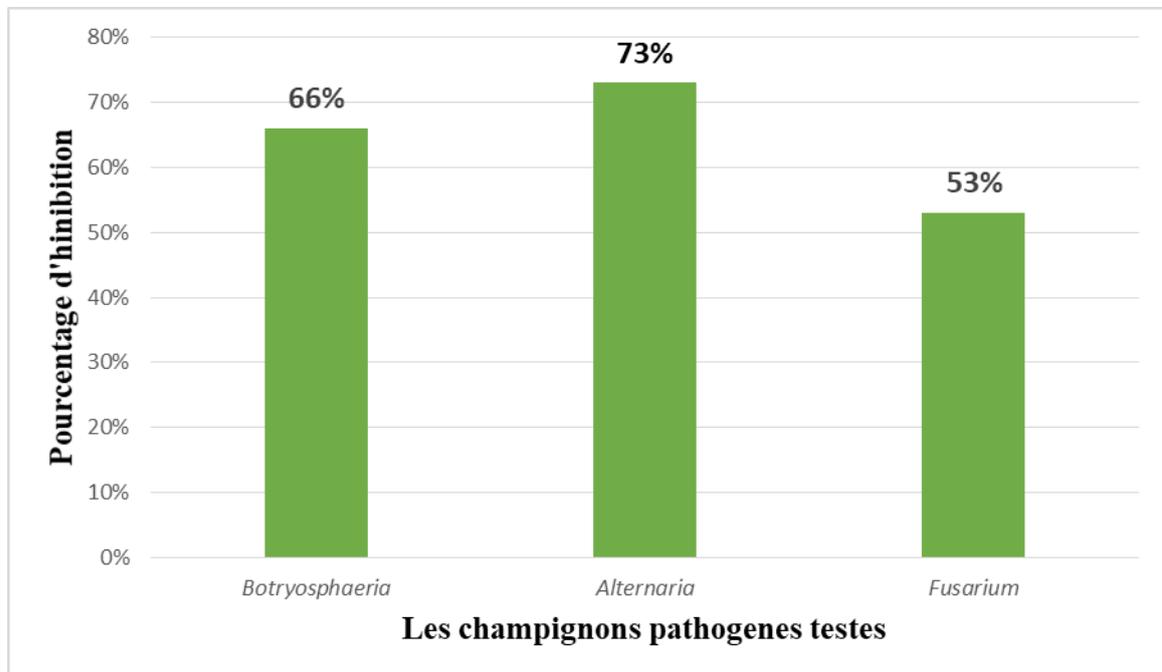


Figure 12 : L'effet inhibiteur de *Trichoderma sp* sur les champignons pathogène (confrontation direct) après 7 jours d'incubation.

### **3. Confrontation indirecte sur milieu de culture entre les pathogènes et l'antagoniste.**

#### **3.1 Cas des *Botryosphaeria***

Les résultats obtenus après un repiquage simultané de *Trichoderma* et *Botryosphaeria dothidea* ont montré ;

➤ L'espèce phytopathogène *Botryosphaeria* occupe une croissance diamétrale allant de 3,6cm à 4,1 cm après 7 jours d'incubation ; ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne allant de 21 % à 26 %, selon l'espèce testée (Figure 13)

#### **3.2 Cas de *Fusarium* :**

L'espèce phytopathogène *Fusarium* a montré une croissance diamétrale allant de 6,6cm à 6,8 cm après six jours d'incubation ; ce qui correspond à un taux d'inhibition de la croissance mycélienne allant de 20 % à 22%. (Figure 13)

#### **3.3 Cas d'*Alternaria* :**

L'agent pathogène *Alternaria* occupe une croissance diamétrale jusqu'à 6 cm ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne jusqu'à 16,66%.

D'après la figure 13 ; Les pourcentages d'inhibition de croissance des agents pathogènes obtenus indiquent que, *Botryosphaeria* est la souche la plus sensible, malgré le contact indirect à distance entre le pathogène et l'antagonisme *Trichoderma*. Alors qu'*Alternaria* est la moins sensible contrairement aux résultats obtenus dans le test direct. (Figure 13)

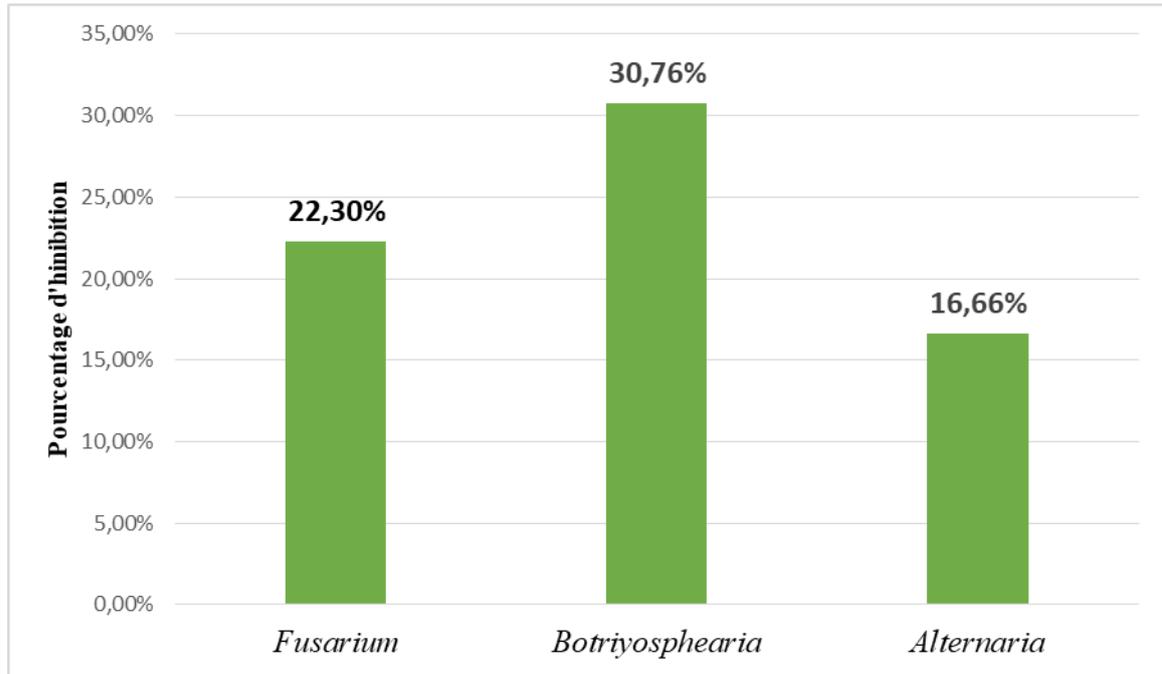


Figure 9: L'effet inhibiteur de *Trichodermasp* sur la croissance mycélienne des agents pathogènes testés (confrontation indirect) après 7 jours d'incubation

### 3.4 Effet de filtrat de culture de *Trichodermasp* sur la croissance mycélienne des champignons pathogènes :

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

Le filtrat de culture de l'agent antagoniste testé a montré un effet inhibiteur de la croissance mycélienne des pathogènes (**Figure 14**) et (**Figure15**).

Une faible croissance mycélienne de *Botryosphaeria dothidae* et *Fusarium sp* a été enregistré, tandis que nous avons noté une bonne croissance mycélienne de la troisième souche *Alternaria sp*.



Figure14 : l'effet de filtrat de culture *Trichoderma sp* sur la croissance de *Fusarium sp* ,



Figure 15 : L'effet de filtrat de culture *Trichoderma sp* sur la croissance d'*Alternaria sp*

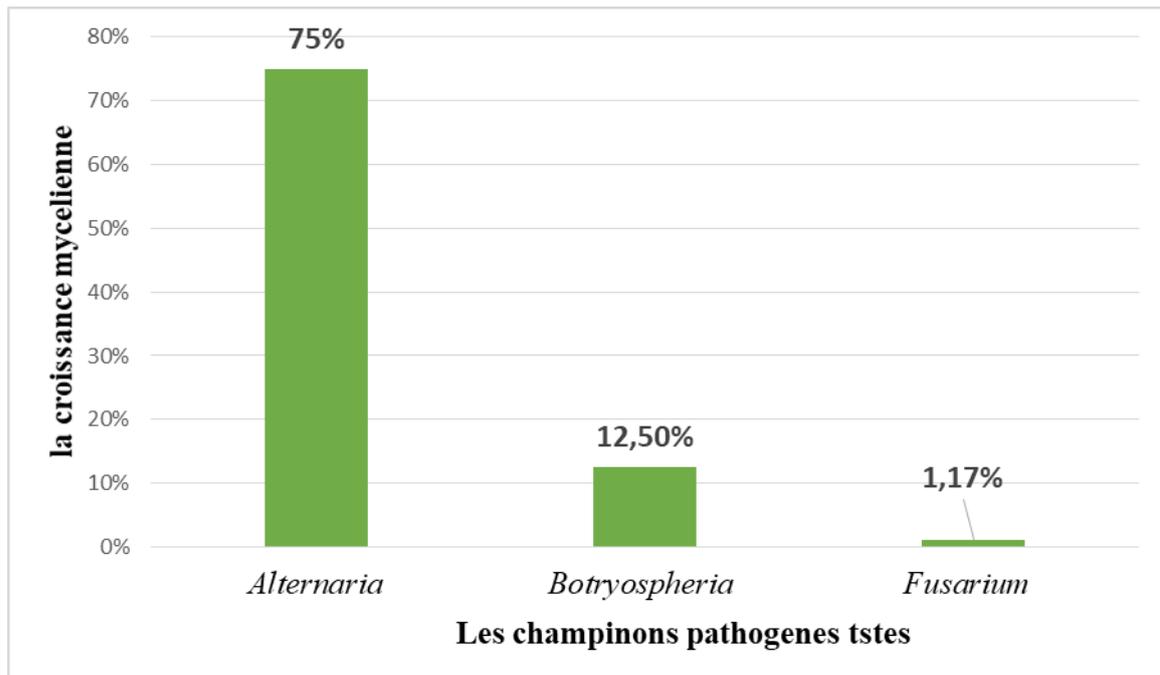


Figure 16 : Effet du filtrat de culture *Trichoderma sp* sur la croissance mycélienne des trois souches fongiques pathogènes

### Discussion

Différents pourcentages d'inhibition ont été obtenus dans chaque test appliqué, les résultats de cette étude dévoilent les potentialités de l'agent antagoniste testé, *Trichoderma sp* était capable d'inhiber la croissance mycélienne des trois souches pathogènes *Alternaria sp*, *Botryosphaeria dothidae* et *Fusarium sp*, nous avons enregistré des taux d'inhibition très intéressants qui diffèrent d'une souche à l'autre..

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

- La confrontation entre *Trichoderma sp* et *B. dothidea* après 48 heures et sans aucun contact entre les mycéliums antagoniste et pathogène, a montré une zone d'inhibition de la croissance du pathogène accompagné par le changement de la couleur du milieu. Le phénomène d'antagonisme observé, où *Trichoderma sp* n'a pas permis la croissance des colonies de *Botryosphaeria* confirme les phénomènes de compétition, d'antibiose et d'hyperparasitisme signalés pour *Trichoderma sp* (Hoitink et al., 2006).
- Le résultat enregistré indique que le champignon pathogène *Alternaria* est beaucoup plus sensible au pouvoir antagoniste de *Trichoderma* jusqu'à 73%. Le niveau d'inhibition élevé d'*Alternaria*, dans le test de confrontation direct, montre le mode d'action pratiqué par *Trichoderma* (le mycoparasitisme). C'est l'attaque directe d'un champignon sur un autre, un processus très complexe qui implique des événements séquentiels, y compris la reconnaissance, l'attaque et la pénétration et la mort ultérieure de l'hôte (T. Benítez. et al, 2004). L'activité antifongique la plus élevée des filtrats de culture de *Trichoderma sp* sur *Alternaria* jusqu'à 75% a été observée. Ces activités inhibitrices très remarquables sont expliquées par la capacité de cette espèce à produire de grandes quantités de métabolites secondaires tels que le trichothécène, trichodermine et harzianum (Klaiklay et al. 2019). Plusieurs scientifiques ont confirmé l'activité inhibitrice de ces métabolites contre les champignons phytopathogènes (Shentu et coll. 2014). Ces métabolites inhibent la croissance mycélienne et même la germination et la sporulation d'*Alternaria*.

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

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

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

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

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

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

Nous avons constaté une faible inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes, ce qui a été montré dans les travaux de Çığdem et al en 2003, des différentes souches de *Trichoderma harzianum* étaient efficaces contre les agents pathogènes des plantes comme le cas pour *Fusarium culmarum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* et *Drechslerasporokiniana*. Cependant, certains isolats de *Trichoderma* tels que *Trichoderma harzianum* T88 and *T. atroviride* T95 ont montré une capacité d'inhibition élevée et une suppression du *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *Piricola* qui cause l'appling rot (Kexiang et al., 2002). Cependant, nombreuses fonctions de ces métabolites secondaires ils ne sont pas identifiés encore puisque une seule espèce de *Trichoderma* spp est suffisante pour produire des métabolites secondaires très diversifiées et spécifiques. Beaucoup des recherches doivent être réalisées pour mieux

étudier les bonnes conditions écologiques favorables la production des métabolites secondaires (Keswani et *al*, 2014).

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

Par conséquent le mycorisme est un mode d'action le plus efficace pour inhiber le développement des souches *Alternaria* et *Botryosphearica* et *Fusarium* puisque leurs taux d'inhibition et entre 53,84 %, 73 %.

### Conclusion

Par le présent travail, nous avons essayé de contribuer à lever le voile sur les potentialités agro-phytosanitaires d'un microorganisme pouvant être utilisé localement comme biopesticides dans la phytoprotection. C'est là un champ de recherche-développement qui mériterait tout l'intérêt des scientifiques, des pouvoirs publics et des acteurs économiques d'autant plus qu'un tel renouveau d'intérêt répond parfaitement aux grandes préoccupations écologiques et environnementales du monde d'aujourd'hui.

Ainsi, cette étude a montré que les résultats relatifs aux traitements biologiques par le biais d'une souche fongique *Trichoderma* sur quelques phytopathogènes, qui menacent les cultures maraichères et les cultures fruitières.

L'étude in vitro du pouvoir antifongique de *Trichoderma sp* sur trois isolats testés à savoir *Fusarium sp*, *Alternaria sp* et *Botryosphaeria dothidae* s'est révélée intéressante.

En effet, la croissance mycélienne des champignons testée a été inhibée aussi bien par confrontation directe que par confrontation indirecte, montrant la sensibilité des pathogène à l'égard des différents mécanismes déployés par l'antagoniste.

Les résultats révèlent une sensibilité accrue de *Altetnaria sp* à l'égard de *Trichoderma sp*, en revanche, *.Fusarium sp* ne se comporte pas de la même manière et affiche une certaine résistance vis-à-vis de cette souche. Un pourcentage d'inhibition considérable qui varie de 53% à 73% selon les espèces pathogènes testées, et ce par rapport au témoin. Alors que les résultats de la confrontation indirecte montrent des pourcentages d'inhibition varient de 16% à 30%.

La relance de la croissance mycélienne caractérisée par un faible pourcentage d'inhibition devrait être étudiée afin de confirmer ces résultats.

Il est à rappeler que cette étude de l'effet fongicide constitue une première étape dans la recherche de molécules biocides d'origine microbienne, elle mérite d'être poursuivie par des études in planta pour confirmer leur activité.

La lutte biologique contre ces phytopathogènes a été mise en évidence aussi par d'autres essais d'antagonismes *In Vitro* (évaluation de l'effet inhibiteur des filtrats

issu de *Trichoderma*). Par ailleurs, les tests de lutte menée avec les métabolites secondaires du même antagoniste, ont révélé des taux d'inhibition de l'ordre 12 % en moyenne.

De ce que nous avons pu avancer comme résultats, il en ressort un certain contraste d'efficacité de cette souche fongique par rapport au modèle biologique étudié à savoir la gamme d'isolats fongiques pathogènes.

Sachant que l'Algérie possède un patrimoine végétal très riche et diversifié, cela indique une très riche diversité microbienne, l'implication des microorganismes dans la lutte éco-chimique comme facteurs de protection des plantes, pourrait s'insérer dans le cadre d'une stratégie alternative et / ou complémentaire dans la lutte contre les ravageurs des cultures en intégrant les autres méthodes de lutte et ceci dans le contexte d'une agriculture durable.

Il reste clair que les méthodes utilisées pour le contrôle des espèces phytopathogènes, ne permettent pas de résoudre définitivement le problème de ces maladies. Il est donc impératif de poursuivre la recherche en vue d'établir la meilleure combinaison des traitements susceptible de conférer une protection maximale de cultures contre les maladies cryptogamiques.

Il serait ainsi envisageable de :

- Tester l'effet in vivo cette souche sur la croissance des phytopathogènes
- Estimer la cinétique d'accumulation des principes bioactifs afin d'augmenter leur efficacité.
- Prévoir des formulations adéquates
- Cibler des microorganismes à activité insecticide et fongic

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE :

- Abd-Elsalam, KA, Yassin, MA, Moslem, MA, Bahkali, AH, de Wit, PJ, McKenzie, EH, ... & Hyde, KD (2010). Les collections de cultures, les nouveaux herbiers des pathogènes fongiques. *Diversité fongique* , 45 , 21-32.
- ADB, Guzzo, SD, Lucon, CMM et Harakava, R. (2011). Stimulation de la croissance et induction de la résistance du plant de tomate contre *Xanthomonase vesicatoria* et *Alternaria solani* par *Trichoderma* spp. *Protection des cultures* , 30 (11), 1492-1500.
- Afzal, S. A. I. M. A., Tariq, S., Sultana, V., Ara, J., & Ehteshamul-Haque, S. (2013). Managing the root diseases of okra with endo-root plant growth promoting *Pseudomonas* and *Trichoderma viride* associated with healthy okra roots. *Pak. J. Bot*, 45(4), 1455-1460.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier.
- Akrami, M., & Yousefi, Z. (2015, janvier). Lutte biologique contre la fusariose de la tomate (*Solanum lycopersicum*) par *Trichoderma* spp. comme champignons antagonistes. Dans *Biological Forum* (vol. 7, n° 1, p. 887). Tendances de la recherche.
- Azarmi, R., Hajieghrari, B., & Giglou, A. (2011). Effet des isolats de *Trichoderma* sur la réponse de croissance des semis de tomate et l'absorption des nutriments. *Revue africaine de biotechnologie* , 10 (31), 5850-5855.
- Baltazar, M., Correia, S., Guinan, KJ, Sujeeth, N., Bragança, R. et Gonçalves, B. (2021). Progrès récents dans les effets moléculaires des biostimulants chez les plantes : un aperçu. *Biomolécules* , 11 (8), 1096.
- Bardin, M., & Pugliese, M. (2020). Agents de lutte biologique contre les maladies. *Gestion intégrée des ravageurs et des maladies dans les cultures sous serre* , 385-407.
- Barman, S., Gorai, PS et Mandal, Caroline du Nord (2021). *Trichoderma* spp.— Application et perspectives d'avenir dans l'industrie agricole. Dans *Recent Advancement in Microbial Biotechnology* (pp. 49-70). Presse académique.
- Benhamou, N., & Picard, K. (1999). La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*, 80(3), 137-168.
- Benítez, T., Rincón, AM, Limón, MC et Codon, AC (2004). Mécanismes de biocontrôle des souches de *Trichoderma*. *Microbiologie internationale* , 7 (4), 249-260.
- Bongiorno, ANGELA, Schulze, A., Merloni, A., Zamorani, G., Ilbert, O., La Franca, F., ... & Scoville, N. (2016). Fonction de masse de la galaxie hôte AGN dans COSMOS-La rétroaction AGN est-elle responsable de l'extinction de masse des galaxies ? *Astronomie & Astrophysique* , 588 , A78.

BRIGITTE.. COURNUT. (1984). LE GENRE TRICHODERMA, HYPHOMYCETES (Doctoral dissertation, Éditeur inconnu).

Cloud, J. E., Yoder, T. S., Harvey, N. K., Snow, K., & Yang, Y. (2013). A simple and generic approach for synthesizing colloidal metal and metal oxide nanocrystals. *Nanoscale*, 5(16), 7368-7378.

Dabiré, TG, Bonzi, S., Somda, I., &Legrève, A. (2016). Evaluation du potentiel de Dabiré, TG, Bonzi, S., Somda, I., &Legrève, A. (2016). Evaluation du potentiel de *Trichoderma harzianum* comme promoteur de croissance des plantes et agent de lutte biologique contre la fonte des semis par *Fusarium* dans l'oignon au Burkina Faso. *Journal asiatique de pathologie végétale* .

Dou, K., Gao, J., Zhang, C., Yang, H., Jiang, X., Li, J., ... & Chen, J. (2019). Biodiversité des trichodermes dans les principaux systèmes écologiques de Chine. *Tourillon de microbiologie* , 57 , 668-675.

Dubey, S.C., Suresh, M., Singh, B. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control*, 40(1): 118–127.

Elad, Y., & Stewart, A. (2007). Contrôle microbien de *Botrytis* spp. *Botrytis* : biologie, pathologie et contrôle , 223-241.

Ellis, EC, Kaplan, JO, Fuller, DQ, Vavrus, S., Klein Goldewijk, K. et Verburg, PH (2013). Planète usée : Une histoire globale. Actes de l'Académie nationale des sciences , 110 (20), 7978-7985.

En ligne Narayanasamy, P. (2013). Gestion biologique des maladies des cultures (Vol. 673). Dordrecht, Pays-Bas :: Springer.

En ligne Poveda, J. (2021). Lutte biologique contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* et *Ascochyta blight* infectant l'indication géographique protégée Fuentesauco-Pois chiche par l'espèce *Trichoderma*. *Journal européen de pathologie végétale* , 160 (4), 825-840. Fontenelle,

Gueye, N., Ndiaye, M. A. F., Sarr, B., Sy, D. S., & Diop, T. A. (2016). Influence in vitro de divers facteurs abiotiques (température, pH, salinité) sur la croissance mycélienne de trois souches locales de *Trichoderma* sp. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(2), 769-778.

Harman, GE, Howell, CR, Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Espèces de *Trichoderma* symbiotes végétaux opportunistes et avirulents. *Nature reviews microbiology* , 2 (1), 43-56.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Effets bénéfiques pour les plantes de *Trichoderma* et de ses gènes. *Microbiologie* , 158 (1), 17-25.

- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, BK, Singh, SP et Singh, HB (2014). Démêler les applications efficaces des métabolites secondaires de divers *Trichodermaspp.* *Microbiologie appliquée et biotechnologie* , 98 , 533-544.
- Klaiklay, S., Rukachaisirikul, V., Saithong, S., Phongpaichit, S., & Sakayaroj, J. (2019). Trichothecenes from a soil-derived *Trichoderma brevicompactum*. *Journal of natural products*, 82(4), 687-693.
- Kubicek, CP, Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., & Szakacs, G. (2003). Diversité génétique et métabolique de *Trichoderma* : une étude de cas sur des isolats d'Asie du Sud-Est. *Génétique et biologie fongiques* , 38 (3), 310-319.
- Lago, R., Gomez, R., Otero, M., Lago, F., Gallego, R., Dieguez, C., ... & Gualillo, O. (2008). A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage*, 16(9), 1101-1109.
- LAMRANI, N., ELABDELLAOUI, F., TOUHAMI, A. O., BENKIRANE, R., & DOUIRA, A. (2013). Etude de la mycoflore des grains de trois variétés de riz et effet d'*Alternaria padwickii* (Ganguly) MB Ellis sur les grains pré-germés. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat*, (35), 1-7.
- Landreau, C. (2001). Polyhétéropolyènes soufrés et azotés en Synthèse Hétérocyclique (Doctoral dissertation, Nantes).
- Li, X., Zhang, X., Wang, X., Yang, X. et Cui, Z. (2019). Phytoremédiation assistée par bioaugmentation des sols co-contaminés par le plomb et la salinité par *Suaeda salsa* et *Trichoderma asperellum*. *Chimiosphère* , 224 , 716-725.
- Li, Y., He, N., Hou, J., Xu, L., Liu, C., Zhang, J., ... & Wu, X. (2018). Facteurs influençant la teneur en chlorophylle des feuilles dans les forêts naturelles à l'échelle du biome. *Frontières en écologie et évolution* , 6 , 64.
- Maniscalco, DP, & Dorta, B. (2015). Diversité de l'hongo *Trichodermaspp.* en plantations de maïs du Venezuela. *Interscience* , 40 (1), 23-31.
- Martinez-Medina, A., Easter, JA, Perez-Alfocea, F., Albacete, A., & Roldan, A. (2010). *Trichoderma harzianum* et *Glomus intraradices* modifient la perturbation hormonale induite par l'infection par *Fusarium oxysporum* chez les plants de melon. *Phytopathologie* , 100 (7), 682-688.
- Mohamed-Benkada, M., Montagu, M., Biard, JF, Mondeguer, F., Verite, P., Dalgalarondo, M., ... & Pouchus, YF (2006). Nouveaux peptaibols courts d'une souche marine de *Trichoderma*. *Communications rapides en spectrométrie de masse : une revue internationale consacrée à la diffusion rapide de la recherche à la minute près en spectrométrie de masse* , 20 (8), 1176-1180.

- Moutassem, D., Belabid, L., & Bellik, Y. (2020). Efficacité des métabolites secondaires produits par *Trichoderma* spp. dans le contrôle biologique de la fusariose du pois chiche. *Journal of Crop Protection*, 9 (2), 217-231.
- Pal, KK et Gardener, BM (2006). Lutte biologique contre les agents pathogènes des plantes.
- Potter, B., Stevenson-Hobbs, A., Cailleux, M., & Roquebert, M. F. (1996). Les champignons. (No Title).
- Ramírez-Valdespino, CA, & Orrantia-Borunda, E. (2021). Trichodermie et nanotechnologie dans l'agriculture durable : un bilan. *Frontières en biologie fongique*, 2, 764675.
- Rathore, HS, Mittal, S., & Nollet, LM (2015). Pesticides biochimiques : Applications de phéromones dans la protection des cultures. Dans *Biopesticides Handbook* (pp. 172-199). Presse CRC.
- Reino, JL, Guerrero, RF, Hernández-Galán, R., & Collado, IG (2008). Métabolites secondaires d'espèces de l'agent de lutte biologique *Trichoderma*. *Revue de phytochimie*, 7, 89-123.
- Rettinassababady, C., & Jeyalakshmi, C. (2014). Bio-fongicides : La meilleure alternative pour une sécurité alimentaire et un écosystème durables. *Diversité microbienne et biotechnologie dans la sécurité alimentaire*, 401-411.
- Rettinassababady, C., & Jeyalakshmi, C. (2014). Bio-fongicides : La meilleure alternative pour une sécurité alimentaire et un écosystème durables. *Diversité microbienne et biotechnologie dans la sécurité alimentaire*, 401-411.
- Romero-Arenas, O., Huerta Lara, M., Damián Huato, M. A., Domínguez Hernández, F., & Arellano Victoria, D. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151.
- Rubio-Martinez, M., Avci-Camur, C., Thornton, AW, Imaz, I., Maspoch, D., & Hill, MR (2017). Nouvelles voies synthétiques vers la production de MOF à grande échelle. *Revue de la société chimique*, 46 (11), 3453-3480.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Woo, SL, Vinale, F., Marra, R., ... & Lorito, M. (2015). Rôles et effets multiples d'une nouvelle hydrophobine de *Trichoderma*. *Interactions moléculaires plantes-microbes*, 28 (2), 167-179.
- Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Andurand, D., Essghaier, B., Boudabous, A., & Nicot, P. (2008). Lutte biologique contre *Botrytis cinerea* sur plaies souches par des bactéries modérément halophiles. *Journal mondial de microbiologie et de biotechnologie*, 24, 2871-2877.

- Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Rouaïssi, M., Hajlaoui, M. R., Rubio, M. Á., Monte, E., ... & Hermosa, M. R. (2009). Biodiversity of Trichoderma strains in Tunisia. *Canadian journal of microbiology*, 55(2), 154-162.
- Shah, PA, & Pell, JK (2003). Champignons entomopathogènes comme agents de lutte biologique. *Microbiologie appliquée et biotechnologie* , 61 (5), 413-423.
- Sharma, PK et Goyalwal, R. (2017). Trichoderma : un champignon puissant comme agent de lutte biologique. *Durabilité agro-environnementale : volume 1 : gestion de la santé des cultures* , 113-125.
- Shentu, X., Zhan, X., Ma, Z., Yu, X. et Zhang, C. (2014). Activité antifongique des métabolites du champignon endophyte *Trichoderma brevicompactum* de l'ail. *Journal brésilien de microbiologie* , 45 , 248-254.
- Thambugala, KM, Daranagama, DA, Phillips, AJ, Kannangara, SD et Promputtha, I. (2020). Champignons contre champignons dans le biocontrôle : un aperçu des antagonistes fongiques appliqués contre les pathogènes fongiques des plantes. *Frontières en microbiologie cellulaire et infectieuse* , 10 , 604923.
- Thangavelu, R., Palaniswami, A., & Velazhahan, R. (2004). Production de masse de *Trichoderma harzianum* pour la gestion de la fusariose du bananier. *Agriculture, écosystèmes & environnement* , 103 (1), 259-263.
- Triolet, M., Guillemain, JP, André, O., & Steinberg, C. (2020). Bioherbicides à base de champignons pour le contrôle des mauvaises herbes : un mythe ou une réalité ?. *Recherche sur les mauvaises herbes* , 60 (1), 60-77.
- Vierling, KK, Standage, M., & Treasure, DC (2007). Prédire les attitudes et l'activité physique dans un échantillon de jeunes appartenant à une minorité «à risque» : un test de la théorie de l'autodétermination. *Psychologie du sport et de l'exercice* , 8 (5), 795-817.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, EL, Ruocco, M., ... & Lorito, M. (2013). Acide harzianique : un nouveau sidérophore de *Trichoderma harzianum*. *Lettres de microbiologie FEMS* , 347 (2), 123-129.
- Vizcaino, J.A. ; Sanz, L. ; Cardoza, R.E. ; Monte, E. & Gutierrez, S. ., 2005 Detection of putative peptide synthetase genes in Trichoderma species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. *FEMS Microb.*
- Yariv, E. (2016). Auto-diffusion induite par les parois de colloïdes isotropes actifs. *Liquides d'examen physique* , 1 (3), 032101.
- Narayan, S., Lata, K. P., & Kotasthane, A. S. (2006). Genetic relatedness among Trichoderma isolates inhibiting a pathogenic fungi *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology*, 5(8), 580-584.
- de Castro, G. L., Berthod, C., Piriou, A., Giannini, E., & Fischer, Ø. (2010). Levy de Castro et al. Reply. *Physical Review Letters*, 105(9), 099702.

Eziashi, E. I., Uma, N. U., Adekunle, A. A., & Airede, C. E. (2006). Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *African Journal of Biotechnology*, 5(9).

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.

Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1), 4-10.

Lago, R., Gomez, R., Otero, M., Lago, F., Gallego, R., Dieguez, C., ... & Gualillo, O. (2008). A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage*, 16(9), 1101-1109.

Tronsmo, A., & Hjeljord, L. G. (1998). Biological control with *Trichoderma* species. *Plant-microbe interaction and biological control*. Marcel Dekker Inc., New York, 111-126.

Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and soil*, 235, 235-242.

Elad, Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 719-732.

# ANNEXES

### **1. milieu de culture PDA :**

- 20g d'agar-agar dans 300 ml d'eau distillée, homogénéiser la solution.
- 200g de pomme de terre, éplucher la pomme de terre, 300 ml d'eau distillée, Bouillir à 100° C
- Auto - claver le mélange à la température de 125° C, la pression de 1,4 bar pendant 15 minutes.
- Sous hotte à flux laminaire, couler la solution obtenue sur des boîtes de Pétri.
- Laisser sécher pendant 24 à 48 heures.

### **2. Milieu de culture PDB :**

Pour préparer l'infusion de pommes de terre, faites bouillir 200 g de pommes de terre en tranches non épluchées dans 1 litre d'eau distillée pendant 30 min. Filtrer à travers une étamine, en économisant l'effluent, qui est une infusion de pommes de terre (ou utiliser une forme commerciale déshydratée). Mélanger les autres ingrédients (ledextrose) et faire bouillir pour dissoudre. Autoclave 15 min à 121°C. Répartir des portions de 20 à 25 ml dans des boîtes de Pétri stériles de 15 × 100 mm.