

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPATREMENT DE BIOTECHNOLOGIE

Thème

Effet antagoniste « *in vitro* » de champignons endophytes vis-à-vis des agents de flétrissement vasculaire.

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de master 2

Option : Biologie des interactions plantes/ microorganismes

Présenté par :

ZIANE SARAH

Devant le jury composé de :

Krimi Z.	Professeur	U.S.D.B	Présidente
MOHAMED MAHMOUD F.	M.C.B	U.S.D.B	Promotrice
AIT SAADI N.	M.A.A	U.S.D.B	Examinatrice
Djellout H.	Doctorante		Invitée d'honneur

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016/2017

REMERCIEMENTS

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

Au terme de ce travail, j'adresse ma gratitude et je remercie énormément **M^{me}. MOHAMED MAHMOUD F.** qui a dirigé ce travail, pour son encadrement, son aide précieuse, et ses conseils qui ont été essentiels pour l'aboutissement de ce modeste travail.

Je tiens à remercier Professeur **Krimi Z.** de m'avoir accueilli au sein de l'équipe de laboratoire de la mycologie et de m'avoir honoré en acceptant d'être présidente de jury.

J'exprime mes vifs remerciements à **M^{me} AIT SAADI N.** de m'avoir accordé son temps pour examiner et enrichir ce travail.

Un grand merci aussi à **M^{me} DJELOUT H.** invité de l'honneur

Je remercie très vivement **M^{me} SALMA** ingénieure de laboratoire de Phytopathologie pour son aide et encouragements

Enfin, je dis merci pour tous ceux que de près ou de loin, dont l'assistance ou les conseils m'ont permis de mener à bien ce travail.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à :

Ma princesse maman **NADHIRA**: merci pour ton amour, tes encouragements et ton soutien inconditionnel durant toute ma vie, je t'aime énormément maman.

Mon cher papa **ABDELKADER**, c'est grâce a toi que je suis devenu ce que je suis, merci beaucoup pour ton amour, tes encouragements, tes conseils et surtout pour tes sacrifices, je t'aime énormément mon très cher papa

A mes chers frères **MOHAMED ET YACINE**

Tout amour et appréciation pour mon grand-père **MOUSSA** et ma grande-mère **DJAOUIDA** je vous aime beaucoup Que Allah vous garde et vous protège

A mes tantes **FELLA, NADIA** et **NASSIMA** et leurs maris **ILYES, AZIOUEZ** et **MOUNIR**

A mes oncles **NESREDDINE** et **REDOUANE** et sa femme **SAMIA**

A toutes la famille **ZIANE** et **OTHMANI**

A mes amies **AMEL, IMENE, OUARDA, ZHOR** et **ASMA**

A tous mes amis de spécialités Biologie des interactions plantes microorganismes de la promotion 2016-2017

A tous ceux qui ont contribué de pré ou de loin a la réalisation de ce travail

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Différents types d'antagonismes menant à la lutte biologique contre des champignons phytopathogènes	5
Tableau 2 : Quelques exemples de champignons endophytes et leurs plantes hôtes.....	14
Tableau 3 : les Aspergillus producteurs des mycotoxines	23
Tableau 4 : Origine des souches pathogènes testées.....	28
Tableau 5 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne des agents pathogènes étudiés	37
Tableau 6: Zones d'inhibition exercées par les endophytes contre les agents pathogènes testés.....	41
Tableau 7: Effet de l'HCN sur la croissance des champignons pathogènes	44
Tableau 8: Croissance de F.o.l sur le milieu PDA en présence de filtrats de culture des champignons endophytes.....	47
Tableau 9 : taux de croissance de F.o.l sur un milieu PDA a base des métabolites secondaires des champignons endophytes.....	48

Liste des Abréviations

- C : celsius
- F.o.a : *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*.
- F.o.l : *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*
- f.sp : Forme spéciale
- PDA : Potato Dextrose Agar
- mm : millimètre
- cm : centimètre
- % : pourcentage
- ° : degré
- R : rayon
- PGPR : Plant Growth Promotion Rhizobacteria
- PGPF : Plant Growth Promotion Fongique
- HCN : Acide Cyanhydrique

Listes des figures :

Figure 1 : Mycoparasitisme de trios <i>Trichoderma strains</i> avec <i>Sclerotinia minor</i> (Sm) et <i>Sclerotini</i>	7
Figure 2 : Hyphes et conidies de <i>Beauveria bassiana</i> sous microscope	15
Figure3 : Observation microscopique de <i>Clonostachys rosea</i>	16
Figure 4 : Aspect morphologique des conidies, des conidiophores et des phialides de <i>Trichoderma</i> spp.....	18
Figure 5 : Quelques espèces du genre <i>Aspergillus</i>	22
Figure 6 :symptômes de Bayoud sur palmier dattier	26
Figure 7 : symptômes de fusariose sur tomate.....	27
Figure 8 : Souches pathogènes utilisées.....	29
Figure 9 : Champignons endophytes utilisée.....	29
Figure 10 : Présentation de la confrontation directe entre l'antagoniste et le pathogène	31
Figure 11 : la préparation de test d'HCN.....	32
Figure 12 : test de production des métabolites secondaires.....	33
Figure 13 : Effet d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i> , par confrontation directe, en présence des champignons endophytes.....	35
Figure 14 : Effet d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albidinis</i> , par confrontation directe, en présence des champignons endophytes	36
Figure 15 : Variation de pourcentage de taux d'inhibition de la croissance des agents pathogène testés.....	37

Figure 16 : Zone d'inhibition exercée par les champignons endophytes à l'encontre de F.o.a.....	39
Figure 17 : Zone d'inhibition exercée par les champignons endophytes à l'encontre de F.o.l.....	40
Figure 18 : Variation des zones d'inhibition exercées par les endophytes contre les agents pathogènes testés.....	41
Figure 19 : Production d'HCN par les champignons endophytes testés.....	42
Figure 20 : Effet de l'HCN sur la croissance des champignons pathogènes	43
Figure 21 : Effet de l'HCN sur la croissance des champignons pathogènes	44
Figure 22 : Croissance des F.o.a sur le milieu PDA en présence de filtrats de culture des champignons endophytes.....	45
Figure 23 : Croissance de F.o.l sur le milieu PDA en présence de filtrats de culture des champignons endophytes.....	46
Figure 24 : Diamètre de la croissance de F.o.a sur le milieu PDA en présence de filtrats de culture des champignons endophytes.....	47
Figure 25 : Diamètre de la croissance de F.o.l sur le milieu PDA à base des métabolites secondaires des champignons endophyte suivre le titre comme le précédant.....	48

Résumé

Effet antagoniste *in vitro* de champignons endophytes vis-à-vis des agents de flétrissement vasculaire.

La mise en évidence des capacités antagonistes *in vitro* des champignons endophytes racinaires isolés à partir de palmier dattier contre deux champignons pathogènes d'origine tellurique *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* a été étudié.

Les essais de confrontation directe, ont montré que les antagonistes testés inhibent d'une façon significative la croissance mycélienne des pathogènes, avec des taux d'inhibitions variant de 38,40% à 66,15 %. Les souches inhibitrices de *Beauveria bassiana* et de *Clonostachys* sp. ont enregistré l'apparition des zones d'inhibitions variant de 1,96 à 6 mm selon l'antagoniste et le pathogène testés. Les espèces de *Trichoderma* sp. ont envahi les colonies des pathogènes et sporulé même sur celle-ci, révélant leurs pouvoirs mycoparasitaires. Ces effets antagonistes ont été également confirmés par confrontation indirecte à cause de la production d'HCN qui est observée en présence de *Beauveria bassiana* et *Aspergillus terreus* et à travers l'utilisation des filtrats de cultures des quatre endophytes testés. L'action de ces tests a été évaluée par la diminution de la croissance mycélienne des agents pathogènes par rapport à leurs témoins respectifs.

Les résultats des trois tests réalisés *in vitro* ont montré que les quatre champignons endophytes testés peuvent être utilisés dans la lutte biologique.

Mots clés :

Champignons endophytes, antagonisme, HCN, antibiose, mycoparasitisme.

Abstract

Effect antagonist *in vitro* of endophytic fung on agents of vascular wilt.

The identification of the antagonistic capacities *in vitro* of root endophytic fungi isolated from date palm against two pathogenic fungi which are *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

The tests have shown that our antagonists inhibit significantly the mycelial growth of pathogens, with rates of inhibition ranging from 38,40% to 66,15%. Among inhibitors isolates *Beauveria bassiana* and *Clonostachys sp.* have recorded the appearance of zone of inhibition ranging from 1,96 to 6 mm depending on the antagonist and the pathogen. *Trichoderma sp.* invaded the colonies of pathogens and sporulate well on it, revealing their power mycoparasitaire. These antagonistic effects were also confirmed by indirect confrontation due to the production of HCN which is observed in the presence of *Beauveria bassiana* and *Aspergillus terreus* and through the use of the culture filtrates of the four endophytes tested. The action of these tests was evaluated by the reduction of the mycelial growth of the pathogens with respect to their respective controls.

The results of the three tests carried out *in vitro* showed that the four endophytic fungi tested can be used in biological control.

Keywords:

Endophytic fungi, antagonism, HCN, antibiosis, Mycoparasitism

الملخص

تأثير عامل التثبيط في المختبر للفطريات الداخلية على الفطريات المتسببة في ذبول الأوعية

التعرف على القدرات العدائية في المختبر للفطريات الداخلية التي تم استخلاصها من جذور النخيل

ضد اثنين من الفطريات المسببة للأمراض الممرضة ذات المصدر الترابي و هي

Fusarium oxysporum f.sp. albedinis و *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

وأظهرت اختبارات المواجهة المباشرة أن الفطريات الداخلية تمنع بشكل كبير نمو ميسيليا للفطريات المتسببة للأمراض، مع مستويات تثبيط متفاوتة من 38.40% إلى 66.15%

السلالات المثبطة سجلت ظهور مناطق من الموانع تختلف من 1,96 الى 6 مم اعتمادا على الخصم و الممرض المدروس و هي

Beauveria bassiana, Clonostachys sp

لأنواع من تريكوديرما قد غزت مستعمرات الفطريات الممرضة و الكشف عن قوة ميكوباراسيتيك بهم

و قد تاكدت هذه الآثار العدائية ايضا بمواجهة غير مباشرة و ذلك بسبب انتاج سيانيد الهيدروجين الذي

لوحظ في وجود

Beauveria bassiana, Aspergillus terreus

و من خلال استخدام الفلترات من الفطريات الداخلية الأربعة التي تم اختبارها. تم تقييم عمل هذه الاختبارات عن طريق الحد من نمو ميسيليا من مسببات الأمراض فيما يتعلق بطوابط كل منها

وأظهرت نتائج الاختبارات الثلاثة التجريبية في المختبر أن الفطريات الداخلية الأربعة يمكن استخدامها في مكافحة البيولوجية

الكلمات المفتاحية

النشاط الضد حيوي، الفطريات الداخلية، الفطريات الممرضة، سيانيد الهيدروجين

Sommaire

Résumé

Abstract

الملخص

Remerciement

Dédicaces

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Sommaire

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur les interactions plantes-microorganismes.....3

1.1. Les types d'interactions plantes-pathogènes.....3

2. Modes d'action des agents antagonistes 4

3. La lutte biologique9

4. Champignons endophytes11

5. La fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud).....25

6. La fusariose vasculaire de la tomate26

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel :

1 : Matériel fongique.....28

2. Méthodes :

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Test d'antagonisme « *in vitro* » et mode d'action de *Trichoderma* sp, *Aspergillus terreus*, *Clonostachys* sp. et *Beauveria bassiana* vis-à-vis des *Fusarium* phytopathogènes34

2. Zone d'inhibition38

3. Confrontation indirect : Effet de l'HCN sur la croissance des agents pathogènes étudiés.....42

4 Effets de filtrats de culture (métabolites secondaires) des champignons endophytes sur la croissance des agents pathogènes44

Conclusion.....56

Référence Bibliographiques

Annexes

Table des Matières

Résumé

Abstract

الملخص

Remerciement

Dédicaces

Liste des Tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Sommaire

Introduction1

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur les interactions plantes-microorganismes.....	3
1.1. Les types d'interactions plantes-pathogènes.....	3
1.1.1. Commensalisme	3
1.1.2. Mutualisme.....	4
1.1.3. Hyper parasitisme.....	4
1.1.4 Antagonisme.....	4
2. Modes d'action des agents antagonistes	4
2.1. Antagonisme direct	5
2.1.1. Compétition pour la nutrition et l'espace	5
2.1.2. Mycoparasitisme	6
2.1.3 Antibiose	7

2.2. Antagonisme indirect	8
2.2.1. Induction de la résistance chez l'hôte.....	8
2.2.2. Production d'HCN	9
3. La lutte biologique	9
3.1. Les PGPR	10
3.2. PGPF ou champignons bénéfiques	10
4. Champignons endophytes	11
4.1. Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs :	12
4.2. Rôles des champignons endophytes	12
4.2.1. Protection contre les microorganismes pathogènes.....	12
4.3. Biodiversités des champignons endophytes :.....	14
4.3.1. <i>Beauveria bassiana</i>	14
4.3.1.1. Les métabolites produits par <i>Beauveria bassiana</i>	15
4.3.1.2. Importance de <i>Beauveria bassiana</i>	15
4.3.2. <i>Clonostachys</i> sp.	16
4.3.2.1. Les métabolites produits par <i>Clonostachys</i> sp.	17
4.3.2.2. Importance de <i>Clonostachys</i> sp.	17
4.4.1. <i>Trichoderma</i> sp.....	17
4.4.1.1. Les métabolites produits par <i>Trichoderma</i> sp.....	19
4.4.1.2. Importance de <i>Trichoderma</i> sp.	20
4.5.1. <i>Aspergillus terreus</i>	21
4.5.1.1. Les métabolites produits par <i>Aspergillus terreus</i>	22
4.5.1.2. Importance d' <i>Aspergillus</i>	24
5. La fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud).....	25

6. La fusariose vasculaire de la tomate	26
---	----

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel :

1 : Matériel fongique.....	28
1.1- Agents phytopathogènes.....	28
1.2Agent antagonistes.....	29

2. Méthodes :

2.1. Purification des souches	30
2. 2.Tests d'antagonisme.....	30
2.2.1. Test de confrontation directe.....	30
2.3. Test de confrontation indirecte	31
2.3.1. Effet de la production de l'acide cyanhydrique (HCN) sur la croissance mycélienne des agents pathogènes testés.....	31
3. Effet de filtrat de culture (métabolites secondaires) sur la croissance mycelienne des pathogènes testes.....	32

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Test d'antagonisme « <i>in vitro</i> » et mode d'action de <i>Trichoderma</i> sp, <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Clonostachys</i> sp. et <i>Beauveria bassiana</i> vis-à-vis des <i>Fusarium</i> phytopathogènes	34
1.1. Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> et <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> par les champignons endophytes à travers l'utilisation de la méthode de la confrontation directe	34
2. Zone d'inhibition	38

3. Condrentation indirect :Effet de l'HCN sur la croissance des agents pathogènes étudiés.....	42
4 Effets de filtrats de culture (métabolites secondaires) des champignons endophytes sur la croissance des agents pathogènes	44

Conclusion.....	56
------------------------	-----------

Référence Binliographique

Annexes

Introduction

Introduction :

Le sol est considéré comme un immense réservoir d'espèces microbiennes, ces dernières établissent des interactions entre elles et/ou avec la plante, en présentant différents modes de vie (symbiose, parasitisme et compétition), ces interactions sont très importantes et remarquables surtout au niveau du sol rhizosphériques, elles influencent directement ou indirectement la croissance et la santé des plantes, elles favorisent positivement leurs développement comme le cas des mycorhizes et des rhizobactéries bénéfiques. Alors que d'autres microorganismes agissent négativement sur la viabilité de la plante comme les agents pathogènes qui sont responsables de nombreuses maladies dites maladies d'origine tellurique (Lemanceau, 1992).

Parmi ces maladies, la fusariose vasculaire provoquée par l'espèce *Fusarium oxysporum* est très redoutable sur de nombreuses espèces végétales. Cette espèce est responsable de la pourriture radiculaires et de trachéomycoses, elle cause des flétrissements vasculaires aussi bien sur des plantes herbacées que ligneuse (Conrath, 2002). Ce pathogène est représenté par une multitude de hôtes qui déterminent les formes spéciales le cas de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* dont l'hôte privilégié est la tomate, et *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* responsable de la fusariose (bayoud) du palmier dattier (Conrath, 2002).

La lutte contre ces organismes pathogènes d'origine tellurique a fait appel à plusieurs méthodes préventives et curatives, comme l'emploi de molécules chimiques, telles que le bromure de méthyle, qui est extrêmement dangereux pour l'homme et l'environnement. Ces molécules étant heureusement interdites et l'utilisation des techniques de lutte biologique reposant sur l'exploitation des potentialités antagonistes entre les microorganismes, deviennent une alternative réelle pour le bio contrôle de ces maladies (Alabouvette, 2009).

L'utilisation de certains microorganismes non pathogènes en tant que bio-pesticides contre les pathogènes telluriques, est une technologie émergente et écologiquement compatible, considérée comme alternative prometteuse aux pesticides de synthèse.

Dans ces dernières années, la découverte de la présence des microorganismes endophytes, spécialement les champignons endophytes racinaires, qui peuvent remplacer les fertilisants chimiques et les pesticides. La capacité de ces microorganismes eucaryotes de

Introduction

coloniser les tissus des plantes vivantes sans causer des symptômes de la maladie ,reportent leurs capacités à protéger la plante quand elle est exposées aux conditions de stress abiotiques (Marquez et *al.*,2007 ; Rodriguez et *al.*,2008) et biotique (Omacini et *al.*, 2001 ; Nasisawa et *al.*, 2004), ainsi que la stimulation de sa croissance Ces champignons colonisant les racines sont observés dans la majorité des espèces de plantes terrestres et marines où ils peuvent vivre en association mutualiste grâce à leurs capacités de mycovitalité et mycohétérotrophie, ce qui influence positivement le contrôle de plusieurs maladies d'origine telluriques(Abdellatif et *al.*, 2009).

Globalement, l'effet protecteur conféré par ces endophytes est basé sur la compétition pour les nutriments essentiels, sur l'activité antagoniste vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et/ou sur leur capacité à stimuler des systèmes de défense chez l'hôte végétal (Jourdan, 2008).

Dans ce contexte, notre étude est dirigée afin d'évaluer le pouvoir antagoniste de quatre souches endophytes racinaires à l'encontre de deux champignons pathogènes ; *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* ; causant respectivement, la maladie de Bayoud sur le palmier dattier et le flétrissement vasculaire sur la tomate.

1. Généralités sur les interactions plantes-microorganismes :

Les interactions entre la plante hôte et les microorganismes peuvent être soit facilitatrices, soit antagonistes pour un indicateur donné comme la croissance de la plante (Souchie et *al.*, 2006 ; Stinson et *al.*, 2006). Ces deux catégories d'interactions se manifestent également entre les microorganismes telluriques (Duponnois et Plenchette, 2003 ; Duponnois, 2006). Parmi les groupes fonctionnels composant la microflore tellurique, certains jouent un rôle majeur dans l'amélioration de la croissance et de la survie des plantes en augmentant notamment la biodisponibilité d'éléments minéraux qui constitue fréquemment la principale contrainte au bon développement du végétal. Dans cette perspective, de nombreux microorganismes telluriques ont été considérés comme des biofertilisants potentiels dans le cadre d'une agriculture durable à faible apport d'intrants (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Johansson et *al.*, 2004 ; Matiru et Dakora, 2004 ; Douuds et *al.*, 2005 ; Gentili et Jumpponen, 2006). Il s'agit notamment des champignons mycorhiziens qui améliorent la nutrition hydrique et minérale (Duponnois et *al.*, 2005 ; Lambers et *al.*, 2008) et la protection phytosanitaire (Leyval et Joner, 2001 ; Joner et Leyval, 2003) des plantes ainsi que des bactéries fixatrices d'azote qui sont capables de piéger l'azote atmosphérique et de le rendre accessible aux plantes (Samba et *al.*, 2002 ; Matiru et Dakora, 2004). Des processus de mobilisation d'éléments nutritifs à partir de formes complexes de phosphates organiques et inorganiques ont également été mis en évidence chez ces microorganismes (Chabot et *al.*, 1996 ; Alikhani et *al.*, 2006). En revanche, il existe des microorganismes phytopathogènes dans le sol et susceptibles de réduire fortement la survie et le développement des végétaux (Miller et *al.*, 1997 ; Nyvall, 1999).

1.1. Les types d'interactions plantes-pathogènes :

1.1.1. Commensalisme :

Le commensalisme existe au niveau de la rhizosphère notamment par des changements dans les conditions environnementales (humidité, pH, le potentiel osmotique, etc...) par un micro-organisme rendant ainsi un climat favorable pour le développement d'un autre. Aussi, certains organismes dégradent ou neutralisent des substances toxiques favorisant ainsi la croissance des autres (Curl et Truelove, 1986).

1.1.2. Mutualisme :

Le mutualisme ou symbiose est une association mutuellement avantageuse aux microorganismes partenaires, exemple : de *Proteris vulgaris* qui a besoin de biotine, mais qui synthétise l'acide nicotinique requis par *Bacillus polymyxa* qui le transforme en biotine (Dommergues et Mangenot, 1970).

1.1.3. Hyperparasitisme :

L'hyperparasitisme est l'attaque directe d'un microorganisme par un autre dans un but nutritionnel. La rhizosphère qui héberge une large variété de populations microbiennes, constitue un milieu favorable pour l'apparition du parasitisme (Gagné, 1984).

1.1.4 .Antagonisme :

L'antagonisme microbien est un phénomène entre deux organismes (l'antagoniste et le pathogène) (Pal et McSpadden Gardener., 2006). Cette alternative consiste à utiliser des microorganismes pouvant être antagonistes des agents pathogènes et /ou éliciteurs des plantes, et aussi ces microorganismes ont la capacité de stimuler directement la croissance des plantes (Hinsinger et Marschner, 2006).

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte (Curl et Truelove, 1986). L'antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un hyperparasitisme, une production de sidérophores ou par une antibiose.

2. Modes d'action des agents antagonistes :

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition (pour éléments nutritifs, l'oxygène et l'espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante (Tableau 1). L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (Jijakli, 2003).

Tableau 1 : Différents types d'antagonismes menant à la lutte biologique contre des champignons phytopathogènes.

Types	Mode d'action	Exemples	Références
Antagonisme direct	compétitions	<i>Trichoderma</i>	Bouziane et al., 2011
	hyper parasitisme	<i>Gliocladium catenulatum</i>	Lahdenpera, 2000
	antibiose	<i>Aspergillus</i> sp.	Shanker et al., 1993
Antagonisme indirect	Induction de la résistance	<i>Pythium</i> <i>Oligandrum</i>	Picard et al., 2002

2.1. Antagonisme direct

2.1.1. Compétition pour la nutrition et l'espace :

La compétition pour les éléments nutritifs entre en jeu lorsqu'il y a simultanément consommation du même composé par plusieurs microorganismes. Pour être un compétiteur efficace, un agent antagoniste doit être capable d'utiliser rapidement et efficacement les éléments nutritifs présents en faible concentration sur les organes de la plante (Jijakli, 2003).

En occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène, un microorganisme peut entrer en compétition avec l'agent pathogène par rapport aux nutriments, ce qui peut diminuer ou même empêcher la croissance de cet agent pathogène. Par exemple, certains champignons produisant des sidérophores ont un avantage écologique. Ces sidérophores captent le fer, pouvant le rendre ainsi non disponible pour l'agent pathogène ce qui, conséquemment, limite sa croissance.

Outre la compétition nutritionnelle, la compétition spatiale contribue aussi à la réduction des infections racinaires par les agents phytopathogènes (Benítez et *al.*, 2004). En effet, les microorganismes ayant la capacité de coloniser les racines comme les bactéries promotrices de la croissance des plantes (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPB) protègent les racines et occupent les sites d'infection aux agents phytopathogènes (Benítez et *al.*, 2004 ; Compant et *al.*, 2005).

2.1.2. Mycoparasitisme :

Ce mécanisme de lutte consiste en une interaction directe entre deux microorganismes où les tissus vivants de l'un constituent une base nutritive pour l'autre (Helluy et Holmes, 2005). Il implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste (Corbaz, 1990). L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques tels que des glucanases, des chitinases et des lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène. Valueva et Mosolor (2004), ont montré que les enzymes utilisées par les antagonistes ont souvent une activité en mélange ou en synergie avec les antibiotiques. Par exemple, il a été démontré que les hyphes de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et les spores de l'agent pathogène *Cochliobolus* sp. peuvent être perforées dans le sol par des myxobactéries du genre *Polyangium* et des amibes vampyrellides. Cette dégradation entraîne une diminution de la population des agents pathogènes. Certains actinomycètes produisent aussi des chitinases et des glucanases pour dégrader les parois de *Fusarium oxysporum* (El-Tarabily et *al.*, 1997; Sabaou et *al.*, 1998 et Errakhi, 2008).

L'agent antagoniste le plus cité pour le mycoparasitisme est sans aucun doute le champignon *Trichoderma* (Chet et Inbar, 1994 ; Haran, 1996). Elad et *al.*, (1983) ont découvert que des glycoprotéines appelées lectines étaient produites par certains agents pathogènes comme *Rhizoctonia solani*. Ces lectines semblent être impliquées dans la reconnaissance de l'interaction entre *Trichoderma* et son hôte fongique. Le rôle des lectines dans le mycoparasitisme et la lutte biologique, qui a été prouvé et discuté par Inbar et Chet (1992,1997) (Figure 1).

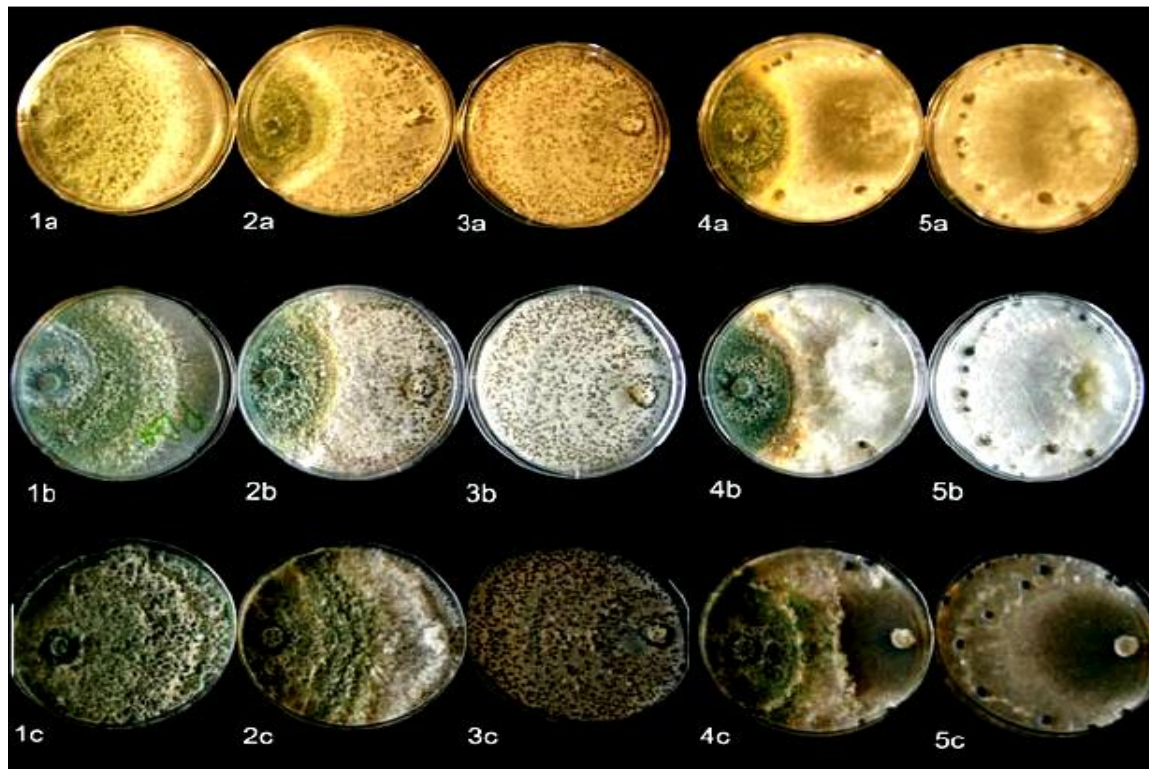


Figure 1 : Mycoparasitisme de trios *Trichoderma* strains avec *Sclerotinia minor* (Sm) et *Sclerotini*. série a1 -5 Correspond à la souche IBA-4, la série b1-5 correspond à la souche IBA-38, et la série c 1-5 correspond à la souche IBA-56. T= souche de *Trichoderma* série 1a,1b, et 1c=contrôles des souches antagonistes (TC);Séries 2a,2b et 2c interaction entre l'antagoniste avec Sm ;Séries 3a,3b, et 3c contrôle de Sm, Séries 4a,4b, et 4c Interaction entre l'antagoniste avec Ss ;et séries 5a,5b et 5c contrôle de Ss

2.1.3 Antibiose :

La sécrétion de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Certains métabolites sont capables d'interférer avec la germination, la croissance mycélienne et/ou la sporulation des agents phytopathogènes. D'autres entraînent le relargage de composés cellulaires suite à la perturbation de la perméabilité cellulaire. L'antibiose est le mode d'action le plus étudié chez les agents de lutte biologique (Jijakli, 2003). Elle consiste en la production par l'agent antagoniste d'antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène. Ces antibiotiques vont ralentir ou arrêter la croissance de l'agent pathogène. (Corbaz, 1990).

L'antibiose repose donc sur l'émission par un micro organisme de métabolites secondaires solubles ou volatiles responsables de l'inhibition de la croissance d'un second microorganisme. L'antibiose est la formation de substances toxiques pour l'agent pathogènes, exemple typique de l'agrocine d'*Agrobacterium radiobacter*. Les cas les plus décrits d'antibiose impliquent une bactérie productrice de métabolites secondaires antagonistes

contre une autre bactérie ou champignon phytopathogène (Fravel, 1988 ; Handelman et Stabb, 1996 ; Thomashow, 1996 ; Waller, 1988).

La production d'antibiotique requiert que le microorganisme producteur possède les éléments nutritifs indispensables à la biosynthèse de ces substances (Baker, 1968). Les nutriments ne sont pas dispersés de façon uniforme dans le sol mais localisés dans le spermosphère, la rhizosphère et autour des débris des végétaux et des lésions des plantes.

2.2. Antagonisme indirect :

2.2.1. Induction de la résistance chez l'hôte :

Des microorganismes intervenant dans la lutte biologique sont capables aussi de déclencher une résistance systémique induite (ISR) chez la plante hôte, ce qui peut rendre l'hôte plus résistant à l'agression future exercée par des agents pathogènes (Jijakli, 2003). L'induction des systèmes de résistance chez la plante a été démontrée pour la première fois par Kempe et Sequira (1983). Ces derniers ont remarqué que des pré-traitements par des bactéries ont protégé des tubercules de pomme de terre des infections de *Pseudomonas solanacearum*.

Le microorganisme antagoniste peut consister en une souche avirulente occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène. L'induction des systèmes de résistance se manifeste par des modifications au niveau de la composition des parois cellulaires ou la libération des éliciteurs. Ces derniers sont des substances mettant en branle les mécanismes de défense de la plante. Celle-ci produira alors des phytoalexines et des protéines PR qui lui confèrent une résistance systémique (Agrios, 1988 ; Toussaint, 1996). Par exemple, *Trichoderma harzianum* T-203 induit des changements structuraux et chimiques des parois cellulaires des plantes ce qui augmente leur résistance aux infections par les phytopathogènes (Brimner et Boland, 2003).

Les maladies racinaires des plantes cultivées sont généralement attribuées à des agents bactériens et/ou fongique adaptés à la vie tellurique. Les affections ou infections cryptogamiques sont souvent redoutables et affectent une gamme très large de plantes cultivées. Divers genres de mycètes tels que les *Fusarium*, sont des causes directes en agissant individuellement, en complexe et même en chaîne, provoquant divers types de maladies et des dégâts économiquement importants (Conrath, 2002).

Parmi ces pathogènes *Fusarium oxysporum* est un pathogène ubiquiste bien représenté au sein de la communauté microbienne tellurique, notamment la microflore rhizosphérique, il se rencontre pratiquement dans la quasi-totalité des sols agricoles surtout sous sa forme asexuée. Cette espèce présente des formes phytopathogènes hautement spécifique sur des hôtes déterminés, Plusieurs formes spéciales selon la plante hôte attaquée sont présentées entre autre la tomate est la plante hôte attaqué par *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* et le palmier dattier sous la menace de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* (Armstrong et Armstrong, 1981).

2.2.2. Production d'HCN :

Les cyanides sont des métabolites secondaires produits par plusieurs microorganismes. Ils peuvent être produits directement à partir de la glycine ou à partir des glycosides cyanogènes. L'action bénéfique de cette molécule, est liée à la lutte biologique, liée à l'induction des mécanismes de défense des plantes et à antagonismes (Bakker et Schippers, 1987).

La présence Les endophytes dans les tissus de la plante peuvent influencer la production des métabolites volatils de la plante (Rini et Sulochana, 2007 ; Baysal et al., 2008). Des études ont clairement démontré l'efficacité relative des endophytes dans la production des métabolites comme l'HCN qui sont impliqué dans la promotion de la croissance des plantes et la résistance systémique induite (Nandhini et al., 2012).

3. La lutte biologique :

D'après la définition de Cook et Baker (1983), la lutte biologique consiste à réduire la densité d'un agent pathogène et/ou l'activité de celui-ci (le potentiel infectieux). L'utilisation d'une méthode de lutte biologique ne cherche pas à prévenir une éradication totale de l'espèce envahissante mais son objectif est d'en réduire suffisamment et durablement les effectifs pour les amener en dessous d'un seuil de nuisibilité, écologiquement et/ou économiquement acceptable. L'objectif principal de cette méthode est donc de rétablir un équilibre durable entre l'agent de lutte biologique et l'agent pathogène (Suty, 2010). La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de bio contrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à l'utilisation de plusieurs modes d'action (Cook, 1993 ; Benbrook et al., 1996) et à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (Singh et al., 2003).

Les microorganismes rhizosphériques peuvent être des agents les plus utilisables pour le biocontrôle des pathogènes des plantes comparées à d'autres microorganismes, ces agents de lutte appelés **PGPR** et **PGPF** peuvent avoir des effets bénéfiques dans le contrôle des champignons pathogènes des racines (Adam, 2008 ; Caron, 2000).

3.1. Les PGPR :

Les PGPR ou «Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » sont des bactérie qui se développent dans la rhizosphère, et qui ont un effet positif sur la plante, pour ces effet on les considère comme rhizobactéries promotrice de la croissance végétale (Dey et *al.*, 2004 ; Herman et *al.*, 2008 ; Microrsky, 2008). Ces bactéries sont utilisées en agriculture pour la biofertilisation des sols en fixant l'azote atmosphérique qui pourra être par la suite utilisé par les plantes, et améliorant leur croissance lorsque l'azote du sol est limité (Glik, 1995).

La fixation biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniacque (Glick, 1995). Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux. Elles peuvent induire la croissance des plantes par la promotion directe ou indirecte (Verma et *al.*, 2010).

L'effet phytobénéfiques direct des bactéries PGPR peut correspondre à une augmentation de la qualité de nutriments disponibles (fixation libre de l'azote et la solubilisation du phosphate, etc.) (Dobbelaere et *al.*, 2003), une augmentation de la microstructuration du sol rhizosphérique qui retient alors mieux l'eau , une modification de l'équilibre hormonal de la plante (production de phytohormones, désamination du précurseur de l'éthylène) et l'induction d'une réponse systémique chez la plante, de type ISR (Induced Systemic Resistance) ou plus rarement SAR (Systemic Acquired Resistance) (Glick et *al.*, 1998 ; Dobbelaere et *al.*, 2003).

3.2. PGPF ou champignons bénéfiques :

Les champignons bénéfiques appelés PGPF (Plant Growth Promoting Fungi) (Bent, 2006), sont également utilisés pour le biocontrôle des maladies des plantes grâce à leur capacité de stimuler les défenses des plantes et présenter une activité antagoniste vis-à-vis des agents phytopathogènes (Wipps, 2001).

Les PGPF peuvent être isolés à partir des plantes ligneuses (Arnold *et al.*, 2003) comme ils peuvent être présents chez les plantes herbacées (Sinclair et Cerkauskas, 1996 ; Saikkonen *et al.*, 1998). Ils peuvent être épiphytes et/ou endophytes (Carroll, 1988 ; Clay, 1990 ; Faeth, 2002 ; Hahn *et al.*, 2003) et sont même quelque fois à l'origine de symbiose remarquables comme le cas des mycorhizes (Selosse *et al.*, 2004).

Divers mécanismes d'action sont impliqués dans la stimulation de la plante lors de l'association bénéfique entre une plante et les PGPF. Ces microorganismes peuvent agir également par une interaction directe avec l'agent pathogène, ce qui protège la plante indirectement. Ceci peut se réaliser par le biais d'un mycoparasitisme et /ou d'un phénomène de compétition pour l'espace et les nutriments (Whipps, 2001 ; Mauchlin *et al.*, 2002 ; Howell, 2003).

Les endophytes ont reçues une attention croissante ces dernières années comme un supplément prometteur ou une alternative aux produits chimiques (Wagenaar et Clardy, 2001) dont ils jouent un rôle important dans la protection des plantes exposées à divers stress abiotique (Marquez *et al.*, 2007 ; Rodriguez *et al.*, 2008) et biotique (Rai *et al.*, 2004) et dans la promotion de leur croissance (Deshmukh et Kogel, 2007). Ces endophytes surtout fongiques peuvent être classés parmi les PGPF.

4. Champignons endophytes :

La définition la plus couramment utilisée pour décrire les endophytes est celle de Petrini (1991), qui définit les endophytes comme étant des microorganismes vivant dans les organes végétaux interne à un certain moment de leurs vie et peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommage apparents chez l'hôte (Hyde et Soyong, 2008).

Les premières descriptions de ces microbes remontent à la fin du 19^{ème} et 20^{ème} siècle (Staniek *et al.*, 2008). En 1866, Anton De Bary, inventa le terme endophytes, qui est composé de deux mots grecs, endo signifiant au sein ou dedans désignant à l'intérieur de la plante et qui désignait tout organisme vivant à l'intérieur des tissus de plantes (Hyde et Soyong, 2008).

Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolés en tant qu'endophytes (Strobel *et al.*, 2004), Ce sont des champignons qui peuvent croître de façon intra et/ou intercellulaires dans les tissus internes des plantes, sous la couche des cellules

épidermiques sans causer aucun symptôme apparent chez l'hôte (Morica et Ragazzi, 2008 ; Vega et *al.*, 2008 et Pimentel et *al.*, 2011). Ils ont été isolés de toutes les plantes déjà étudiées (Hyde et Soyong, 2008), leurs façons de croître symptomatiquement dans les tissus de plantes à montre que leurs relations avec l'hôte était de l'ordre du mutualisme et de la symbiose mais leur biodiversité suggère qu'ils peuvent être également des saprophytes ou des pathogènes opportunistes (Strobel et *al.*, 2004).

4.1. Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs :

Le développement de résistance aux médicaments de plusieurs bactéries, l'augmentation de l'incidence des infections fongiques, ainsi que d'autres problèmes de santé et d'environnement, poussent à rechercher de nouvelles substances bioactives. Ceux produites par des champignons endophytes, en plus d'être impliqués dans la relation hôte-endophyte, ils peuvent aussi avoir des applications en médecine, l'agriculture et l'industrie (Strobel, 2002a).

Les champignons endophytes sont considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (Strobel et *al.*, 2004 ; Tan et Zou, 2001), produisant le plus grand nombre de métabolites secondaires par rapport aux autres catégories de microorganismes (Zhang et *al.*, 2006), ainsi qu'une grande diversité structurale comprenant des alcaloïdes (amines, amides...), peptides, stéroïdes, terpénoïdes, phénols, quinones, composés aliphatiques, flavonoïdes etc. (Yu et *al.*, 2010). Ces substances naturelles produites par les champignons endophytes possèdent un large spectre d'activité biologique (Zhang et *al.*, 2006).

4.2. Rôles des champignons endophytes :

Les champignons endophytes reçoivent la nutrition, la protection, et la possibilité de se propager grâce à leurs hôtes et en retour la plante hôte bénéficie aussi de certains avantages procurés par l'endophytes (Clay et Schardl, 2002).

4.2.1. Protection contre les microorganismes pathogènes :

Plusieurs mécanismes peuvent être utilisés par les endophytes pour inhiber les microorganismes phytopathogènes. Parmi eux, il ya la production d'antibiotiques, la stimulation des mécanismes de défense de l'hôte, la concurrence pour la nourriture ou les sites de colonisation ainsi que et le mycoparasitisme (Cao et *al.*, 2009).

De nombreuses espèces de champignons endophytes produisent divers métabolites secondaires (Strobel, 2002b Schulz et Boyle, 2005 ; Wang et *al.*, 2007).

Les études, de Koshino ont démontré que le champignon endophyte *Epichloë typhina* de *Phleum pretense* produisent des sesquiterpènes (chokols AG) jugés être des fongitoxiques contre le champignon pathogène *Cladosporium phlei*. La cryptocine qui est produite par l'endophyte *Cryptosporiopsis quercina* hébergé dans une plante médicinale *Tripterigeum wilfordii*, a montré une puissante activité contre *Pyricularia oryzae* agent de la pyriculariose du riz (Li et *al.*, 2000).

Plusieurs extraits liquides des cultures des endophytes , ont démontré une inhibition de la croissance de plusieurs espèces de champignons phytopathogènes (Liu et *al.*, 2001 ; Park et *al.*, 2005 Inacio et *al.*, 2006 ; Kim et *al.*, 2007). (Dingle et McGee, (2003) ; Istifadah et McGee, (2006) ont fait l'expérience avec les endophytes du blé *Chaetomium* et *Phom.*, L'inoculation de ces champignons ainsi que l'application de leurs filtrats de cultures sur la plante ont réduit de la même façon la sévérité de la maladie foliaire causé par *Puccinia* sp. et *Pyrenophora* sp.

Les endophytes peuvent aussi induire ou activer des mécanismes de défenses des plantes hôtes (Arnold et *al.*, 2003). Rodriguez et *al.*, (2004) ont observé que les mécanismes de défense étaient activés plus rapidement chez les plantes hôtes que chez les autres plantes. Ces mécanismes principalement impliqués dans la défense, sont la stimulation du métabolisme oxydatif, la mort cellulaire rapide et localisée, l'accumulation de phytoalexines et la synthèse de protéines reliées à la pathogénèse (PR). Lors de l'inoculation de *Piriformospora indica*, un endophyte qui colonise les racines des plantes, une résistance contre deux champignons pathogènes (*Fusarium culmorum* et *Blumeria graminis*) a été observée. La protection contre l'agent pathogène foliaire semble être méditée par un mécanisme de résistance induit, où il y a eu une réaction de défense impliquant la mort des cellules hôte (Waller et *al.*, 2005).

4.3. Biodiversités des champignons endophytes :

Les champignons endophytes sont extrêmement ubiquitaires ; la majorité des espèces végétales dans les écosystèmes naturels hébergent des champignons endophytes (Rodriguez et al., 2009). ils sont trouvés dans les *Coniferaceae*, *Gramineae* et *Ericaceae* et d'autre (Okane et al., 2001) (Tableau 2).

Tableau 2 : Quelques exemples de champignons endophytes et leurs plantes hôtes.

Champignon endophyte	Plantes hôtes	références
<i>Trichoderma</i> sp.	Cacaotier	Mejia et al. (2008) ; Bailey et al. (2009)
<i>Trichoderma asperellum</i> <i>T34</i>	Arabette	Segarra et al. (2009)
<i>Beauveria bassiana</i>	Café Blé, coton ,tomate	Peterson et al. (2005) Ownley et al. (2010)
<i>T. harzianum</i>	Poivron rouge Tomate, tabac	Chang et al. (1986) Windham et al. (1994)

4.3.1. *Beauveria bassiana* :

Le champignon *Beauveria bassiana* est un mycète filamenteux naturel, initialement décrit par Jean Beauveria en 1911 sous le nom de *Beauveria* sp. le genre a été établi par Vuillemin (1912). Il appartient à la classe des ascomycètes et à l'ordre des hyphomycètes famille *Cordycipitaceae*. (Subramanian, 1983), *Beauveria* est d'origine tellurique entomopathogène facultative, que l'on trouve également sous forme de saprophyte et endophyte. *B. bassiana* naturellement présent dans l'environnement, ubiquitaire et pathogène pour de nombreux ordres d'insectes. *B. bassiana* se multiplie par reproduction asexuée et il produit des spores de couleur blanchâtre à jaunâtre qui sont soutenues par de long filaments en zigzag nommés hyphes transparents de diamètre varient entre 2 et 25 µm. elles sont produites sur des épis courts donnant un aspect épineux aux cellules conidiogènes (Weiser, 1972 ; Lipa ,1975) (Figure 2).

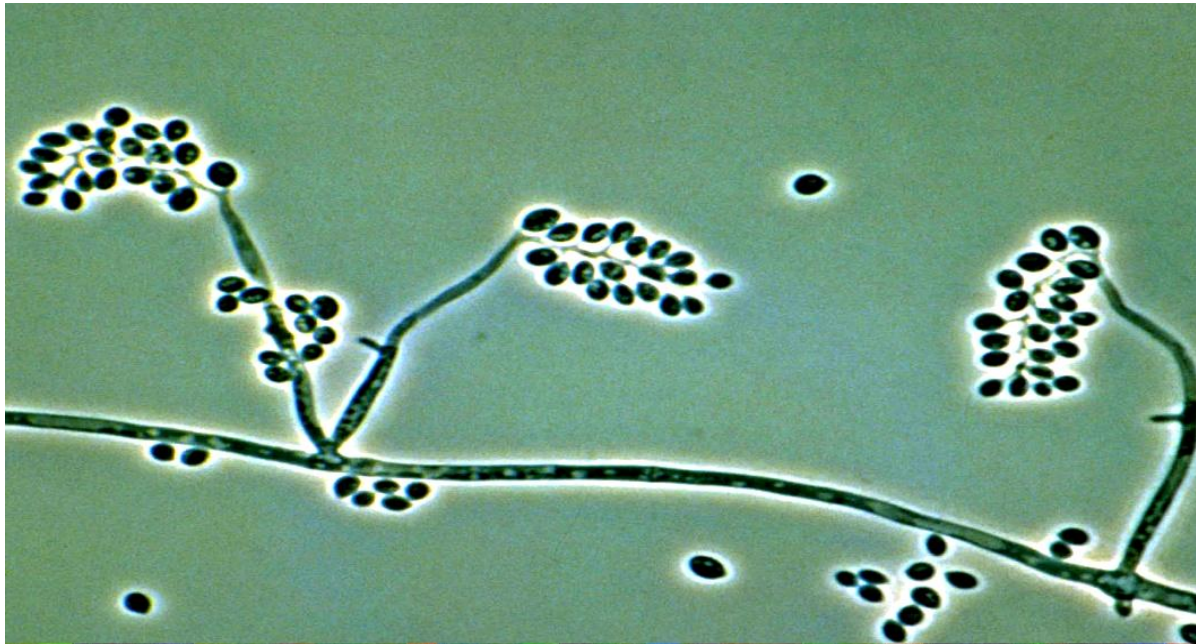


Figure 2 : Hyphes et conidies de *Beauveria bassiana* sous microscope (Barron, George 2013)

4.3.1.1. Les métabolites produits par *Beauveria bassiana* :

Des espèces du genre *Beauveria* ont signalé produire des métabolites secondaires comme bassianine, bassiacridine, beauvericine, bassianolide, beauverolide, tenelline et oosporeine (Strasser et *al.*, 2000 ; Vey et *al.*, 2001 ; Quesada-Moraga et Vey, 2004).

4.3.1.2. Importance de *Beauveria bassiana* :

Plusieurs études ont démontré que le champignon *Beauveria bassiana* peut être utilisé contre différents insectes ravageurs appartenant à divers ordres, notamment **les coléoptères** (Todorova et *al.*, 1996 et *al.*, 2002 ; Dowd et Vega, 2003 ; Cornia et Beatriz, 2004 ; Liu et Bauer, 2008a) **les homoptères** (Todorova et *al.*, 2002 ; Fenf et *al.*, 2004 ; Daraet et *al.*, 2007 ; liu et *al.*, 2008b) **les lépidoptères** (Todorova et *al.*, 2002a Tadela et pringle, 2003 ; El-Sinary et Rizk., 2007 ; Nguyen et *al.*, 2007) et **les hémiptères** (Luz et *al.*, 1989 ; liu et *al.* 2003 ; Kauassi et *al.*, 2002 ; Jarrod et Robert, 2005 ; McGuire et Leland, 2006 ; Sabbahiet , 2008a). Les résultats obtenus concernant la réduction des populations de doryphore de la pomme de terre. *Leplonolars adecemlineala*, montrent tout le potentiel de ce champignon comme une alternative aux pesticides chimiques (Talaie et *al.*, 2006). D'autres études ont démontré que *Beauveria bassiana* est un agent de lutte contre les principaux ravageurs des fraiseraias au

Québec, (Sabbahi et *al.*, 2008b). D'autres travaux de recherche montrent l'efficacité de *Beauveria bassiana* contre le charançon rouge du palmier dattier (Besse et Panchaud., 2014).

4.3.2. *Clonostachys sp* :

Clonostachys sp. est un champignon commun du sol reconnu comme un saprophyte avec une haute capacité de compétition. Il est rencontré régulièrement sur une gamme très large d'habitats et d'hôtes (John et *al.*, 1997).

Clonostachys sp. a été signalé fréquemment sur les racines des plantes, sur les animaux et insectes morts, et sur les nématodes (Schroers et *al.*, 1999). D'après ces auteurs *Clonostachys* sp, appartient à la classe des ascomycètes à l'ordre des Hypo céréales et à la famille des *Bionectriaceae*. (Figure 3).

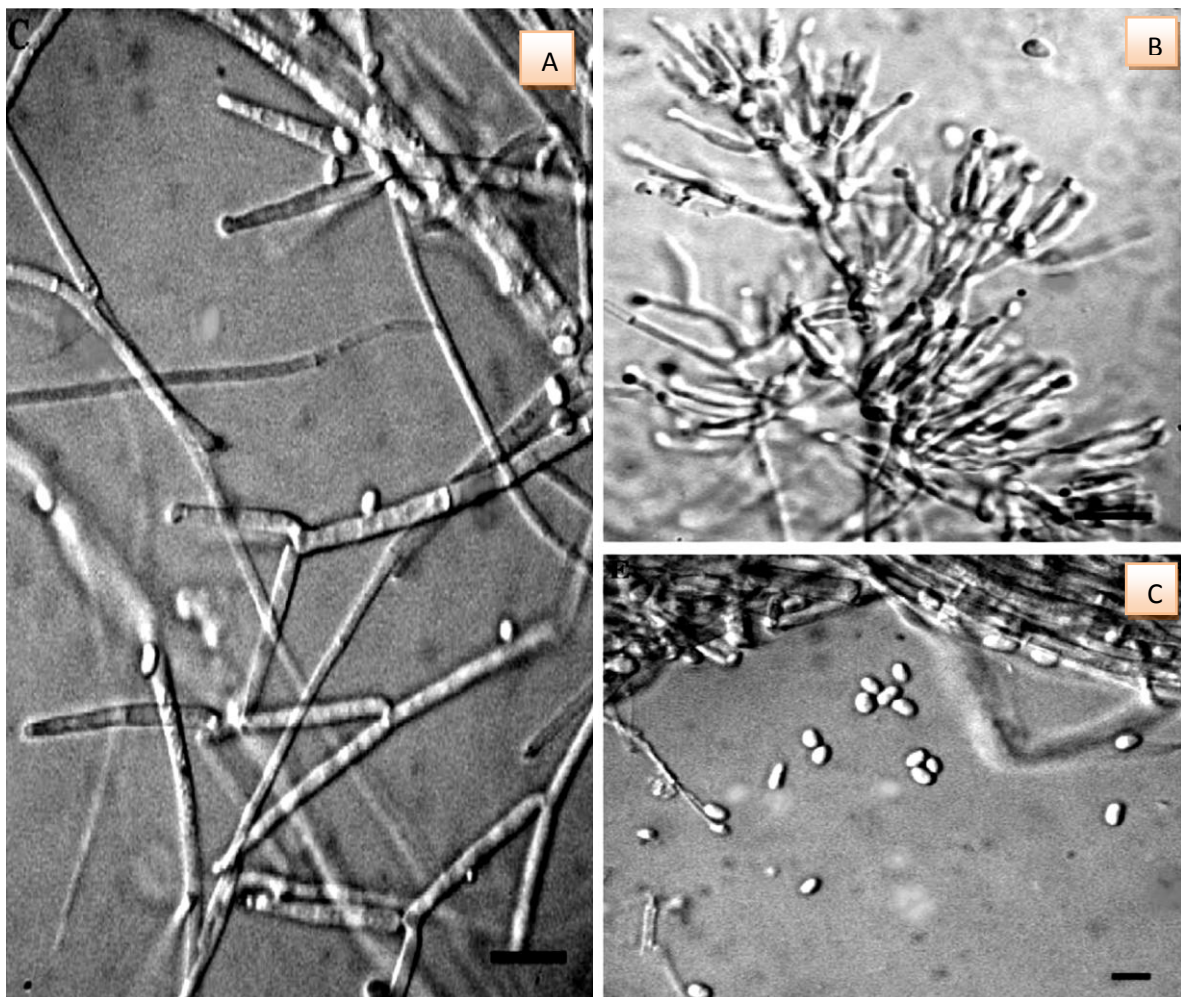


Figure3 : Observation microscopique de *Clonostachys rosea*. A : Conidiophores primaires, phialides et conidies. B : Conidiophores secondaires, phialides et conidies. C : Conidie. A.V. Toledo et *al.*, (2006)

4.3.2.1. Les métabolites produits par *Clonostachys* sp. :

L'espèce *Clonostachys* sp. Produit des composés toxiques enzymatiques tels que les protéases extracellulaires qui peuvent être des enzymes clés dans le processus d'infection des nématodes (Tunlid et al., 1994 ; Ahman et al., 2002 ; Zhao et al., 2004).

4.3.2.2. Importance de *clonostachys* sp. :

De nombreux isolats de *Clonostachys* sp. Sont des antagonistes très efficaces contre plusieurs champignons pathogènes des plantes, comme par exemple *Botrytis cinerea* (Choux et Foury 1994) qui attaque la fraise, la framboise et la tomate (Sutton et al., 1997)

Des études réalisées sur *Botrytis cinerea* montre que *Clonostachys roseum* à une pénétration directe par les pointes des hyphes sans formation d'appressorium et qu'à chaque pénétration des sites nécessitent que les hyphes de *C. roseum* produisent une force mécanique pour surmonter la barrière de la paroi cellulaire au cours de processus d'infection (Li et al., 2004).

4.4.1. *Trichoderma* sp. :

Le terme «*Trichoderma*» a été utilisé pour la première fois par le mycologue sud-africain Christiaan Hendrik Persoon en 1794. C'est le premier qui a décrit le genre *Trichoderma* à partir des échantillons collectés en Allemagne.

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

Toute espèce fongique à spores vertes appartenant au genre *Trichoderma* était considérée comme étant l'unique espèce : *Trichoderma viride* (Bisby, 1939). Ce système de l'espèce unique était très apprécié d'où aucune compétence particulière n'a été nécessaire pour parvenir à une nouvelle identification. Ce type de systématique « espèce unique » de Bisby a incité John Webster et son étudiant Mein Rifai à revoir la taxonomie de *Trichoderma* et *Hypocrea* (Rifai et Webster, 1966 ; Webster et Rifai, 1968).

Les travaux de Rifai (1969) ont abouti à la publication de sa thèse, une monographie révolutionnaire sur les *Trichoderma* utilisables avec le concept « d'espèces agrégées », basé sur les caractères microscopiques anamorphe. Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer. Rifai a créé neuf espèces agrégées de *Trichoderma* (figure 4).

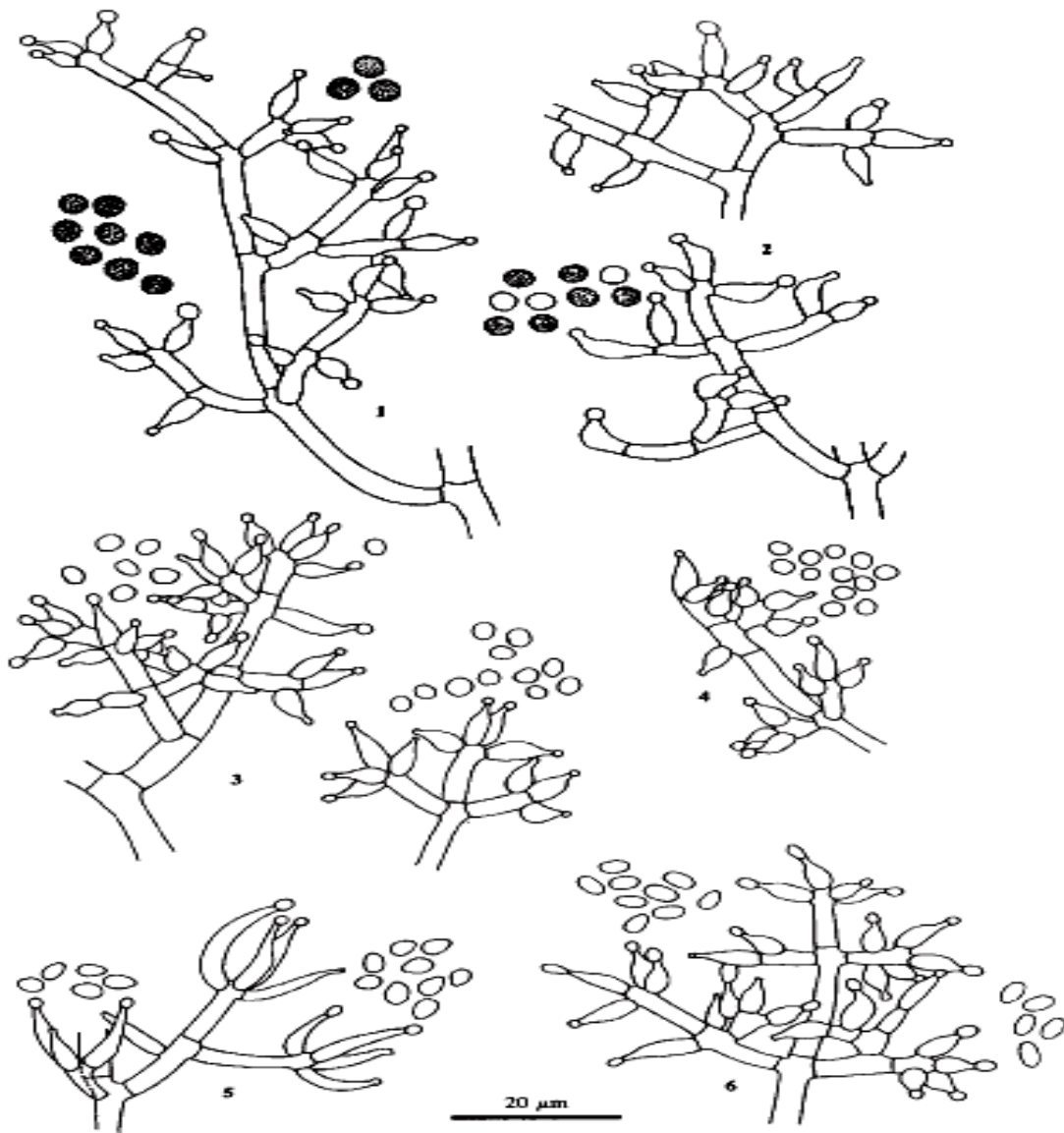


Figure 4: Aspect morphologique des conidies, des conidiophores et des phialides de *Trichoderma* spp. **1.** *T. viride*. **2.** *T. atroviride*. **3.** *T. harzianum*. **4.** *T. inhamatum*. **5.** *T. aureoviride*. **6.** *T. koningii* (Gams et Bissett, 1998)

4.4.1.1. Les métabolites produits par *Trichoderma* sp. :

Les espèces de *Trichoderma* sont capables de produire plus de 180 métabolites secondaires 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). Il est très difficile de connaître quels sont les métabolites secondaires réellement produits et actifs *in situ*. Certaines souches de *Trichoderma* peuvent produire plusieurs métabolites différents selon les conditions environnementales, le sol, la plante et l'agent pathogène auquel elles sont confrontées.

Certaines espèces de *Trichoderma*, à savoir *T. viride*, *T. harzianum* et *T. koningii*, sont capables de produire l'antibiotique 6-pentyl- α -pyrone (6PAP) qui appartient au groupe métabolites volatiles jouant un rôle dans la lutte biologique à l'égard des champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* (Jeleń et al., 2013 ; Błaszczuk et al., 2014).

Les enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes, comme les chitinases, β -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 secrétés des peptaïboles (polypeptides) ayant des effets antifongiques, antibactériens (Gram +) et antivirales. Les composés appartenant à cette classe comprennent : les viridines, trichotoxines A et B, trichorovines (synthétisées par *T. viride*) ; trichorzianines A et B, trichorzines (synthétisés par *T. harzianum*) ; koningine, acide koningique, trichokonines (synthétisés par *T. koningii*) ; longibrachines (synthétisé par *T. longibrachiatum*) et autres (Vinale et al., 2006 ; Reino et al., 2008 ; Andrabi et al., 2011).

4.4.1.2. Importance de *Trichoderma* sp. :

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 révélée que les espèces *Trichoderma*, non seulement sont associées aux racines des plantes, mais elles persistent également à l'intérieur des tissus racinaires (Xia et al., 2011 ; Mulaw et al., 2013 ; Cummings et al., 2016).

L'utilisation de *Trichoderma* en lutte biologique pour protéger les plantes cultivées date Des années 1930, mais leurs propriétés antagonistes sont connues depuis longtemps où la première publication qui en fait mention en 1887. Cependant, l'étude approfondie du phénomène d'antagonisme et de son application comme moyen de lutte à l'égard des parasites des plantes n'a débuté qu'entre les deux guerres mondiales.

Les modèles étudiés s'intéressaient essentiellement aux parasites du sol mais déjà, en 1952, Wood a signalait l'efficacité de *Trichoderma viride* pour contrôler *Botrytis cinerea* sur la laitue (Caron, 2002).

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

En plus, *Trichoderma* sp. est utilisé commercialement pour la production des cellulases et d'autres enzymes qui dégradent les polysaccharides complexes. Il est fréquemment employé dans les industries alimentaires et textiles (Harman, 2006). *Trichoderma* sp. a fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de la protection des plantes vis-à-vis des maladies parasitaires Il est capable d'attaquer différents agents pathogènes par des mécanismes variés dont les principaux sont le parasitisme, l'antibiose et la compétition (Howell, 2003 ; Vinale et al., 2007). Ces mécanismes sont utilisés de manière complexe, indépendamment ou en synergie, suivant l'adversaire à neutraliser et les conditions du milieu (Suty, 2010). Un autre mécanisme est proposé pour expliquer l'activité antagoniste du

Trichoderma sp. est l'induction de la résistance chez la plante hôte (Howell, 2003 ; Shores et al., 2005).

4.5.1. *Aspergillus terreus* :

Aspergillus terreus appartenant à la classe des Ascomycètes. Elle possède un thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Raper et Fennell, 1965).

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002), ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, et les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires ; *Aspergillus niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif) (Morin, 1994). De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines. Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques et de molécules bioactives (Botton et al., 1990) (Figure 5).

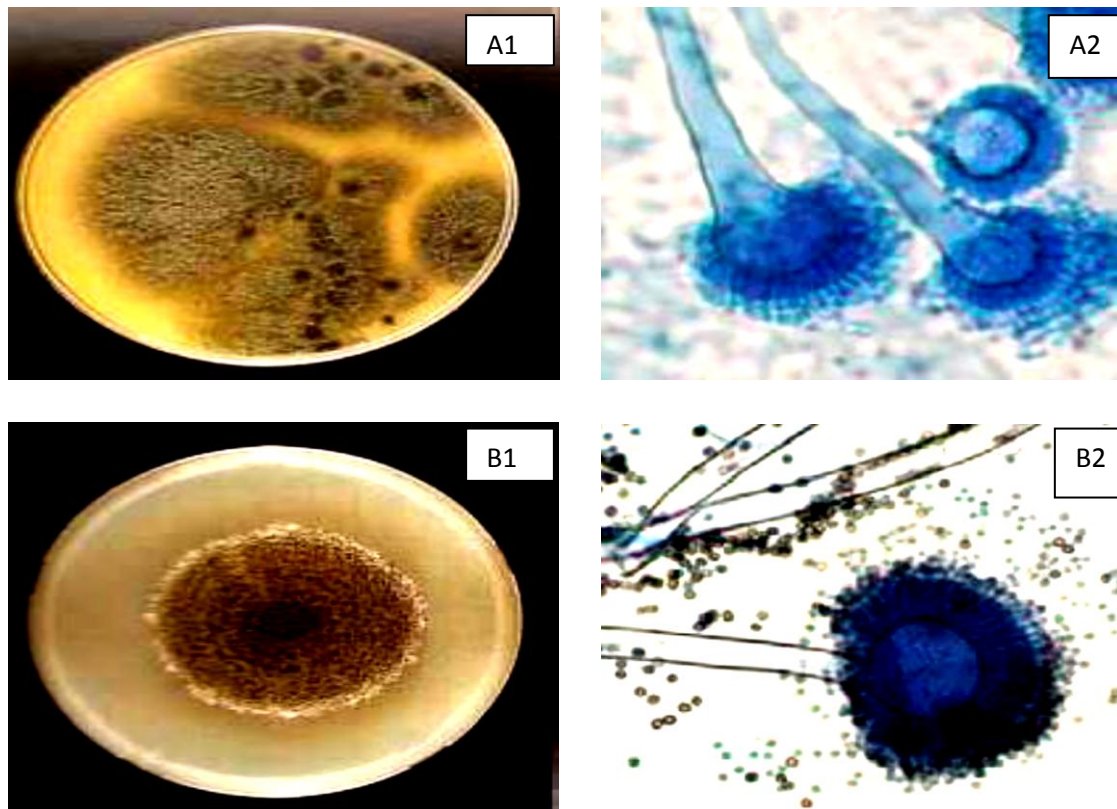


Figure 5: Quelques espèces du genre *Aspergillus* : A1 et A2 : *Aspergillus flavus* ; B1 et B2 : *Aspergillus fumigatus* (Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et aspect microscopique) (Tabuc, 2007).

4.5.1.1. Les métabolites produits par *Aspergillus terreus* :

De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* (Tableau 3) sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines (Pitt, 2000). *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* sont les principaux producteurs d'aflatoxines. L'aflatoxine B1 est classée comme cancérigène chez l'homme et l'animal (IARC, 1993).

Aspergillus fumigatus synthétise plusieurs métabolites très toxiques comme la fumagiline, l'acide helvolique, la gliotoxine, les dérivés quinoniques, des alcaloïdes voisins de ceux de l'ergot de seigle.

Aspergillus niger peut produire de l'acide oxalique, des malformines et, certaines souches, des aflatoxines. *Aspergillus ochraceus* est le principal producteur d'ochratoxine A. Il colonise lui aussi de très nombreux substrats.

Les métabolites secondaires produits par *Aspergillus terreus* : gliotoxine, fumagilline, acide helvolique, tryptacidine, fumitremorgines, fumiquinazolines, aflatoxines, ochratoxines et stérigmatocystine. *Aspergillus terreus* élabore aussi des substances antibactériennes, de toxicité variable tel que la flavipine, la terréine, la citrinine, l'erdine et molécules voisines, la clavacine (Botton et al., 1990)

Tableau 3 : les *Aspergillus* producteurs des mycotoxines (pitt,2000)

Espèces d' <i>Aspergillus</i>	Mycotoxines produites
<i>Aspergillus candidus</i>	candiduline
<i>Aspergillus carneus</i>	citrinine
<i>Aspergillus clavatus</i>	acide kojique, patuline, xanthociline
<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxines B1 et B2, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, acide kojique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	fumigaclavine, fumagiline, fumitoxine, fumitremorgine A et C, gliotoxine
<i>Aspergillus niger</i>	malformine, naftoquinone
<i>Aspergillus nomius</i>	aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique
<i>Aspergillus ochraceus</i>	acide kojique, acide neoaspergillique, ochratoxine, acide penicillique, acide sécalonique A
<i>Aspergillus oryzae</i>	acide cyclopiazonique, acide kojique
<i>Aspergillus parasiticus</i>	aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique, acide kojique
<i>Aspergillus sydowii</i>	stérigmatocystine, griséofulvine
<i>Aspergillus terreus</i>	citréoviridine, citrinine, gliotoxine, patuline, terréine, acide terréique, terrétonine, territrem, terramide A
<i>Aspergillus versicolor</i>	stérigmatocystine
<i>Aspergillus wentii</i>	acide kojique

4.5.1.2. Importance du genre *Aspergillus* :

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la fermentation de divers substrats et la production d'enzymes ou d'acides organiques : - *Aspergillus awamori*, agent lipolytique d'oléagineux, est utilisé fréquemment au Japon pour la fermentation alcoolique. - *Aspergillus niger* est utilisé dans les processus biotechnologiques pour la synthèse de différents acides comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes : alpha-amylase, beta-glucanase, catalase, glucose oxydase, lipase, pectinase, polygalacturonase. - *Aspergillus oryzae* est utilisé, dans les pays asiatiques, pour la fabrication de produits fermentés à base de soja. Il est utilisé aussi dans des processus biotechnologiques 35 pour la production de certaines enzymes comme : alpha-amylase, beta-glucanase, lipase (Botton et al., 1990).

Aspergillus terreus est un agent important d'aspergilloses pulmonaires et cérébrales chez les patients immunodéficients ; il est souvent isolé des expectorations chez les patients atteints de mucoviscidose (Baculard et Tournier, 1995 ; Khan et al., 1999) ; c'est aussi une espèce fréquemment isolée dans des prélèvements de peau et de phanères. Il est considéré comme le principal agent d'onychomycoses (Morin, 1994).

A. terreus, a été sélectionnée pour la biosynthèse des AgNP en raison de la réaction rapide. Après l'addition de la solution d'ion d'argent 1mM, la couleur du jaune a été changée en brun. Ce qui indique la formation de particules d'argent colloïdal et la variation de couleur est dû à l'excitation des vibrations de plasma de surface, typiques des AgNP. Le contrôle n'a montré aucun changement dans la couleur du mélange. Donc, cela a été sélectionné pour la production d'AgNP et des études de caractérisation. (Biosynthèse extracellulaire des nanoparticules d'argent par les champignons endophytes *Aspergillus terreus* et son activité anti dermatophyse G. Sathiya et al., 2013).

5. La fusariose vasculaire du palmier dattier (Bayoud) :

Le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) causée par un champignon d'origine tellurique *Fusarium oxysporum* fsp *albedinis* (Killian et Maire 1930), est la maladie la plus destructive et la plus menaçante dans l'Afrique du nord. Elle est répandue surtout au Maroc et dans une grande partie des palmeraies de l'Algérie (Pereau Leroy 1958 ; Djerbi 1982 ; Brac et Benkhalifa 1991). En effet, au cours d'un siècle, il a détruit plus de dix millions de palmiers au Maroc (Pereau – Leroy 1958, Sedra 2005) et trois millions en Algérie (Dejerbi 1982a, Sedra 2005). Ces dernières années, la maladie a été découverte aussi dans les palmeraies d'Adrar et Tagant en Mauritanie (Sedra 1995, 1999 a, et b, 2003). La catastrophe causée par le Bayoud ne s'arrête pas à l'érosion génétique causée par la disparition de nombreuses variétés parmi les meilleures, mais conduit également à l'accentuation de la désertification et à l'appauvrissement des phoeniculteurs qui finissent par émigrer. Par ailleurs, le Bayoud constitue un véritable fléau des zones phoenicicoles d'une partie de l'Afrique du Nord et aussi une menace potentielle pour la Tunisie et les autres pays producteurs de dattes. (Figure 6).

La lutte contre la maladie de Bayoud est un défi qui a longtemps préoccupé les agriculteurs des zones du sud, utilisant différentes méthodes traditionnelles allant jusqu'à la brûlure des arbres infectés. La meilleure solution consiste à protéger les palmeraies saines en empêchant leur contamination par les palmeraies infectées. Cette mesure a donné des résultats satisfaisants dans les palmeraies Tunisiennes, où la variété Deglat-Nour sensible au Bayoud a pu être, jusqu'ici, protégée (Rhouma, 1996).



A



B

Figure 6: symptômes de Bayoud sur palmier dattier (Djerbi,1990) A :dessèchement d'un coté de folioles. B : mort d'arbre

6. La fusariose vasculaire de la tomate :

La fusariose vasculaire de la tomate est une maladie mortelle (*Fusarium wilt*) causée par *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*. Elle affecte la tomate en plein champs ou sous serre (Bouhot et al .1972).

Ce pathogène est un champignon tellurique doté d'une spécificité stricte d'hôtes. Il est capable d'envahir l'ensemble du système vasculaire de la plante provoque ainsi son

obstruction et par la suite l'affaiblissement de la plante qui finit par mourir (Snissi et *al.*, 2006) (Figure 7).

Plusieurs moyens de lutte ont été appliqués contre la fusariose vasculaire de la tomate, le moyen préventif consiste à éliminer des débris végétaux et mauvaises herbes, désinfection des engins et outils de travail qui peuvent héberger le pathogène. Le moyen chimique tel que les fongicides systémiques ont montré un effet sensible sur la maladie, cependant, la migration en profondeur de pathogène montre leur limite d'action. L'utilisation des variétés hybrides ou résistants et le greffage des variétés sensibles sur des portes greffes résistants n'ont pas donné de grandes satisfactions du fait de la mutation et de l'apparition de nouvelles races parfois très virulentes (Bouhot, 1978).

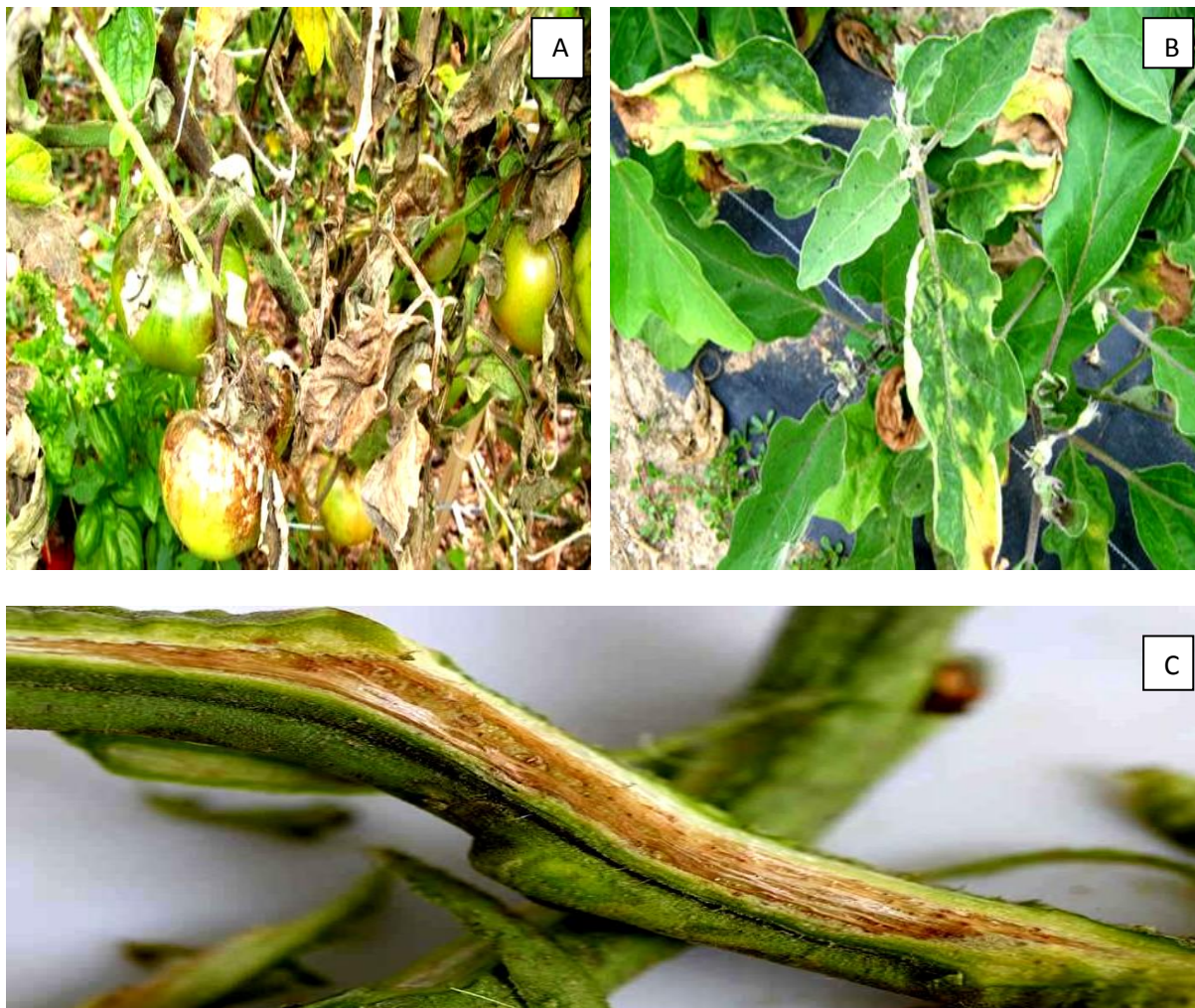


Figure 8 : symptômes de fusariose sur tomate (Cynthia, 2011) A : Dessèchement et mort des feuilles. B : Flétrissement et jaunissement des feuilles C : Brunissement longitudinale de la tige

Matériel et méthode :

Le but de notre travail est de déterminer l'effet antagoniste *in vitro* de quatre souches fongiques endophytes contre deux souches de champignons pathogènes ; il s'agit de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* agent causale de la fusariose vasculaire de palmier dattier et *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* agent causale de la fusariose vasculaire de la tomate. Cet effet à été mis en évidence à travers la production de quelques métabolites secondaires produits par les champignons endophytes (l'HCN et les antibiotiques).

1 : Matériel fongique

1.1- Agents phytopathogènes

Les agents phytopathogènes utilisés dans la présente étude provenant de la collection du laboratoire de phytopathologie (département de biotechnologie faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Blida 1). Une souche locale de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, isolée à partir des racines de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) d'Algérie et une souche de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* isolée à partir de la tomate provenant de laboratoire de phytopathologie de Belgique. (Tableau4), (figure 8).

Tableau 4 : Origine des souches pathogènes testées :

Souches	Origine végétale	Provenance
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i> (F.o.a.)	Palmier dattier	Laboratoire de phytopathologie d'Université de Blida
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i> (F.o.l.)	Tomate	Laboratoire de phytopathologie d'Université (Belgique)

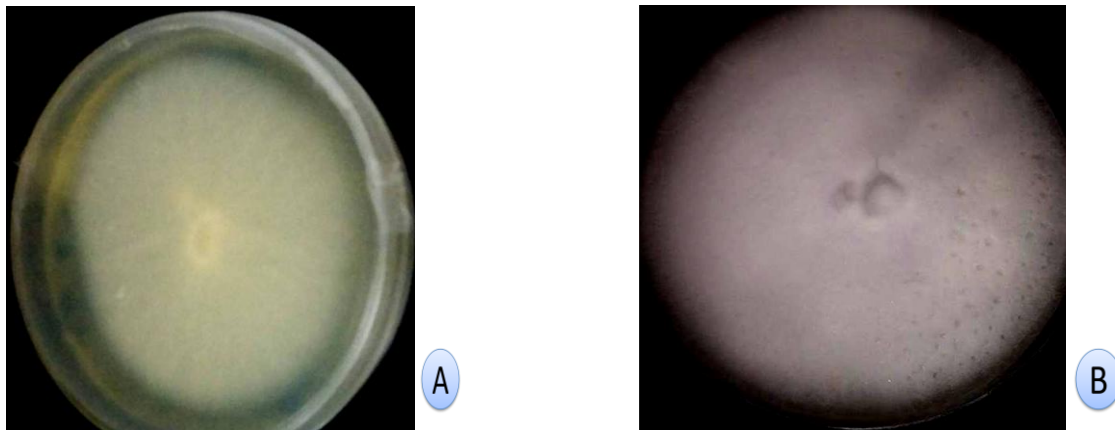


Figure 8 : Souches pathogènes utilisées. A : *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*. B : *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*

1.2 Agent antagonistes :

Les endophytes fongiques étudiés proviennent de la collection du laboratoire de phytopathologie provenant des racines de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) de l'Algérie et de l'Espagne. *Aspergillus terreus* est une souche locale et les trois autres sont des souches espagnoles. *Clonostachys* sp., *Beauveria bassiana* et *Trichoderma* sp. (Figure 9).

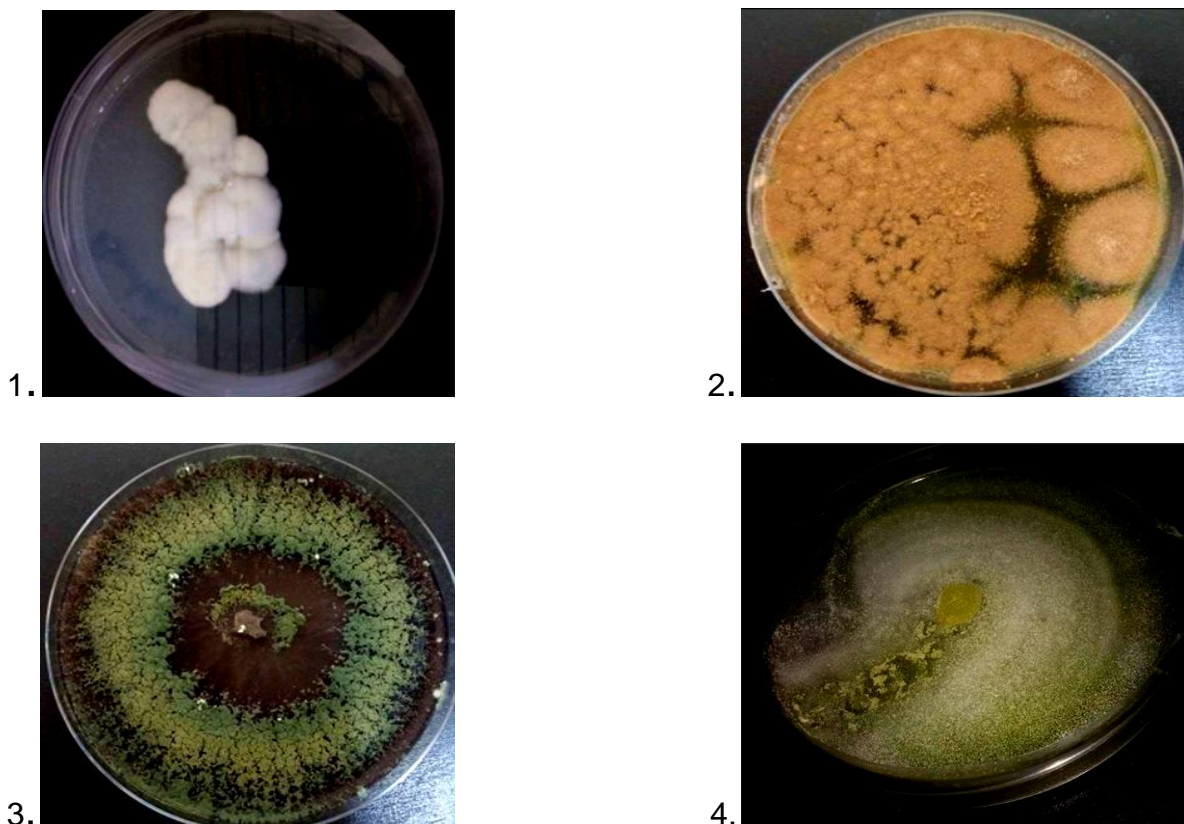


Figure 9 : Champignons endophytes utilisée 1 : *Beauveria bassiana* 2 : *Aspergillus terreus*, 3 : *Trichoderma* sp. , 4 : *Clonostachys* sp.

2. Méthodes :

2.1. Purification des souches :

La purification a été réalisée par plusieurs repiquages successive des disques mycéliens de chaque champignon dans des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé à base de pomme de terre (PDA).

2.2. Tests d'antagonisme

2.2.1. Test de confrontation directe :

L'activité antagoniste des champignons endophytes vis-à-vis de deux champignons phytopathogènes a été étudiée en utilisant la technique de la confrontation directe ou technique des cultures opposées, décrite par Sivan et Chet (1989). Cette technique consiste à co-ensemencer, dans la même boîte de Pétri, contenant un milieu PDA (Jonsthorpe et Booth, 1983) (Annexe 1), deux pastilles gélosées de 5 mm de diamètre prélevées à partir de cultures âgées de 7 à 10 jours des souches endophytes et des souches pathogènes. Les deux pastilles ont été ensemencées à 4,5 cm de distance l'une en face de l'autre et à équidistance du centre de la boîte. Les témoins sont constitués uniquement des pathogènes, cultivés seules dans la périphérie de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA, (Figure 10). Les boîtes sont par la suite incubées à l'obscurité à 25 °C pendant dix jours. La lecture des résultats consiste à mesurer le diamètre de croissance des pathogènes testés en direction de l'antagoniste au bout de 2, 4 et 6 jours après l'inoculation et qui sera comparée à celle développée par le pathogène uniquement (le témoin). Les diamètres de croissance ont été mesurés à l'aide d'une règle graduée. Le taux d'inhibition est évalué selon la méthode de (Datta et al. 2004), en utilisant la formule suivante :

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

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

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

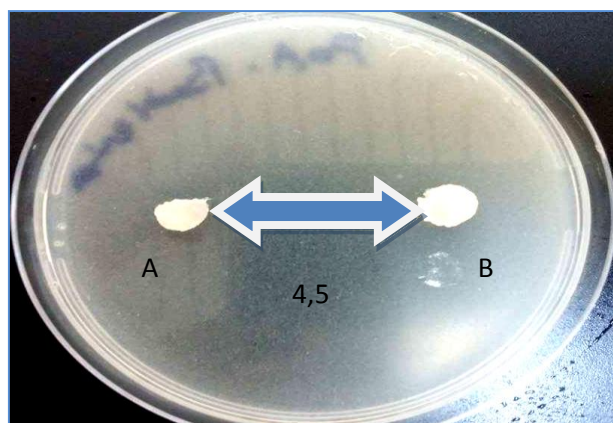


Figure 10 : Présentation de la confrontation directe entre l'antagoniste et le pathogène

A : F.o.a, B : *Beauveria bassiana*.

2.3. Test de confrontation indirecte :

2.3.1. Effet de la production de l'acide cyanhydrique (HCN) sur la croissance mycélienne des agents pathogènes testés :

La production d'HCN par les champignons endophytes a été évaluée en utilisant la méthode de Kloepper et *al.*, (1991) avec quelques modifications. Sur un milieu PDA additionné de 4,4 g/l de glycine, les disques mycéliens sont déposés. Du papier Wattman n°1 stérile saturé en picrate alcalin (2,5 g acide picrique+12,5g Na₂CO₃ dans 1 litre d'eau) est déposé dans le couvercle de la boîte de Pétri. Ces dernières sont scellées au parafilm et incubées en position inverse à 28 °C pendant 7 jours. Le virage de la couleur du jaune vers le brun clair ou rouge brun indique respectivement, une production modérée ou élevée d'HCN par le champignon producteur selon Trivedi et *al.*, (2008). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque champignon endophyte, le témoin négatif est représenté par une boîte de Pétri sans inoculum.

En déplace les couvercles des boîtes de pétri des champignons qui produisent l'HCN sur d'autres boîtes de Pétri qui contient au centre un disque mycélienne de champignon pathogène et la lecture des résultats est réalisé après 7 à 10 jours d'incubation. (Figure 11).

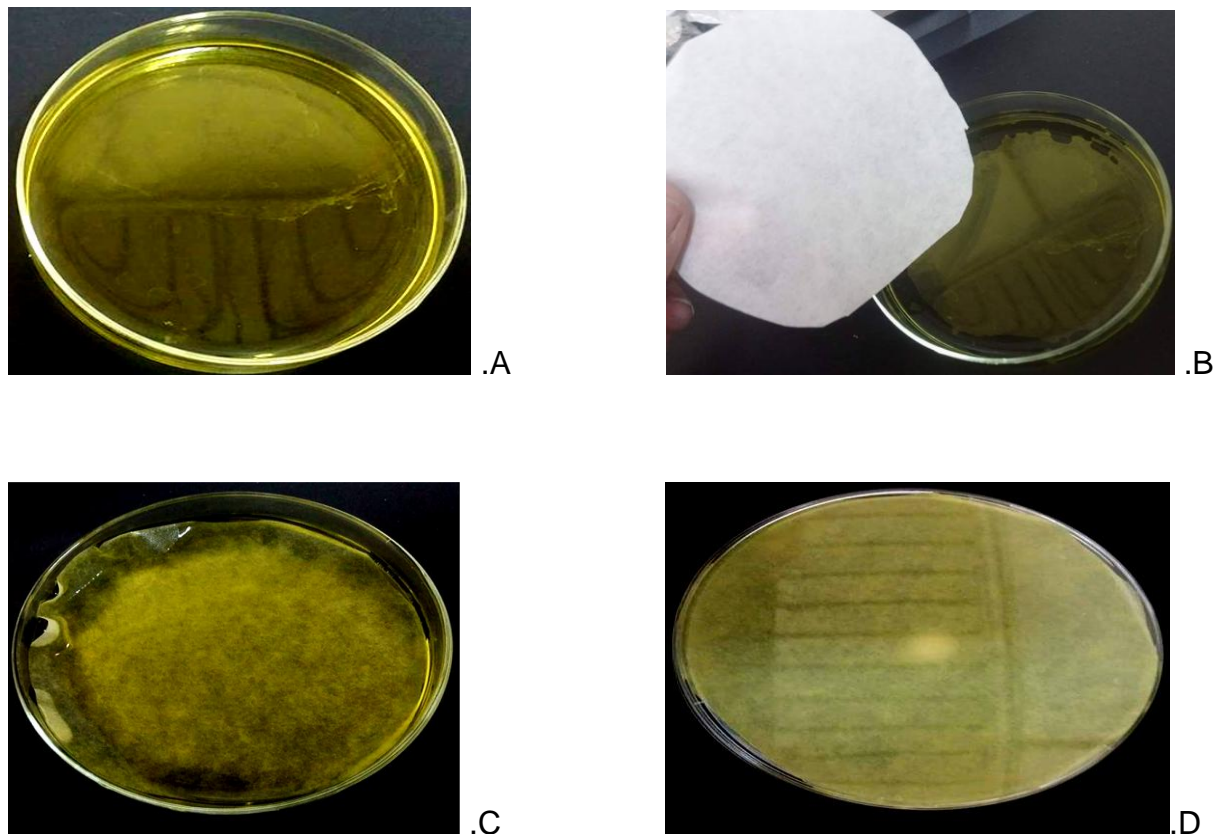


Figure 11 : la préparation de test d'HCN, A : Réactif d'HCN, B : papier Wattman n°1 stérile, C : papier Wattman saturé en picrate alcalin, D : papier Wattman saturé en picrate alcalin déposé dans le couvercle de la boîte de Pétri.

3. Effet de filtrat de culture (métabolites secondaires) sur la croissance mycélienne des pathogènes testés :

Chaque flacon contenant 200 ml du milieu PDB trois disques de chaque champignon endophyte sont déposés (*Aspergillus terreus*, *Trichoderma* sp. , *Clonostachys* sp. et *Beauveria bassiana*). Ces derniers sont fermés avec du papier aluminium et placés dans un agitateur électrique pour assurer une agitation continue pendant 10 jours. Les filtrats de cultures de *Trichoderma* sp, d'*Aspergillus terreus*, de *Clonostachys* sp. et *Beauveria bassiana* ont été récupérés par filtration sous vide en présence du papier filtre à 0,22 µm de diamètre (Figure 12). 50 ml de filtrat de culture est mélangé avec 50 ml de milieu PDA, est coulé dans des boîtes de Pétri. Après la solidification du milieu, les disques de F.o.a. et de F.o.l ont été déposés dans des boîtes séparées à raison de 3 répétitions pour chaque agent pathogène et filtrat de culture de chaque endophyte.

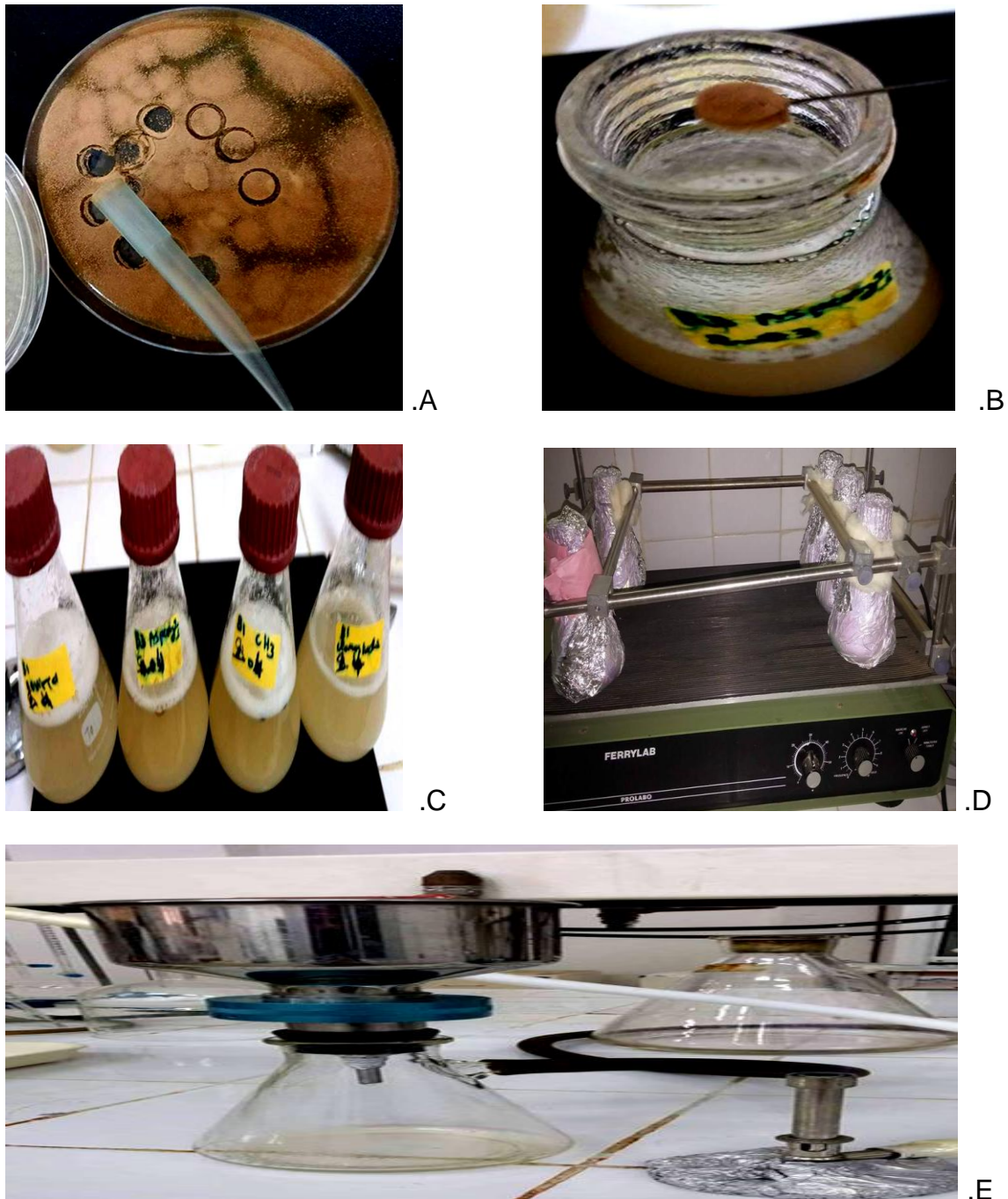


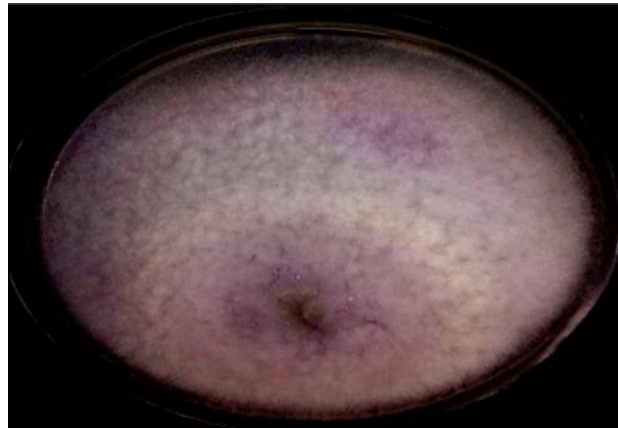
Figure 12 : test de production des métabolites secondaires. Préparation des filtrats de culture d'*Aspergillus terreus*. A : Les disques mycelien d'*Aspergillus terreus*, B : dépôt des disques d'*Aspergillus* dans le milieu PDB, C : Flacons de PDB contenant les disques myceliens de *Beauveria bassiana*, d'*Aspergillus terreus*, de *Clonostachys* sp. et *Trichoderma* sp., D : Flacons déposés dans l'Agitateur électrique, E : Appareil de Filtration sous vide.

1. Test d'antagonisme « *in vitro* » et mode d'action de *Trichoderma* sp, *Aspergillus terreus*, *Clonostachys* sp. et *Beauveria bassiana* vis-à-vis des *Fusarium* phytopathogènes

1.1. Taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en présence des champignons endophytes par l'utilisation de la méthode de confrontation directe

Après 7 jours d'incubation et une vérification après un mois, les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (pathogène-antagoniste).

Le taux d'inhibition maximum a été enregistré en présence d'*Aspergillus terreus* qui est de 66,15 % vis-à-vis de F.o.a et 60 % vis-à-vis de F.o.l. En présence de *Trichoderma* sp. Le taux d'inhibition est de 64,65 % vis-à-vis de F.o.a et de 56,92 % vis-à-vis de F.o.l respectivement. *Beauveria bassiana* a montré un taux d'inhibition proche de *Trichoderma* sp. Qui est de 64,03 % vis-à-vis de F.o.a et 53,33 % de vis-à-vis F.o.l, par contre *Clonostachys* sp. a marqué le faible taux d'inhibition qui est de 44,75 % vis-à-vis de F.o.l et 38,40 % vis-à-vis de F.o.a (Figure13 et 14), (Tableau 5).



F.o.I Témoin



F.o.I /*Trichoderma* sp.



F.o.I /*Clonostachys* sp.

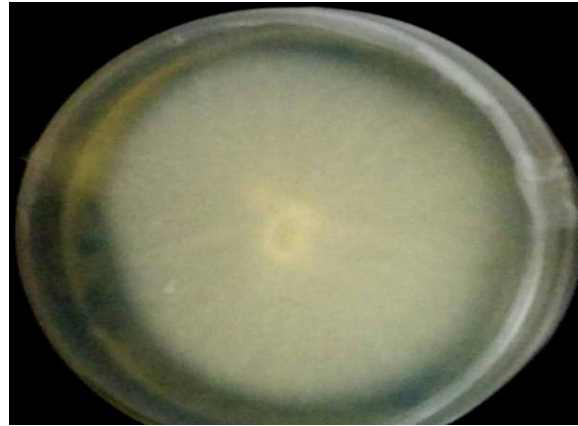


F.o.I /*Aspergillus terreus*



F.o.I /*Beauveria bassiana*

Figure 13 : Effet d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*, par confrontation directe, en présence des champignons endophytes après 6 jours d'incubation.



F.o.a Témoin

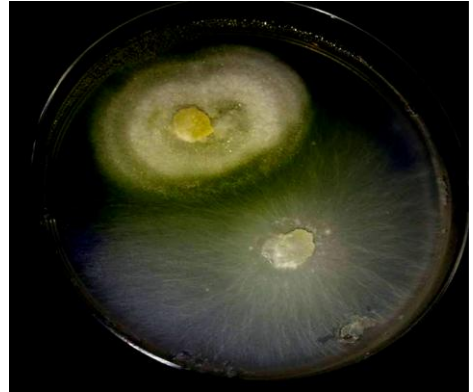
F.o.a/*Trichoderma* sp.F.o.a/*Clonostachys* sp.F.o.a/*Aspergillus terreus*F.o.a/*Beauveria bassiana*

Figure 14: Effet d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albidinis*, par confrontation directe, en présence des champignons endophytes après 6 jours d'incubation.

Tableau 5 : Taux d'inhibition (en pourcentage) de la croissance mycélienne des agents pathogènes étudiés :

Endophytes	Agents pathogènes	
	F.o.a	F.o.l
<i>Beauveria bassiana</i>	64,03	53,33
<i>Clonostachys sp.</i>	38,40	44,75
<i>Aspergillus terreus</i>	66,15	60
<i>Trichoderma sp.</i>	64,65	56,92

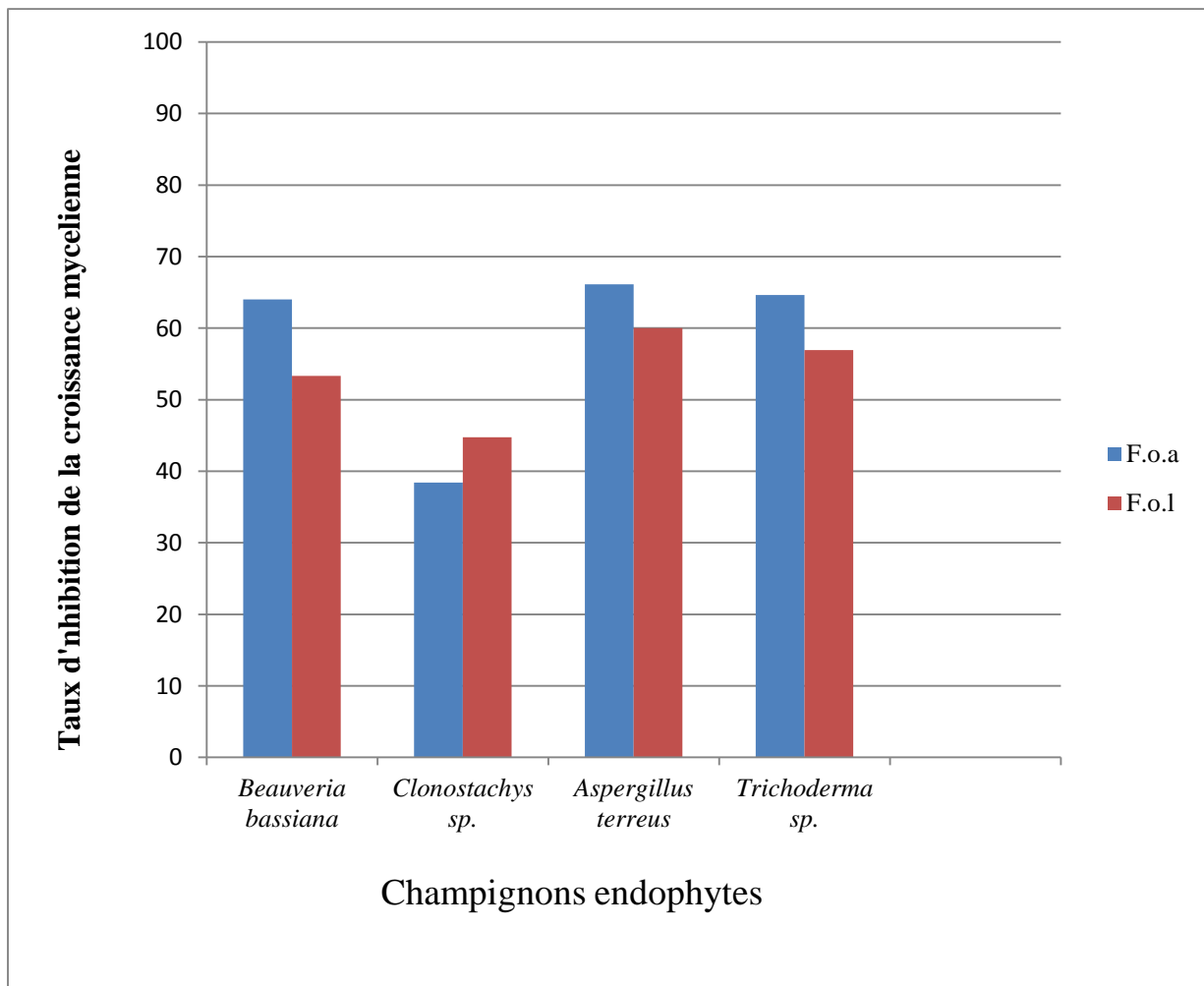


Figure 15 : Variation de pourcentage de taux d'inhibition de la croissance des agents pathogène testés.

Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins était plus importante en comparaison à ceux obtenus avec les différentes confrontations (Pathogène – Antagoniste). *Aspergillus terreus* produit un grand nombre de spores ce qui le rend plus compétitif pour d'augmenter ses caractéristiques inhibitrices. La compétition entre les microorganismes se fait également pour les nutriments et par rapport à l'espace occupé, en excréant des chélateurs spécifiques de fer-ferrique nommé sidérophores, pour mobiliser le fer et pour inhiber la croissance de d'autres microorganismes. *Aspergillus terreus* a la capacité de synthétiser des sidérophores qui est un pigment diffusible, ce dernier été observé dans le milieu de culture de nos boîtes.

Beauveria bassiana implique dans notre étude l'antibiose comme mécanisme d'action pour concurrencer les autres microorganismes, Elle produit des métabolites très toxiques.

Au delà d'une période de six jours, *Trichoderma* sp. envahisse les colonies de *Fusarium* et sporule même sur celles-ci, révélant ainsi son pouvoir hautement myco-parasitaire. L'envahissement de *Trichoderma* sp. a été rapide et intense. Il semble qu'il existe un certain tropisme qui mène les hyphes de *Trichoderma* à l'encontre des spores du parasite.

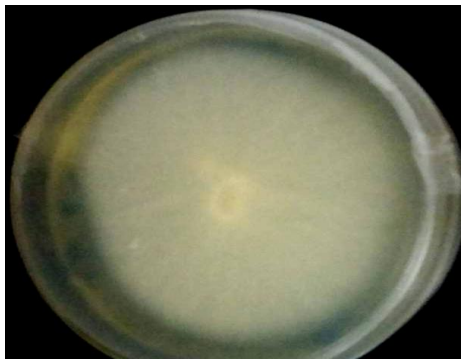
Clonostachys sp. implique le phénomène de mycoparasitisme contre les champignons pathogène étudiés F.o.a et F.o.l., l'inhibition de ces derniers se fait sans pénétration des hyphes, qui peut être considéré comme un effet de mycoparasitisme indirect.

2. Zone d'inhibition :

Après 6 jours d'incubation, les quatre souches sélectionnées ont montré une bonne activité inhibitrice vis à vis des souches pathogènes testés et ce par l'apparition d'une zone d'inhibition suivie par un arrêt de croissance pour la plus part des souches pathogènes testées. Nous constatons qu'il y a une variabilité de diamètre des zones d'inhibitions, cette variation dépend des espèces antagonistes utilisés et aussi des agents fongique étudiés.

Nous avons remarqué que parmi les quatre souches testées *Beauveria bassiana* a enregistré la meilleure zone d'inhibition qui est de 6 mm vis-à-vis de F.o.l, de 2,53 mm avec *Clonostachys* sp. vis-à-vis de F.o.a et 1,96 vis-à-vis de F.o.l. par contre on n'a pas remarqué une zone d'inhibition claire en présence d'*Aspaegillus terreus* et *Trichoderma* sp. à cause

d'envahissement complet de la boîte par le mycélium de ces derniers (Tableau 6), (Figure 16 et 17).



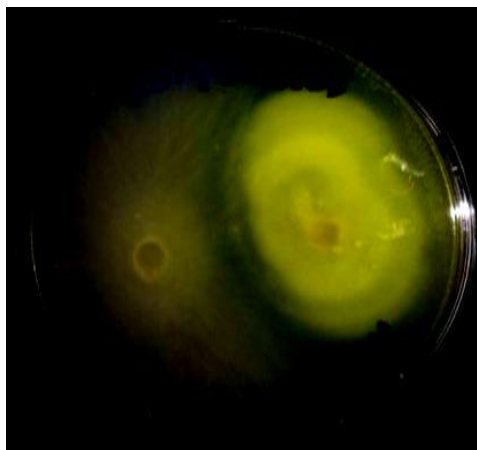
F.o.a Témoin



F.o.a/*Aspergillus terreus*



F.o.a/*Beauveria bassiana*

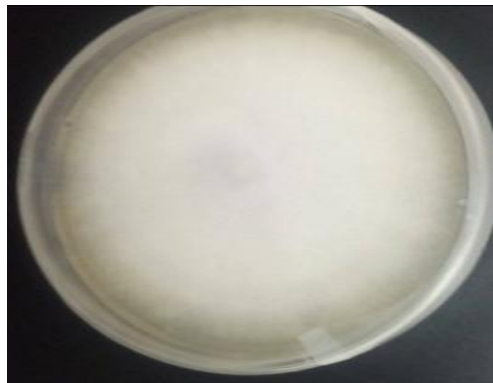


F.o.a/*Clonostachys* sp.



F.o.a/*Trichoderma* sp.

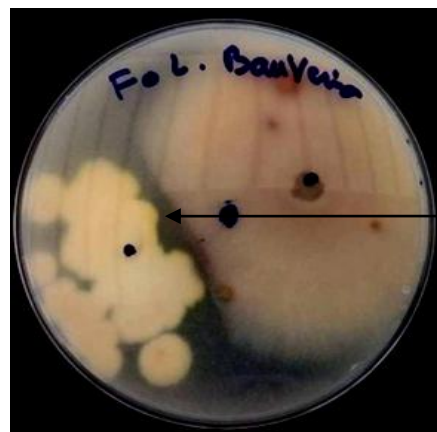
Figure 16 : Zone d'inhibition exercée par les champignons endophytes à l'encontre de F.o.a.



F.o.l / Témoin



F.o.l./*Aspergillus terreus*



F.o.l / *Beauveria bassiana*



F.o.l./*Clonostachys* sp.



F.o.l/ *Trichoderma* sp.

Figure 17 : Zone d'inhibition exercée par les champignons endophytes à l'encontre de F.o.l.

Tableau 6: Zones d'inhibition (en mm) exercées par les endophytes contre les agents pathogènes testés.

Champignons endophytes	Agent pathogènes	
	F.o.l	F .o.a
<i>Beauveria bassiana</i>	6	0
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0
<i>Trichoderma sp.</i>	0	0
<i>Clonostachys sp.</i>	1,96	2,53

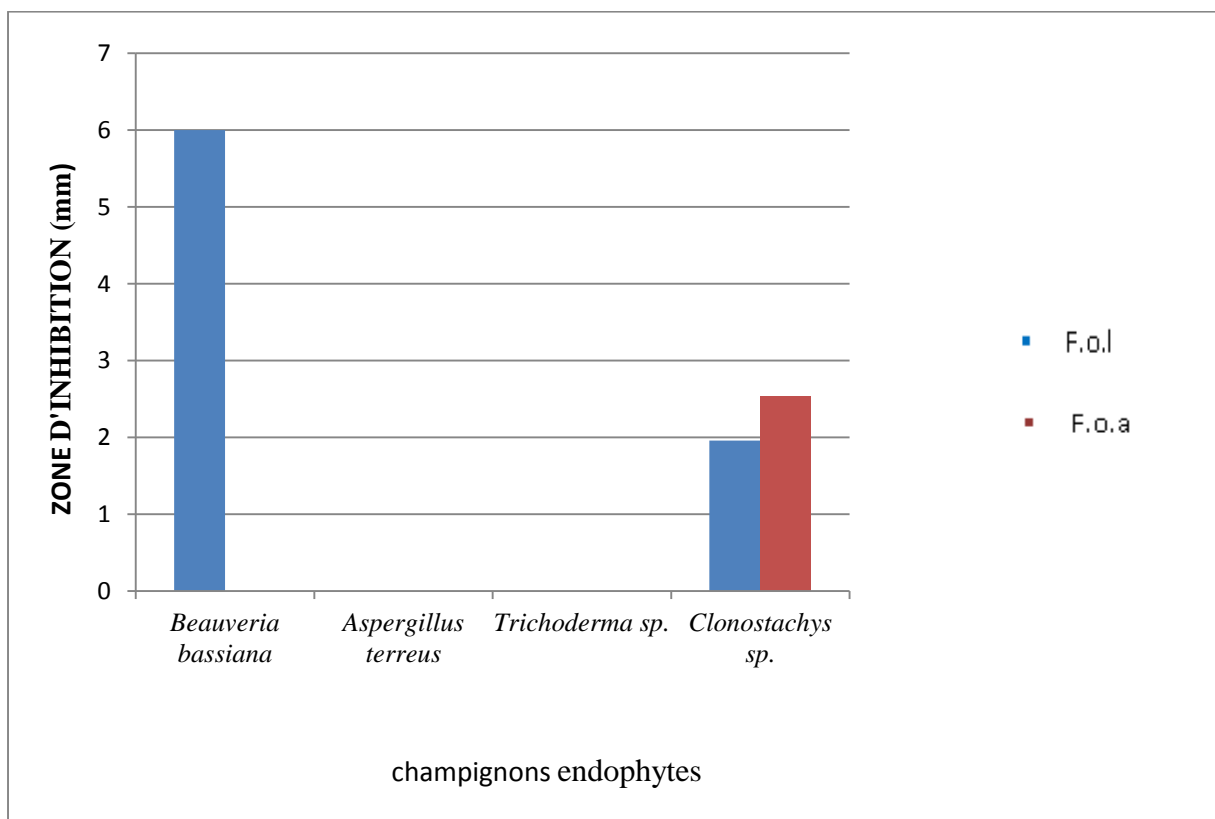


Figure 18 : Variation des zones d'inhibition exercées par les endophytes contre les agents pathogènes testés.

3. Confrontation indirect : effet de l'HCN sur la croissance des agents pathogènes étudiés :

La production d'HCN par les champignons endophytes est testée sur le milieu PDA additionné de la glycine, ce composé joue un rôle majeur dans la production de l'HCN par les microorganismes. Les deux champignons *Beauveria bassiana* et *Aspergillus terreus* ont été capables de produire l'HCN contrairement aux autres souches endophytes étudiées. La production de l'HCN par *Beauveria bassiana* est indiquée par le virage de la couleur du papier Wattman du jaune vers l'orange foncé et par le virage de la couleur de ce papier du jaune vers le marron ou brune pour *Aspergillus terreus* (Figure 19).

L'effet de l'HCN sur la diminution de la croissance mycélienne des champignons pathogènes testés F.o.a et F.o.l par rapport aux témoins respectifs, est bien remarqué dans cette étude. En présence de l'HCN secrété par *Aspergillus terreus*, on a observé une diminution de la croissance de F.o.l, avec un diamètre de 4 cm et 8 cm avec F.o.a. En présence de l'HCN de *Beauveria bassiana*, le diamètre était de 4,1 cm avec F.o.a et de 4,5 cm avec F.o.l, comparativement avec les témoins qui étaient de 8,5 cm et 9 cm pour F.o.a. et F.o.l., respectivement (Tableau 7) (Figure 20).

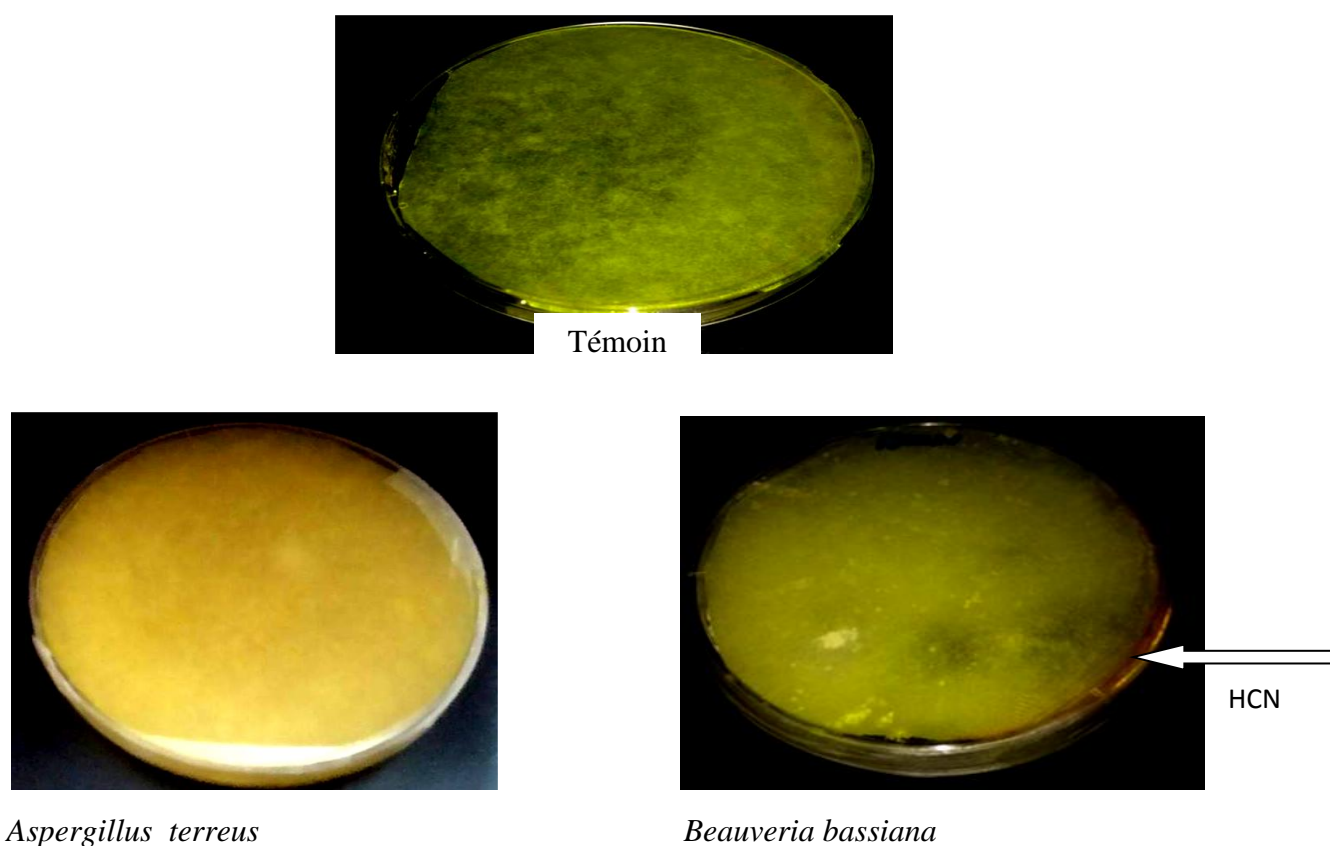
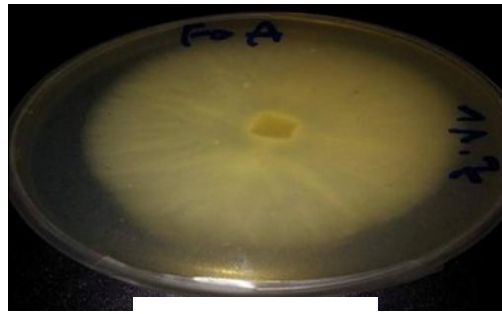
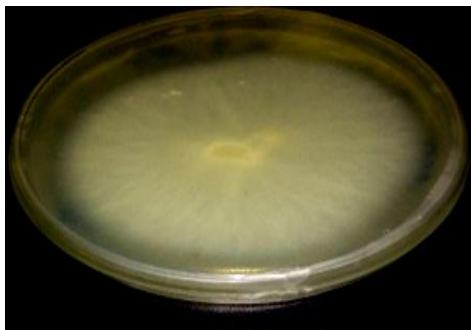


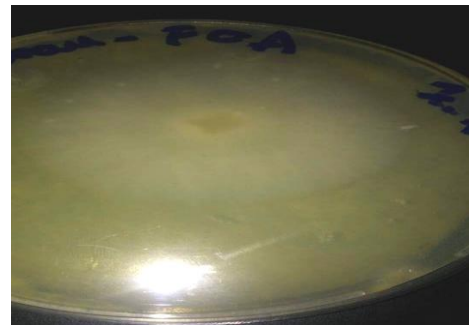
Figure 19 : Production d'HCN par les champignons endophytes testés.



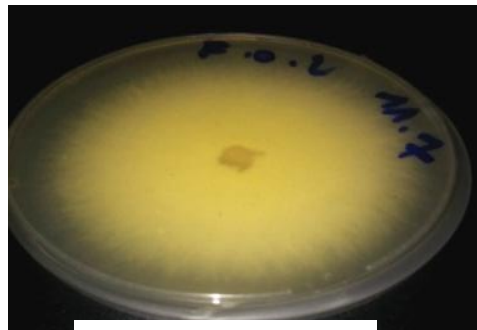
F.o.a Témoin



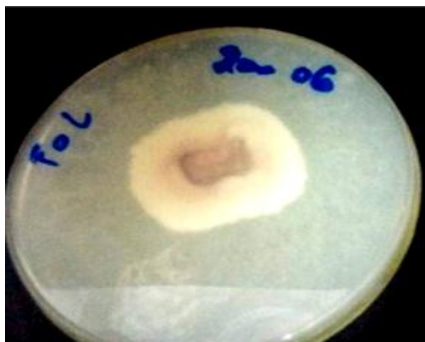
F.o.a /*Aspergillus*



F.o.a /*Beauveria bassiana*



F.o.l Témoin



F.o.l /*Aspergillus terreus*



F.o.l /*Beauveria bassiana*

Figure 20: Effet de l'HCN sur la croissance des champignons pathogènes (F.o.a et F.o.l)

Tableau 7: Effet de l’HCN sur la croissance des champignons pathogènes (F.o.a et F.o.l)

Champignons testés	Diamètre de croissance	
	F.o.a	F.o.l
<i>Aspergillus terreus</i>	8	4
<i>Beauveria bassiana</i>	4,1	4,5
F.o.a	8,5	-
F.o.l	-	9

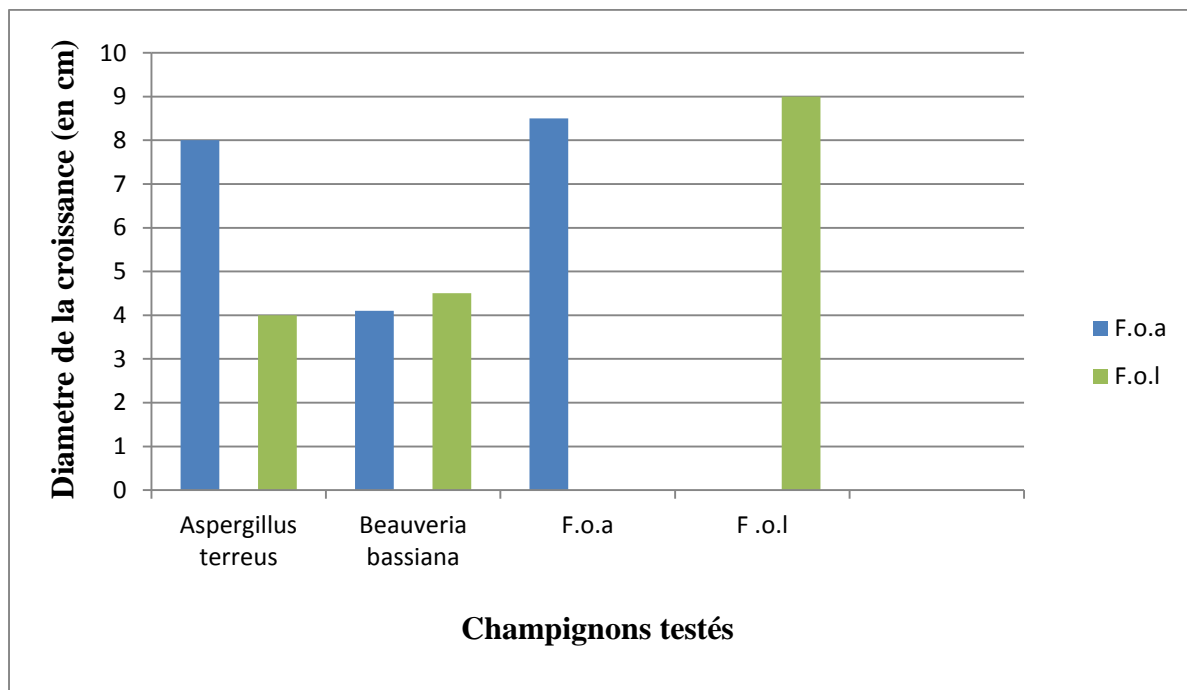
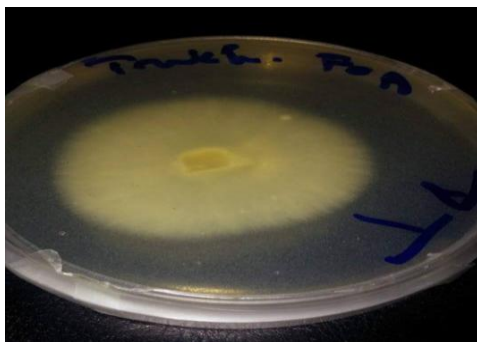
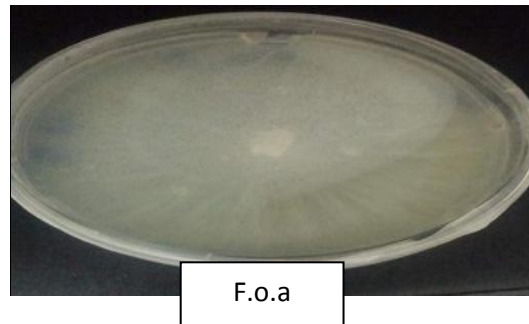


Figure 21 : Effet de l’HCN sur la croissance des champignons pathogènes (F.o.a et F.o.l)

4. Effets de filtrats de culture (métabolites secondaires) des champignons endophytes sur la croissance des agents pathogènes :

Nous avons remarqué en présence de filtrats de cultures des endophytes, une diminution de la croissance de F.o.a et de F.o.l par rapport aux témoins respectifs qui était de 8,5 cm pour F.o.a. et 9,3 cm pour F.o.l. En présence de filtrat de culture d’*Aspergillus terreus*

le diamètre de croissance de F.o.a était 6 cm et 7,5 cm pour F.o.l. Le filtrat de culture de *Trichoderma* sp. a exercé un diamètre de F.o.a de 6,8 cmet 6,2 pour F.o.l. Le diamètre de croissanc de F.o.l était de 6 cm et de 7,5 pour F.o.a en présence de filtrat de culture de *Beauveria bassiana*. et avec le filtrat de culture de *Clonostachys* sp. a influencé la croissance de F.o.a dont le diamètre était de 7 cm et de 6,7 cm pour F.o.l (Tableau 8 et 9) (Figure 22, 23 et 24).



F.o.a / *Trichoderma* sp.



F.o.a / *Clonostachys* sp.



F.o.a / *Beauveria bassiana*

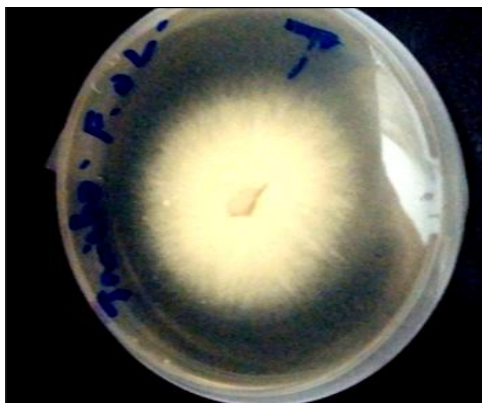


F.o.a / *Aspergillus terreus*

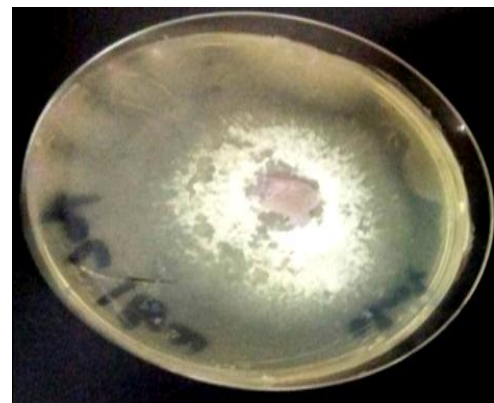
Figure 22 : Croissance des F.o.a sur le milieu PDA en présence de filtrats de culture des champignons endophytes.



F.o.l Témoin



F.o.l / *Trichoderma* sp.



F.o.l / *Beauveria bassiana*



F.o.l / *Clonostachys* sp.



F.o.l / *Aspergillus terreus*

Figure 23 : Croissance de F.o.l sur le milieu PDA en présence de filtrats de culture des champignons endophytes.

Tableau 8: Croissance de F.o.l sur le milieu PDA en présence de filtrats de culture des champignons endophytes.

Champignons testés	Diamètre de croissance de F.o.a (en cm)
<i>Aspergillus terreus</i>	6
<i>Trichoderma</i> sp.	6,8
<i>Beauveria bassiana</i>	7,5
<i>Clonostachys</i> sp.	7
F.o.a	8,5

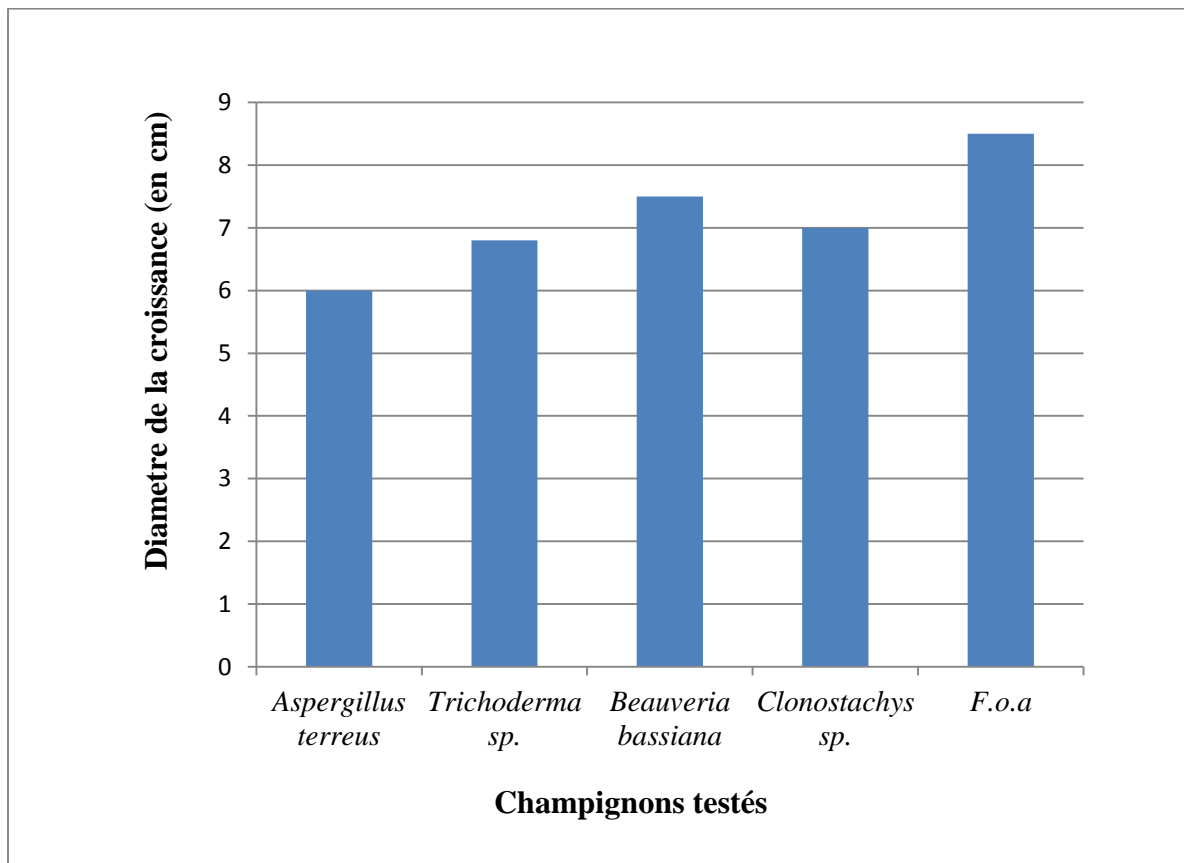
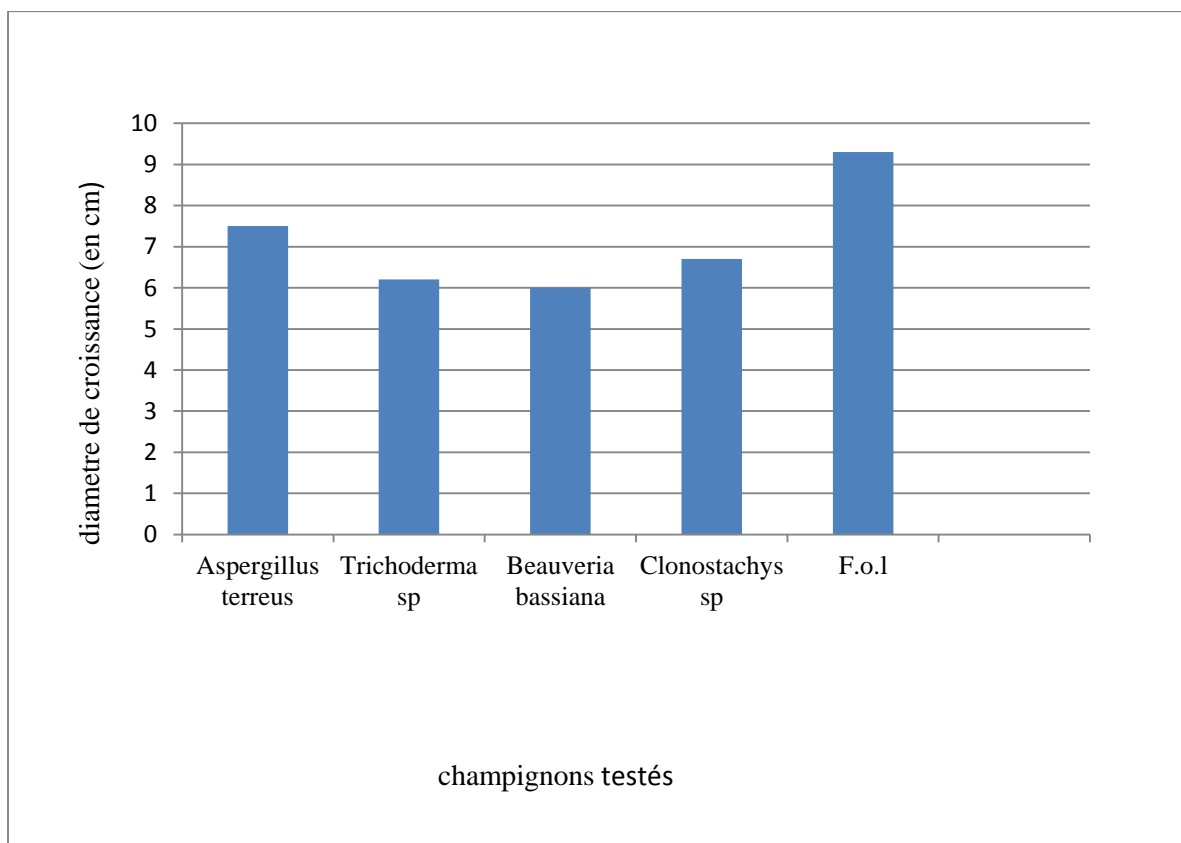


Figure 24: Diamètre de la croissance de F.o.a sur le milieu PDA en présence de filtrats de cultures des champignons endophytes.

Tableau 9 Taux de croissance de F.o.l sur un milieu PDA en présence de filtrats de cultures des champignons endophytes

Champignons testés	Diamètre de croissance de F.o.l (en cm)
<i>Aspergillus terreus</i>	7,5
<i>Trichoderma</i> sp.	6,2
<i>Beauveria bassiana</i>	6
<i>Clonostachys</i> sp.	6,7
F.o.l	9,3



Figur 25 : Diamètre de la croissance de F.o.l sur le milieu PDA en présence de filtrats de cultures des champignons endophytes.

5 : Discussion :

L'effet antagoniste *in vitro* de quatre souches fongiques endophytes (*Beauveria bassiana*, *Aspergillus terreus*, *Clonostachys* sp. et *Trichoderma* sp.) contre deux souches de champignons pathogènes *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*, a été mis en évidence à travers la confrontation directe des champignons pathogènes et les endophytes et la confrontation indirecte par le biais de la production de quelques métabolites secondaires produits par ces champignons endophytes (l'HCN et les antibiotiques).

Les résultats obtenus par confrontation directe ont révélé la capacité des endophytes utilisés d'inhiber la croissance mycélienne des pathogènes testés. Cette inhibition est du principalement à la compétition et l'antibiose entre les endophytes et les pathogènes.

Nos résultats montrent qu'*Aspergillus terreus* exerce la compétition comme mécanisme d'action et produit un grand nombre de spores ce qui le rend plus compétitif prouvant ses caractéristiques inhibitrices. La compétition entre les microorganismes se fait également par rapport aux nutriments et l'espace occupé en excréant des chélateurs spécifiques de fer-ferrique nommé sidérophores, pour mobiliser le fer et pour inhiber la croissance des autres microorganismes. *Aspergillus terreus* a la capacité de synthétiser des sidérophores, qui est un pigment diffusible, ce dernier a été observé dans le milieu de culture de nos boîtes.

Calvet (1989) montre qu'*Aspergillus niger*, comme d'autre espèce de ce genre inhibe la germination et le développement de *Glomus mosseae*. Des études réalisées sur *Sclerotinia sclerotiorum* montrent également que cette espèce a un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de cet champignon et qu'*Aspergillus niger* produit un grand nombre de spores ce qui le rend compétitifs et donc d'augmenter ses caractéristique inhibitrices (Dhliwayo, 2008).

La compétition entre les microorganismes se fait également pour les nutriments à travers leurs capacités de synthétiser des sidérophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le Fe^{3+} , en s'appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère, les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. *Aspergillus*

terreus inhibe, *in vitro*, la croissance des agents phytopathogènes telluriques sur un milieu pauvre en fer, et sont même capable d'utiliser des sidérophores hétérologues.

Plusieurs chercheurs ont montré que les genres *Penicillium* et *Aspergillus* ont la capacité de synthétiser des siderophores, ces derniers ont été isolé à partir de ces deux champignons, Goutam(1999) a isolé des sidérophores à partir d'*Aspergillus niger* AN 27 et a fait l'hypothèse que ces molécules permettent farouchement la compétition pour l'acquisition du fer.

Nos résultats montrent la capacité d'*Aspergillus terreus* de synthétiser l'acide cyanhydrique. Bien que ce composé soit un inhibiteur métabolique général, il est excrété comme moyen de prédation ou de compétition (Heydari et *al.*, 2008). Toutefois, la majorité des souches isolées ne possèdent pas la capacité de produire de l'HCN. Ceci peut être expliqué par l'absence des gènes (HCN) responsables de la production de ce métabolite (Laville et *al.*, 1998), ou bien de celle d'un précurseur adéquat utilisé. En plus de la glycine comme précurseur, d'autres composés peuvent être utilisés tels que le glutamate ou la méthionine (Castric, 1977; Curl et Truelove, 1986). La production d'HCN par *Aspergillus terreus* est en partie responsable de ses capacités de bio contrôle.

Dans cette étude, plusieurs métabolites et plus spécialement les antibiotiques sont produits par *Aspergillus terreus* et qui jouent un rôle important dans l'inhibition des agents phytopathogènes.

De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines (Pitt, 2000). *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* sont les principaux producteurs d'aflatoxines. L'aflatoxine B1 est classée comme cancérigène chez l'homme et l'animal (IARC, 1993).

Dans nos résultats l'inhibition de la croissance mycélienne des pathogénies a été également observé en présence de *Beauveria bassiana*, qui est un champignon très utilisé dans le contrôle biologique des phytopathogènes. Bing et Lewis (1991); Renwick et *al.*, (1991) ont montré que *Beauveria bassiana* est parmi les 1800 microorganismes efficaces dans le biocontrôle de piétin échaudage de blé. Ce champignon est prouvé aussi comme efficace dans des études *in vitro* à l'encontre de *Fusarium oxysporum* (Reisenzein et Tiefenbrunner, 1997; Bark et *al.*, 1996) *Botrytis cinerea* (Bark et *al.*, 1996) et *Rhizoctonia solani* (Lee et

al.,1999). L'activité antagoniste de cet endophytes a été également étudiée à l'égard de *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfecturn*, agent causal de flétrissement du coton et le test de double culture montre que l'inhibition de *F. oxysporum* f.sp *vasinfecturn* par *Beauveria bassiana* est associée à la compétition pour la nutrition et l'espace (Sheng-li et li, 2010).

Une zone d'inhibition très claire a été observée entre les agents pathogènes et *Beauveria bassiana*, cela pourrait être causé par des antibiotiques produits par ces provoquant l'inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes testés. . Certains antibiotiques jouent un rôle dans la suppression de la maladie soit par l'inhibition de la germination des spores, ou de tuer les cellules Bentiz et *al.*, 2004 ; Haggag et Mohamed, 2007).

Beauveria bassiana a la capacité aussi de synthétiser l'acide cyanhydrique utilisé comme inhibiteur métabolique contre les *Fusarium* testés La production de l'HCN par *Beauveria bassiana* est responsable de ses capacités de biocontrôle. *Beauveria bassiana* produit plusieurs métabolites pour inhiber la croissance des pathogènes testés (F.o.a et F.o.l). Cette espèce produit des métabolites très toxiques avec plusieurs propriétés comme antibactériens, antifongiques, cytotoxines tel que la beauvericine et basinoloïde (Genthnez et *al.*, Grove et Pople.,1980).

Les résultats montrent l'effet mycoparasitaire de *Clonostachys* sp. vis-à-vis des deux champignons *F.o.a* et *F.o.l*, par l'apparition d'une zone d'inhibition très claire, qui pourrait être dû aux enzymes produits par cet antagoniste fongique. Des expériences similaires sur *Rhizoctonia solani* montrent que les champignons endophytes *Choiromyces aboriginum*, et *Stachybotrys elegans* ont le même mode d'action (mycoparasitisme). Ces deux endophytes produisent des enzymes capables de dégrader la chitine et la B-1,3 glucane, deux principaux composée de la paroi cellulaire des nombreux champignons pathogènes. La présence de la chitine de la paroi cellulaire chez *Rhizoctonia solani*, stimulent les deux endophytes à produire des quantités significatives de chitinases et B-1,3 glucanase, qui sont des enzymes lytiques clés de la lyse des paroi cellulaire des champignon supérieurs (Ronghua et *al.*, 2009). Ces enzymes sont produits par d'autre organismes qui sont connus par leur attaque et parasitisme sur d'autres champignons (Gaort *al.*, 2005 : Mucha et *al.*,2006).

De nombreuses souches de *Clonostachys* sp. sont des antagonistes très efficaces contre plusieurs champignons pathogènes des plantes, comme par exemple *Botrytis cinerea* qui attaque la fraise, la framboise et la tomate (Sutton et al., 1997).

Le filtrat de culture (métabolites secondaires) de *Clonostachys* sp. A exercé une diminution de la croissance des *Fusarium*. Ces résultats indiquent que cet endophyte a produit des métabolites secondaires autre que l'HCN.

Clonostachys sp. a été testé avec succès comme agent de lutte biologique contre divers pathogènes des plantes, y compris *S. sclerotiorum* (Ervio et al., 1994) *Verticillium* (Keinath et al., 1991) et plusieurs espèces de *Botrytis* (James et Sutton, 1996). Hamel et Samet, (2010) ont montré que *Clonostachys* sp. est un antagoniste très efficace contre trois agents pathogènes telluriques (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* et *F. oxysporum* f.sp. *Lycopersici* et *Gaeumanomyces* var. *tritici*) et son effet a été remarquable par l'application du phénomène de mycoparasitisme.

Nos résultats montrent qu'au bout de quatre jours d'incubation, la boîte de Pétri est totalement envahie par *Trichoderma* sp. alors que les souches de pathogènes n'occupent qu'une surface variant de 1 à 2 cm de diamètre, ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne supérieure à 50 %. Le témoin des souches pathogènes cultivé seul, occupe une surface variant de 8 à 9 cm de diamètre. En effet, le calcul du taux d'inhibition montre que les souches de pathogènes sont inhibées à plus de 60 %.

L'activité mycoparasitaire de *Trichoderma* sp. contre les sclérotés des champignons phytopathogènes est considérée comme un outil puissant pour la lutte biologique, puisque ces structures végétatives, très résistantes, représentent la forme de survie primaire du pathogène dans le sol (Fang et al. 2005, St Leger et Wang 2010, Sandhu et al. 2012).

La compétition, qui se manifeste par l'aptitude de l'antagoniste à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes, cette action est observée par la technique de confrontation sur milieu gélosé, où le *Trichoderma* sp colonise le milieu de culture en le épuisant en éléments nutritifs (Alabouvette et al., 1983 ; Dubot, 1985 ; Davet, 1996). Plusieurs chercheurs ont analysé microscopiquement la zone de contact entre l'agent pathogène et l'antagoniste pendant le test d'antagonisme par confrontation directe et un enchevêtrement est observé et qui se manifeste par la destruction de l'agent pathogène lorsque les hyphes de *Trichoderma* sp. s'enroule autour

de celui-ci, en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur et l'action d'antibiose se manifeste par l'injection des substances (enzymes ou antibiotiques) qui détruisent le mycélium du pathogène (Daami-Remadi et El Mahjoub, 2001 ; Howell, 2003 ; Fang et *al.*, 2005 ; St Leger et Wang 2010 ; Sandhu et *al.*, 2012).

L'envahissement du mycélium du pathogène par les hyphes de *Trichoderma* sp. a été également observé par Benhamou et Chet (1997) en réalisant une confrontation directe sur milieu de culture entre cet antagoniste et un autre champignon tellurique, *Pythium ultimum* et ce, au bout de quatre à cinq jours après l'inoculation. D'après Davet, (1983) et Meslouhi, (1989), cette action inhibitrice est due à des substances de nature chimique libérées par les souches de *Trichoderma* (phénomène d'antibiose). Les souches de *Tricodarma* sp. produit des métabolites secondaires qui inhibent la croissance mycelienne des champignons pathogènes testés.

La production de métabolites secondaires par différentes espèces de *Trichoderma* sp. est bien documentée. Il a été rapporté que *Trichoderma* sp. produire une large gamme de substances volatiles et non volatiles (Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998 ; Vyas et Mathur, 2002).

La capacité à produire de telles substances varie selon les isolats d'une même espèce ou d'espèce différente. En plus de son action parasitaire, *Trichoderma* sp se développe plus rapidement par rapport au pathogènes en colonisant le milieu nutritif et en ravissant les éléments nutritifs, c'est le phénomène de compétition (Alabouvette et *al.*, 1983 ; Dubot, 1985 ; Davet, 1996).

L'abondance de *Trichoderma* sp. dans les écosystèmes est due à leur production élevée d'enzymes hydrolytiques et leur action mycoparasitaire, basé sur la sécrétion d'un ensemble complexe d'enzymes dégradant la paroi cellulaire de divers hôtes (Calistru et *al.*, 1997; Eziashi et *al.*, 2006; Reino et *al.*, 2008). Un système multi-enzymatique important a été décrit chez les espèces de *Trichoderma* sp.: les chitinases (De la Cruz et *al.*, 1992), β -1,3-glucanases (De la Cruz et *al.*, 1995; Lorito et *al.*, 1994; Noronha et Ulhoa, 1996), β -1,6-glucanases (De la Cruz et *al.*, 1995; De la Cruz et Llobell, 1999), β -1,3- glucanases (Ait-Lahsen et *al.*, 2001) les cellulases (Castro et *al.*, 2010), et des protéases (Geremia et *al.*, 1993; Howell, 2003).

La stimulation de *Trichoderma* sp. perçoit la présence de son hôte, ses hyphes se dirigent directement vers lui par chimiotropisme. Différentes espèces peuvent suivre différents modèles d'inoculation, mais en général de ces dernières catalyse la libération des oligomères de la paroi fongique du champignon cible et à leur tour en induisant l'expression des endochitinases qui attaqueront le champignon cible avant le contact (Viterbo et al., 2002; Brunner et al., 2003). La reconnaissance, l'enroulement et l'attachement se fait par la liaison des glucides de la paroi fongique du *Trichoderma* à des lectines sur le champignon cible. Une fois que *Trichoderma* est attaché, il s'enroule autour de l'agent pathogène et forme des appressoriums contenant des concentrations élevées de solutés osmotiques tels que le glycérol (Benitez et al., 2004). La pénétration, la lyse et la production des enzymes lytiques et des peptaïboles permet l'entrée des hyphes de *Trichoderma* dans les hyphes du parasite et facilite ainsi l'assimilation du contenu cellulaire de l'hôte (Howell et al., 2003). Les espèces de *Trichoderma* sp. produisent des antibiotiques potentiels mais aussi plus de 100 métabolites avec une activité antibiotique, y compris les polykétides, les pyrones, les terpènes et les polypeptides utilisés dans la chimio-taxonomie des espèces (Keszler et al., 2008). Ghisalberti et Sivasithamparam (1991) ont classé les métabolites secondaires de *Trichoderma* sp. en trois catégories: métabolites volatils : 6 pentyl-pyrone, les ethylènes, les cynure d'hydrogène, les alcools, les aldéhydes (Vizscaino et al., 2005; Stoppacher et al., 2010). Les métabolites non volatils diffusibles : les acide Heptéolidiques ou koningiques, les trichotécènes notamment les trichodermines (Blumenthal, 2004 ; Vinale et al., 2008). Les peptaïbols (peptides acide-amino iso butyrique alcool) qui sont des oligopeptides linéaires de 12 à 22 acides aminés riche en acide α -amino isobutyrique (Degenkolb et al., 2003; Wada et Tanka, 2004 ; Benkada, 2006 ; Degenkolb et al., 2008). Compétition pour les nutriments et l'espace, la compétition pour le carbone, l'azote et d'autres facteurs de croissance, ainsi que les sites spécifique d'infections, sont utilisées par les agents de lutte biologique. *Trichoderma* sp. a une forte capacité d'utiliser et de métaboliser les nutriments du sol, qui le rend plus compétitif à de nombreux micro-organisme du sol (Benitez et al., 2004). L'espèce *T. harzianum* est capable de contrôler *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la vigne en colonisant les floraux et en éliminant le pathogène de son site d'infection (Vinale et al., 2008). Sivan et Chet (1989) ont démontré que la compétition pour les nutriments est le principal mécanisme utilisé par *T. harzianum* pour contrôler *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*.

Trichoderma sp. , *Aspergillus terreus*, *Clonostachys* sp. et *Beauveria bassiana* produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui pourraient jouer un rôle important dans l'effet antagoniste de ces micro-organismes dans le sol .Ces facteurs inhibiteurs peuvent être scindés en 4 groupes : les antibiotiques, les sidérophores, les enzymes et l'acide cyanhydrique (HCN). Ces champignons endophytes peuvent être classés dans le groupe des PGPF

Parmi les principales pathologies d'origine telluriques qui causent des pertes de production considérables des cultures, les fusarioses causées par différents agents pathogènes appartenant au genre *Fusarium oxysporum*. Le caractère épidémique de ces maladies vasculaires, l'inefficacité des méthodes de lutte chimique imposent la considération d'autres méthodes alternatives, notamment celles qui se basent sur l'exploitation des potentialités microbiennes antagonistes. Des effets d'antagonismes à l'encontre des deux pathogènes telluriques avec des endophytes racinaires est possible.

Les essais par confrontation directe à travers le test de doubles culture entre les pathogènes (*F.o.a* et *F.o.l*) et les souches endophytes ont révélé des taux d'inhibition variant entre les antagonistes et les pathogènes testés. Le taux le plus faible qui est de 38,40 % enregistré en présence de *Clonostachys* sp. vis à vis de *F.o.a* et de 44,75 % vis à vis de *F.o.l*. Le taux d'inhibition le plus élevé est évalué à l'encontre d'*Aspergillus terreus* qui est de 66,15 % vis-à-vis de *F.o.a* et 60% pour *F.o.l*. *Trichoderma* sp a envahi les colonies des pathogènes et y sporulent même au bout de six jours d'incubation présentant des taux de croissance de l'ordre de 64,65 % avec *F.o.a* et de 56,92 % avec *F.o.l* . et ce en exerçant un effet mycoparasitaire. *Beauveria bassiana* et *Clonostachys* sp inhibent la croissance mycélienne des champignons pathogènes testés avec apparition d'une zone d'inhibition très claire allant jusqu'à 6 mm en présence de *B. bassiana* et cela à cause de la production des substances inhibitrices cas des antibiotiques.

Nous avons constaté que l'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des souches antagonistes, mais aussi du pathogènes étudiés, cette variation est liée aux mécanismes d'action impliqués par les endophytes qui sont principalement la compétition pour les nutriments et l'espace, l'antibiose et le mycoparasitisme. L'effet inhibiteur des antagonistes a été constaté à l'encontre de *F.o.a*. par rapport à *F.o.l*., et cela peut être du que ces endophytes vivent dans la même niche écologique que *F.o.a*.

La production de l'HCN est observée dans ce travail chez *Aspergillus terreus* et chez *Beauveria bassiana*. La production de l'HCN par ces deux champignons antagonistes a exercé un effet inhibiteur de la croissance mycélienne des champignons pathogènes testés, dont le diamètre était inférieurs par rapport aux témoins respectifs. Les plus faibles diamètres de croissance sont observés chez *F.o.l* qui varie entre 4 cm et 4,5 cm.

Les champignons antagonistes tels qu'*Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Clonostachys* sp. et *Trichoderma* sp. Produisent des métabolites secondaires qui causent l'inhibition des agents pathogènes. La production des métabolites secondaires en présence de filtrats de cultures des endophytes, est observée par la diminution de la croissance de F.o.a et de F.o.l par rapport aux témoins respectifs, qui était de 8,5 cm pour F.o.a. et 9,3 cm pour F.o.l. En présence de filtrat de culture d'*Aspergillus terreus* le diamètre de croissance de F.o.a était de 6 cm et 7,5 cm pour F.o.l. Le filtrat de culture de *Trichoderma* sp. a exercé l'apparition d'un diamètre de F.o.a de 6,8 cm et de 6,2 cm pour F.o.l. Le diamètre de croissance de F.o.l était de 6 cm et de 7,5 pour F.o.a en présence de filtrat de culture de *Beauveria bassiana*. Le filtrat de culture de *Clonostachys* sp. a influencé la croissance de F.o.a dont le diamètre était de 7 cm et de 6,7 cm pour F.o.l

Les souches endophytes ont révélé un effet antagoniste important contre ces pathogènes. Cette efficacité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte contre les maladies d'origine tellurique et les classer parmi les PGPF. Toutefois, cette éventualité ne pourra être envisagée que si l'efficacité est observée *in vitro* est confirmé *in situ* sur les cultures de palmier dattier et la tomate.

Le contrôle biologique des plantes par les microorganismes est une alternative très prometteuse à l'utilisation prolongée de pesticides, qui sont souvent coûteux, s'accumulent dans les plantes, et ayant des effets néfastes sur l'environnement.

Perspectives : il serait intéressant de :

- Faire l'observation microscopique des zones de contact entre le pathogène et l'antagoniste pour confirmer le phénomène de mycoparasitisme surtout chez *Trichoderma* sp.
- L'application de ces endophytes sur d'autres agents fongiques.
- Purifier et identifier la nature chimique des métabolites secrétés afin de les utiliser à la place de l'antagoniste.

- **Abdellatif, L., Bouzid, S. et Vujanovic, V., 2009** endophytic hyphal compartmentalization is required for successful symbiotic ascomycota association with root cells. *Mycological research*, Volume 113, issues 6-7. P 782-791
- **Adam, A., (2008)**, « Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogène » These doctorat, université de Liège, P 194.
- **Agrios, G.N. (1988)**-Plant pathology 3rd edition. Academic press. Inc : San Diego. 803p.
- **Ahman, H., Johansson, T., Olsson, M., Punt, P.J., Van den Hondel, C.A.M.J.J. and Tunlid, A. (2002)**. Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. *Applied and Environmental Microbiology* 68 : 3408-3415.
- **Alabouvette, C (2009)** « Interaction sol-Plante-microorganismes » UMR 1229 INRA Université de Bourgogne Colloque 'Jardins, environnement et santé.
- **Alikhani, H.A., Saleh-Rastin, N. & Antoun, H. (2006)**. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant & Soil*, 287: 35-41.
- **Arnold A. E., Mejia L. C., Kylo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E. A.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003; 100**: 15649-15654.
- **Baculard A., Tournier G., (1995)**, Aspergilloses broncho-pulmonaires et mucoviscidose, *Rev. Pneumol. Clin.* 51, 159-162.
- **Bakker A. et Schippers B., 1987**. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* sp –mediated plant growth stimulation. *Soil Biol. biochem.* 19 : 451-457.
- **Baysal O., Caliskan M. et Yesilova O. 2008**. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU 07) against *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 73 :25-32.
- **Benítez T., Rincón A.M., Limón M.C. and Codón A.C. (2004)**. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249-260.
- **Bisby G.R., 1939**. *Trichoderma viride* Pers. ex Fries, and notes on *Hypocrea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 23:149-168.

Références Bibliographiques

- **Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990),** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris.
- **Bouhot, D., Rouxel . F., et Louvet. J., (1972)** » Première observation de la fusariose vasculaire de la tomate en France, « *Ann. Phytopathologie*, 412, 187-191.
- **Brac de la Perrière, R.A., Benkhalifa, A., 1991.** Progression de la fusariose du palmier dattier en Algérie. *Sécheresse*, 2 : 119-128.
- **Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Dai Y. and Wang X.** Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology* 2009; **59**: 584-592.
- **Caron J., Laverdière L., Thibodeau P.O. et Bélanger R.R., 2002.** Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection*, 83 : 73-87.
- **Caron., (2000).** « Champignons phytopathogènes du sol. » phytopathologiste Horti-protection inc .conférence lors des journées horticoles régionales à ST-Rémi. *Bull. Soc. Pharm.* 144 : 211-224.
- **Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A., (2002),** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.
- **Chabot, R., Antoun, H. & Cescas, M.P., (1996).** Growth promotion of maize and lettuce by phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant & Soil*, 184: 311-321.
- **Chaux C et Foury C. L., 1994-**Cultures légumières et marichères. légumineuses potagères, légumes fruit ; Tec et Doc Lavoisier, Paris, 563 P.
- **Chaverri P., and Samuels G.J., 2004.** *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Stud. Mycol*, 48:1-116.
- **Clay K. and Schardl C.** Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* **2002; 160 Suppl 4**: S99-S127.
- **Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. and Ait Barka E. (2005).** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles,

mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71(9)**, 4951-4959. concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology.*190: 63-68.

- **Conrath,U.,Pieterse,C.M.J.and Mauch-Mani, B.(2002)**, « Priming in plant-pathogen interactions », *Trends Plant Sci.*7,210-216.
- **Corbaz R. (1990)**. Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presse polytechniques et universitaires romandes*.
- **Corbaz R. (1990)**. Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. *Presse polytechniques et universitaires romandes*.
- **Cornia,M.B. et Beatriz, M.D., 2004**.Pathogenicity of hyphomycètes fungi against *Cyclocephala signaticollis*. *Bio-Control* 100 :1-8,2004.Kluwer Academie PubJishers.Printed in the Nethrlands.
- **Cummings N.J., Ambrose A., Braithwaite M., Bissett J., Roslan H.A., Abdullah**
- **Curl E. A. and Truelove B. (1986)**. The rhizosphere, Advanced series in agriculture sciences. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 288.
- **Daret,S.K.,Mcguire,M.RKaya,H.K.2007**.Isolation and evaluation of *Beauveria bassiana* (deuteromycotina :hyphomycetes)for the suppression of glassy-Winged sharpshooter, *homalodisca coagula ta* (homoptera :cicadellidae). *Journal of Entomological Science.* 42 :56-65.
- **Dey R., Pal K.K., Bhatt D.M. and Chauhan S.M. (2004)**. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea L.*) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbio.Res.* 159: 371-394.
- *Dictionary of the Fungi* (8 th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. p:616.
- **Dingle J. and McGee P. A.** Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita f. sp. tritici* in wheat. *Mycological Research* **2003; 107**: 310-316.
- **Djerbi, M., 1982 b.** Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control. *Date palm Journal*, 1 (2): 153-97.
- **Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003)**. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Plant Sci.* 22:107-149.
- **Dommergues Y. and Mangenot F. (1970)**. *Écologie Microbienne du sol*. Masson, Paris.

- **Douds, D.D. Jr, Nagahashi, G., Pfeffer, P.E., Kayser, W.M. & Reider, C. (2005).** On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum. *Canadian Journal of Plant Science*, 85: 15-21.
- **Dowd, P.F et Vega, F.E. 2003.** Autodissemination of *Beauveria bassiana* by Sap Beetles (Coleoptera : Nitidulidae) to Overwintering Sites ? *Biocontrol Science and Technology*. 13 : 65-75.
- **Duponnois, R. & Plenchette, C. (2003).** A mycorrhiza helper bacterium (MHB) enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza* 13: 85-91.
- **Duponnois, R. (2006).** Bacteria Helping Mycorrhiza Development. In: Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J (eds) *Microbial Activity in the Rhizosphere*. SpringerVerlag, Berlin. pp: 297-310.
- **Duponnois, R., Founoune, H., Masse, D. & Pontanier, R. (2005).** Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semi-arid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation. *Forest Ecology and Management*, 207: 351-362.
- **Elad Y ; Chet ; Boyle, P et al,** parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 1983.73 :85-88.
- **El-Tarabily K.A. (2006a).** Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-Streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can. J. Bot.* **84**, 211-222.
- **Errakhi R. (2008).** Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad, Marrakech Maroc.
- **Fenf, M.G, Chen, S et Ying, S.H. 2004.** Trials of *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* and imidacloprid for management of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera : Aleyrodidae) on greenhouse grown lettuce. *Biocontrol Science and Technology*. 14 : 531-541.
- **Fravel D.R. (1988).** Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* **43**, 337-359.

Références Bibliographiques

- **Gagné S., Antoun H. and Richard C. (1984).** Inhibition of phytopathogenic fungi by bacteria from soils and legume rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* **31(9)**, 856-860.
- **Gams W, Bissett J. 1998** .Morphology and Identification of *Trichoderma* .In: Kubicek CP.
- **Gentili, F. & Jumpponen, A. (2006).** Potential and possible uses of bacterial and fungal biofertilizers. in: Rai MK (ed) Handbook of Microbial Biofertilizers. Food Products Press. pp 1-28.
- **Glick B.R., Penrose D. and Li J. (1998).** A model for the lowering of plant ethylene
- **Glick, B ;(1995).** « the enhancement of plant growth by free-living bacteria » Journal of Microbiology 41 : 109-117.
- **Haran,S ;Scinckler ,H. ;Chet 1 1996.**molecular mechanism of lyticenzymes involved in the biocontrol activity of trichoderma harzianum.Microbiology 142 :2312_2331.
- Harman GE, editors. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor and Francis Ltd. pp. 3–34.
- **Helluy S. and Holmes J.C. (2005).** Parasitic manipulation: further considerations. *Behav. Processes.* **68**, 185-99.
- **Herman MAB, Nault BA, Smart CD. (2008).** Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop. Protect.* 27: 996-1002.
- **Hinsinger, P ; and Marschner, P. (2006)** « Rhizosphere-perspectives and challenges » a tribute to Lorenz Hiltner 12-17 september 2004-Munich,Germany. *Plant and soil* 283 :Vii-Vii.
- **Howell C.R., 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*, 87: 4–10.
- **Hyde K. D. and Soytong K.** The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* **2008** ; **33**: 163-173.
- **Inacio M. L., Silva G. H., Teles H. L., Trevisan H. C., Cavalheiro A. J., Bolzani V. S., Young M. C. M., Pfenning L. H. and Araujo A. R.** Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandiocana* Nees (Lauraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 2006; **34**: 822-824.
- **Issac S., Frankland J.C., Watling R., Whalley A.J.S. (1993).** Airworth and Bishys

Références Bibliographiques

- **J., Stewart A., Agbayani F.V., Steyaert J., Hill R.A., 2016.** Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. *Mycol Progress*, 15: 50.
- **Jarrold, E.L. et Robert W.B. 2005.** Coating *Beauveria bassiana** with lignin for protection from solar radiation and effects on pathogenicity to *Lygus lineolaris* (Heteroptera : Miridae). *Biocontrol Science and Technology*, 15 :309-320.
- **Jijakly M.H. (2003).** La lutte biologique en phytopathologie, *In : Phytopathology*. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
- **Johansson, J.F., Paul, L.R. & Finlay, R.D. (2004).** Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 48: 1-13.
- **John, C.S., Li, D. W., Peng, G. n Yu, H. and Zhang, P., 1997.** *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 81,644-648.
- **Joner, E.J. & Leyval, C. (2003).** Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science & Technology*, 37: 2371-2375.
- **Kauassi, M., Coderre, D et Todorova, S. I. 2002.** Relative Performance of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina : Monilia) and the insecticide cygon (Dimethoate) in field control of the tarnished plant bug *Legus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hemiptera : Miridae). *J Entomol Sci*, 38 : 359-367.
- **Kempe J. and Sequeira L. (1983).** Biological control of bacterial wilt of potatoes: Attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Dis.* **67**, 499-501.
- **Killian, C., Maire, R., 1930.** Le Bayoud, maladie du dattier. *Bull. Soc. Hist. Nat. Agr.*, 21: 89-101.
- **Kim H. Y., Choi G. J., Lee H. B., Lee S. W., Kim H. K., Jang K. S., Son S. W., Lee S. O., Cho K. Y., Sung N. D. and Kim J. C.** Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology* 2007; **44**: 337.
- **Lambers, H., Raven, J.A., Shaver, G.R. & Smith, S.E. (2008).** Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology & Evolution*, 23: 95-103.
- **Lepoivre P., 2003.** *Phytopathologie.*, Edition De Boeck Université rue des minimes 39, B-1000. Bruxelles, 427 P.

Références Bibliographiques

- **Leyval, C. & Joner, E.J. (2001).** Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. in: Trace elements in the rhizosphere. CRC Press. pp 165-185.
- **Li J. Y., Strobel G. A., Harper J. K., Lobkovsky E. and Cllardy J.** Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Organic letters* **2000**; **2**: 767-770.
- **Li,G. Q., Huang,H.C.,Achrya,S.N.et Erickson,R.S.(2004).**Plant Dis.88,1246-1251.
- **Liu C. H., Zou W. X., Lu H. and Tan R. X.** Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology* **2001** ; **88**: 277-282.
- **Liu,H et Bauer,L.S. 2008 a.** Microbial control of emerald ash borer,*Agrilus planipennis* (Coleoptera : Buprestidae) with *Beal /veria bassiana strain GHA* :Green house and field trials-Biological control.45 :124-132.
- **Liu,H.,Skinner,M. et Parker,B.L.2003.** Bioassay method for assessing the virulence of *Beauveria bassiana* against tarnished plant bug,*Lygus lineolaris* (Hem,Miridae). *App .,Entomol.*127 :299-304.
- **Luz,c ,Tigano ,M.S.,Silva,1.0., Cordeiro,C.M.et Salah,M.A.1989.**Selection of *B.bassiana* and *Metarhizium ani* 50ploae Isolates ti Control *Triatoma infestans*.*Mem Inst Oswaldo Cruz,Rio de Janeiro.* 93 :839-846.
- **Matiru, V.N. & Dakora, F.D. (2004).** Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology* **3**: 1-7.
- **Mauchline T.H.,Kerry B.R.and Hirsch P.R. (2002)** « Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticilium chlamydosporium* by copmetitive PCR and comparison with selective plating » *Applied and Environmental Microbiology* **68** :1846-1853.
- **McGuire,M.R.,Leland,IE.2006.**Field trials of *Beauveria bassiana* against *Lygus* spp. In California and Mississippi. National Cotton Council Beltwide Cotton Conference.p.1389-1392.
- **Miller, S.A., Madden, L.V. & Schmitthenner, A.F. (1997).** Distribution of *Phytophthora* spp. in field soils determined by immunoassay. *Phytopathology*, **87**: 101-107.
- **Minorsky PV (2008).** On the inside. *Plant. Physiol.* **146**: 323-324.
- **Moricca S. and Ragazzi A.** Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* **2008**; **98**: 380-386.

Références Bibliographiques

- **Morin O., (1994)**, *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10.
- **Mulaw T.B., Druzhinina I.S., Kubicek C.P. et Atanasova L., 2013.** Novel Endophytic *Trichoderma* spp. Isolated from Healthy *Coffea arabica* Roots are Capable of Controlling Coffee Tracheomycosis. *Diversity*, 5: 750-766.
- **Nguyen,N.,Christian,B.,Hans-Michael, P. et Gisbert.Z. 2007.**Laboratory investigation on the potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) larvae and pupae. *Biocontrol Science and Technology*.17 : 853-864.
- **Nyvall, R.F. (1999).** Field Crop Diseases, 3d edition. Iowa State University Press.
- **Park J. H., Choi G. J., Lee H. B., Kim K. M., Jung H. S., Lee S. W., Jang K. S. and Cho K. Y.** Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, and endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2005; 15**: 112-117.
- **Pereau-Leroy, P., 1958.** Le Palmier dattier au Maroc. Min .Agric. Maroc, Service. Rech. Agron. et Inst Français Rech. Fruit Outre Mer, (I.F.A.C), 142 p.
- **Pimentel M. R., Molina G., Dionisio A. P., Marostica Junior M. R. and Pastore G. M.** The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int* 2011; doi:10.4061/2011/576286.
- **Raper K., Fennell D.J., (1965)**, The genus *Aspergillus*”, Williams and Wilkins editors, Baltimore.
- **Rifai M.A., and Webster J., 1966.** Culture studies of *Hypocrea* and *Trichoderma*II. *H. aureo*-and *H. rufa* f. *sterilis* f. nov. *Trans. Br. Mycol. Soc*, 49:296.
- **Rini C. et Sulochana K., 2007.** Usefulness of *Trichoderma* spp. and *fluorescent pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato.*Journal of Tropical Agriculture*. 44 : 79-82.
- **Rodriguez R. J., Redman R. S. and Henson J. M.** The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Migration and Adaptation Strategies for Global Change* **2004; 9**: 261-272.
- **Rodriguez, H. & Fraga, R. (1999).** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339.
- **Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. et al. (1998).** Les sols du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. **9**, 147-153.

Références Bibliographiques

- **Sabbahi,R ;Merzollki,A et Guertin,C.2008b.**Effecacy of *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill.against the tarnished plant bug,*Lygus lineolaris* L.,in strawberries.1App.,Entamal. 2 : J24-J34.
- **Sabbahi,R ;Merzouki, A et Gilertin,e. 2008a.** Effecacy of *Beauveria bassiana* against the strawberry pests,*Lygus lineolaris*,*Anthonomus signatus* and *Otiiorhynchus ovatus*.J.Appl. Entomol. In presse.
- **Samba, R.T., Sylla, S.N., Neyra, M., Gueye, M., Dreyfus, B. & Ndoye, I. (2002).** Biological nitrogen fixation in *Crotalaria* species estimated using the 15N isotope dilution method. African Journal of Biotechnology, 1: 17-22.
- **Samuels G.J., 2006.** *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology, 96:195-206.
- **Schroers , H-J., Samuels, G. J.,Seifert, A. K.,Gams,W.,1999.**Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C.rosea*, its relations hip to *Bionectria ochroleuca*,and notes on other *Gliocladium*-like fungi.Mycologia.91 : 365-385.
- **Schulz B. and Boyle C.** The endophytic continuum. *Mycological Research* **2005** ; **109**: 661-686.
- **Sedra, My.H. 2003.** Le bayoud du palmier dattier en Afrique du nord, FAO, RNE/SNEA-Tunis. Edition FAO sur la protection des plantes. Imprimerie Signes, Tunis, Tunisie, 125p.
- **Sedra, My.H., 2005a.** la maladie du Bayoud du palmier dattier en Afrique du Nord: Diagnostic et caractérisation. Actes du symposium International sur le développement Durable des Systèmes oasiens du 08 au 10 mars. Erfoud Maroc. B. Boulanouar et C. Kradi (Eds).
- **Selosse, M.A. ,Baudoin,E. and Vandenkoorhuyse,P.(2004)** « Symbiotic microorganismes, akey for ecological success and protection of plants. Comptes Rendus de Biologie »327 : 639-648.
- **Souchie, E.L., Saggin-Junior, O.J., Silva, E.M.R., Campello, E.F.C., Azcon, R. & Barea, J.M. (2006)** Communities of P-Solubilizing Bacteria, Fungi and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ - Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 78: 183-193.
- **Staniek A., Woerdenbag H. J. and Kayser O.** Endophytes exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal of Plant Interactions* **2008** ; **3**: 75-98.

Références Bibliographiques

- **Stinson, K.A., Campbell, S.A., Powell, J.R., Wolfe, B.E., Callaway, R.M., Thelen, G.C., Hallett, S.G., Prati, D. & Klironomos, J.N. (2006).** Invasive plant suppresses the growth of native tree seedling by disrupting belowground mutualisms. *Plos Biology*, 4: 727- 731.
- **Strobel G. A.** Microbial gifts from rain forests. *Can J Plant Phenol* 2002a ; **24**: 14-20.
- **Strobel G. A.** Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology* 2002b; **22**: 315-333.
- **Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J.** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 2004; **67**: 257-268.
- **Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J.** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 2004; **67**: 257-268.
- **Sutton, J. C.,Li,D.W.,Gang,P.,Y. and Zhang,P . 1997.** *Gliocladium reseau* a versatile adversary of a *Botrytis cinerea* in crops.Plant Disease, 81 ,316-328.
- **Suty, L., (2010)** « La lutte biologique vers un nouveau équilibre écologique »,Bp8799-2107 Dijon cedex.
- **Suty L., 2010.** La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Eds Quae, 323 pages.
- **Tadela,T.et Pringle,K.L. 2003.**Foodconsumption by Cllolo par /el/us (Lepdidoptera :Peralidae)larvae infected with Beauveria bassiana and Metharizium anisopliae and effects of feeding naturel versus artificial diets on mortality and mycosis.I.Inv.Pathol . 84 :220-225.
- **Talaei, H.R ;KHrazi,P.A ;Goettel ,M.et I 2006.**Variation in virulence of Beauveria bassiana isolates and its relatedness to some morphological characteristics.Biocontrol.Sei.Technol,525-534.
- **Tan R. X. and Zou W. X.** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 2001; **18**: 448-459.
- **Todorova, S.I.,coté,IC.et coderre,D.1996.**Evaluation of the effects two Beauveria bassiana (Balsamo)vuilleimin srains on the developement of Coleomegilla macuiatae ie lligi Timberlal(col,coccinellidae).1Appi.Ent.120 :159-163.
- **Todorova,S.I.,Cloutier,C.,coté,le.et Coderre, D.2002a.**Pathogenicity of six isolates of Beauveria bassiana (balsamo)vuillemin(Deuteromycotina,hyphomycetes) to Perillus bioculatus(Hem :Pentatomidae).1Appel. Ent. 126 : 182-185.

Références Bibliographiques

- **Tunlid A, Jansson S. 1991.** Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Appl Environ Microbiol* ; 57 :2868-72.
- **Valueva T.A. and Mosolov V.V. (2004).** Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochem.* **69**, 1305-1309.
- **Vega F. E., Posada F., Aime M. C., Ripoll M. P., Infante F. and Rehner S. A.** Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* **2008**; **46**: 72-82.
- **Verma, J.P., J. Yadav and K.N. Tiwari. (2010).** Application of *Rhizobium* sp. Bhurc 01 and plant growth promoting rhizobacteria on nodulation, plant biomass and yields of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Agric. Res.*, 5: 148-156.
- **Vinale F. et al., 2007.** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, pp. 1-10.
- **Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., von W. D., Franken P. and Kogel K. H.** The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2005; **102**: 13386-13391.
- **Wang F. W., Jiao R. H., Cheng A. B., Tan S. H. and Song Y. C.** Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2007**; **23**: 79-83.
- **Webster J., and Rifai M.A., 1968.** Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* IV. *Hypocrea pilulifera* sp. nov. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 51:511-514.
- **Wipps, J.M. (2001).** « Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere ». *Journal of Experimental Botany* 52 :487-511.
- **Xia X., Lie T.K, Qian X., Zheng Z., Huang Y., Shen Y., 2011.** Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots, 61 (3):619-25.
- **Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P. and Qin L.** Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* **2010** ; **165**(6): 437-449.
- **Zhang H. W., Song Y. C. and Tan R. X.** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* 2006; **23**: 753-771.

ANNEXE 1

Milieux de cultures utilisés :

❖ Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) :(Jonsthon et Booth, 1983)

Pomme de terre 200g

Dextrose 20g

Agar 15g

Eau distillée 1L

PH=5,5 autoclavage 20 min à 120 °C

❖ Milieu PDB (Potato Dextrose broth) :(Jonsthon et Booth, 1983)

Pomme de terre 200g

Dextrose 20g

Eau distillée 1L

❖ Milieu de production d'HCN

Milieu PDA+4,4de glycine