

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Sciences biologiques"

Spécialité: "Infectiologie"

Présenté et soutenu publiquement par

- Benseddik fatma
- Benseddik ouissem
- Yahia moulay

Thème : Contribution à la lutte biologique *in vitro et in vivo* par *Trichoderma harzianum* vis-à-vis *fusarium oxysporum* f. sp *radicis lycopersici* (Forl).

JURY:

- Président : Dr. Ait Abderhim Laila. MAA
- Promoteur : M^r. Yezli Wassim. MAA
- Examineur : M^{elle} Medjbar N. MCB

Année universitaire: 2016 -2017

Remerciement

Avant tout nous remercions DIEU le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens de pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nos profonds remerciements à notre encadreur, Monsieur YEZZI Wassim qui a proposé ce thème et pour sa confiance, son soutien, sa gentillesse et pour ses conseils avisés et ses grandes qualités scientifiques.

Un grand merci à D^r Ait Abderrhim L. d'avoir accepté de présider notre travail

Un grand merci également à D^r MEDJBER N. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions également la responsable de la spécialité Dr. DOUKANI K,

Nous remercions par la suite D^r AIT HAMMOU M., chef de département de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

Nos sincères remerciements vont à l'équipe du laboratoire de microbiologie notamment à la technicienne M^{lle}.

Kheira pour son aide et à la promotion de Master 2 Infectiologie.

En fin, nous remercions encore tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, trouveront ici l'expression de notre profonde gratitude.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au long de mes études que dieux me les garde tout les deux,

A mes deux frères qui ont été à mes cotés durant tout mon cursus

A ma famille,

A mes amies (Hanane, fatma , linda.),

Et à mes camarades de classe

Wissem

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A la mémoire de mon très cher frère Mansour et ma grand-mère que Dieu les accueille dans son vaste paradis aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour eux, je ne les oublierai jamais.

A mes chers parents qui ont guidé mes premiers pas dans la vie, qui m'ont inculqué une éducation, une conduite certes et conservatrices, un encouragement énorme dans mes études, que dieu me les garde

A mon grand-père qui est et qui sera toujours ma fierté, sa bonté, sa sagesse et sa gentillesse sont le souvenir lumineux qui demeure dans mon cœur

A mes chères tantes et mes oncles aimables, honorables, l'exemple de l'honnêteté et le symbole de la bonté

A mes sœurs Salima, Lamia, Hanaa, Batoul et Ghezlane et mes frères Sofiane, Amine, Mouley eddriss et Hichem en témoignage de l'amour et l'affection que je porte pour vous

A mes cousins et cousines Asmaa, Imene, Aouatif, Khadidja, Zoubida, Latifa et Zoubida, Ainsi que mes amies Hanane, wissem et Meriem

Et à toute ma famille

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accordez

Santé, bonheur et longue vie.

Fatma

Dédicaces

Je dédie ce mémoire a mes parents, mes guides affectueux et attentifs, en reconnaissance pour leur soutien moral et pour toutes les charges assurées durant toutes ces longues années d'études.

Je dédie également ce mémoire à mes frères et sœurs et sur tout Hanane pour la confiance et l'espoir qu'elle a mis en moi .Elle m'a toujours réconforté et pousser plus avant.

Je dédie également à tous ceux qui me sont proches et à mes amis les deux kradih (Moustafa , Boumediene), Zaki mosta et mes frères et sœurs de la promo Infectiologie Abedlakder et Ikram et Zoulikha .

Moulay

Sommaire

Liste des figures	i
Liste des tableaux	ii
Liste des abréviations	iii
Introduction	1

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: AGENT PATHOGENE ET PATHOLOGIE

I.1. Le pathogène	2
I.1.1. Le genre <i>Fusarium</i>	2
I.1. 1.1. Généralité	2
I.1.1.2. Taxonomie	2
I.1.2. L'espèce <i>Fusarium oxysporum</i>	3
I.1.2.1. Position taxonomique.....	3
I.1.2.2. Position systématique.....	3
I.1.2. 3.Les <i>Fusarium oxysporum</i> phytopathogènes.....	4
I.1.2.4. Caractères morphologiques.....	5
I.1.2.4.1. Macroscopique	5
I.1.2.4.2. Microscopique.....	6
I.2. La pathologie	7
I.2.1. Les symptômes externes	7
I.2.2 Les symptômes internes	8

CHAPITRE II LUTTE BIOLOGIQUE

II.1. LA LUTTE BIOLOGIQUE.....	9
II.2. CLASSIFICATION DE <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>	10
II.3. DESCRIPTION DE <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i>	10
II.4. MODE D'ACTION ET PRINCIPE ACTIF	12
II.4.1 COMPETITION ET MYCOPARASITISME	13
II.4.2. ANTIBIOSE.....	13
II.4.3. COMPATIBILITE	14

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I.1. Objectif	15
I.2. Lieu et période	15
I.3. Matériel utilisé	15
I.3.1. Matériel biologique	15
I.3.1.1. Agent pathogène	15
I.3.1.2. Agent antagoniste.....	15
I.3.1.3. Plante hôte.....	15
I.3.2. Matériel du laboratoire.....	16
I.4. Milieux de cultures utilisés	16
I.5. Protocole expérimental	17
I.5.1. Repiquage	18
I.5.2. Lutte biologique <i>in vitro</i>	18
I.5.2.1. Confrontation directe sur milieu de culture solide	18
I.5.2.2. Confrontation indirecte sur milieu de culture solide.....	19
I.5.3. Lutte biologique <i>in vivo</i>	19
I.5.3.1. Test du pouvoir pathogène.....	19
I.5.3.2. Effet du <i>T. harzianum</i> sur l'expression de la maladie.....	24

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II. RESULTAT

II.1. Etudes morphologique de <i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i>	25
II.1.1. Caractérisation macroscopique	25
II.1.2. Caractérisation microscopique	26
II.2. Etude morphologique de <i>Trichoderma harzianum</i>	26
II.2.1. Caractérisation macroscopique	26
II.2.2. Caractérisation microscopique	27
II.3. <i>In vitro</i>	27
II.3.1. Confrontation directe	27
II.3.2. Confrontation indirecte	29
II.4. <i>In vivo</i>	31
II.4.1. Test du pouvoir pathogène	31

II.4.2. Test de lutte biologique	34
III DISCUSSION	35
Conclusion.....	37
Annexe	
Références bibliographiques	
Résumé	

Liste des figures

Figure n°1 : les symptômes de la pourriture racinaire de la plante de tomate	8
Figure n°2 : protocole expérimental	17
Figure n°3 : Confrontation directe de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> et de <i>T. harzianum</i> sur milieu PDA.....	18
Figure n°4 : Confrontation indirecte de <i>Forl</i> et <i>T. harzianum</i>	19
Figure n°5 : plantules de tomate	21
Figure n°6 : Inoculation des plantules pendant 30 minutes	23
Figure n°7 : plantules de tomate après transplantation	23
Figure n°8 : Aspect macroscopique des souches fongiques utilisées	25
Figure n° 9 : observation microscopique de <i>Forl</i>	26
Figure n°10 : représente des colonies blanchâtres avec centre verdâtre.....	26
Figure n°11 : observation microscopique de <i>Trichoderma harzianum</i> (objectif x 10).....	27
Figure n°12 : effet inhibiteur direct de <i>T.harziaum</i> sur la croissance mycélienne du <i>Forl</i> pour une durée d'incubation du 2 ^{ème} et 3 ^{ème} jours à 28 °C.....	28
Figure n°13 : Croissance radiale des souches fongiques traitées par <i>T. harzianum</i> comparativement au témoin au 3 ^{ème} jour de confrontation directe	28
Figure n°14 : présentation des taux d'inhibition de <i>Forl</i> par <i>T.harzianum</i> au 3 ^{ème} jour d'incubation par confrontation directe	29
Figure n°15 : effet inhibiteur indirect de <i>T.harziaum</i> sur la croissance mycélienne du <i>Forl</i> pour une durée d'incubation du 3 ^{ème} et 6 ^{ème} jours à 28 °C	30
Figure n°16 : croissance radiale des souches fongiques traitées par <i>T.harzianum</i> comparativement au témoin au 6 ^{ème} jour de confrontation indirecte	30
Figure n°17 : présentation des taux d'inhibition de <i>Forl</i> par <i>T.harzianum</i> au 6 ^{ème} jour d'incubation par confrontation indirecte	31
Figure n°18 : plantules présentant les symptômes de pourriture racinaire avec un degré de pathogénicité différent.....	32
Figure n°19 : plantules témoin utilisées dans le test de lutte biologique	34

Liste des tableaux

Tableau N 1 : Les différents morphotypes observés chez <i>Fusarium oxysporum</i>	5
Tableau n°2 : Caractéristiques et origines des souches de <i>Fusarium</i> utilisées.....	16
Tableau n°3 : matériel utilisé dans le laboratoire	16
Tableau n°4 : les symptômes observés lors des tests <i>in vivo</i>	33

Liste des abréviations

Cov : Composé Organique Volatiles.

F : *Fusarium*.

f. sp. : Forme spéciale.

Forl : *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi*.

MML : milieu minimum liquide.

PDA : Potato-Dextrose-Agar.

T.harzianum : *Trichoderma harzianum*.

Introduction

Introduction

Les agents phytopathogènes sont sans doute apparus peu après leurs plantes hôtes (**Corbaz, 1990**). Parmi ces agents, on trouve les champignons telluriques les plus agressifs, tels que les *Fusarium*, qui sont présents dans tous les types de sol et sous différents climats ; et qui ont la particularité de se développer en saprophyte et en parasite dans le sol.

Cet agent pathogène cause des flétrissements et des pourritures à plus de 100 plantes différentes (**Snyder et Hansen, 1940 ; Burgess, 1981 ; Zebboudj et al., 2014**).

Parmi les formes spéciales appartenant à ce genre, on trouve *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) ; qui est présent dans de nombreux pays, est capable de s'attaquer aux racines et au collet de la tomate, causant la pourriture racinaire (*Fusarium crown and root rot*) ; et aussi bien aux cultures de plein champ que sous abri (**Blancard, 2009**).

En dépit des pertes économiques qu'il entraîne, le contrôle de ce pathogène reste toujours limité à l'utilisation de fongicides de synthèse ; qui ont un effet indésirable sur l'environnement ; et à des mesures prophylactiques, la désinfection du sol n'est jamais complète en raison d'une part, la difficulté de sa réalisation et d'autre part, à l'induction de souches résistantes (**Benhamou et al., 1997**).

C'est dans cette perspective qu'on a opté pour l'étude de l'effet antagoniste de *Trichoderma harzianum* *in vitro* et *in vivo* contre Forl, dans le but de contribuer dans les recherches de lutte biologique et trouver d'autres alternatives de lutte permettant de réduire les maladies fusariennes, tout en préservant l'environnement.

Ce travail est constitué de deux parties, une partie bibliographique qui est divisée en deux chapitres :

- chapitre 1 : agent pathogène et pathologie
- chapitre 2 : lutte biologique

Et une partie expérimentale qui est subdivisée aussi en deux parties dont l'une est *in vitro* et l'autre *in vivo*.

PREMIERE PARTIE :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
AGENT PATHOGENE ET PATHOLOGIE

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**CHAPITRE I: AGENT PATHOGENE ET PATHOLOGIE****I.1. Le pathogène****I.1.1. Le genre *Fusarium*****I.1.1.1. Généralité**

Décrit pour la première fois par **Link en 1809 (in Booth, 1984)**, le genre *Fusarium* est bien connu par sa pathogénicité.

Ce dernier regroupe un grand nombre d'espèces (**Messiaen et Cassini, 1968**) présentant une spécificité parasitaire pour une large gamme de plantes hôtes (**Ozenda, 1990**) et responsables des maladies connues sous le terme de fusarioses telles que le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet (**Lepoivre, 2003**).

Bien que la forme parfaite de certains d'entre eux est connue et lui permettant de faire partie de la division des Ascomycota (**Leslie et Summerell, 2006**), la forme imparfaite existe encore pour d'autres. Ces derniers appartiennent à la division des Deuteromycota, classe des Hyphomycètes, ordre des Tuberculariales, famille des Tuberculariacées (**Lepoivre, 2003**).

Ainsi, la classification classique des *Fusarium* est comme pour tous les champignons, basée essentiellement sur les critères morphologiques (pigmentation, aspect du mycélium, présence ou absence des spores, taille, forme, nombre de cloisons, ...) (**Bouhot, 1981**).

I.1.1.2. Taxonomie

Les champignons appartenant au genre *Fusarium* se caractérisent tant par leur diversité et par leur extrême variabilité en culture, ce qui explique les difficultés rencontrés pour les identifier et les classer. Ces difficultés sont à l'origine du nombre important de systèmes taxonomiques proposés (**Smahi, 2008**).

Ainsi, les travaux de **Wollenweber et Rincking (1935)**, qui ont servi de références, ont pu décrire 65 espèces, 55 variétés et 22 formes, rassemblées en 16 sections et 06 sous-sections.

Le genre *Fusarium* a été profondément revu par **Synder et Hansen (1940, 1941, 1945)**, **Tousson et Nelson (1968, 1976)** et **Messiaen et Cassini (1968, 1981)**.

Ils ont simplifié la classification pour que le genre *Fusarium* se trouve réduit à 09 espèces, dans le but de permettre une détermination rapide des parasites rencontrés (**Bounaga, 1985**).

D'autres systèmes taxonomiques proposés, s'appuyant sur les travaux de (**Wollenweber et Reinking, 1935**) ont été suggérés, notamment par **Raillo (1935)**, **Bilai (1955, 1977)**, **Gordon (1952, 1960, 1965)**, **Booth (1971, 1975, 1981)**, **Joffe (1974)** et **Gerlach (1970, 1977, 1981)**. Ils ont conservé un certain nombre de section et d'espèces avec quelques modifications (**Bounaga, 1985**).

De toutes les espèces du genre *Fusarium* rencontrées dans le sol, c'est l'espèce *F. oxysporum* qui est la plus réponde (**Meyer, 1967**).

Aujourd'hui et grâce à l'utilisation des techniques de la biologie moléculaire, la systématique des *Fusarium* a considérablement évolué et ces derniers sont considérés comme les formes asexuées de plusieurs espèces d'Ascomycètes.

I.1.2. L'espèce *Fusarium oxysporum*

I.1.2.1. Position taxonomique

Les nombreuses controverses dans les études taxonomiques du genre *Fusarium* ont peu concerné l'espèce *F. oxysporum*. En effet, (**Snyder et Hansen, 1940**) ont montré que les différences morphologiques décrites par (**Wollenweber et Reinking, 1935**) pour distinguer plusieurs espèces dans la section **Elegans** n'étaient que des variations culturelles d'une même espèce, appelée *F. oxysporum*.

La plupart des systèmes taxonomiques proposés ultérieurement ont maintenu *F. oxysporum* comme espèce unique dans la section *Elegans*.

La seule controverse qui subsiste concerne la position taxonomique de *F. redolens*, considérée comme une espèce (**Wollenweber et Reinking, 1935 ; Gerlach et Nirenberg, 1982**) ou comme une variété de *F. oxysporum* (**Booth, 1971 ; Nelson et al, 1983**).

Cependant, des données récentes tendent à définir *F. redolens* comme une espèce à part entière (**Waalwijk et al., 1996 ; Baayen et al., 1997 ; O'Donnell et al., 1998**).

I.1.2.2. Position systématique

Fusarium oxysporum est considéré comme Ascomycète proche du groupe téléomorphique *Gibberella* que *Nectria* (**Di Pietro et al., 2003 ; Michielse et Rep, 2009**) et ayant plus de 120 *formae speciales*.

La nouvelle classification taxonomique actualisée et basée sur la phylogénie moléculaire selon **(Debourgone, 2013)** est la suivante :

Règne : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Hymenoascomycètes

Sous-classe : Pyrenomycetideae

Ordre : Hypocreales

Famille: Nectriaceae

Genre: *Fusarium*

espèce: *F. oxysporum*

I.1.2. 3.Les *Fusarium oxysporum* phytopathogènes

Les champignons telluriques appartenant au genre *Fusarium* et plus précisément à l'espèce *F. oxysporum* sont les plus dommageables des cultures d'intérêt économique **(Armstrong et Armstrong, 1981)**.

Cette espèce est fréquente parmi les *Fusarium* du sol et qui est responsable de nombreuses maladies connues sous le nom de fusarioses (trachéomycose, nécrose, fonte de semis) **(Fravel et al., 2003)**.

Elle possède une grande spécificité d'hôtes appelée *formae speciales* **(Dommergues et Manganot, 1970)**. Leur capacité à vivre en saprophyte lors des conditions non propices (en hiver) grâce à la formation de chlamydospores ou par le développement d'hyphes sur des résidus organiques (les débris végétaux) **(Burgess et al., 1994)**, lui permet d'être une source de contamination importante au champs **(Schaafsma et al., 2001)**.

La dissémination des spores par le vent ou les insectes est également une autre voie de contamination **(Sutton, 1982)**.

I.1.2.4. Caractères morphologiques

I.1.2.4.1. Macroscopique

Sur un milieu gélosé à base de pomme de terre PDA (Potato Dextrose Agar), les différentes formes spéciales de *F. oxysporum* peuvent varier d'apparence.

L'aspect cultural de *F. oxysporum* correspond à un mycélium aérien blanchâtre au début de la croissance et il vire par la suite vers d'autres pigmentations (violette, mauve, orange ou beige, pêche et rose saumon), dues à la formation d'une multitude de spores en surface par des orages fructifères (sporodochies, pionnotes), ainsi qu'aux variations de la lumière. Cependant, l'aspect des souches de *F. oxysporum* peut varier d'une culture à une autre après des repiquages successifs (Burnett, 1984 ; Windels, 1992)

Cependant, les formes spéciales de *Fusarium oxysporum* possèdent un phénomène commun qui est la grande variabilité morphologique qui peut être expliquée par les variations portées sur les caractères culturaux (aspect du mycélium aérien, pigmentation du thalle et du milieu), sur les caractéristiques biométriques, sur des spores (taille, forme, cloisonnement, etc...), sur les organes fructifères qui leur donnent éventuellement naissance (sporodochies et pionnotes), et enfin, sur la présence ou l'absence de sclérotés (Henni *et al.*, 1994).

Tableau N 1 : Les différents morphotypes observés chez *Fusarium oxysporum*

Morphotype	Caractéristiques
Type Sporodochial	Caractérisé par la présence de macrosporodochies massives, disposées plus ou moins en grand nombre dans un mycélium aérien assez court mais dense et d'aspect duveteux.
Type Sclérotal	Le même aspect que le type précédent mais les Sporodochies sont remplacées par les sclérotés plus ou moins volumineux d'une pigmentation beige violacé à rosâtre Sclérotal.
Type Pionnotal	Présente un aspect luisant et humide ou crémé, sans mycélium aérien. La couche superficielle est constituée de nombreuses microconidies. Les macroconidies sont formées en nappes ou sur phialides non ramifiées.

Type Duveteux	Présente un mycélium aérien assez court mais dense, portant de nombreuses microconidies. Les macroconidies et les chlamydozspores se forment tardivement.
Type Cotonneux	Présente un mycélium aérien très abondant, épais et très peu sporidie.
Type Muqueux	Ne présente pas un mycélium aérien. Les microconidies sont abondantes, les macroconidies rares et les Chlamydozspores abondantes mais tardives.
Type Ras Sénéscent	Il est caractérisé par un mycélium aérien extrêmement ras, clairseme. Peu visqueux et par une vitesse de croissance très faible.

I.1.2.4.1 Microscopique

Autant que champignons imparfaits, ces derniers produisent trois types de spores asexuées produites par des phialides, des sporodochies ou par des sclérotés.

- **Les spores asexuées**

Les microconidies *F. oxysporum* est caractérisé par la présence abondante de micro conidies (Tivoli, 1988) qui sont des spores de petite taille (3-5 x 10-15 µm) en générale ovoïdes ou réniforme à ellipsoïdes, unicellulaires ou bicellulaires, produite en fausses têtes, jamais en chaîne, (Nelson *et al.*, 1983 ; Agrios, 2005). Elle se forme sur le mycélium aérien à partir de monophialides courtes (Guezlane, 1976).

Les macroconidies sont des spores cloisonnées transversalement (souvent triseptées), de grande taille (5-10 x 25-35 µm) en forme de fuseau, produites par des conidiophores ramifiés en sporodochies ou par le mycélium aérien (Guezlane, 1976). Dans les sporodochies, les macro conidies ont une forme typique et une taille uniforme. Sur le mycélium aérien, elles sont produites indifféremment par des monophialides ou des polyphialides et sont alors de forme et de taille très variables (Benouali, 2015).

Elles comportent 4 à 6 cellules dont une cellule apicale plus mince que les autres et une cellule basale en forme de pied (Smahi, 2008).

Les chlamydospores Ce sont des organes de conservation et des spores d'origine thallique de résistance, entourées d'une paroi épaisse et parfois ornementée. Elles sont présentes, solitaires ou en paires, lisses ou rugueuses, globuleuses terminales ou intercalaire sphériques ou ovoïdes (6 x 30µm), isolées ou en groupes (Djerbi *et al.*, 1984 ; Komi, 1993; IMI, 1994).

I.2. La pathologie

La pourriture des racines et du collet causée par *Forl Jarvis et Shoemaker* (Katan *et al.*, 1997).

Découverte pour la première fois au Japon en 1969 et s'est propagée dans le monde une année après sa découverte (Yamamoto *et al.*, ;1974 Menzies et Jarvis, 1994) d'origine tellurique et dotés d'une spécificité stricte d'hôtes, ces champignons ont la capacité d'envahir l'ensemble du système vasculaire de la plante provoquant ainsi son obstruction et par la suite l'affaiblissement de la plante qui finit par s'effondrer et mourir (Snissi *et al.*, 2006).

Cette forme spéciale est l'une des principales maladies responsables des pertes économiquement importantes de la culture de la tomate partout dans le monde (Jarvis et shoemaker ,1978).

La maladie est présente aujourd'hui dans plusieurs pays du globe terrestre, où elle est caractéristique des cultures printanières et s'attaquent aux racines et au collet de la tomate aussi bien aux cultures en plein champ que sous abris et elle peut s'exprimer à maturité lorsque les plantes sont chargées de fruits (Blancard, 1997).

I.2.1. Les symptômes externes

Ce champignon dévastateur est avant tout inféodé au système racinaire de la plante de tomate.

Dans un premier temps, il provoque de nombreuses lésions brunes rougeâtres humide sur les racines, plus le diamètre des racines est faible plus celle-ci pourrissent et se décomposent rapidement évoluant donc en pourriture (Si Mohamed, 2010) suivi d'un développement d'un chancre brun sur seul coté de la tige et du collet en forme d'une flamme.

Suite à ses altérations ; des symptômes de flétrissement et de jaunissement apparaissent à la périphérie du limbe des vieilles feuilles, suivit de la nécrose du pétiole et de la chute des feuilles. Certaines plantes affectées précocement voient leur croissance réduite (**Blancard 1997**).

I.2.2. Les symptômes internes

Lors d'une coupe au niveau du cylindre centrale des grosses racines, apparaissent des brunissements assez marqués, il en est de même pour les tissus vasculaires du pivot. Ce brunissement peut s'étendre jusqu'à la tige sur plusieurs dizaines de centimètres au dessus du collet (**Blancard 1997**).



Figure 1 les symptômes de la pourriture racinaire de la plante de tomate (*Fusarium crown and root*).

Chancre brun en forme de flamme se développant sur un seul coté du collet et de la tige. b) Système racinaire réduit, brun et pourri, vaisseau brun chocolat dans les parties basses de la tige. c) Brunissement des racines, de leur cylindre central et des vaisseaux situés au niveau du pivot et du collet malade (**Blancard, 2013**).

CHAPITRE II
LUTE BIOLOGIQUE

CHAPITRE II LUTTE BIOLOGIQUE**II.1. La lutte biologique**

La lutte biologique est un ensemble de procédés exploitant la relation de concurrence ou d'antagonisme existant entre le parasite et leurs ennemis naturels, en vue d'empêcher ou de minimiser les dommages ainsi que l'abondance des agents phytopathogènes sans nécessairement les détruire par la suite, en s'appuyant sur une stratégie de défense écologique et durable.

Parmi les microorganismes expérimentés avec succès, à l'égard des maladies d'origine tellurique : les *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., bactéries lactiques, *Serratia marcescens*, comme bactéries et les *Fusarium* non pathogènes, *Trichoderma hazianum* comme champignons qui occupent une place de choix (**Benchabane, 2005 ; Zebboudj et al., 2014 ; Yezli et al., 2015**).

Aujourd'hui il a été démontré que des souches de *F. oxysporum* non-pathogènes pour une espèce végétale peuvent rentrer en compétition pour les nutriments et la colonisation racinaire avec des souches de *F. oxysporum* pathogènes (**Alabouvette et al., 2006**).

La lutte biologique contre les maladies fongiques par des agents microbiens semble être une excellente option, car les effets néfastes secondaires sur l'environnement peuvent être nulle ou minime, en plus de l'avantage d'être en mesure d'exporter des produits à l'étranger sans restriction par rapport à l'utilisation de produits chimiques. L'inhibition des pathogènes par des souches bactériennes rhizosphériques est considérée comme un mécanisme indirect de favoriser la croissance des plantes (**Benouali, 2015**).

Les *Pseudomonas* produisent une diversité de composés antimicrobiens qui est une stratégie indirecte de promouvoir la croissance des plantes. En outre elles présentent des mécanismes indirects pour améliorer la santé des plantes, mais peuvent promouvoir directement la croissance en produisant des phytohormones, ainsi que la sécrétion de composés organiques volatiles (COV) est responsable des activités favorisant cette croissance (**Trivedi et Pand 2008 ; Hernández-León et al., 2015**).

Les études d'**Alabouvette en 1984** montrent que l'introduction d'un mélange de souches de *Fusarium oxysporum* non pathogène permet d'établir un très bon niveau de résistance dans le sol traité à la chaleur, alors que l'introduction d'un mélange de souches *Pseudomonas* et du

Fusarium non pathogène ne se traduit pas un effet synergique, le niveau de résistance observé étant comparable à celui déterminé par les *Fusarium* non pathogènes (**Couteaudier et Alabouvette, 1985**).

Les *Trichoderma* spp. en particulier *Trichoderma hamatum* et *Trichoderma harzianum* sont des agents possibles de lutte biologique contre les champignons telluriques parasites des cultures (**Smahi, 2008**).

II.2. Classification de *Trichoderma harzianum*

Règne Fungi

Division Ascomycota

Sous-division Pezizomycotina

Classe Sordariomycetes

Sous-classe Hypocreomycetidae

Ordre Hypocreales

Famille Hypocreaceae

Genre *Trichoderma*

Espèce *T. harzianum*

II.3. Description de *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum est un genre qui regroupe un ensemble de champignons imparfaits saprophytes qui est naturellement abondant dans le sol et la matière organique telle le bois mort ou en décomposition, les débris végétaux et la paille (**Papavizas, 1985, Sippell et al., 1985, Widden et Scattolin, 1988**).

Les espèces de ce genre possèdent également des aptitudes à dégrader de nombreux substrats organiques du sol pour se nourrir et se développer ce qui suggère qu'elles peuvent survivre dans plusieurs niches écologiques (**Papavizas, 1985**).

Les propriétés antagonistes des diverses espèces de *Trichoderma* ne se manifestent qu'entre des limites précises de températures (**Papavizas, 1985**).

Le spectre d'activité optimal de *Trichoderma* varie entre 18 et 25°C tandis que pour un agent pathogène comme *Botrytis cinerea*, il peut agir dans un spectre beaucoup plus large (entre 5 et

28°C. L'étude en laboratoire de ces modes d'action renseigne sur le potentiel d'un champignon antagoniste à l'égard du pathogène (**Papavizas, 1985**).

Caron (1993) a évalué le potentiel antagoniste de 142 souches indigènes de *Trichoderma* isolées à partir des sols provenant de différentes régions agricoles du Québec. De toutes ces souches, *Trichoderma harzianum* fut la souche retenue en raison de son développement adapté aux conditions climatiques observées dans les serres au Québec.

La vitesse de croissance de *Trichoderma*, à différentes températures, est connue puisque toutes les souches de *Trichoderma* ont subi une caractérisation thermique (entre 5 et 30°C par gradation de 5°C) ce qui permet de travailler avec des souches adaptées aux conditions climatiques où elles seront utilisées (**Caron, 1993**).

Le potentiel antagoniste de *T. harzianum* a également été démontré contre les agents pathogènes des substrats dans les cultures serricoles (productions légumières et plantes ornementales) (**Caron et al., 2002a**).

Une technique de production massive de spores de *Trichoderma* a également été mise au point (**Caron et al., 1994a; 1998, 2002, 2003**).

Suite aux tests effectués, *Trichoderma* ne cause pas de stress aux plants, qu'il n'a pas d'effets négatifs observés sur le développement des plants et qu'il peut accroître la production (**Caron et al., 2002a**).

En production commerciale, *Trichoderma* a permis d'accroître les rendements de 7% par rapport aux parcelles traitées chimiquement (**Caron et al., 1994b**). Par contre, pour que *Trichoderma* soit efficace, il doit être appliqué en prévention.

Selon **Davet et Camporota (1986)**, à mesure que les traitements par *Trichoderma* augmentent la population initiale augmente assurant un niveau croissant de contrôle. Par contre, à l'arrêt des traitements, les populations de *Trichoderma* diminuent et sont ramenées à son niveau initial lors de l'arrêt définitif des traitements.

Selon **Caron et al. (2002b)**, l'emploi de l'agent biologique *Trichoderma harzianum* permettrait de :

→ Restreindre l'utilisation de fongicides en agriculture : protection du consommateur et de l'environnement;

- Favoriser le développement des plantes en l'absence d'agents pathogènes dans les substrats (effet stimulant);
- Offrir un contrôle efficace, *in vitro*, contre *Botrytis cinerea*, Forl, *Pythiumultimum*, *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thielaviopsis basicola* et *Verticillium dahliae*.
- Contrôler efficacement, *in vivo*, *Botrytis cinerea*, Forl, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thielaviopsis basicola* et *Verticillium dahliae* et à un niveau moindre, *Pythium ultimum* et *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*;
- Survivre et se multiplier dans les substrats pour toute la période de germination et de production des semis;
- Lutter efficacement contre plusieurs agents pathogènes présents en même temps dans un substrat;
- Se comporter de façon égale ou supérieure à un biofongicide actuellement homologué au États Unis ;
- Offrir un produit facile à manipuler, disponible sous forme de poudre mouillable, pour les arrosages ou les incorporations directes au substrat;
- Ne laisser aucun résidu sur les fruits;
- Être compatible avec la majorité des pesticides chimiques;
- Être d'utilisation sécuritaire en production commerciale (aucune nocivité pour les utilisateurs, l'environnement, le consommateur et les cultures).

II.4. Mode d'action et principe actif

Trois modes d'action sont principalement utilisés par *Trichoderma* dans la lutte aux agents pathogènes (**Baker et Cook, 1982 ; Papavizas, 1985 ; Whipps, 1992**).

Il y a la compétition, le mycoparasitisme et l'antibiose (**Harman, 2006**). Ces modes d'action peuvent par contre être utilisés en synergie et signalés l'activation de la défense des plantes (**Djonovic et al., 2007**).

Ces modes d'action permettent à *Trichoderma* de s'installer prioritairement avant l'agent pathogène ce qui facilite sa survie et conservation dans le milieu.

II.4.1 Compétition et mycoparasitisme

La compétition permet à *Trichoderma* d'utiliser les ressources du milieu aux dépens de l'agent pathogène tandis que le parasitisme fait référence à l'altération ou la destruction des hyphes de l'agent pathogène par des mécanismes de prédation et/ou de lyses enzymatiques (chitinases et $\beta(1,3)$ glucanases) (Widden et Scuttolin, 1988 ; Harman *et al.*, 1993 ; Elad, 1996).

Se sont manifestés par contact entre les deux antagonistes :

1) La croissance de l'agent pathogène s'arrête tandis que celle de *Trichoderma* se poursuit et envahit l'agent pathogène.

2) au contact entre les deux protagonistes, *Trichoderma* sporule abondamment avant de poursuivre sa progression vers l'agent pathogène. Lors de la compétition, *Trichoderma* croît fréquemment en parallèle avec son hôte et s'attache au mycélium de l'hôte par des crochets ou haustorium soit par enroulement ou appressorium.

La dégradation des parois mycéliennes se fait grâce à la présence d'enzymes telles les $\beta(1,3)$ glucanases, les chitinases et parfois des cellulases (Elad *et al.*, 1983 ; Harman *et al.*, 1993 ; Papavizas, 1995).

Lors des différentes expériences réalisées, le mode de compétition a été mis en évidence sur les blessures d'effeuillage puisque *Trichoderma* ne détruit pas ou n'empêche pas les autres microorganismes de croître contrairement aux fongicides (Caron *et al.*, 1994 et 1997).

II.4.2. Antibiose

L'antibiose se manifeste par un arrêt de la croissance mycélienne des deux champignons (Elad and Freeman, 2002 ; Howell, 2003). *In vitro*, aucune évolution des champignons dans le temps n'est observée et les fronts mycéliens sont séparés par une zone claire, généralement de 3 à 5 mm (Caron, 1993).(kerroum, 2010).

Ghisalberti et Sivasithamparam (1991) ont décrit une batterie de substances antibiotiques produites par *Trichoderma* qui serait responsable de leurs propriétés antagonistes et qui sont classés dans différents groupes basés sur leur origine biosynthétique ou leur structure

chimique, et ils incluent des composés non-volatiles (peptaibols) et volatiles (métabolites aromatiques simples) (Cardoza *et al.*, 2005 ; Reino *et al.*, 2008) ; Bélanger *et al.*, (1995).

II.4.3 Compatibilité

Trichoderma est reconnu pour avoir un large spectre de tolérance vis-à-vis les pesticides comparativement à beaucoup de micro-organismes du sol (Papavizas, 1985; Harman, 2002). De plus, *Trichoderma* possède la capacité de coloniser les sols traités chimiquement. Il peut être appliqué avec les mêmes appareils que ceux employés pour pulvériser les pesticides chimiques.

Les tests effectués en laboratoire par Caron *et al.* (1993 ; 1994a) ont permis d'établir la charte de compatibilité de *Trichoderma* avec les pesticides les plus couramment utilisés dans les serres. *Trichoderma* est compatible avec tous les insecticides vérifiés et résistant ou tolérant à la majorité des fongicides. Par contre, elle est sensible à la famille des captanes, produit largement utilisé dans les serres.

DEUXIEME PARTIE
PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I
MATERIEL ET METHODES

I. Matériel et méthodes**I.1. Objectif**

L'objectif essentiel de notre travail est de contribuer dans la lutte biologique contre *Forl*, tout en préservant l'environnement, et cela en évaluant l'effet antagoniste de *Trichoderma harzianum* vis-à-vis le pathogène *in vitro* et *in vivo* et d'établir une relation entre les deux tests.

I.2. Lieu et période

Ce travail a été réalisé durant la période du 13 février jusqu'au 30 avril 2017 au laboratoire de microbiologie, ainsi qu'à la serre de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Ibn khaldoun- Tiaret.

I.3. Matériel utilisé**I.3.1. Matériel biologique****I.3.1.1. Agent pathogène**

Les caractéristiques et les origines des souches fongiques utilisées dans cette étude sont représentées dans le Tableau n°2.

Dans cette étude, on a utilisé sept souches de l'agent phytopathogène *Fusarium* et deux souches témoins, provenant de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Ahmed BEN BELLA Oran1.

I.3.1.2. Agent antagoniste

Une souche du champignon antagoniste - connu pour son mycoparasitisme - *Trichoderma harzianum* a été utilisée dans les tests de lutte vis-à-vis *Forl in vitro* et *in vivo*.

I.3.1.3. plante hôte

La variété de tomate *Montfavet 63-5* Hybride F1 a été utilisée.

Tableau n°2 : Caractéristiques et origines des souches de *Fusarium* utilisées

Souche	Morphotype et pigmentation du recto de la colonie	Origine	Wilaya	Date de prélèvement
FR2'	Cotonneux rosâtre	Tige	Mostaganem	Janvier 2012
FR2	Rhizomorphique beige	Racine	Mostaganem	Janvier 2012
FR3''	Cotonneux blanchâtre	Tige	Mostaganem	Janvier 2012
ST1	Cotonneux blanchâtre	Tige	Sekikda	Avril 2016
ST1''	Cotonneux beige	Tige	Sekikda	Avril 2016
SR2	Duveteux rosâtre	Racine	Sekikda	Avril 2016
SR2''	Cotonneux blanchâtre	Racine	Sekikda	Avril 2016

I.3.2. Matériel du laboratoire

L'appareillage, la verrerie, le milieu de culture et les autres produits sont représentés dans le tableau n°3

Tableau n°3 : matériel utilisé dans le laboratoire

Appareillage et verrerie	Produits et milieux de culture	Autres
Agitateur Autoclave Balance Etuve (Memmert) Pipettes Pasteur Eprouvettes graduée Tubes à essai Béchers Vortex (techno Kartell)	PDA (annexe n°1) Hypochlorite de sodium MML (annexe n°1)	Bec Bunsen Barreau magnétique Boîtes de Pétri Anse de platine Pissette Portoir des tubes à essai Flacons Eau physiologique Eau distillée Eau de robinet

I.4. Milieux de cultures utilisés

On a utilisé le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) qui est utilisé pour- l'isolement et le repiquage des champignons, car il favorise une croissance rapide et une sporulation abondante (Rappily, 1998).

II. Protocole expérimental

Le protocole expérimental se déroule en deux parties : *in vitro* et *in vivo* ; et avant de commencer, on a effectué des repiquages des souches de *Fusarium*.

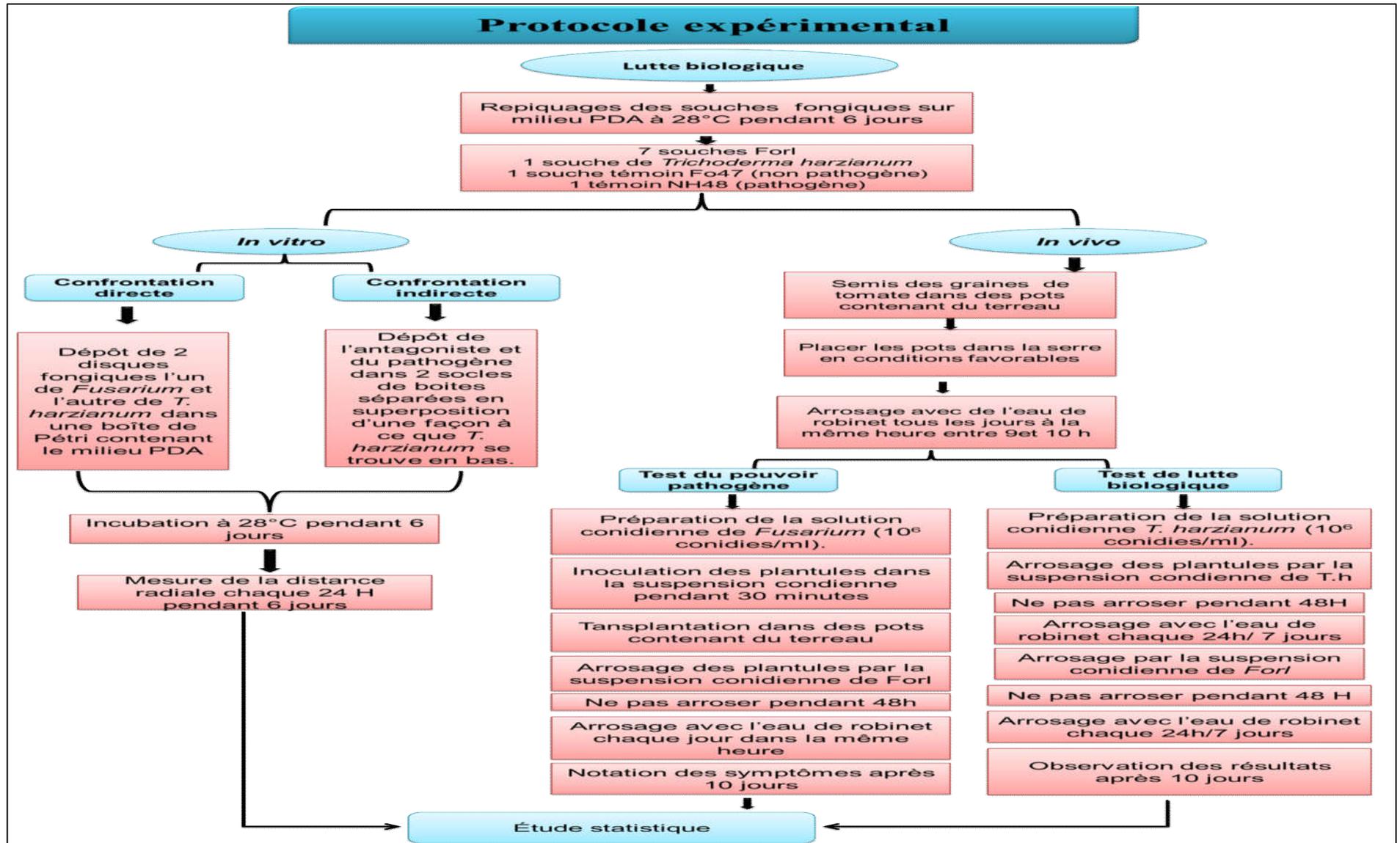


Figure n°2 : protocole expérimental

II.1.Repiquage

Après la préparation du milieu PDA on a coulé les boîtes de Pétri et on a placé dans le centre de la boîte une pastille gélosée de 5 mm de diamètre portant les différentes souches de *Fusarium*.

L'incubation a été réalisée pendant 6 jours à 28 °C, avec la mesure du diamètre de développement mycélien des souches quotidiennement. Le test a été réalisé en duplicate.

II.1.1Lutte biologique *in vitro*

Le but de cette partie *in vitro* est d'étudier l'effet inhibiteur de *Trichoderma harzianum* vis-à-vis le *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi*

L'activité antagoniste *in vitro* du *T. harzianum* a été étudiée en utilisant deux méthodes :

II.1.1.1. Confrontation directe sur milieu de culture solide

Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant le milieu PDA, deux pastilles gélosées (5mm de diamètre), l'une contenant *T. harzianum* et l'autre *Forl*. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 20 mm et à équidistance du centre de la boîte (Figure n°3) (Benhamou et Chet, 1996).

Le taux d'inhibition a été calculé selon la loi suivante, décrite par Wang *et al.* (2002) :

$$I = [(Rt - Rts) / Rt] \times 100$$

I : Pourcentage d'inhibition

Rt : distance radiale maximale de la croissance du champignon (témoin).

Rts : distance radiale sur une ligne en direction de l'antagoniste (test).

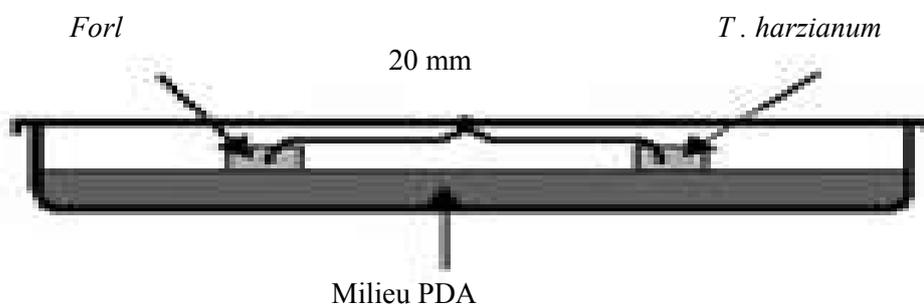


Figure n°3: Confrontation directe de *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopercisi* et de *T. harzianum* sur milieu PDA.

II.1.1.2. Confrontation indirecte sur milieu de culture solide

Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées ; par la suite, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, de façon à ce que *Trichoderma* soit en bas et *Fusarium* en haut (**Figure n°4**).

La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de Para film afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (**Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001**).

Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation directe sur milieu de culture. La mesure du diamètre moyen des colonies traitées a été réalisée chaque 24 heures, jusqu'à ce que les filaments mycéliens d'un des deux champignons atteignent la périphérie de la boîte de Pétri.

Le test a été réalisé en triplicate et le taux d'inhibition a été calculé de la même façon et selon la méthode décrite par **Wang et al. (2002)**.

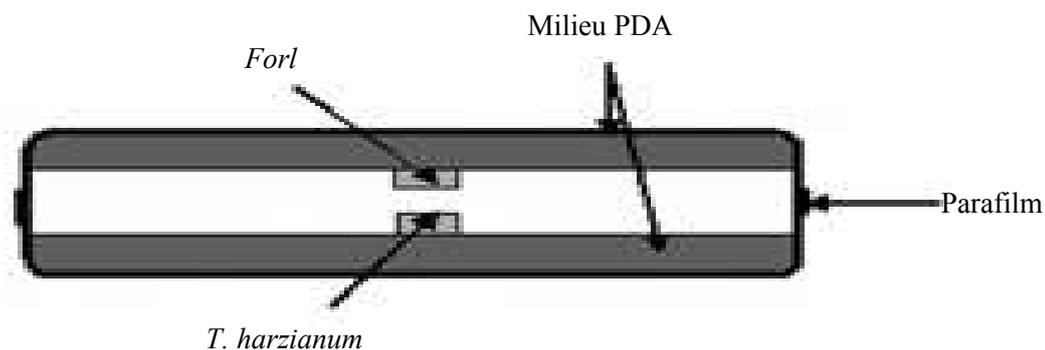


Figure n°4 : Confrontation indirecte de *Forl* et *T. harzianum*.

II.1.2. Lutte biologique *in vivo*

Dans cette partie, on a étudié dans un premier temps, le pouvoir pathogène des souches de *Fusarium*, pour confirmer leur pathogénicité envers la plante hôte ; et en deuxième temps, l'effet de *T. harzianum* sur l'expression de la maladie.

II.1.2.1. Test du pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène d'un champignon se définit comme sa capacité à provoquer des infections chez un hôte. Ce test est un passage *in vivo* dans la plante qui permet de différencier les souches pathogènes des souches non pathogènes (**Smahi, 2008**).

Le test est porté sur deux répétitions pour chacune des souches et en faisant référence à deux souches témoins pour la confirmation du test. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Hamini (2010)**.

Deux témoins fongiques ont été utilisés dans ce test :

- Souche NH48, correspondant à *Forl* pathogène (**Hamini, 2010**).
- Souche Fo 47, correspondant à une souche de *Fusarium oxysporum* non-pathogène (**Fournit par l'INRA de Dijon**).

Une autre série de témoin négatif a été utilisée, là où on a arrosé les plantules de tomate par le MML (milieu minimum liquide) stérile.

Dans ce test, on a utilisé deux répétitions différentes où on a travaillé avec deux plantules de tomate pour chaque souche testée, pour évaluer par la suite le degré de pathogénicité des souches de *Fusarium* vis-à-vis des plantes de tomate.

La variété de tomate utilisée est « *Montfavet 63/5 hybride F1* », qui est une variété précoce, très productive, à croissance indéterminée, avec un fruit ferme et résistant à l'éclatement et sensible à la pourriture racinaire.

Ce test est passé par une étape réalisée au laboratoire et une autre en serre et il a duré 42 jours.

Principe

Le système racinaire est coupé à 7 mm sous le pivot avant d'être mis en contact direct avec une suspension de conidies de l'agent pathogène.

Les plantules sont ensuite transférées dans des pots individualisés et placés au hasard dans des conditions favorables dans la serre.

Au bout de 42 jours, une notation est effectuée (présence / absence de symptômes et éventuellement le type de symptômes).

La durée totale de l'expérience : (laboratoire + serre) est de 6 semaines et se déroule comme suit :

J0 → Mise en culture des souches sur boîte de Pétri contenant du milieu PDA solide et incubé à 28°C pendant 5 jours.

J5 → Repiquage des souches dans autant de tubes PDA que de répétitions et incubé à 28°C pendant 8 jours.

J9 → Semis des graines de tomate :

Avant le semis

- Remplissage des pots avec du terreau amendé de sable ;
- Léger arrosage des pots avec l'eau de robinet ;
- Tassage manuel.

Pendant le semis

- Déposer les graines tomate dans les pots
- Recouvrir avec une fine couche de terreau.
- Placer les pots en conditions favorables en serre.

Après le semis - Arroser légèrement et délicatement à l'eau de robinet.

J10 → Arrosage délicat tous les jours à la même heure (entre 9 h et 10 h) avec l'eau de robinet.



Figure n°5 : plantules de tomate

J13 → Transfert des souches dans des tubes contenant du MML. A partir des tubes PDA mis en culture à J5, 2 ml de MML sont introduits dans chaque tube.

Vortexer environ 20 secondes puis récupérer 1 ml qui est introduit dans le tube contenant 9 mL de MML correspondant.

J20 → Préparation des inoculums :

- Filtrer la suspension conidienne des tubes MML dans des tubes à visse étiquetés puis ajuster la suspension à 10^6 spores/ml ;
- Conserver une nuit à 4°C.

J21 → Inoculation et transplantation :

- Les plantules de tomate semées à J9 sont extraites des pots;
- Les plantules sont rincées avec de l'eau distillée stérile ;
- Couper les systèmes racinaires à 7 mm au scalpel en dessous du pivot ;
- Les inoculums conservés à 4°C sont vortexés ;
- Dans chaque tube, une plantule, dont le système racinaire a été coupé, est placée pendant 30 minutes (**Figure n°6**).

Après inoculation, transplanter chaque plantule dans un pot de terreau comme suite (**Figure n°7**) . :

- Faire un trou avec un cône stérile ;
- Placer la plantule dans le trou ;
- Combler le trou autour des racines de la plantule ;
- Verser le contenu du tube à essai dans le trou de la plantule correspondante ;
- Combler le trou totalement avec du terreau stérile ;
- Verser le reste de la suspension conidienne sur toute la surface du pot.

NB : Ne pas arroser le jour de l'inoculation.

J22 → Arrosage délicat à l'eau de robinet en évitant le lessivage de l'inoculum ;

J23 → Arrosage tous les jours à l'eau de robinet entre 9 h et 10 h du matin ;

J42 → Notation des symptômes.



Figure n°6 : Inoculation des plantules pendant 30 minutes.



Figure n°7 : plantules de tomate après transplantation

II.1.2.2. Effet du *T. harzianum* sur l'expression de la maladie

Dans le but de tester l'effet antagoniste de *T. harzianum* sur *Forl*, un essai de lutte *in vivo* a été mis en place, nécessitant les étapes suivantes :

Préparation des plantules à inoculer

Cette étape a été réalisée de la même façon que celle utilisée pour la préparation des plantules destinées au test du pouvoir pathogène au J9 (semis des graines et arrosage) et avec la même variété de tomate.

Traitement des plantules

Le repiquage des plantules de tomate est réalisé lorsque ces dernières atteignent le stade deux feuilles bien étalées.

La transplantation des plantules est réalisée dans des pots en plastique remplis du terreau, après la préparation de la solution conidienne de *T.harzianum* ; un arrosage de ces plantules par la même suspension a été réalisé et on a évité l'arrosage pendant 48h et après on a arrosé quotidiennement avec de l'eau de robinet pendant 7 jours.

Un deuxième arrosage par la suspension conidienne de *Forl* a été réalisé, on a évité d'arroser pendant 48h après on a arrosé quotidiennement avec l'eau de robinet pendant 7 jours.

Analyse statistique

L'analyse des résultats expérimentaux et la représentation graphique ont été effectuées par le logiciel Microsoft Office Excel 2007.

Pour étudier l'effet antagoniste de *T. harzianum* vis-à-vis *Forl* *in vitro* et *in vivo*, on a utilisé l'analyse de la variance (ANOVA). Cette méthode consiste à mettre en évidence l'effet d'un/des facteur(s) sur la croissance fongique. Dans ce contexte, le seuil de signification considéré est de 5 % ($P < 0.05$).

CHAPITRE II
RESULTATS ET DISCUSSION

II. Résultat

II.1. Etudes morphologique de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*

II.1.1. Caractérisation macroscopique

L'étude macroscopique des colonies fongique en culture sur milieu PDA a permis de mettre en évidence les morphotype des isolats fongiques âgé de 6 jours , avec une variabilité de la pigmentation , l'aspect et la couleur des colonies .

La couleur varie entre le blanc, le jaune et le violet.

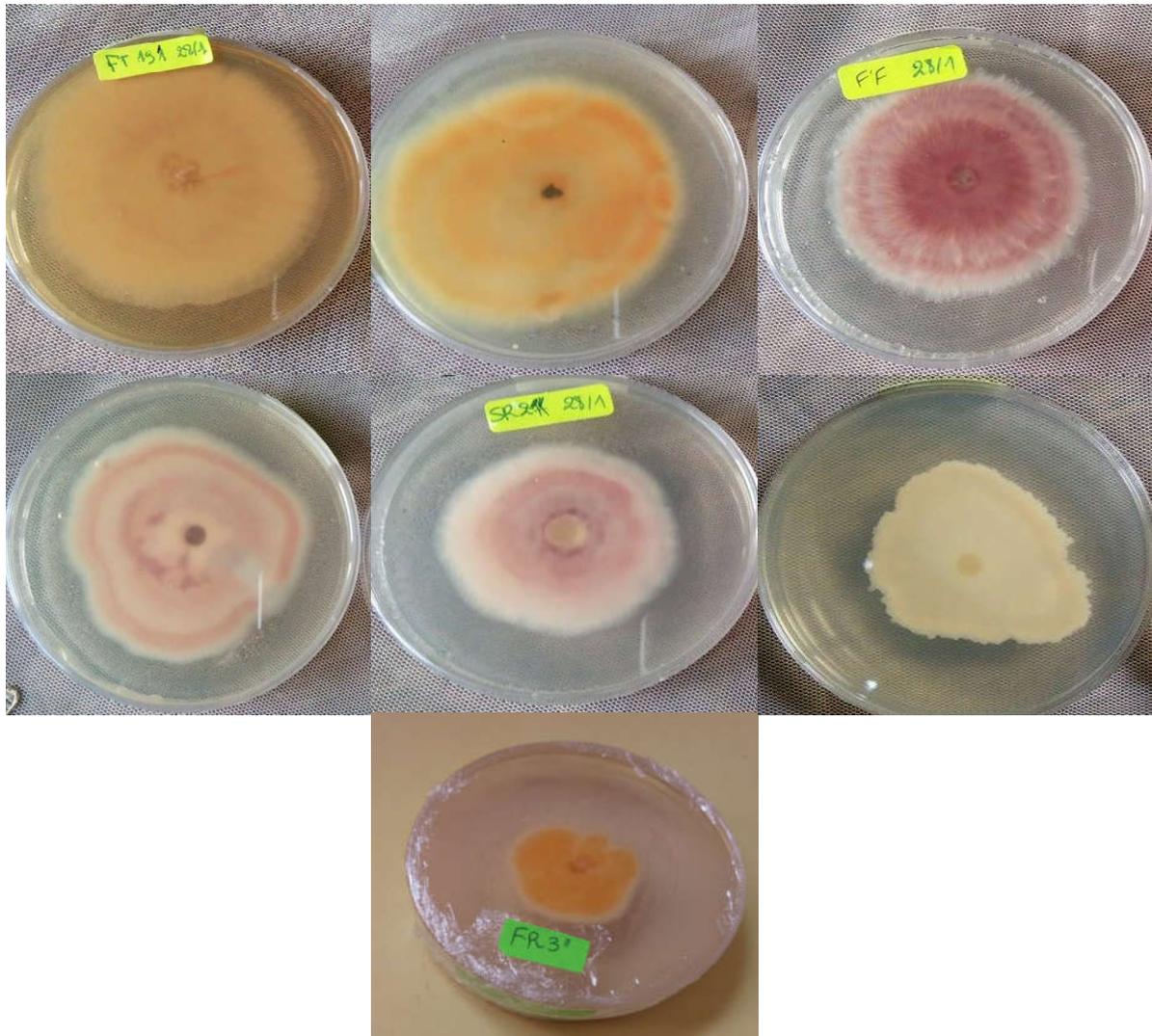


Figure 8: Aspect macroscopique des souches fongiques utilisées.

II.1.2. Caractérisation microscopique

L'observation microscopique a montré la présence d'un thalle cloisonné avec de courtes monophialides sur lesquelles se trouvent des micro conidies, ainsi que la présence de macro conidies et des chlamydozoospores.

Les microconidies(m) : sont unicellulaires ou bicellulaires, globuleuses ou arrondies, elles sont formées sur des phialides courtes, perpendiculaires aux filaments.

Les macroconidies(M) : sont pourvues de 2 à 3 cloisons, leurs tailles varie considérablement.

Les chlamydozoospores(C) : sont présentes en position terminale ou intercalaire.

Le mycélium (my) : est cloisonné et ramifié (**figure n° 9**).

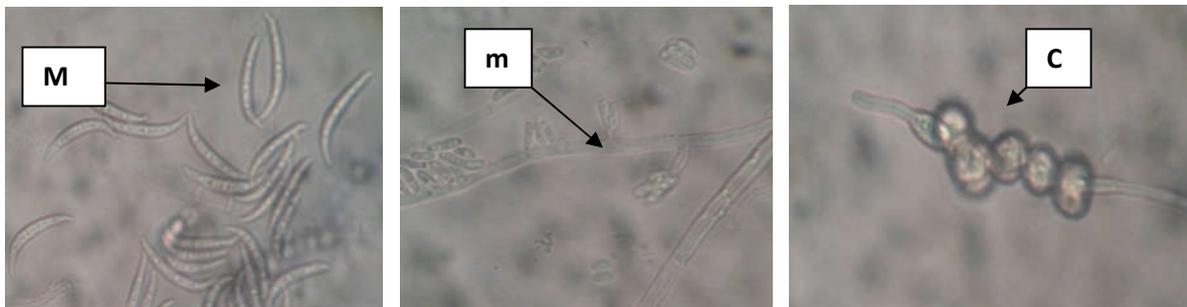


Figure 9: observation microscopique de *Fusarium oxysporum* (objectif x 40)

II.2. Etude morphologique de *Trichoderma harzianum*

II.2.1. Caractérisation macroscopique

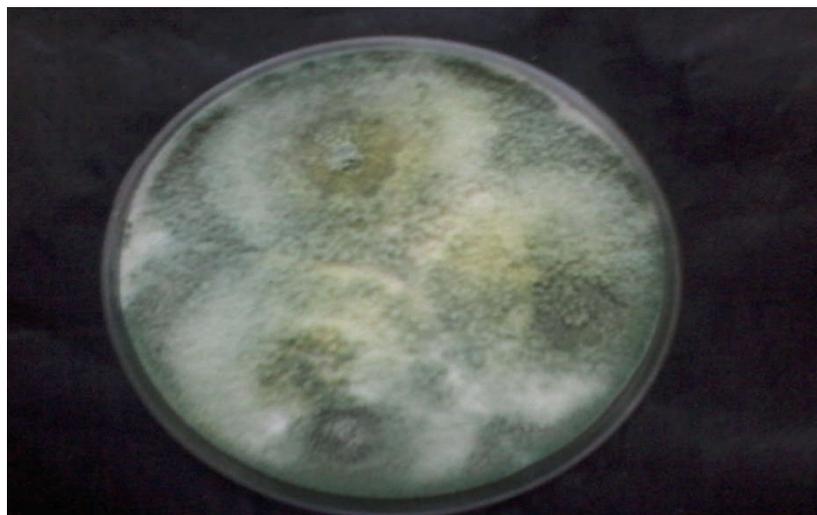


Figure 10: observation macroscopique de *Trichoderma harzianum*

La figure n°10 représente des colonies blanchâtres avec un centre verdâtre

II.2.2. Caractérisation microscopique

Type de spores (les conidies unicellulaires, rondes ou ellipsoïdales, lisses ou verruqueuses, sont produites en masse mucilagineuses formant des glomérules au sommet des phialis » des) (figure n°11).

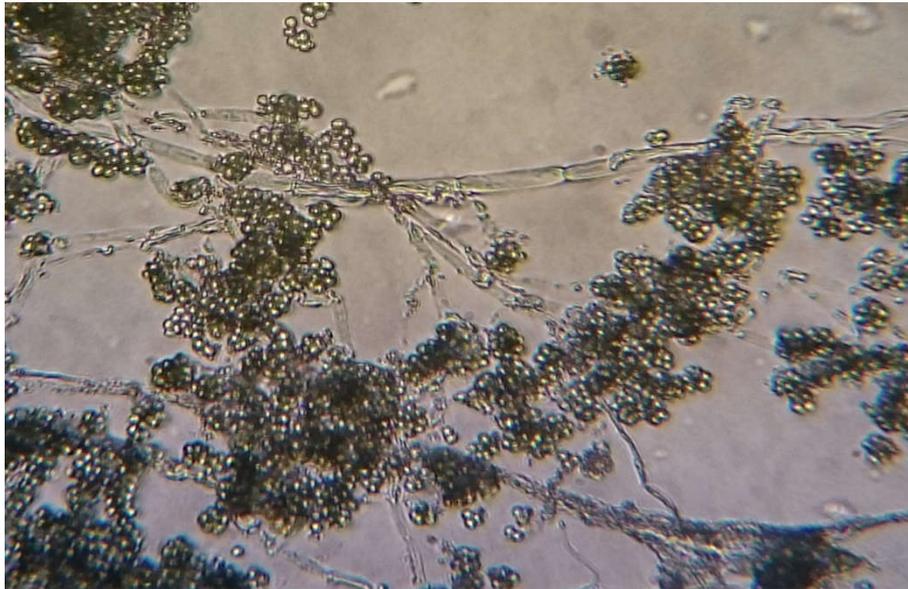


Figure 11: observation microscopique de *Trichoderma harzianum* (objectif x 10)

LUTTE BIOLOGIQUE

II.3. *In vitro*

II.3.1. Confrontation directe

Le repiquage réalisé des souches de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* et de *T. harzianum* a montré une croissance plus importante de *T. harzianum* que des souches de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

Les résultats illustrés sur la figures n°12 montrent qu'au bout de trois jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste, dont les souches FR2 et FR2' occupent une surface de 2.7 cm de diamètre ; ce qui correspond à un taux d'inhibition de 40% alors que le témoin cultivé seul occupe une surface d'environ 3.7 cm de diamètre , et la souche SR2 occupe une surface de 2.6 cm ce qui correspond à un taux d'inhibition de négligeable alors que le témoin 2.6 cm . Et pour les souches FR3'' et SR2'' occupent une surface entre 1.7 et 2.2 cm ; ce qui correspond à un taux d'inhibition négatif avec une valeur qui varie entre -0.8%

et - 12% et cela est dû à l'utilisation d'un autre milieu de culture PDA usé qui n'a pas favorisé la croissance mycélienne alors que les témoins varient entre 1.6 et 1.9 cm de diamètre.

La confrontation directe de l'antagoniste (*Trichoderma harzianum*) vis-à-vis du pathogène (*Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis-lycopersici*), *in vitro*, montre qu'il n'y a pas de zone de séparation des fronts mycéliens des deux champignons ainsi que l'envahissement de la colonie de *Fusarium* par la colonie de *T. harzianum* (figure n°12).

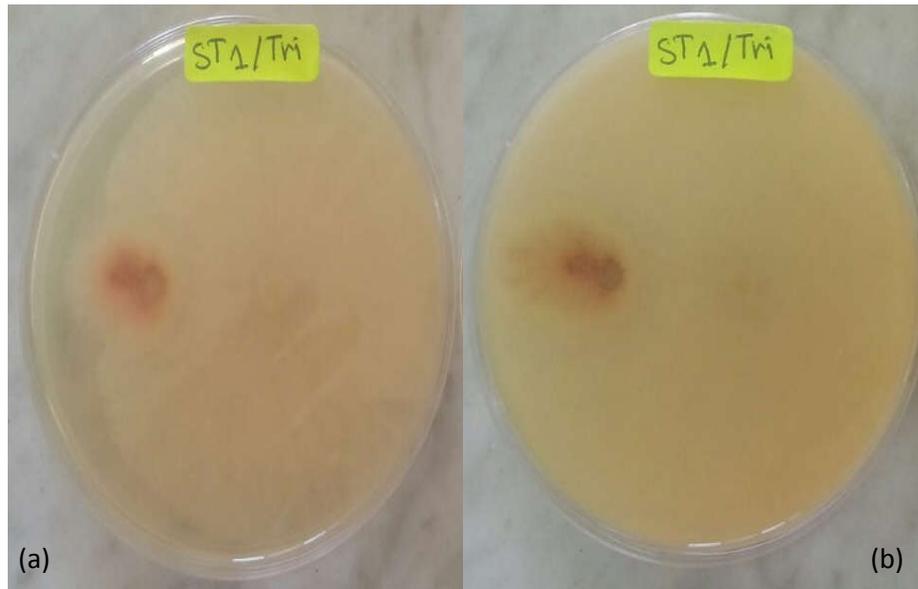


Figure 12 : Confrontation directe de *T. harzianum* vis-à-vis *Forl* aux 2ème (a) et 3ème (b) jours à 28 °C.

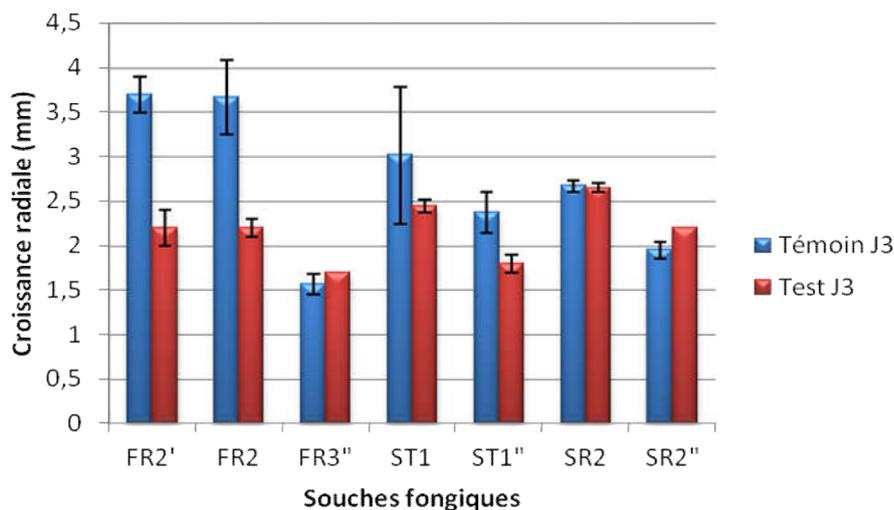


Figure 13: Croissance radiale des souches fongiques traitées par *T. harzianum* comparativement au témoin au 3ème jour de confrontation directe.

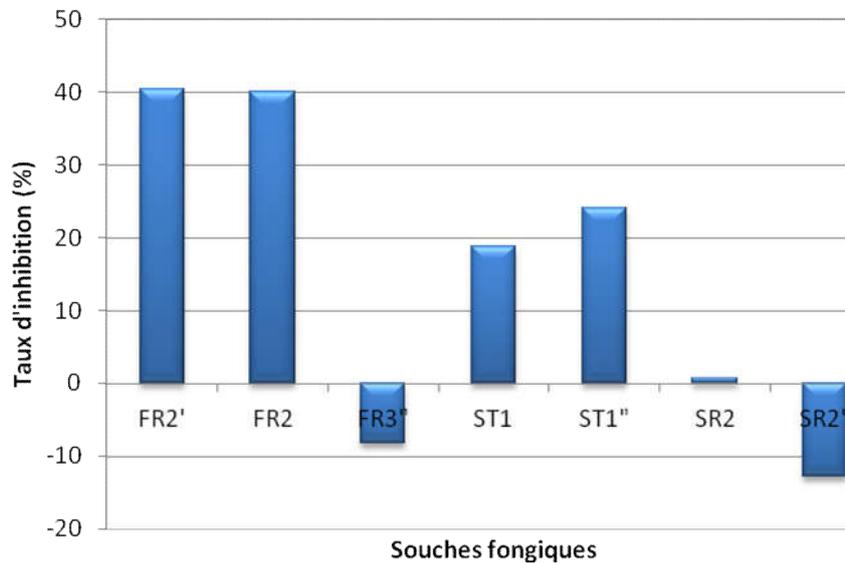


Figure 14: Présentation des taux d'inhibition de *Forl* par *T. harzianum* au 3ème jour d'incubation par confrontation directe.

II.3.2. Confrontation indirecte

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur des substances volatiles sécrétées par *Trichoderma harzianum* exercé sur les souches de *Forl* malgré l'absence d'un contact directe entre les deux champignons.

Cet effet est évalué par la mesure des diamètres des colonies du pathogène cultivé en présence ou en absence de l'antagoniste.

Les résultats obtenus et illustrés sur la figure n°15 montrent une nette réduction du diamètre des colonies de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en présence de *T. harzianum* par rapport au témoin non traité.

Au bout de six jours d'incubation la croissance radiale varie entre 3.9 et 5.2 cm de diamètre pour les souches FR3'' et FR2 traduisant une inhibition de l'ordre de 25%. Le témoin *Forl* cultivé seul occupe une surface qui varie entre 5.2 et 6.9 cm de diamètre. Et pour les souches FR2' et ST1 ; la croissance radiale varie entre 6.5 et 6.9 cm de diamètre traduisant une inhibition que varie entre 7 et 11 % alors que le témoin vari entre 7 et 7.6 cm. Et pour les

souches ST1'', SR2 et SR2'' occupent une surface qui varie entre 5, 6.6 et 6.9 cm de diamètre ce qui correspond à un taux d'inhibition négatif avec une valeur qui varie entre -13,-11,-5 % et cela est dû à l'utilisation d'un autre milieu de culture PDA usé qui n'a pas favorisé la croissance mycélienne alors que le témoin varie entre 4.3, 5.9 et 6.3 cm de diamètre.

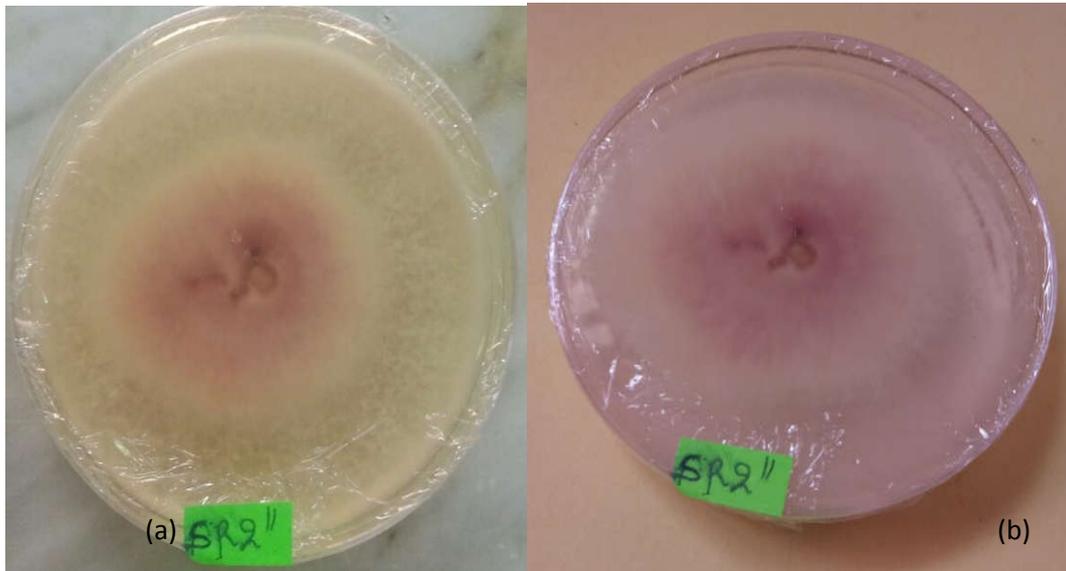


Figure 15: Confrontation indirecte de *T. harziaum* vis-à-vis *Forl* aux 3ème et 6ème jours à 28 °C.

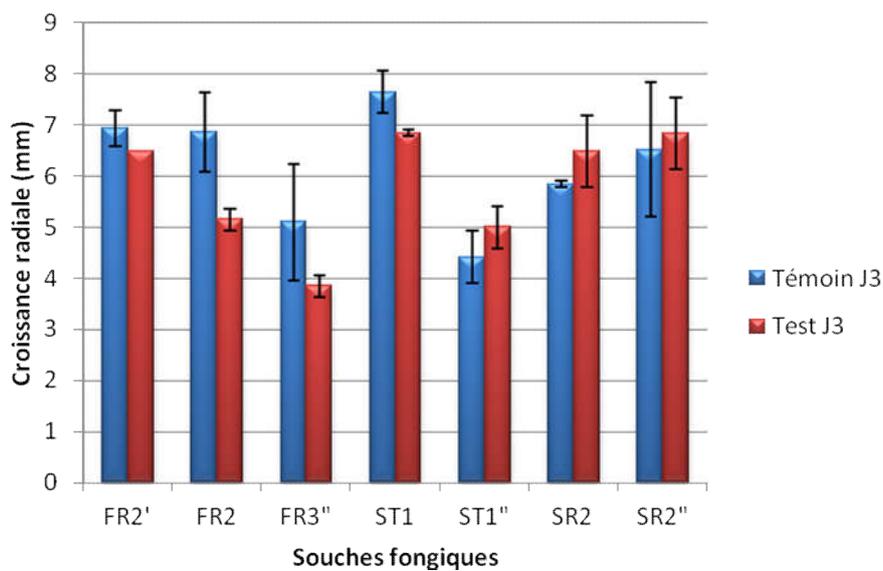


Figure 16 : Croissance radiale des souches fongiques traitées par *T. harziaum* comparativement au témoin au 6ème jour de confrontation indirecte

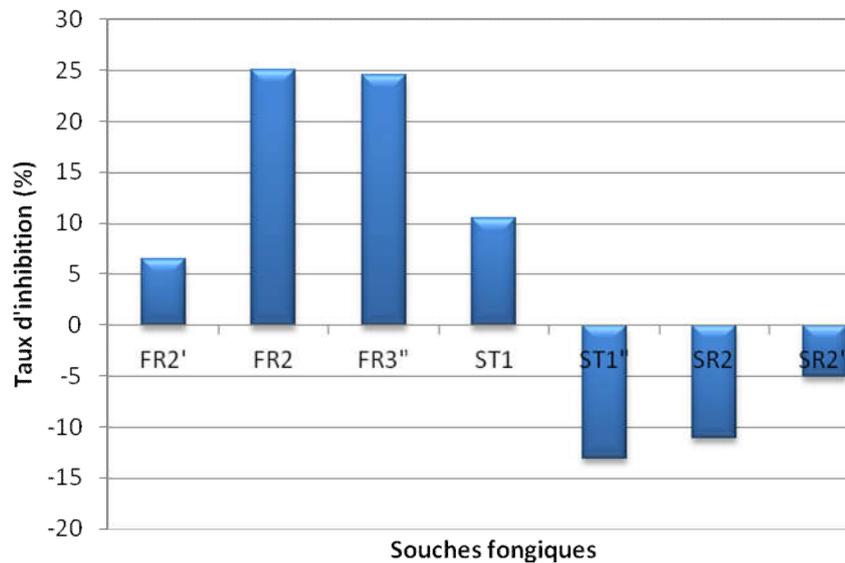


Figure 17: Taux d'inhibition de *Forl* par *T. harzianum* au 6ème jour d'incubation par confrontation indirecte.

II.4. *In vivo*

II.4.1. Test du pouvoir pathogène

Les résultats du test de la virulence des sept isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* utilisées ont montré que toutes les souches sont pathogènes avec un degré de virulence qui diffère selon la souche.

Les plants de tomate de la variété *Montfavet 63_5 hybride F1* dont les racines ont été trempées dans une suspension conidienne du *Forl* pendant 30 min et non traités ; ont présenté les symptômes qui ont été manifestés par une nécrose racinaire, un brunissement du pivot et de la tige suivi d'un jaunissement des feuilles qui a commencé du bas vers le haut, et donc un rétrécissement puis la mort totale de la plante comparativement au témoin négatif.



Figure 18: Présentation des symptômes de pourriture racinaire.

En revanche, le témoin (non inoculé et non traité) n'a présenté aucun symptôme similaire. Sur la plante témoin, il n'y a pas eu manifestation des symptômes.

Les résultats du test de pouvoir pathogène obtenus sont utilisés sur le tableau n° 4

Notation des symptômes

La notation des symptômes est présentée sur le Tableau n°4, et cela concerne les tests réalisés in vivo (témoin négatif et le test du pouvoir pathogène).

Tableau n°4 : les symptômes observés lors des tests *in vivo*

Souche		Brunissement de la tige	Brunissement du pivot	Jaunissement des feuilles	PR
Test pouvoir pathogène(<i>Forl</i>)	FR2'	↗	M	+	+
	FR2	↗	M	+	+
	FR3 "	↗	M	+	+
	ST1	↗	M	+	+
	ST1 "	↗	M	+	+
	SR2	↗	M	+	+
	SR2"	↗	M	+	+
Test de lute biologique (<i>Forl+T.h</i>)		↘	RAS	-	-
Témoin positif (<i>T.h</i>)		↘	RAS	-	-
Témoin négatif(ED)		↘	RAS	-	-

RAS : Rien à Signaler

T.h : *Trichoderma harzianum*

ED : Eau Distillé

M : Moyen

PR : Pourriture Racinaire

↗ : Augmente

↘ : Diminue

+ : Présence

- : Absence

II.4.2. Test de lutte biologique

Les plants de tomate de la variété *Montfavet 63_5 hybride F1* ont été arrosés par la suspension conidienne de *Trichoderma harzianum* et après 48h par la suspension conidienne de *Forl*, les résultats ont montré que le *Trichoderma harzianum* a un effet bénéfique pour le développement végétatif des plantules malgré la présence de l'agent pathogène *Forl* comparativement à des plantules témoin (non inoculé et non traité) et donc les plantules n'ont présenté aucun symptôme de pathogénicité.

Les plantules témoin sont arrosées par l'eau physiologique.



Figure 19: Plantule témoin utilisée dans le test de lutte biologique

III. Discussion

Notre travail de recherche s'inscrit dans le cadre d'une contribution dans les recherches de lutte biologique par *Trichoderma harzianum* vis-à-vis *Forl* *in vitro* et *in vivo*, tout en prenant considération de l'impacte sur l'environnement.

Ce travail se propose dans une première étape qui est l'étude *in vitro* et qui est réalisée en appliquant deux tests : la confrontation directe et la confrontation indirecte. Dans une deuxième étape on a étudié l'effet antagoniste *in vivo* qui a été réalisé en appliquant ainsi deux tests dont le test du pouvoir pathogène et le test de lutte biologique.

Au-delà de cette période et au terme de 3 jours, *Trichoderma harzianum* a envahit les colonies de *Forl* et sporule même sur celle si, révélant ainsi son pouvoir hautement mycoparasitaire **(Benhamou, chet, 1996 ; Daami-Remadi, 2001 ; Daami- Remadi , El mahjoub , 2001)**.

L'envahissement du mycélium du pathogène par *T. harzianum* a également été observé par **Benhamou et Chet (1997)** en réalisant une confrontation directe sur milieu de culture PDA entre cet antagoniste et un autre champignon tellurique, *Fusarium*.

Cependant, **Daami-Remadi et El Mahjoub (2001)** ont signalé, en testant l'activité antagoniste de *T. harzianum* vis-à-vis le *Forl* et que pendant les trois premiers jours ; la boîte de Pétri est totalement envahie par *T. harzianum* qui ne commence à exercer son activité antagoniste qu'à partir du troisième jour d'incubation.

Ces observations sont en accord avec les résultats de **Dubot (1985) et Davet (1986)** qui ont montré que la croissance de *Trichoderma* est plus rapides que celle du pathogène, c'est le phénomène de compétition, ainsi les substances secrétées par *Tichoderma* agissant comme étant des antibiotiques inhibent la croissance de ce pathogène, ce qui explique le mécanisme d'antibiose.

En vue des résultats obtenus, nous pouvons expliquer que malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats de *Fusarium* testés et *T. harzianum*, ce dernier a pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

Maslouhi (1989) et Davet (1983) on décrit une action inhibitrice qui est due à une batterie de substances de nature chimique qui sont des antibiotiques libérées par *Trichoderma* (phénomène d'antibiose) **Ghisalberti et Sivasithamparam (1991)**.

Ce dernier est responsable de leur propriétés antagonistes et qui sont classées dans différents groupes basés sur leur origine biosynthétique ou leur structure chimique **(Cardoza et al ..,2005 ; Reino et al.,2008)**.

Ceci s'expliquerait par l'aptitude de *Trichoderma* à produire des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine présents sous forme des substances volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène **Dennis et Websters (1971)**.

Cela traduit que l'antagoniste possède une vitesse de croissance plus importante que celle du pathogène.

L'étude du pouvoir pathogène, nous a permis de démontrer la pathogénicité des souches sur la variété de tomate *Montfavet 63-5 HF1*.

Les résultats obtenus démontrent que les plantes de tomate inoculées par les souches testées présentent des symptômes de pourriture racinaire suivi par la mort de la plante, ce qui signifie que ces souches appartiennent à la forme spéciale *radicis lycopersici*. . **(Song et al. 2004)**.

Nous avons utilisé l'infection *in vivo* cité par **Si Mohammed et al. 2016 ; Hamini 2010**, c'est la méthode qui a donné les meilleurs résultats puisque l'inoculation se fait au stade plantule permettant ainsi de réaliser le test dans un temps relativement court.

Le traitement des plantes de tomate inoculé par l'antagoniste *T. harzianum* a réduit le taux de pathogénicité de *Forl* responsable de la pourriture racinaire à 80 %, donnant donc des résultats significatifs.

Ainsi les résultats de **Johanne et al., 2002** montrent que le flétrissement fusarien causé par *Forl* chez la tomate peut être contrôlé par *Trichoderma harzianum*.

L'effet bénéfique de *T. harzianum* a été signalé aussi par **Sivan et al. (1987)**

Qui ont montré que l'enrobage des semences de tomate à l'aide de cet antagoniste a réduit de 80 % de la pourriture racinaire et du collet de la tomate.

De plus *T. harzianum* a un effet protecteur et stimulateur de la croissance chez les plantes de la tomate puisque les symptômes de pourriture ont été réduits, car elle préserve le système racinaire et favorise le développement végétatif de la plante comparativement aux plants témoin non inoculés et non traités.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux de **(Kerroum, 2010)** qui ont montré que l'antagoniste (*Trichoderma harzianum*) utilisé dans ce travail joue un rôle très important dans l'inhibition du pathogène *Forl in vivo* ce qui indique que *Trichoderma* sécrète des substances dans le sol qui faiblissent la pathogénicité du pathogène ou la stopper définitivement et favorise la résistance de la plante de tomate.

CONCLUSION

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la mise en évidence de l'effet antagoniste de *Trichoderma harzianum* vis-à-vis *Forl* *in vitro* et *in vivo*, dans le but de contribuer dans les recherches de lutte biologique.

Les résultats de la confrontation directe et indirecte *in vitro* entre *Forl* et *T. harzianum*, ont montré une inhibition de la croissance mycélienne du pathogène testé. En effet, dans la confrontation directe, *T. harzianum* a envahi les colonies de *Forl* au bout du 3^{ème} jour d'incubation.

Dans le cas de la confrontation indirecte, une réduction du diamètre des colonies de *Forl* a été observée par rapport au témoin. Cela montre, qu'en plus de son pouvoir mycoparasitaire, *T. harzianum* peut agir par la sécrétion de substances volatiles qui sont capables de stopper à distance le développement de l'agent pathogène.

L'étude du pouvoir pathogène nous a permis de démontrer la pathogénicité des souches, vu les symptômes de la pourriture racinaire observés, ce qui a confirmé l'appartenance des souches à la forme spéciale pathogène « *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi* ».

D'après le traitement des plantes de tomate inoculé par l'antagoniste *T. harzianum* qui a réduit le taux de pathogénicité de *Forl* responsable de la pourriture racinaire et il a favorisé le développement de la plante et la rigidité du système racinaire donnant donc des résultats significatifs comparativement à la plante témoin.

En se basant sur les résultats obtenus dans le test de lutte biologique, on peut dire que l'utilisation *Trichoderma harzianum*, en tant qu'agent de lutte biologique naturel contre la pourriture racinaire de la tomate causée par *Forl* est d'intérêt primordial, d'autant plus que les produits chimiques actifs contre ce pathogène sont en nombre relativement réduit à cause de leurs effets sur l'environnement.

A l'issue de notre étude, on peut dire qu'il reste comme perspective l'application de *Trichoderma harzianum* sur les champs ainsi que l'utilisation d'autres microorganismes comme moyen de lutte biologique.

ANNEXES

Le milieu de culture est autoclavé à 120°C pendant 15 min sous une pression de 1 bar.

Milieu Potato Dextrose Agar (PDA) solide :

Pomme de terre	200 g
Glucose	10 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH=5,6

MML (Milieu Minimum Liquide) :

Na (NO ₃).....	2g/L
KH ₂ PO ₄	1g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	2.5g/L
KCL.....	0.5g/L
Glucose	5g/L
Solution d'oligoéléments.....	2ml/L

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographiques

- Agrios, G.N.** 2005. Plant Pathology. Fifth Edition, Elsevier Academic Press, California 92101, 524-539.
- Alabouvette C, Couteaudier Y, Louvet, J.**1984.Recherche sur la résistance des sols aux maladies.X-Comparaison de la mycoflore colonisant les racines de melons cultivés dans un sol résistant ou dans un sol sensible aux fusarioses vasculaires.4,735-740.
- Alabouvette, C. Olivain, C. et Steinberg, C.** 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. European Journal of Plant Pathology, 114: 329-341.
- Armstrong, GM. Armstrong, JK.**1981. "Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases", in: Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Cook, R.J. (Eds.) *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*, The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA: 391-399.
- Baayen R.P ; Dreven F ; Krijger M.C et Waalwijk C,**1997 .Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f.sp.*dianthi* and *Fusarium redolens* f.sp.*dianthi*.*European Journal of Plant Pathology* 103,395-408.
- Baker, K.F. and R.J. Cook, eds.** 1982. Biological Control of Plant Pathogens. St Paul: APS Press 433 pp.
- Bélanger, R.R., N. Dufour, J. Caron and N. Benhamou.** 1995. Chronological events associated with antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* : Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology* 5 : 41-53.
- Benaouli Hadjira,** 2015.La biodiversité des *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*« caractérisation, compatibilité végétative » la lutte chimique et la lutte biologique.
- Benchabane, M.** 2005. Caractérisation des effets d'antagonisme microbienne et de promotion de la croissance végétale de souche de *Pseudomonas* spp. *fluorescents*, thèse de Doctorat d'état .FSB6UTHB.Alger, p. 235.
- Benhamou, N. Rey, P. Cherif, M. Hockenhull, J. Tirilly, Y.** 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence-related reactions in tomato root when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis- lycopersici*. *Phytopathology*. 87 : 108-121.
- Benhamou N. , Chet I . (1997).** Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum* .*Appl .Environ .Microbiol* .63 , p . 2095-2099.

- Benhamou N et Chet I (1996)** .Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* : ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction .Phytopathology86 . P 405-416 .
- Bilal, VI.** 1955. The Fusaria Biology and Systematics. Kiev. Akad. Nauk. Ukr.
- Bilal, VI.**1977. Experimental morphogenesis in the fungi of the genus *Fusarium* and their Taxonomy. Ann. Acad. Sci. Fenn. A. IV Biologica. 168 : 7-18.
- Blancard, D. (2009)**. Les maladies de la tomate: identifier, connaître, maîtriser. Quae.
- Blancard, D.** 1997. Les maladies de la tomate : Observer, identifier, lutter. Edition INRA, station de phytopathologie végétale, Monfavet.170-179.
- Blancard, D.**2013 .<http://ephytia.inra.fr/fr/C>
- Booth C.** 1971. The genus *Fusarium* , Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Booth, C.** 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Agricultural Bureaux. England
- Booth, C.** 1975. The present status of *Fusarium* taxonomy. Ann. Rev. Phytopath. 13: 83-93.
- Booth, C.** 1981. Perfect states (telemorphs) of *Fusarium* species, p. 446-452. In P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook (ed.), *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Booth, C.** 1984. The *Fusarium* problem: Historical, economic and taxonomic aspects. In The applied Mycology of *Fusarium*, Moss, M.O. and Smith, J. E. Ed. Cambridge University Press, 1-13.
- Bouhot, D.** 1981. Some aspects of the pathogenic potential in *formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* on *Cucurbitaceae*. In : *Fusarium*. Diseases, biology, and taxonomy, (P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. Cook, editors). The Pennsylvania State University Press:318-326.
- Bounaga, N.** 1985. Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent de la fusariose du palmier dattier. Thèse de Doctorat d'état. Université des sciences et de Technologie Houari Boumédiène, Alger, p.195.
- Burgess, L.W.** 1981. General ecology of the Fusaria. In *Fusarium: diseases biology and taxonomy*. (ed. P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook), p. 225-235. Pennsylvania State University Press: University Park and London.
- Burgess, L. W. Summerell, BA. Bullock, S. Gott, KP. Backhouse, D.** 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 3rd ed. University of Sydney, Sydney, Australia.

Références bibliographiques

- Burnett J.H.** .1984. Aspets of *Fusarium* genetics. In “TheApplied Mycology of *Fusarium*“(Moss M.O.& Smith J.E., eds.), pp.39-69. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cardoza R.E ,Hermasa M .R, Vizacaino J . A, Sanz L, Monte E et Gutierrez S. (2005).** Secondary metabolite sprduced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. In : Mellado, E.,Barredo , J.L. (Eds.), *Microorganisms for Indusrial Enzymes and Biocontrol*. Research Signpost, Kerala, 1-22.
- Cardoza, R.E., Hermosa, M.R., Vizcaino, J.A., Sanz, L., Monte, E., Gutierrez, S., 2005.** Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. In: Mellado, E., Barredo, J.L. (Eds.), *Microorganisms for Industrial Enzymes and Biocontrol*. ResearchSignpost, Kerala, pp. 1–22.
- Caron, J. 1993.** Isolement et caractérisation de divers isolats de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la fraise. Thèse M.Sc. no 12 350, Université Laval, Québec.
- Caron, J., L. Laverdière et P.O. Thibodeau. 1997.** Évaluation d’un biofongicide à base de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre – phase 2. Rapport de recherche, Serres du St-Laurent. 43 pp.
- Caron, J., L. Laverdière et P.O. Thibodeau. 2003.** Amélioration des qualités nutritionnelles du milieu de culture utilisé pour produire *Trichoderma*, afin d’en maximiser le potentiel antagoniste. Rapport de recherche, CRAAQ. 44 pp.
- Caron, J., L. Laverdière, P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 2002a.** 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, J., L. Laverdière, P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 2002b.** Contrôle biologique des micro- organismes pathogènes dans les substrats à l'aide d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum*. Rapport de recherche – projet #98-FP-0096, FPGST-E, 166 pp.
- Caron, J., P.O. Thibodeau et F. Charrier. 1998.** Technique rapide de production massive d'inoculum de micro-organismes : cas de *Trichoderma* et de *Botrytis*. *Phytoprotection* 79 : 97.
- Caron, J., P.O. Thibodeau et R.R. Bélanger. 1993.** Isolation et caractérisation de diverses souches de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise dans la production de la fraise. Rapport final de recherche – CORPAQ – projet #1A1-41696634-134. 47 pp.

Références bibliographiques

- Caron, J., P.O.** Thibodeau et R.R. Bélanger. **1994a.** Sélection d'isolats de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre. Rapport de recherche, Club d'encadrement technique Pro-Serre. 48 pp.
- Caron, J., P.O.** Thibodeau et R.R. Bélanger. **1994b.** Évaluation d'un biofongicide à base de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea*) dans la production de la tomate de serre. Rapport de recherche, Club d'encadrement technique Pro-Serre. 52 pp.
- Corbaz R.** 1990. Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Edition Presse polytechnique et universitaire romande ,286.
- Couteaudier Y ; Alabouvette C** 1985. lutte biologique entre la fusariose de la tomate. Résultats en serre de production. Agronomie 2 (5) : 151-156.
- Daami-Remadi M , El Mahjoub M . (2001).** Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum* . Ann. L'INRAT 74, 167-186.
- Davet , p.** 1983. Introduction et conservation de *Trichoderma* dans le sol. Les antagonistes microbiens , mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes, pp. 159-168. ACTA. INRA- ENSAM –Monpellier (FR).
- Davet , P.**1983. Les *Trichoderma*, exemple de champignon antagoniste d'agents pathogènes. Faune et flore auxiliaire en agriculture ; pp. 193-204. ACTA , INRA- ENSAM Montpellier (FR).
- Davet, P. et P. Camporota.** 1986. Étude comparative de quelques méthodes d'estimation de l'aptitude à la compétition saprophytique dans le sol des *Trichoderma*. Agronomie 6 : 575-581.
- Davet, P.**1986. Activité parasitaire des *Trichoderma* vis-à-vis des champignons à sclérotés ; corrélation avec l'aptitude à la compétition dans un sol non stérile. Agronomie 6 (9) :863-867.34
- Davet, P.**1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, p.384.
- Debourgogne, A. (2013).** Typage moléculaire du complexe d'espèces *Fusarium solani* et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole. Thèse de Doctorat, Université de Lorraine, France.
- Denis, C et Webster, I.,** 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* (II) production of volatile antibiotic Trans. Br. Mycol. Soc 57. 41-48.

Références bibliographiques

- Di Pietro, A. Madrid, MP. Caracuel, Z. Delgado-Jarana, J, Roncero, MIG.** 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wiltfungus Molecular Plant Pathology(4): 315-325.
- Djerbi, M. Sedera, MH. El Idrissi MA.** 1984. Caractéristiques culturales et identification du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* agent causal du bayoud. Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie. (58) : 1-8.
- Djonovic, S., Vargas, W.A., Kolomiets, M.V., Horndeski, M., Wiest, A., Kenerley, C.M.,** 2007. A protein aceouselicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* isrequired for induced system iceresistance in maize. Plant Physiol. 145, 875–889.
- Dommergues, Y. Mangenot, F.** 1970. Ecologie microbienne du sol. Edition Masson. 40-45.
- Elad , Y ; Chet, I ; Boyle, P et al .** parasitism of *Trichoderma spp.onrhizoctonia solani* and sclerotiumrolfsii.scaningelection microscopy and fluorescens microscopy.phytopathology ,1983.73 :85-88.
- Elad, Y.,** 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea*- incited diseases. European Journal of Plant Pathology 102, 719–732.
- Elad, Y., Freeman, S.,** 2002. Biological control of fungal plant pathogens. In Kempken, F. (Ed.), The Mycota: a Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. XI. Agricultural Applications. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 93–109.
- Fravel, D. Olivain, C. Alabouvette, C.** 2003. *Fusarium oxysporum* its biocontrol. New Phytologist, (157) : 493-502.
- Gerlach W & Nirenberg H.** 1982. The Genus *Fusarium* –a Pictorial Atlas.Biologische Bundesanstalt fur Land-und Forst wirts chaft,Berlin.
- Gerlach, W.** 1981. The present concept of *Fusarium* classification. In: *Fusarium: Diseases Biology and Taxonomy*. Edit. by Nelson P.E., Tousson T.A., and Cook R.J. The Penn. State Univ. Press. Univ. Parck and London.
- Gerlach, W.,** 1977. *Fusarium* species inciting plant diseases in the tropics. In: The disease spests and weeds in tropical crops. Edit. byKranz J., Schumutterer H., et Koch W. Verlag. Paul Parey. Berlin.
- Gerlach, W.**1970. Suggestions to an acceptable modern *Fusarium* taxonomy system. Ann. Acad. Sci. Fenn. A. IV. Biologica.(168): 37-49.
- Ghisalberti E. L et Sivasthamparam K. (1991).** Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma spp.* *SoilBiol .Biochem* . 23,1011-1020.

Références bibliographiques

- Gordon, WL** 1952. The occurrence of *Fusarium* species in Canada. Prevalence and Taxonomy of *Fusarium* species in cerealseed. Can. J. Bot.(30): 209-251.
- Gordon, WL.** 1960. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperateregions. Can. J. Bot. (38) : 643-658.
- Gordon, WL.** 1965. Pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Can. J. Bot. (43):1309-1318.
- Guezlane, A.** 1976. Essais de caractérisation enzymatique des *Fusarium* par électrophorèse. Catabolisme auxinique et virulence chez deux isolats de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*(Prill. Et Del). Thèse de Doctorat. Faculté des sciences de l'Université d'Aix Marseille II .
- Hamini, N.2010.** Diversité génétique des populations de *Fusarium* pathogène de la tomate sur le pourtour méditerranéen. Thèse de doctorat. Spécialité : Microbiologie. Option : Phytopathologie.
- Harman, G.E., 2006.** Overview of mechanis and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96, 190–194.
- Harman, G.E., C.K. Hayes, M. Lorito, R.M. Broadway, A. Di Pietro, C. Peterbauer and A. Tronsmo. 1993.** Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* : purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology 83 : 313-318.
- Henni, JE. Boisson, C. Geiger, JP.** 1994. Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*. Thèse de Doctorat en science de la nature (Phytopathlogie), Phytopathmedit. 51-58.
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H., ... & Santoyo, G. (2015).** Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, 81, 83-92.
- Howell, C.R., 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant disease 87, 4–10.
- IMI .1994.** Distribution Maps of Plant Diseases No. 240 (edition 3). CAB International, Wallingford, Royaume-Uni.
- Jarvis, WR. Shoemaker, RA.** 1978. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. Phytopathology(68): 1679-1680.
- Joffe, AZ.** 1974. A modern system of *Fusarium* taxonomy. Mycopathol. Mycol. Appl.(53): 201-228.

Références bibliographiques

- CARON, Johanne, LAVERDIÈRE, Lucie, THIBODEAU, Pierre O., et al.** Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection*, 2002, vol. 83, no 2, p. 73-87.
- Katan, T., Shlevin, E., Katan, J.** 1997. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculums. *Phytopathology* 87: 712-719.
- Kerroum F.** 2010. Caractérisation génétique par la compatibilité végétative et l'effet de certain Triazoles sur la croissance du *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis-lycopersici* .Mémoire de magister.Spécialité : Microbiologie, Option : Phytopathologie et phytopharmacie ,1-26,30-32.
- Komi A,** 1993. Pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp.*vasinfectum*(ATK) SN.Et H : Agent de la fusariose du cotonnier. Thèse de doctorat d'état. Université de Montpellier II.Science et Technique du Languedoc.
- Link, H. F. (1809).** Observationes in ordines plantarum naturales: Dissertatio Ima complectens anandrarum ordines epiphytas, mucedines gastromycos et fungos. In : Hawksworth, D. L. (2012). Managing and coping with names of pleomorphic fungi in a period of transition. *IMA fungus*, 3(1), 15-24.
- Lepoivre, P.** 2003. Phytopathologie: bases moléculaires de biologiques des pathosystèmes et fondement des stratégies de lutte. De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux (Eds.), Brussels, Belgium, 149-167.
- Leslie, JF. Summerell, BA.** 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual, Blackwell Publishing.
- Maslouhi A.,** 1989. Contribution à l'étude in vitro des antagonistes de *Fusarium oxysporum* f.sp.*albedinis*. agent causal du Bayoud, pp 4-8. Thèse de doctorat . INA, Marrakech (Maroc).
- Menzies, JG. Jarvis, WR.** 1994. The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Pathology*(43) : 378-386.
- Messiaen, CM. Cassini R.** 1968. Recherches sur les *Fusarium*, La systématique des *Fusarium*.Tome. (19):396-454.
- Messiaen, CM. Cassini, R.** 1981. Taxonomy of *Fusarium*. In“*Fusarium* Diseases, Biology and Taxonomy”, Ed Nelson P.E., Tousson T.A. et KOO K, R, J. The Pennsylvania State University Press(37): 427-445.
- Meyer, J.A.** 1967. Recherche sur les fusarioses. II. Ecologie et pathogénie du *Fusarium oxysporum*. *Ann. Epiphytes*, 18(2) : 241-247.
- Michielse, CB. Rep, M.** 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10 (3): 311-324.

- Nelson P.E ; Toussoum T. A and Marasas ,**1983.Fusarium species an illustrated manuel for identification. The Pennsylvania State University. Press.University. Press. University Park.
- O Donnell K ; CigelnikE ,** 1998. A phylogenetic structure for *Fusarium oxysporum* .In 8th International *Fusarium* Workshop (Brayford D., ed) http://pages.Hotbot.com/edu*fusarium/FUSWKSHP.html.
- Ozenda, P.** 1990. Les organismes végétaux, tome I : Végétaux inferieurs, Masson, p.220.
- Papavizas, G.C. 1985.** *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 23 : 23-54.
- Raillo, A.,** 1935. Diagnostic estimation of morphological and cultural character in the genus *Fusarium*. Bull. Plant. Prot. II. Leningrad. (Phytopathol).
- Rappily, F.** 1998. Evolution historique des concepts de résistances des plantes Aux agents pathogènes. Cahiers Agricultures.7(3) : 223-228.
- Reino J .L , Guerrero R .F , Hernández-Galan R et Collado I. G. (2008).**Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma* .*Phytochem* .Rev . 7,89-123 .
- Schaafsma, AW.Tamburic-Ilinic, L. Miller, JD. Hooker, DC.** 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. Canadian Journal of Plant Pathology. (23): 279-285.
- SI MOHAMMED ABDESLEM , 2010.** Etude de la compatibilité végétative chez des populations de *Fusarium oxysporum* isolées dans l'ouest Algérien. Mémoire de magister. Spécialité : Microbiologie Option : Phytopathologie et phytopharmacie, 7.8-17.
- Si Mohammed, A., Hamini-Kadar, N., Kihal, M., Henni, J. E., Sanchez, J. E., Gallego, E., & Garrido-Cardenas, J. E. A. (2016).** Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from tomato plants in Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 10(30), 1156-1163
- Sippell, D.W., J.G.N. Davidson, and R.S. Sadasivaiah. 1985.** Rhizoctonia root rot of raspberry in the peaceregion of Alberta. Can. J. Plant Pathol. 7 : 184-186.
- Sonoda, R.M., 1976.** The occurrence of *Fusarium root rot* of tomatoes in South Florida. Plant Dis. Rep., 60: 221-274.
- Sivan A., Ucko O.,Chet I. (1987)** .Biological of *Fusarium crown rot* of tomato by *Trichoderma harzianum* underfield condition .Plant Dis . 71 ,p.587-592.
- Smahi Asma,** 2008.Controle biologique de la fusariose vasculaire de la tomate causée par *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*. Thèse de magister. Spécialité : Microbiologie fondamentale et appliquée. Option : Phytopathologie et phytopharmacie.

Références bibliographiques

- Snissi, A. Ezzouhri, B. Rossi, D. Lairini, K.** 2006. Contrôle biologique de la fusariose de la tomate causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biochimie Substances Naturelles et Environnement*. 352-365.
- Snyder W.C et Hansen H.N**,1940.The species concept in *Fusarium*.American Journal of Botany 27,64-67.
- Song W.,Zho L., Yang C., Cao., Zhang N., Liu X.(2004)**. Tomato fusarium wilt and its achemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Prot.*23,p. 243-247.
- Sutton, J.C.** 1982. Epidemiology of wheatheadblight and maizeear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of plant pathology*. (195):195-209.
- Synder, W.C. Hansen , H.N.** 1940. The species concept in *Fusarium* American Journal of Botany.(27): 64-67.
- Synder, W. C., & Hansen, H. N.** (1941). The species concept in *Fusarium*withreference to section Martiella. *Am. J. Bot*, 28, 738-742.
- Synder, W.C. Hansen, H.N.** 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to discolor and other section. *Am. J. Bot.* (27): 738-742.
- Tivoli, B.** 1988. Guide d'identification des différentes espèces ou variétés de *Fusarium* rencontrées en France sur la pomme de terre et dans son environnement. *Agronomie*, 8(3): 211-222.
- Tousson, T.A. Nelson, P.E.** 1968. A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species. The pennsylvania state University Parck and London. 51 p.
- Tousson, T.A. Nelson, P.E.** 1976. A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species, Second Edition. Pennsylvania State UniversityPress, University Park.
- Trivedi, P. Pand, A.** 2008. In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research* (163) : 329-336.
- Waalwijk C ; Baayen R.P et GamsW**,1996. Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* section *Liseola* and *Sydowia* 48,90-104.
- Wang X, Yu J, Wang Y et Wang L. (2002)**. Mechanism1 based quantitative structure activity relationships for the inhibition of substituted phenols on germination rate of *Cucumissativus*. *Chemosphere*.46,241-250.
- Whipps, J.M.** 1992. Statusof biological disease control in horticulture. *Biocontrol Science and Technology* 2:3-24.
- Widden, P. and V. Scattolin.** 1988. Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing sprucelitter. *Mycologia* 80 : 795-803.

Références bibliographiques

Windles C.E , 1992. Fusarium . In “Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic fungi”(Singleton L.L,J.D.M et Rush C.M., eds), pp 115-128.American Phytopathological Society Press, ST.Paul.

Wollenweber, HW. Reinking, OA.1935. Die Fusarien, Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung fung.Berlin:PaulParey

Yamamoto, I., Komada, H., Kuniyasu, K., Saito, M., and Ezuka, A. 1974. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* inducing root rot of tomato. Proc. Kansai. *Plant Prost. Soc.* 16:17-29.

Yezli, W., Zebboudj-Yezli, N., Hamini-Kadar, N., Kihal, M., & Henni, J. E. (2015). An in vitro antagonistic activity evaluation of rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) isolated from the Algerian west. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 7(1), 95-103.

Zebboudj, N., Yezli, W., Hamini-Kadar, N., Kihal, M., & Henni, J. E. (2014). Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis* isolated from diseased date palm in South Algeria. *Int. J. Biosci*, 5, 99-106.

Résumé

La pourriture des racines et du collet de la tomate est une maladie provoquée par le pathogène *Fusarium oxysporum f.sp.radicis lycopersici*. Ce champignon est d'origine tellurique et doté d'une spécificité stricte d'hôtes.

Dans notre travail nous avons utilisé neuf souches du pathogène *Fusarium* et une souche de l'antagoniste *Trichoderma harzianum*, selon leurs aspects macroscopiques on a pu distinguer trois morphotypes (ras muqueux, cotonneux, duveteux) avec différentes pigmentations (violet, jaune, blanche).

La lutte biologique est parmi les moyens les plus couramment utilisée pour le contrôle de cette maladie en se basant sur l'utilisation de *Trichoderma harzianum*.

Parmi les méthodes de confrontations utilisées *in vitro* et sur milieu PDA qui favorise la croissance mycélienne des souches à 28°C la confrontation directe là où on a remarqué un envahissement de la colonie du pathogène par la colonie de l'antagoniste ce qui prouve son pouvoir mycoparasitaire avec un taux d'inhibition qui correspond à 40% ce qui explique la sensibilité de la souche FR2 et un taux d'inhibition faible de 0.2% ce qui explique que la souche SR2 est moins sensible que l'autre.

Et la confrontation indirecte ce qui a démontré que cet antagoniste sécrète des substances volatiles qui inhibent la croissance mycélienne de *Forl* avec un taux d'inhibition qui correspond à 25% ce qui explique la sensibilité des souches FR2 et FR3'' et un taux d'inhibition faible qui varie entre 6 et 11 % pour les souches FR2'' et SR2'' ce qui explique une faiblesse de sensibilité.

La confrontation de l'antagoniste avec le champignon pathogène *in vivo* est due à L'inoculation des plantules de tomate par les souches a montrée pour la plus part une diminution de la gravité de cette maladie.

Mots clés : *Fusarium oxysporum f.sp.radicis lycopersici*, *Trichoderma harzianum*, lutte biologique, *in vitro*, *in vivo*.

Abstract

Root rot and collar of the tomato is a disease caused by the pathogen *Fusarium oxysporum f.sp.radicis lycopersici*. This fungus is of telluric origin and endowed with a strict specificity of hosts. In our work we used nine strains of the *Fusarium* pathogen and one strain of the antagonist *Trichoderma harzianum*. In their macroscopic aspects, three morphotypes (mucous, fluffy, fluffy) were distinguished with different pigments (violet, yellow, white). Biological control is one of the most common ways of controlling this disease based on the use of *Trichoderma harzianum*. Among the confrontation methods used *in vitro* and on a PDA medium, which favors the mycelial growth of strains at 28 ° C., the direct confrontation where there has been observed invasion of the colony of the pathogen by the colony of the antagonist, which proves its power Mycoparasitic with a rate of inhibition which corresponds to 40%, which explains the sensitivity of the FR2 strain and a low inhibition rate of 0.2%, which explains why the SR2 strain is less sensitive than the other. And the indirect confrontation which demonstrated that this antagonist secretes volatile substances that inhibit the mycelial growth of *Forl* with an inhibition rate which correspond to 25% which explains the sensitivity of the strains FR2 and FR3" and a rate of ' Inhibition which varies between 6 and 11% for the FR2 'and SR2' 'strains, which explains a weakness of sensitivity. The comparison of the antagonist with the pathogen fungus *in vivo* is due to the inoculation of the tomato seedlings by the strains have shown mostly a decrease in the severity of this disease.

Key words: *Fusarium oxysporum f.sp.radicis lycopersici*, *Trichoderma harzianum*, biological control, *in vitro*, *in vivo*.

ملخص

عفن الجذور والعفن تاج الطماطم هو المرض الذي يسببه الممرض *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici*. هذا الفطر هو البرية، ولها خصوصية المضيف صارمة. في عملنا استعملنا تسعة سلالات من مسببات المرض *Fusarium* وسلالة واحدة من *Trichoderma harzianum* عدائية، وفقا لجوانبها العيانية يمكننا أن نميز ثلاثة morphotypes (رأس المخاطية، قطنية، رقيق) مع تصبغ مختلف (اللون الأرجواني والأصفر والأبيض).
المكافحة البيولوجية هي من بين الأكثر شيوعا للسيطرة على المرض تعتمد على استخدام وسائل *Trichoderma.harzianum*.

ومن بين الأساليب المواجهات المستخدمة في المختبر على المستنبت PDA الذي يعزز نمو فطر في 28°C المواجهة المباشرة حيث لاحظنا غزو مستعمرة الممرض من قبل مستعمرة للخصم الذي يثبت قوته mycoparasitic بمعدل تثبيط والتي تتطابق إلى 40% وهذا هو السبب في الحساسية من سلالة FR2 وانخفاض معدل تثبيط 0.2% وهذا هو ما يفسر أن سلالة SR2 هي أقل حساسية من غيرها.

والمواجهة غير المباشرة والتي أظهرت أن هذا الخصم تفرز المواد المتطايرة التي تمنع نمو فطر *Frol* مع معدل تثبيط والذي يتطابق إلى 25% وهو ما يفسر حساسية السلالات و FR3"et و FR2 ومعدل تثبيط ضعيف الذي يتراوح بين 6 و 11% للسلالات FR2 و SR2 " وهو ما يفسر انخفاض الحساسية.

المواجهة بين الخصم والفطر الممرض في الجسم الحي راجعة الى تلقيح شتلات الطماطم بالسلالات أظهرت بالنسبة للجزء الأكبر انخفاض في شدة هذا المرض.

كلمات البحث: *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici* ، *Trichoderma harzianum* ، والمكافحة البيولوجية، في المختبر، في الجسم الحي.