

**Université Mustapha Stambouli de Mascara**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département des Sciences Agronomiques**



# **Polycopié de**

***Méthodes de lutte biologique en protection des végétaux***

**- Travaux pratiques -**

**Préparé et présenté par**

**Dr. Ahmed Amine BEKKAR**

**(Maitre de conférences B à l'université de Mascara)**

**Année Universitaire 2016-2017**

## *Préface*

Ce polycopié de Travaux pratiques de la matière « *Méthodes de lutte biologique en protection des végétaux* » est destiné aux étudiants de master 1, spécialité protection des végétaux, dans le domaine des sciences agronomiques. Il est conforme au programme officiel entré en vigueur depuis l'harmonisation des masters 2015-2016. La matière « *Méthodes de lutte biologique en protection des végétaux* », si importante dans un cursus spécialisé, est enseignée dans le semestre 2 (S2). Ce polycopié peut s'adresser aussi aux doctorants préparant des thèses dans le domaine de la lutte microbiologique.

Ce document va fournir à l'étudiant l'opportunité d'apprendre des méthodes et des techniques expérimentales utilisées en laboratoire, pour l'étude et la sélection d'un agent de lutte biologique efficace contre les maladies des plantes par lequel il doit comprendre un certain nombre de mécanismes biologiques impliqués dans le biocontrôle pour mieux gérer les risques phytosanitaires par des méthodes respectueuses de l'environnement.

Ce polycopié de travaux pratiques est rédigé d'une façon à présenter des techniques et des méthodes pour énoncer leurs résultats attendus. L'objectif de la structure rédactionnelle de ce document est de permettre à l'étudiant d'apprendre à manipuler correctement (comment suivre un protocole pour qu'un résultat soit valide...) et d'évaluer par lui-même les résultats expérimentaux.

Toute remarque, proposition ou critique constructive permettant l'amélioration de ce polycopié sera recueillie avec grand intérêt. Je vous serais totalement reconnaissant de me faire part de vos observations en me les communiquant au mail : [amisou09@yahoo.fr](mailto:amisou09@yahoo.fr)

Polycopié de Travaux pratiques de  
*Méthodes de lutte biologique en protection des végétaux*  
Dr. BEKKAR Ahmed Amine (maitre de conférences B à l'université de Mascara)

*Préface*

## SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Étude de l'activité antagoniste <i>in vitro</i> des isolats fongiques ou bactériens vis-à-vis des champignons phytopathogènes</b> .....	<b>02</b>
<b>1.1. Confrontation par contact direct sur milieu de culture</b> .....	<b>02</b>
1.1.1. Cas des champignons antagonistes .....	02
1.1.2. Cas bactéries antagonistes .....	05
<b>1.2. Confrontation à distance sur milieu de culture</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. Cas des champignons antagonistes .....	10
1.2.2. Cas des bactéries antagonistes .....	11
1.2.3. Résultats attendus après une confrontation à distance .....	11
<b>1.3. Analyse <i>in vitro</i> de l'effet des filtrats de culture des antagonistes</b> .....	<b>12</b>
1.3.1. Effet des inhibiteurs non-volatiles sur la germination des conidies .....	12
1.3.2. Effet des inhibiteurs non-volatiles sur la croissance mycélienne .....	13
1.3.3. Résultats attendus .....	13
1.3.3.1. Analyse de l'effet des inhibiteurs non-volatiles sur la germination des conidies .....	13
1.3.3.2. Analyse de l'effet des inhibiteurs non-volatiles sur la croissance mycélienne .....	14
<b>2. Étude du MODE D'ACTION des isolats fongiques ou bactériens utilisé contre les champignons phytopathogènes</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1. Mycoparasitisme</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2. Antibiose</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3. Production des enzymes lytiques</b> .....	<b>23</b>
2.3.1. Chitinases .....	23
2.3.2. Production des cellulases .....	23
2.3.3. Production des protéases .....	25
2.3.4. Production des lipases .....	26
<b>2.4. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) (Cyanogenèse)</b> .....	<b>27</b>

<b>3. Protection des plantes par des traitements de semences avec des microorganismes antagonistes (Bio-essai) .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Méthodologie de travail .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Lecture des résultats .....</b>	<b>30</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>31</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>35</b>

# Introduction

## Introduction

La production végétale mondiale connaît chaque année des pertes de récolte très importantes dues aux agents pathogènes en réduisant le rendement, la productivité et la croissance de plusieurs cultures (Strange et Scott, 2005).

Pour contrôler ces organismes pathogènes, des fois difficiles à atteindre, une série de stratégies a été proposée, dont la rotation des cultures, l'utilisation de variétés résistantes ou le traitement phytosanitaire, ce sont les principales approches pratiques utilisées à une efficacité limitée (Correa et Soria, 2011).

La désinfection du sol n'est jamais complète en raison d'une part, de la difficulté de sa réalisation et d'autre part, à l'induction de souches résistantes (Hervas *et al.*, 1997 ; Arunodhayam *et al.*, 2014).

Les traitements phytosanitaires à base des produits chimiques de synthèse donnent de bons résultats à court terme, mais à long terme leur accumulation ou l'accumulation de leurs résidus dans l'environnement représente un danger qu'on ne peut plus négliger (Toussaint, 1996).

Le développement de méthodes de lutte biologique, par l'utilisation des organismes antagonistes, pourrait contribuer à réduire l'emploi de pesticides et qui constitue donc une alternative potentielle et très prometteuse.

Parmi les agents de lutte biologique, il existe une grande diversité d'organismes, parmi lesquels des microorganismes, des invertébrés et des vertébrés avec une grande variété de modes d'action qui les différencie (Suty, 2010).

Ce *polycopié* de *travaux pratiques (TP)* regroupe les différentes techniques et méthodes utilisées pour l'étude *in vitro* et *in vivo* de l'activité antagoniste d'un microorganisme vis-à-vis des champignons phytopathogènes dans le but de sélectionner les antagonistes les plus performants.

La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à l'utilisation de plusieurs modes d'action vis-à-vis les pathogènes. ***Une partie de ce polycopié*** est consacrée à l'étude des modes d'action employés par des antagonistes, d'origine fongiques et bactériens, à l'égard des champignons phytopathogènes comme le mycoparasitisme, l'antibiose et la production des métabolites secondaires (HCN et enzymes lytiques).

## 1. Étude de l'activité antagoniste *in vitro* des isolats fongiques ou bactériens vis-à-vis des champignons phytopathogènes

L'activité antagoniste *in vitro* des isolats fongiques ou bactériens est étudiée selon deux méthodes : confrontation par contact direct et confrontation à distance sur milieu de culture. Elle a pour but de sélectionner les isolats les plus antagonistes sur la base des effets inhibiteurs sur la croissance mycélienne des pathogènes.

Le pouvoir antagoniste est testé sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe 1).

### 1.1. Confrontation par contact direct sur milieu de culture

#### 1.1.1. Cas des champignons antagonistes

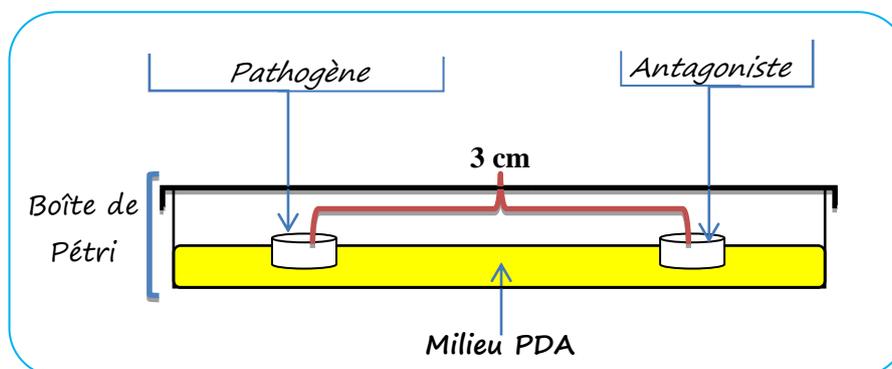
##### A- Technique utilisée

Cette activité est étudiée en utilisant la technique de la confrontation directe décrite par plusieurs auteurs dont Sivan et Chet (1989).

Cette technique consiste à co-ensemencer, dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA (Annexe 1), deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre) prélevées à partir de cultures d'antagoniste et du pathogène (cultures âgées de 7 jours). Les deux pastilles sont ensemencées à 3 cm de distance l'une de l'autre et à équidistance du centre de la boîte (Figure 1).

Le témoin est constitué uniquement du pathogène, repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA.

Les boîtes sont par la suite incubées à l'obscurité pendant six jours à une température ambiante pour les deux protagonistes (généralement à 25°C).



**Fig. 1:** Confrontation équidistante d'un pathogène et un antagoniste par contact direct sur milieu PDA

### B- Estimation du pourcentage d'inhibition

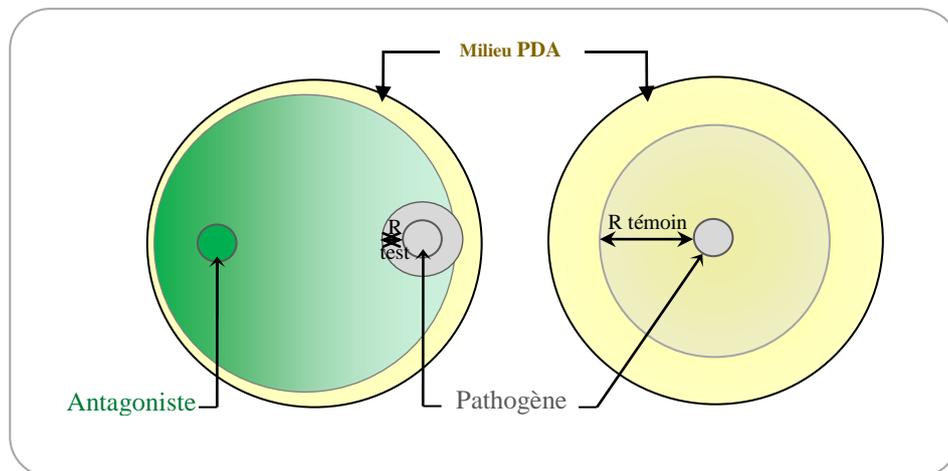
La lecture des résultats consiste à mesurer la distance développée par le pathogène en direction de l'antagoniste au bout de 2, 4 et 6 jours après l'ensemencement et qui sera comparée à celle développée par le pathogène uniquement.

L'inhibition des antagonistes testés est évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon la formule suivante (Figure 2) (Datta *et al.*, 2004) :

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

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

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



**Fig. 2** : Calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène par confrontation directe en comparaison avec le témoin

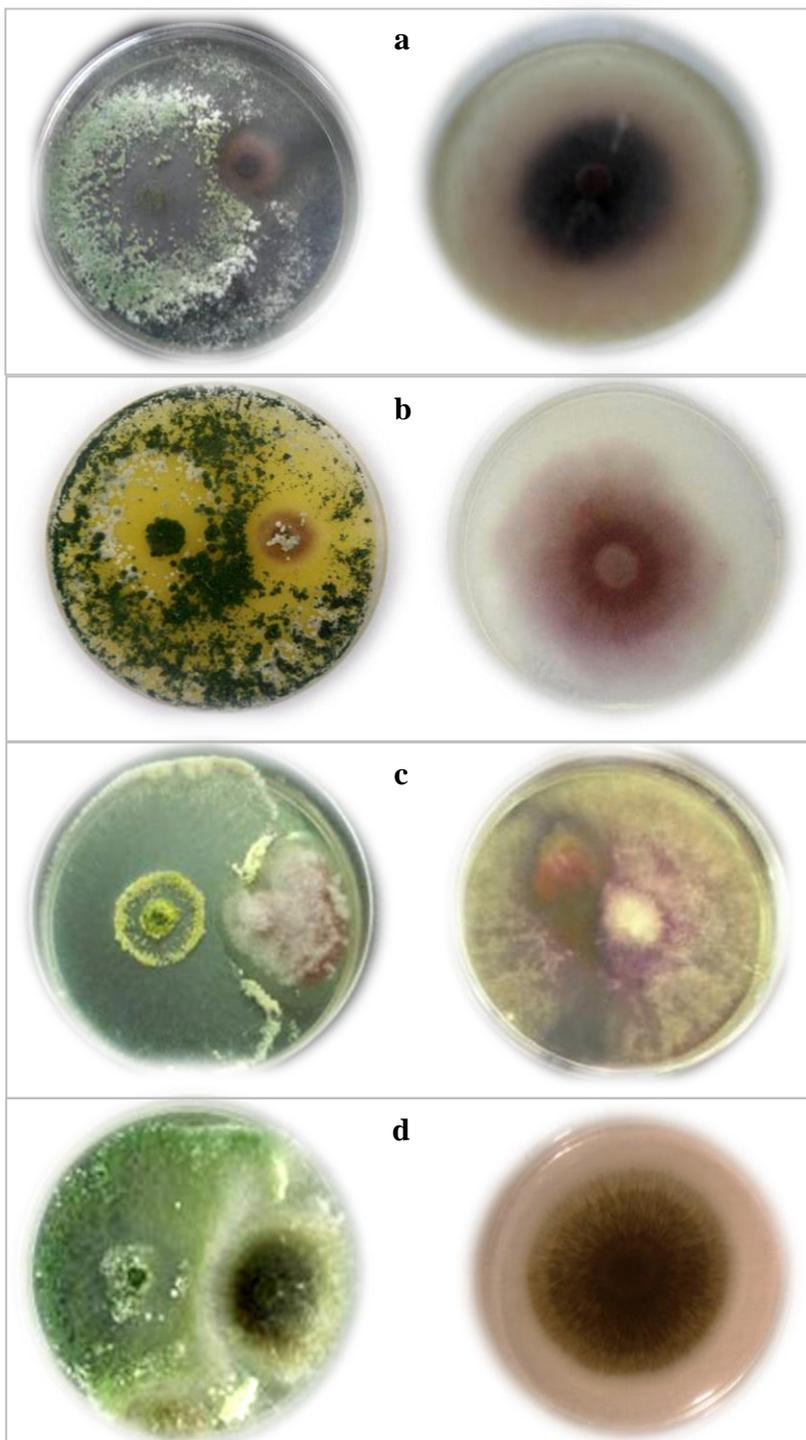
### C- Résultats attendus

Cette étude met en évidence l'effet inhibiteur des isolats antagonistes testés sur les pathogènes.

Le repiquage simultané des deux isolats protagonistes doit montrer une croissance plus rapide de l'antagoniste par rapport à l'isolat pathogène. La confrontation a eu lieu en tenant compte de la vitesse de croissance des champignons pathogènes testés.

La figure 3 représente l'effet inhibiteur exercé par des isolats de *Trichoderma* sur la croissance mycélienne des 4 isolats de champignons phytopathogènes après six jours d'incubation à 25°C. Il s'agit de :

- *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* (FOL : agent causal du flétrissement vasculaire de la lentille)
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (FOA : agent causal du flétrissement vasculaire du palmier dattier)
- *Fusarium solani* (FS : agent causal de la pourriture racinaire du pois chiche)
- *Helminthosporium teres* (HT : agent causal de l'helminthosporiose de l'orge)



**Fig. 3:** Inhibition de la croissance mycélienne 4 champignons phytopathogènes, en comparaison avec leur témoin, par confrontation directe avec *Trichoderma* après 6 jours d'incubation à 25°C

- a :** *F. oxysporum* f. sp. *lentis*
- b :** *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*
- c :** *F. solani*
- d :** *Helminthosporium teres*

(a) Zaim, 2007.

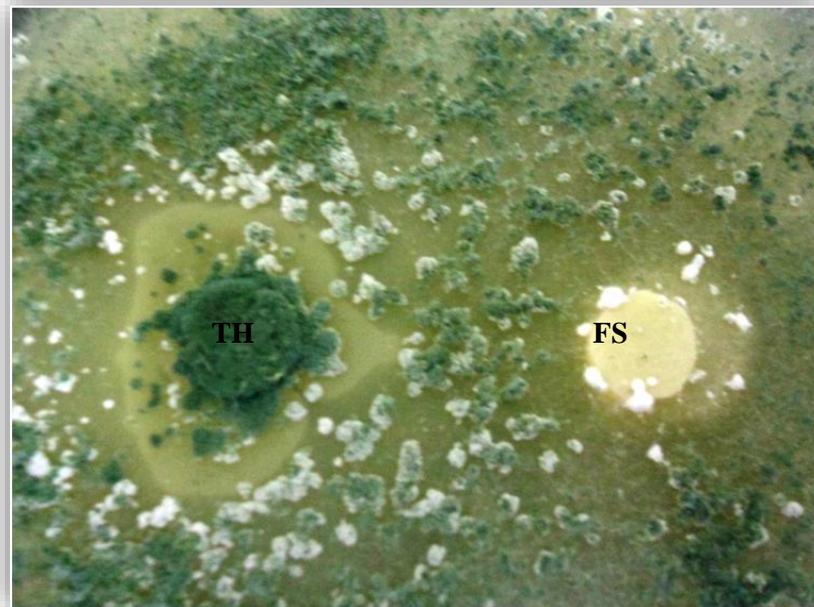
(b) Bekkar, 2016.

(c et d) Allal et Kaddour Benali, 2009

Au delà d'une période de six jours, les isolats de *Trichoderma* spp. envahissent les colonies du pathogène et sporulent même sur celles-ci, révélant ainsi son pouvoir hautement myco-parasitaire. L'envahissement de *Trichoderma* est rapide et intense (Figure 3). Il semble qu'il existe un certain tropisme qui mène les hyphes de *Trichoderma* à l'encontre des spores du parasite.

Certains isolats de *Trichoderma* confrontés avec *Fusarium* ont montré une coloration jaunâtre diffusible dans le milieu de culture après 6 jours d'incubation (Figure 3b).

Une surcroissance des hyphes de *Trichoderma* (Figure 4) accompagnée d'une sporulation en masse sur les hyphes de *Fusarium* dans la zone de contact ont été observées dès le 4<sup>ème</sup> jour de confrontation.



**Fig. 4:** Action mycoparasitaire de *Trichoderma harzianum* (TH) montrant une surcroissance et une sporulation abondante sur la colonie *Fusarium solani* (FS) (Bekkar *et al.*, 2016)

### **1.1.2. Cas bactéries antagonistes**

#### ***A- Technique utilisée***

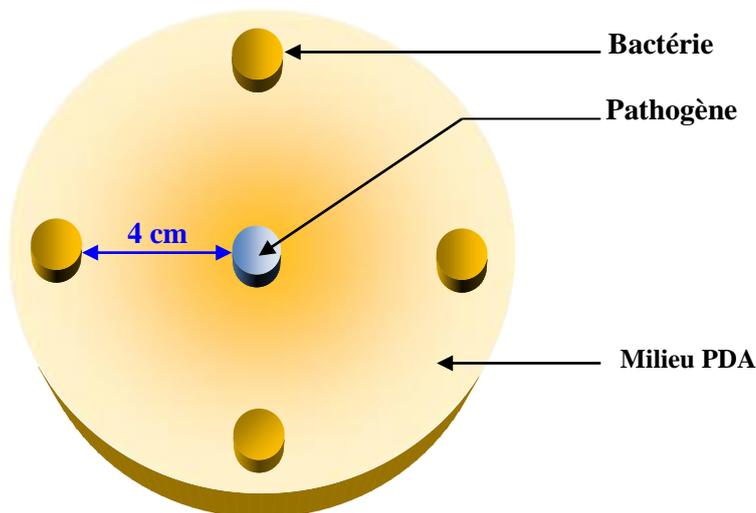
La méthode utilisée pour ce test est décrite par Landa *et al.* (1997) et Swain et Ray (2007) qui consiste à ensemercer quatre pastilles gélosées de la même bactérie à une distance de 4 cm du centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Par la suite, une

pastille gélosée de 6 mm de diamètre du pathogène est ensemencée au centre de la boîte (Figure 5).

Le témoin est constitué par un repiquage des pathogènes au centre de la boîte sans les bactéries.

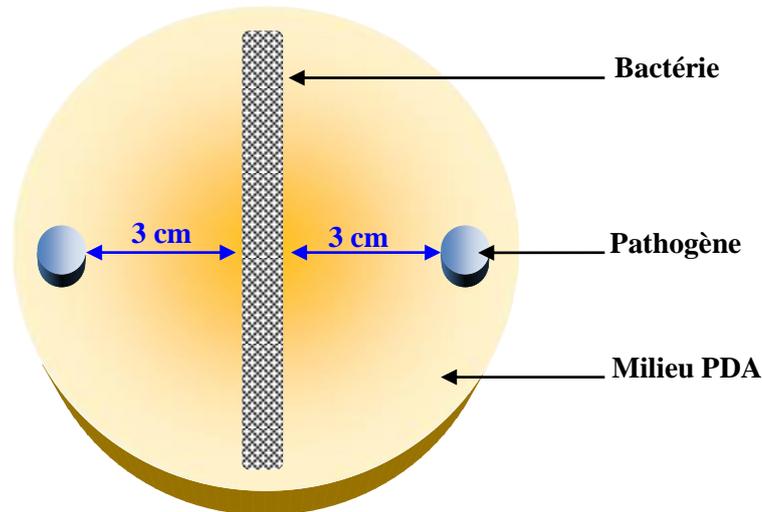
L'incubation des boîtes est effectuée à 25°C pendant 6 à 7 jours.

Pour les bactéries à croissance lente et une période de latence longue, les boîtes de Pétri contenant le milieu PDA sont ensemencées par les bactéries et incubées à 28°C pendant 24h pour s'acclimater avec le milieu. Après un jour d'incubation, une pastille gélosée (6 mm de diamètre) du champignon phytopathogène est déposée au centre de boîtes de Pétri.



**Fig. 5 :** Confrontation directe entre champignon pathogène et une bactérie antagoniste sur milieu PDA

Une autre méthode de l'antagonisme direct peut être utilisée pour le même objectif de la sélection des bactéries antagonistes. La bactérie est inoculée sous forme d'une strie rectiligne qui partage la boîte en deux parties égales. En suite, le champignon est placé sous forme de disques de part et d'autre de la strie à une distance de 3 cm (Figure 6). Les boîtes témoins ne sont pas ensemencées avec la bactérie.



**Fig. 6 :** Confrontation directe entre champignon et une bactérie sur milieu PDA

### **B- Estimation du pourcentage d'inhibition**

Après la période d'incubation, le diamètre moyen des colonies fongiques témoins et de celui des colonies en présence de l'antagoniste sont mesurés. On en déduit le pourcentage d'inhibition de développement du champignon pathogène selon la formule décrite précédemment.

L'effet antifongique des bactéries antagonistes est caractérisé par une inhibition partielle ou totale de la croissance radiale du champignon phytopathogène. L'inhibition de la croissance mycélienne est aussi évaluée selon une échelle de 0 à 3: 0 (pas d'inhibition), 1 (1-25%), 2 (26-50%) et 3 (51-75%) (Korsten *et al.*, 1995).

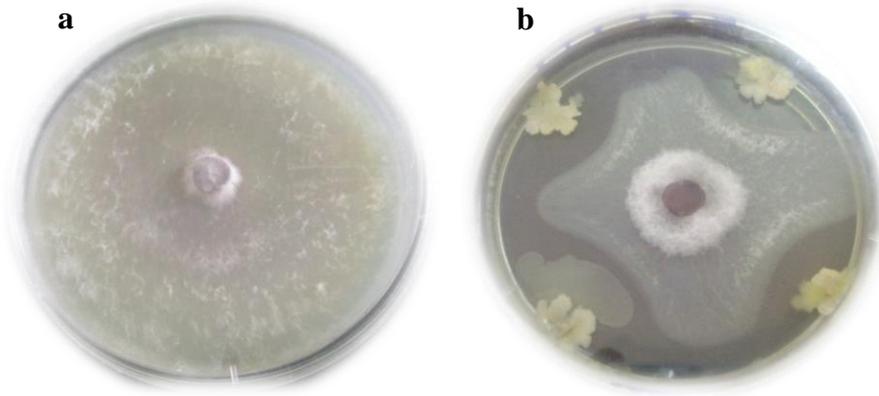
### **C- Résultats attendus**

La figure 7 représente l'effet inhibiteur exercé par des bactéries appartenant au genre *Bacillus* sur la croissance mycélienne du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* FOC (agent causal du flétrissement vasculaire du pois chiche) après six jours d'incubation à 25°C.

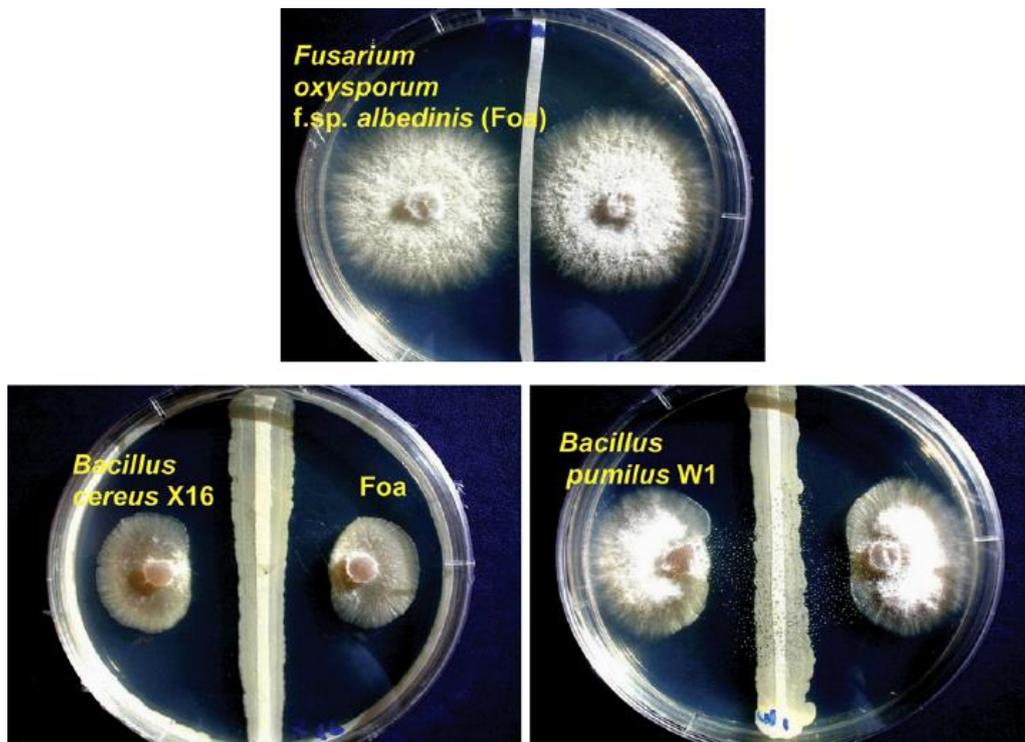
L'étude de l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes confrontés aux bactéries montre une réduction de la croissance par rapports aux témoins après six jours d'incubation (Figure 7 et 8).

Certains des isolats bactériens inhibent non seulement la croissance mycélienne mais également ont changé la coloration des mycéliums de *F. oxysporum* du blanc au jaune brun (Figure 9).

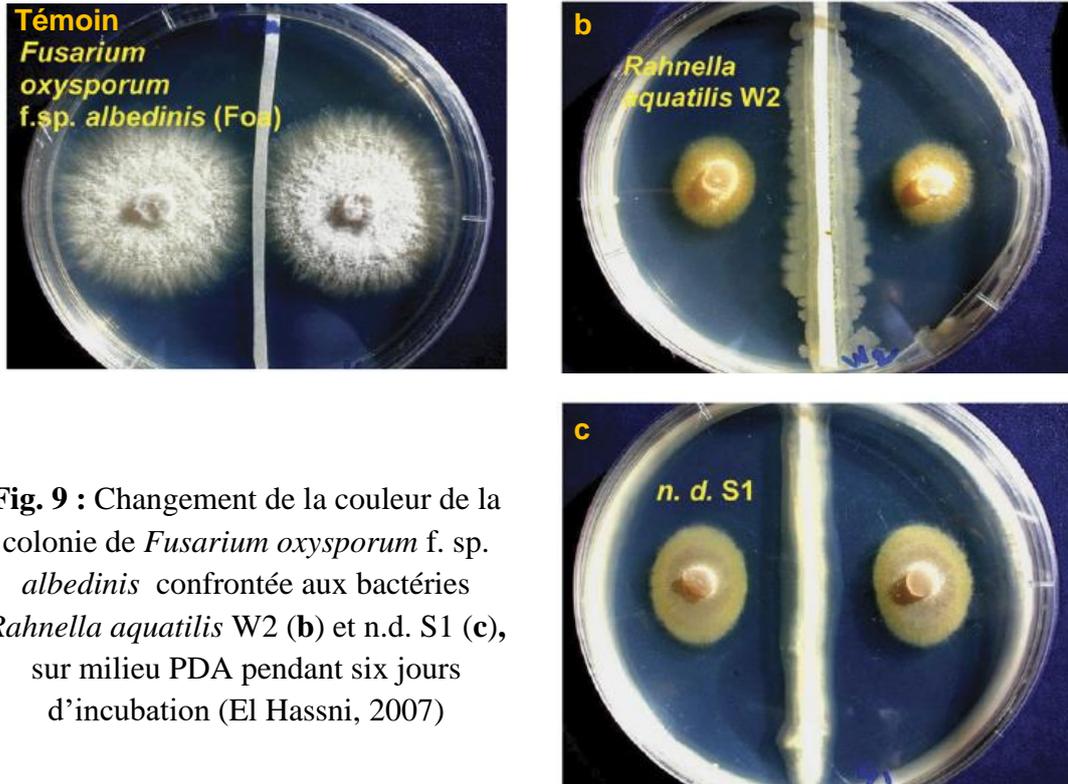
Aussi, l'activité antagoniste de certains isolats bactériens est en fonction de la production de substances antifongiques qu'on peut apprécier sur gélose. Les colonies sont nettement colorées en marron foncé, et où la coloration est plus accentuée lors de confrontations fongiques à proximité du mycélium (Figure 10).



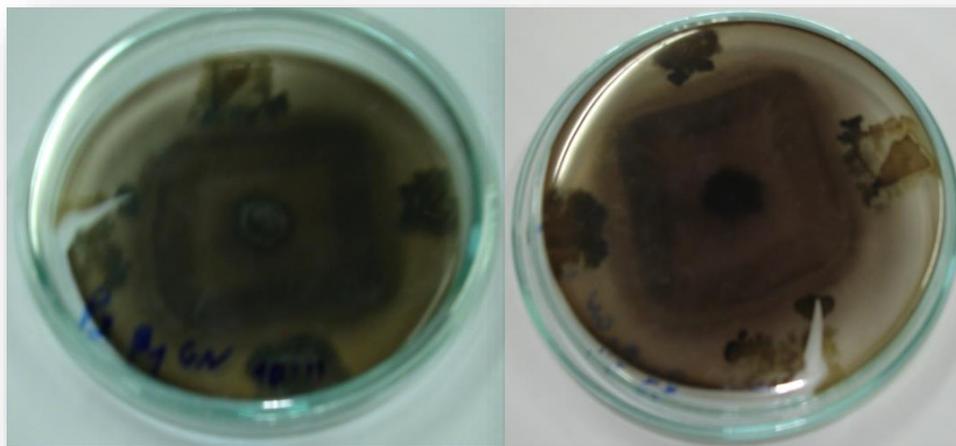
**Fig. 7:** Inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* (b) par rapport au témoin (a), après confrontation directe sur milieu PDA à 25°C pendant six jours d'incubation (Zaim *et al.*, 2016)



**Fig. 8 :** effet antifongique des bactéries *Bacillus cereus* X16 et *B. pumilus* W1 sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (agent causal du bayoud de palmier dattier) après 6 jours d'incubation sur le milieu de confrontation PDA (El Hassni, 2007)



**Fig. 9 :** Changement de la couleur de la colonie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* confrontée aux bactéries *Rahnella aquatilis* W2 (b) et n.d. S1 (c), sur milieu PDA pendant six jours d'incubation (El Hassni, 2007)



**Fig. 10:** La production de substances antifongiques diffusibles dans le milieu de culture PDA après confrontation directe (*Fusarium oxysporum*-Rhizobactérie antagoniste) (Zaim *et al.*, 2016)

## 1.2. Confrontation à distance sur milieu de culture

Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance (substances antifongiques volatiles) des antagonistes exercés sur les champignons phytopathogènes.

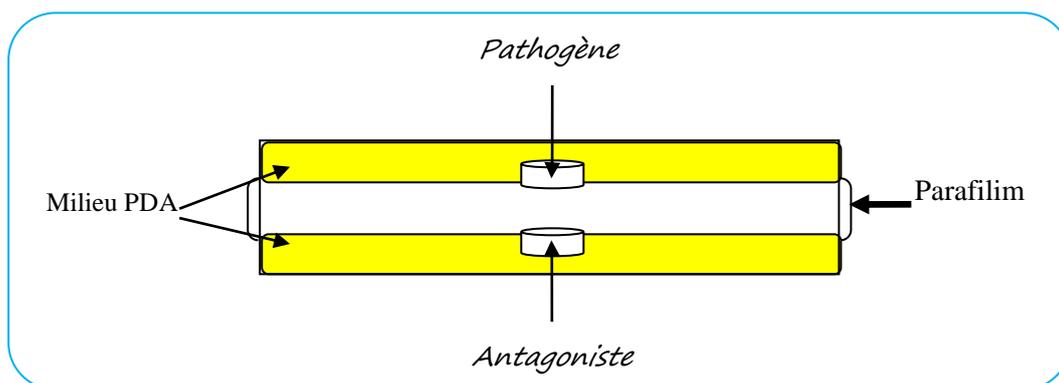
### 1.2.1. Cas des champignons antagonistes

#### A- Technique utilisée

L'inhibition fongique grâce à la production des substances volatiles par des champignons antagonistes est mesurée selon la méthode décrite par Dennis et Webster (1971a). A partir des cultures âgées de 7 jours des protagonistes, une pastille gélosée de 6 mm de diamètre est prélevée de chaque culture et placée séparément au centre d'une boîte de Petri contenant le milieu PDA. Après l'enlèvement des couvercles aseptiquement, la boîte de Petri ensemencée avec le pathogène est placée au dessus de celle qui contient l'antagoniste (Figure 11).

Les deux fonds adhésés sont fermés par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles.

Pour le témoin, le même assemblage est réalisé par la superposition de deux boîtes. Le fond de boîte contenant le milieu PDA seul est placé en dessous d'un fond de boîte contenant le pathogène.



**Fig. 11** : Confrontation à distance entre deux champignons protagonistes

#### B- Estimation du pourcentage d'inhibition

Le diamètre de la colonie du pathogène est mesuré après une période d'incubation de 6 jours à 25°C et le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est estimé comme étant la méthode décrite précédemment.

### 1.2.2. Cas des bactéries antagonistes

#### A- *Technique utilisée*

L'inhibition bactérienne grâce à la production des substances antifongiques volatiles est mesurée selon la méthode utilisée par Fiddaman et Rossall (1995).

Quatre disques de bactérie prélevée à partir d'une culture sur gélose nutritive sont placés de façon équidistante le long du périmètre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA.

Une seconde boîte de Pétri contenant le milieu PDA etensemencée avec un disque de 6 mm du pathogène au centre de la boîte de Pétri est placée au dessus de celle qui contient la bactérie après l'enlèvement des couvercles aseptiquement où les deux fonds adhésés sont fermés par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles.

Pour le témoin, un fond de boîte contenant le milieu PDA seul est placé en dessous d'un fond de boîte contenant le pathogène.

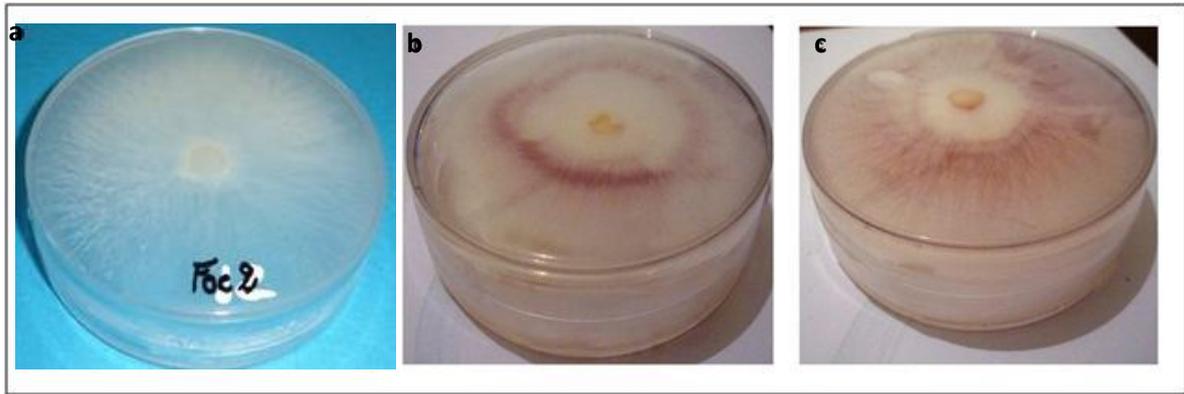
#### B- *Estimation du pourcentage d'inhibition*

Après six jours d'incubation à 25°C, l'inhibition de la croissance mycélienne est estimée et évaluée comme la méthode décrite précédemment.

### 1.2.3. Résultats attendus après une confrontation à distance

Les résultats obtenus de cette étude doivent montrer l'existence d'une nette réduction du diamètre des colonies du pathogène par rapport au témoin.

Un changement de couleur du mycélium du pathogène confronté à distance avec les antagonistes est aussi observé par rapport au témoin, ce qui correspond à la sécrétion des substances volatiles par ces derniers en présence du pathogène (Figure 12).



**Fig. 12:** Changement de l'aspect de la colonie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC) (b et c) après confrontation à distance par rapport au témoin (a) sur milieu PDA à 25°C pendant six jours d'incubation (Zaim, 2016)

### 1.3. Analyse *in vitro* de l'effet des filtrats de culture des antagonistes

L'effet des substances non-volatiles produites par des espèces antagonistes sur la germination des conidies et la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes est déterminé selon la méthode décrite par Dennis et de Webster (1971b).

Les filtrats de culture de l'antagoniste sont préparés en utilisant le milieu liquide PDB (Potato Dextrose Broth, Annexe 1) pour les champignons antagonistes et le milieu BN (Bouillon nutritif) pour les bactéries antagonistes. Deux pastilles gélosées de l'antagoniste (6 mm de diamètre) prélevées d'une culture âgée de 7 jours sontensemencées dans 100 ml de milieu liquide PDB ou BN et incubées à 25°C pendant 15 jours sous agitation. Les différents isolats antagonistes sont cultivés séparément sur le milieu liquide. Les cultures sont ensuite centrifugées à 8000 rpm pendant 10 mn. Le surnageant recueilli est filtré à travers un filtre millipore de 0,22 µm de diamètre.

#### 1.3.1. Effet des inhibiteurs non-volatiles sur la germination des conidies

La germination des conidies constitue une phase importante dans le cycle infectieux des champignons phytopathogènes. L'action *in vitro* des filtrats de culture des antagonistes est évaluée sur la germination des spores du pathogène.

Le filtrat de chaque antagoniste est ajouté aseptiquement, à l'aide d'une seringue stérile, au milieu PDB ou BN pour obtenir une concentration de 50% (v/v).

A partir des cultures jeunes du pathogène, des spores sont récoltées dans de l'eau distillée stérile. La suspension sporale est agitée afin de libérer les conidies des conidiophores. La suspension résultante est filtrée à travers un papier filtre stérile afin d'éliminer les fragments mycéliens puis ajustée à  $10^3$  spores/ml. Une quantité de 0,2 ml de cette suspension est ensemencée dans le milieu liquide PDB à laquelle le filtrat a été ajouté.

Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions mais sans addition du filtrat. Les cultures sont incubées à 25°C. Pour chaque filtrat, des répétitions sont réalisées.

Après chaque 24 h, le comptage des spores, germées ou non, a été effectué sur un total de 150 spores et le pourcentage d'inhibition de la germination des conidies (**IG**) du pathogène est déterminé en utilisant la formule suivante (Chandrakala *et al.*, 2012) :

$$\text{IG (\%)} = (\text{NPA}/\text{NT}) \times 100$$

**NPA** : nombre de conidies germées en présence de l'antagoniste

**NT** : nombre de conidies germées chez le témoin ;

La spore est considérée comme germée si la longueur du tube germinatif est supérieure au plus petit diamètre de la spore (Besri et Diatta, 1985).

### **1.3.2. Effet des inhibiteurs non-volatiles sur la croissance mycélienne**

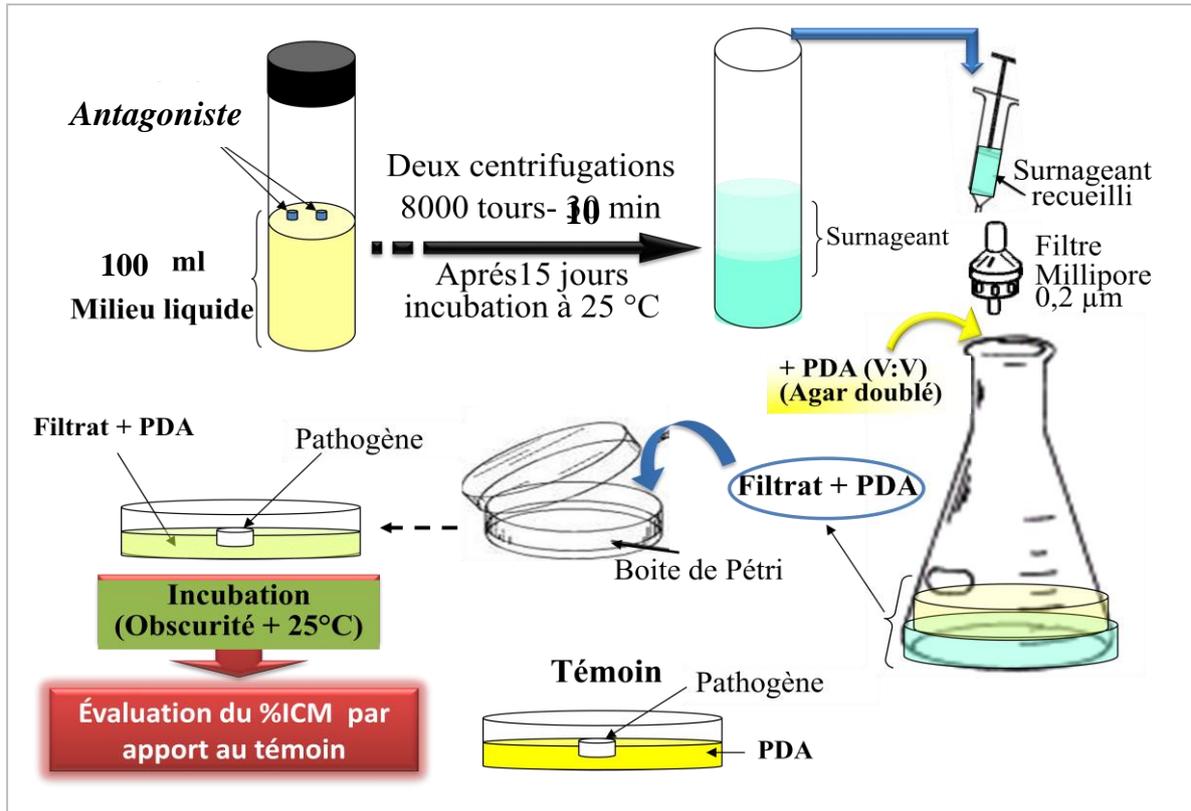
Le filtrat obtenu est introduit dans un erlen en mélange avec du milieu PDA en quantité suffisante pour atteindre 100 ml et obtenir les concentrations suivantes (V/V) : 0, 10, 20 et 50 %. Le milieu (PDA + filtrat) est versé dans des boîtes de Pétri (10 ml/ boîte). Après solidification de ce dernier, un explant de champignon pathogène est inoculé et incubé à 25 °C pendant 6 jours (Figure 13).

Le témoin est constitué par un explant du pathogène, inoculé dans un milieu PDA sans filtrat. La croissance mycélienne de pathogène est mesurée et le pourcentage d'inhibition (ICM) a été calculé.

### **1.3.3. Résultats attendus**

#### **1.3.3.1. Analyse de l'effet des inhibiteurs non-volatiles sur la germination des conidies**

L'action des filtrats de culture des antagonistes évaluée *in vitro* sur le milieu liquide PDB ou BN permet de mettre en évidence l'effet inhibiteur des substances non-volatiles (diffusibles) de isolats antagonistes exercées sur la germination des conidies du pathogène.



**Figure 13 :** Effet des inhibiteurs non-volatiles sur la croissance mycélienne (Dennis et de Webster, 1971b)

Une inhibition de la germination des conidies du pathogène sous l'effet des filtrats des antagonistes par rapport au témoin (sans filtrat) peut être observée et qui évolue en fonction du temps d'incubation (Figure 14 et 15). Le pourcentage moyen de germination dans le cas du témoin est de 99%.

L'inhibition de la germination conidienne du pathogène justifie la présence des métabolites libérés dans le milieu de culture par les isolats antagonistes.

### 1.3.3.2. Analyse de l'effet des inhibiteurs non-volatiles sur la croissance mycélienne

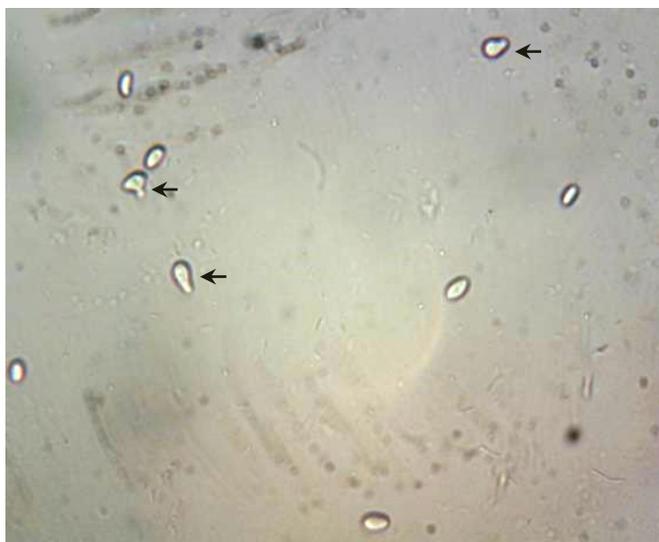
La figure 16 présente l'effet de différentes concentrations du filtrat de culture du champignon antagoniste *Trichoderma* spp. sur la croissance mycélienne de deux champignons phytopathogènes : *Helminthosporium teres* et *Fusarium oxysporum*.

A partir de la concentration 10 % l'effet inhibiteur du filtrat de *Trichoderma* spp. augmente brutalement pour atteindre un maximum à 50 %.

Témoin : pathogène FOC sans filtrat – après 24h

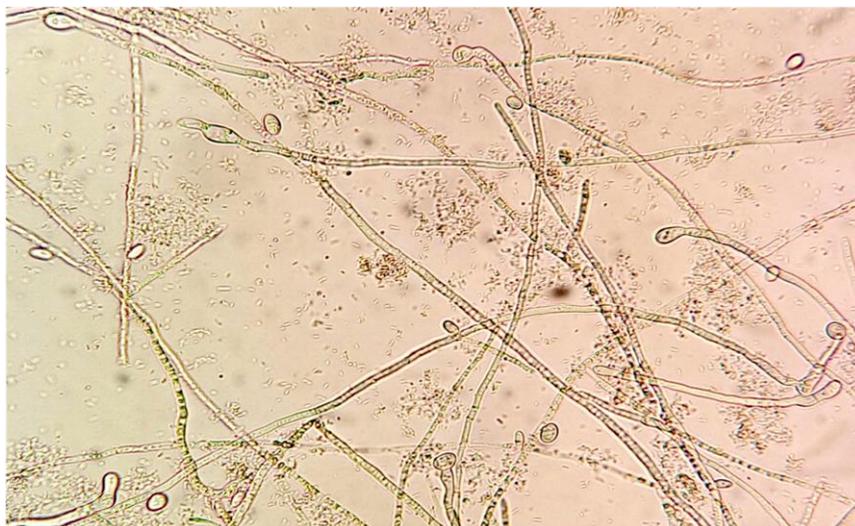


Pathogène FOC avec filtrat – après 24h



**Figure 14** : Action du filtrat de culture de *T. harzianum* (T5) sur la germination des conidies de FOC en comparaison avec le témoin après 24h et 72h d'incubation (Bekkar, 2016)

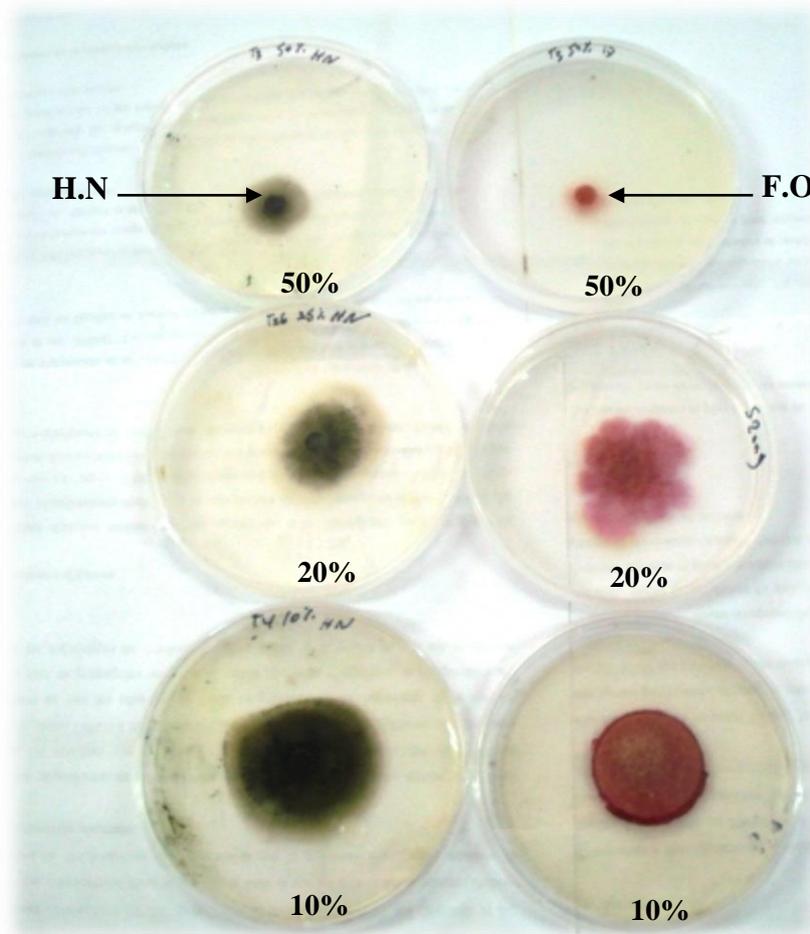
Témoin : pathogène FOC sans filtrat – après 72h



Pathogène FOC avec filtrat – après 72h



**Figure 15** : Action du filtrat de culture de *T. harzianum* (T5) sur la germination des conidies de FOC en comparaison avec le témoin après 24h et 72h d'incubation (Bekkar, 2016)



**Fig. 16 :** Effet de différentes concentrations du filtrat de culture de *Trichoderma* spp. sur la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes *Helminthosporium teres* (H.N) et *Fusarium oxysporum* (F.O) (Allal et Kaddour Benali, 2009)

## 2. Étude du MODE D'ACTION des isolats fongiques ou bactériens utilisé contre les champignons phytopathogènes

La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de biocontrôle efficace. L'efficacité est notamment liée, dans une grande partie, à l'utilisation de plusieurs modes d'action (Cook, 1993 ; Benbrook *et al.*, 1996).

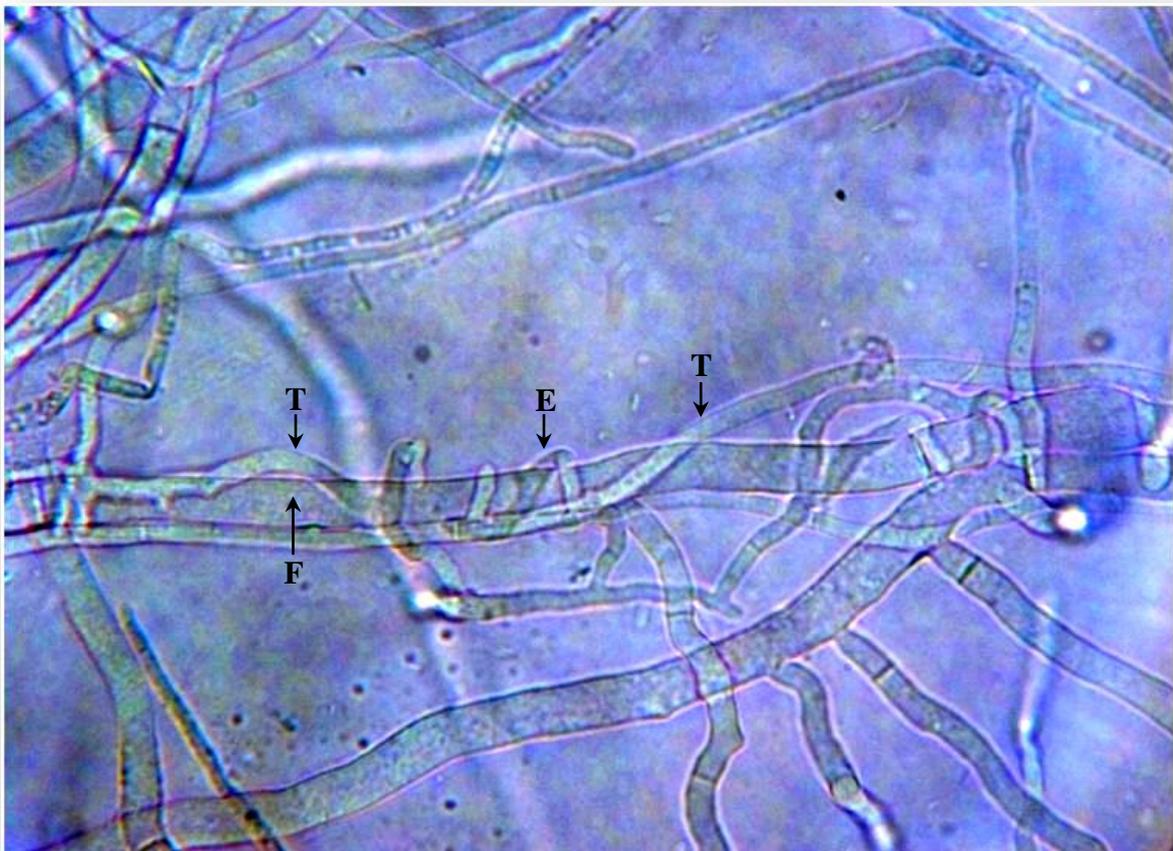
Cette partie de polycopie fait l'objet de l'étude des modes d'action employés par des antagonistes à l'égard des espèces fongiques phytopathogènes.

## 2.1. Mycoparasitisme

Dans les boîtes de Pétri des confrontations directes pour la croissance mycélienne (voir 2.1.1.) et après 2 à 6 jours d'incubation, la zone d'interpénétration des deux colonies fongiques est observée au microscope en vue d'étudier le mode d'action des champignons antagonistes.

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre les deux protagonistes *Fusarium* et *Trichoderma*, montrent un **enroulement** du mycélium du *Trichoderma* sur celui du *Fusarium* (Figure 17) et parfois on peut noter chez certains isolats de *Trichoderma* que leur hyphe croît fréquemment en parallèle avec celui du pathogène et s'attache au mycélium de l'hôte par des appressoriums qui lui permette la pénétration (Figure 18). Le processus d'enroulement est associé à un mycoparasitisme interne.

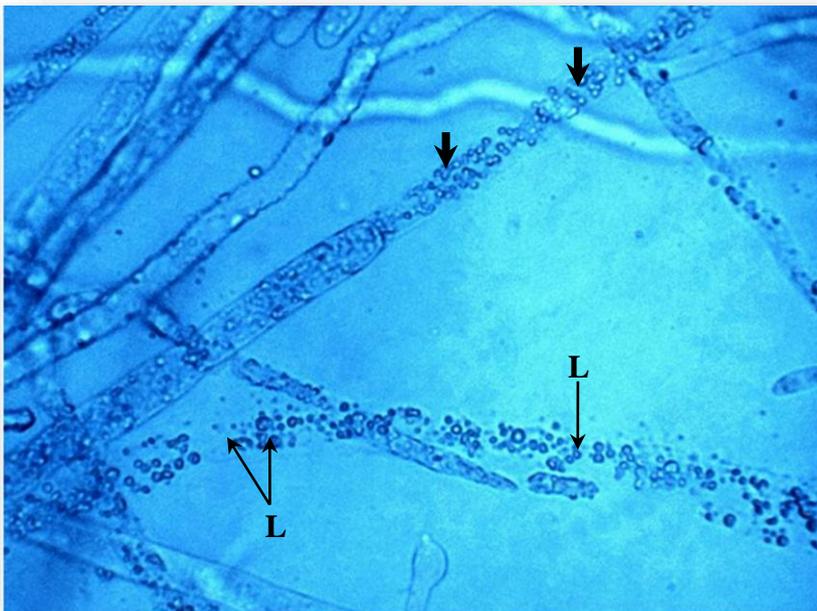
Les observations montrent également une modification profonde au niveau du mycélium du pathogène (Figure 19 et 20) se marquant par une **lyse** importante, une présence de petites vésicules et une coagulation du cytoplasme (Figure 20d et 21).



**Fig. 17:** Enroulement (E) des hyphes de *Trichoderma harzianum* sur celui du *Fusarium oxysporum* (F) (X40) (Bekkar *et al.*, 2016)



**Fig. 18 :** Pénétration et formation d'un appressorium (A) de *T. harzianum* (T1) dans le mycélium de *F. oxysporum* (40x) (Zaim, 2007)



**Fig. 19 :** La lyse (L) et présence de petites vésicules dans le mycélium du pathogène (voir flèches) (X40) (Bekkar *et al.*, 2016)

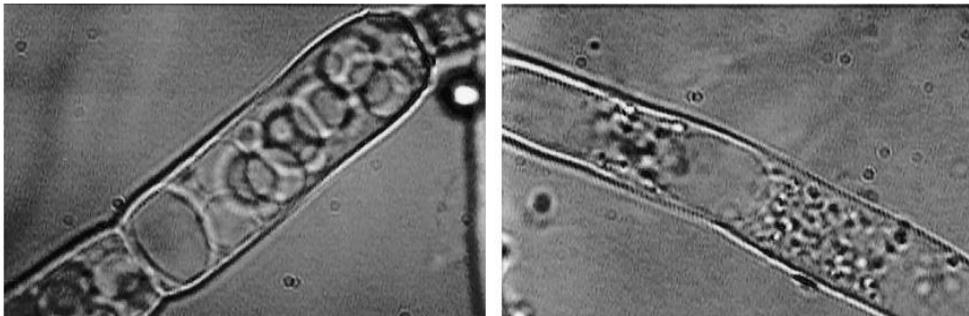


**Fig. 20:** Observations microscopiques de mycéliums de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa) (El Hassni, 2007):

(a) mycélium normal

(b-d) des mycéliums de Foa prélevés de la zone de contact avec *Ulocladium atrum*

(d) Coagulation du cytoplasme sur le mycélium de Foa



**Fig. 21 :** Coagulation du cytoplasme du mycélium de *Botrytis cinerea* infecté par l'antagoniste *Pythium contiguanum* (Paul, 2000)

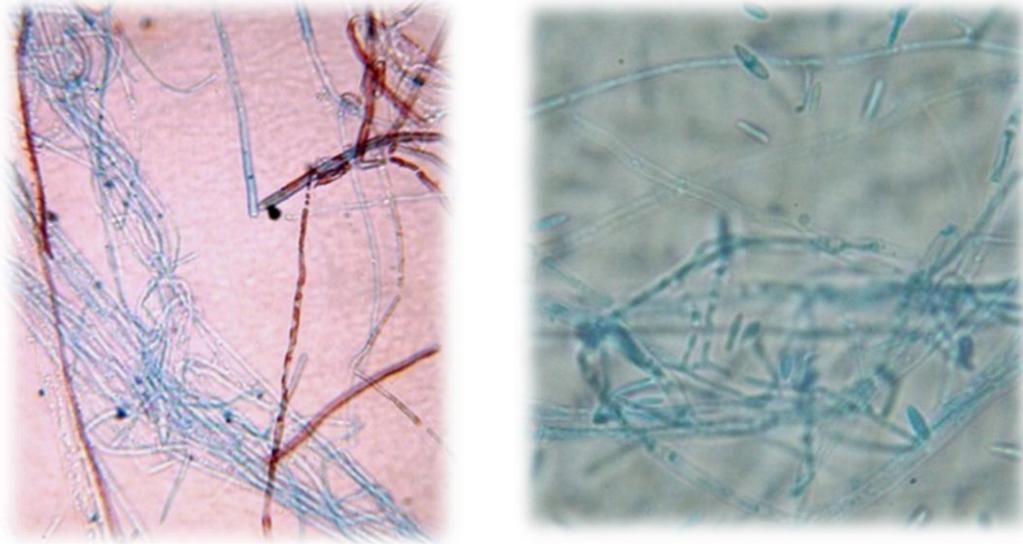
Le parasitisme des champignons phytopathogènes par les *Trichoderma* est un phénomène complexe qui se déroule en plusieurs étapes

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

## **2.2. Antibiose**

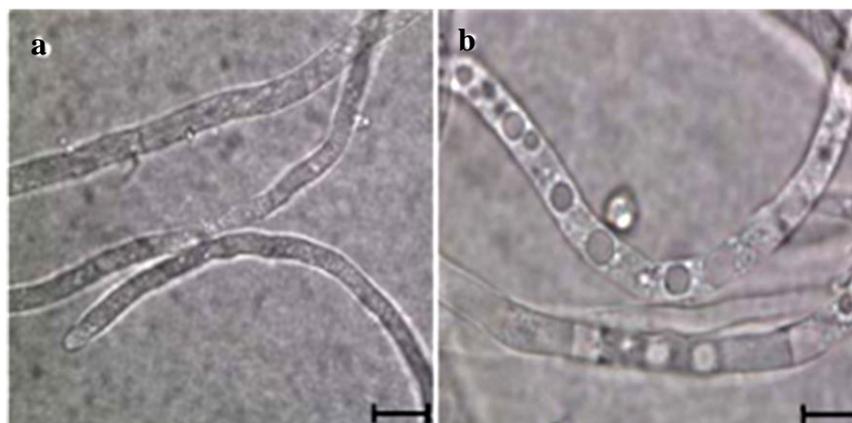
Suite à une confrontation directe entre des bactéries antagonistes et des champignons phytopathogènes (voir **2.1.2.**) et après 4 à 6 jours d'incubation, les observations microscopique du mycélium du pathogène, collecté au niveau de l'interface des isolats bactériens peuvent démontrer des modifications de couleur du mycélium d'une part (Figure 22) et de l'aspect microscopique du pathogène d'une autre part (Figure 23 et Figure 24).

De nombreuses bactéries sont capables d'agir directement sur l'agent pathogène par antibiose. L'antagonisme par antibiose est un mode d'action très répandu aussi chez les espèces fongiques qui repose sur la production de métabolites secondaires de nature diverse, exerçant un effet inhibiteur voir létal sur l'agent pathogène (Vinale *et al.*, 2007).

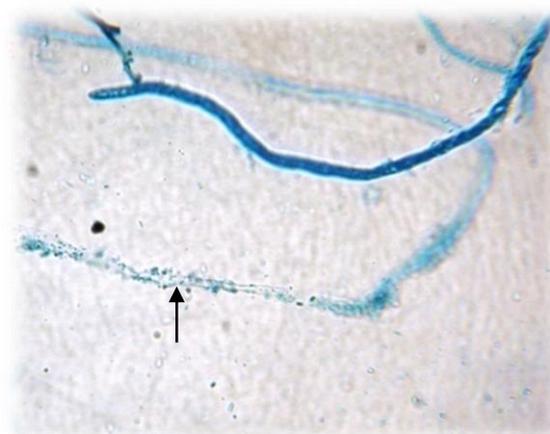


**Fig. 22:** Changement de couleur du mycélium de *Fusarium oxysporum* collecté au niveau de l'interface de la bactérie antagoniste *Bacillus subtilis*

(a) : mycélium rouge en comparaison avec le témoin (b) (X40) (Zaim *et al.*, 2016)



**Fig. 23:** Observation microscopique de mycéliums normaux du *Colletotrichum dematium* (a) et l'apparition de grandes vacuoles dans le mycélium du pathogène (b) collecté au niveau de l'interface d'un isolat bactérien antagoniste (*Burkholderia cepacia*) (Ji *et al.*, 2010)



**Fig. 24:** Lyse du mycélium de *Fusarium oxysporum* collecté au niveau de d'interface d'un isolat bactérien antagoniste (X40) (Zaim, 2016)

### 2.3. Production des enzymes lytiques

Les enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes, comme les chitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, cellulases, protéases et autres hydrolases, sont parmi les métabolites diffusibles impliqués dans le mécanisme d'antibiose exercé par les microorganismes antagonistes.

La production des enzymes lytiques peut former une partie importante du processus général de l'antagonisme. Cette partie fait l'objet d'établir une caractérisation *in vitro* des enzymes à activité antifongique qui peuvent être secrétés par des antagonistes.

La production des enzymes peut être détectée sur un milieu de culture solide contenant un substrat spécifique comme unique ou principale source de carbone.

Pour chaque test enzymatique, une pastille gélosée provenant de cultures fraîches de l'antagoniste est déposée sur le milieu de culture.

L'activité enzymatique est évaluée en mesurant le halo transparent ou la zone hydrolysée autour des colonies après une période d'incubation de 2 à 5 jours, ce qui indique la production de l'enzyme testée (Ceska, 1971 ; Federici, 1982).

#### 2.3.1. Chitinases

L'activité chitinolytique est estimée selon la méthode décrite par de Kamala et Indira Devi (2011) sur le milieu de détection de la chitinase (Annexe 2) avec l'utilisation de la chitine colloïdale comme la seule source de carbone additionnée ou non du pourpre de bromocrésol (colorant indicateur de pH); Le pH a été ajusté à 4,7. La zone de virage du colorant s'étend de pH 5,2 à pH 6,8, passant du jaune au pourpre.

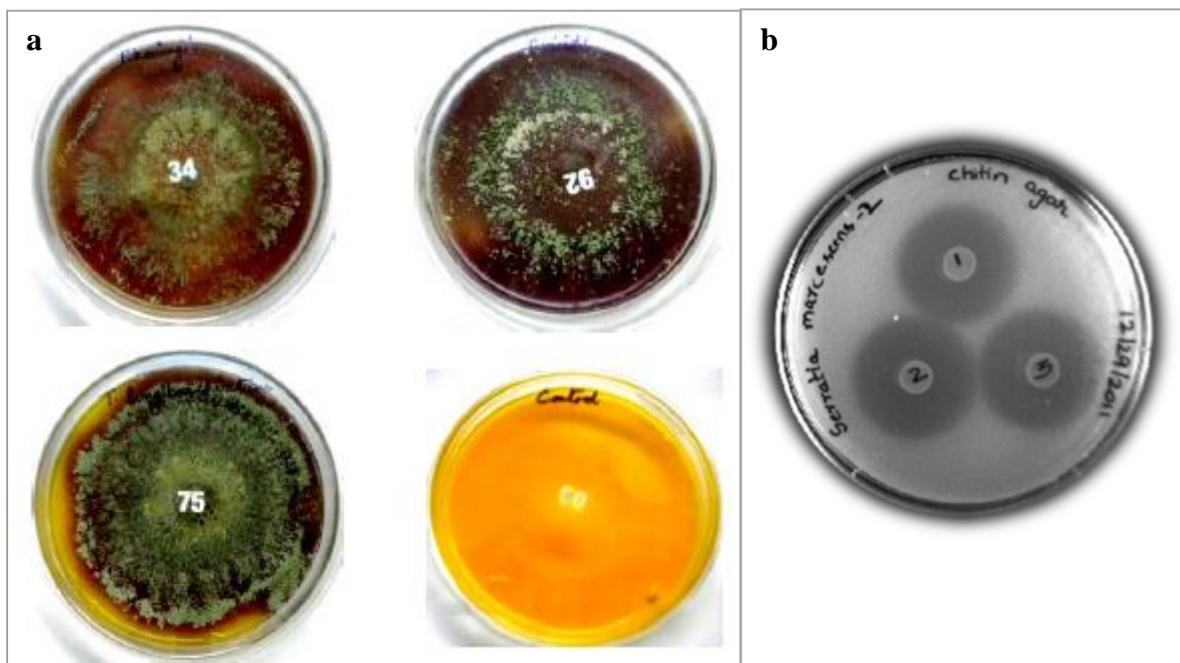
La formation d'halos clairs autour des colonies après quelques jours d'incubation indique une chitinase positive (Figure 25). Un changement de couleur du jaune au violet pourpre peut être vu dans la région d'utilisation de la chitine autour des colonies suite à l'augmentation du pH.

#### 2.3.2. Production des cellulases

Afin de démontrer la capacité des antagonistes à produire des cellulases, deux sources de celluloses sont utilisées : la *carboxy-méthyl-cellulose* (CMC) et la cellulose microcristalline (MCC), pour la détermination de l'activité des enzymes endoglucanases et cellobiohydrolases respectivement (Stewart *et al.*, 1982 ; Kausar *et al.*, 2010 ; Kamala et Indira Devi, 2011).

Après incubation, la production de l'endoglucanase (CMCase) est observée après une inondation des boîtes avec 0,1% de rouge Congo (1 mg/ml) pendant 15 min. La solution de rouge Congo est ensuite déversée et les boîtes sont ensuite traitées par une inondation avec 1M de NaCl pendant 15 min. La dégradation de la cellulose est visualisée sous forme d'une zone claire autour de la colonie (Figure 26a et 26c).

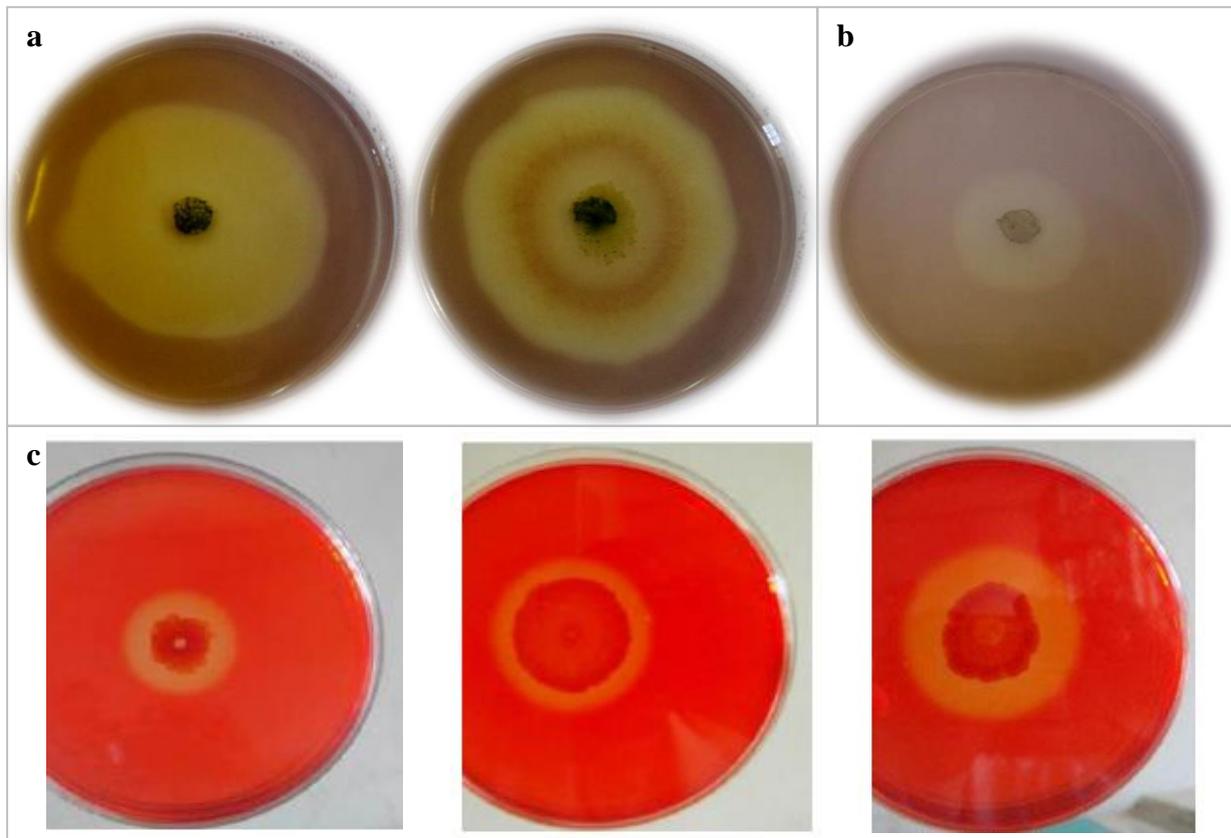
Concernant la production de cellobiohydrolase (MCCase), elle est évaluée après une incubation supplémentaire à 50°C pendant 16 heures afin d'accélérer l'action des cellulases extracellulaires (Abe *et al.*, 2015). Après cette période d'incubation, les cultures sont inondées avec 5 ml de solution iodée (1% KI ; 0,5% I<sub>2</sub> (v/v)) qui a formé après 3 à 5 minutes un complexe de couleur noire bleuâtre avec de la cellulose, donnant une forte et distincte zone autour des colonies produites de la cellulase (Figure 26b) (Kasna *et al.*, 2008).



**Fig. 25: Production des chitinases :**

(a) un changement de couleur du jaune (témoin) au violet pourpre dans la région de dégradation de la chitine autour des colonies de *Trichoderma* après 7 jours d'incubation (Pandey *et al.*, 2014).

(b) activité chitinolytique de la bactérie *Serratia marcescens* (Murthy et Bleakley, 2012)



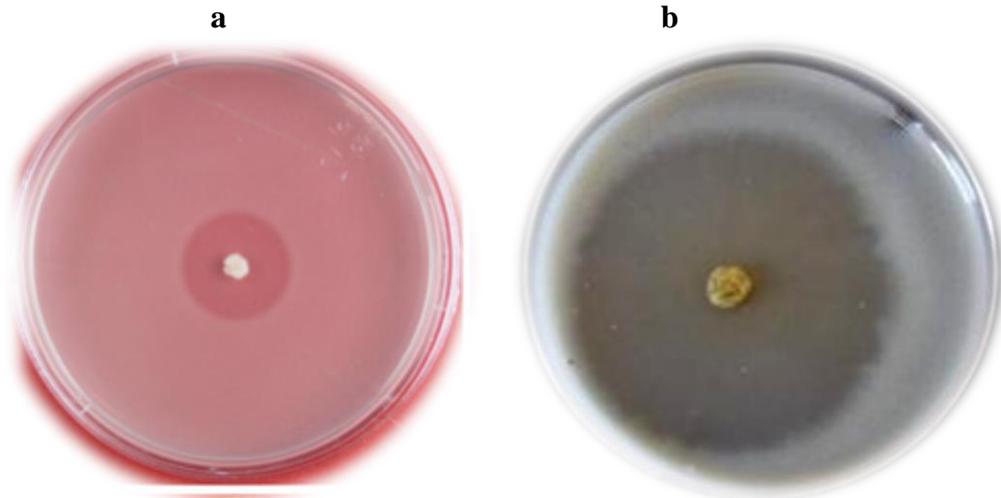
**Fig. 26 :** Formation d'un halo transparent autour des colonies fongiques de *Trichoderma* spp. (a et b) et bactériennes de *Bacillus licheniformis* (c) caractéristique de la production des cellulases :

(a) Production d'endoglucanase sur le milieu CMC et (b) de cellulbiohydrolase sur le milieu MCC (Bekkar, 2016).

(c) Zones claires autour des colonies de bactéries cellulolytique *Bacillus licheniformis* sur le milieu CMC (Kiiio *et al.*, 2016).

### 2.3.3. Production des protéases

Les antagonistes sont testés pour la production de la protéase en utilisant le milieu au lait écrémé (Annexe 2). Après une période d'incubation, les antagonistes ayant une activité protéase démontrent une zone claire autour de la colonie (Figure 27) (Berg *et al.*, 2002).



**Fig. 27: Production des protéases sur milieu au lait écrémé:**

Halo transparent autour de colonie bactérienne de *Paenibacillus* sp. **(a)** (Xu et Kim, 2014)  
et de la colonie du champignon *Trichoderma* **(b)** (Bekkar, 2016)

#### 2.3.4. Production des lipases

La production des lipases est déterminée sur un milieu de culture contenant du Tween 20 (polyoxy-éthylène-sorbitan-monolaurate) comme un substrat lipidique (Annexe 2) (Abe *et al.*, 2015). Le Tween 20 est autoclavé séparément et ajouté au milieu stérile avant de le couler dans les boîtes. Après 2 à 5 jours d'incubation à 28 °C, les boîtes sont ensuite incubées à 4°C pendant 12 h, avant la lecture des résultats (Hankin et Anagnostakis, 1975).

La production des lipases est évaluée par la présence d'un halo blanc opaque autour des colonies (Figure 28).



**Fig. 28 : Production de lipase traduite par la présence d'un halo blanc opaque autour des colonies de *Trichoderma* sur le milieu de culture contenant du Tween 20 comme un substrat lipidique (Bekkar, 2016)**

#### 2.4. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) (Cyanogénèse)

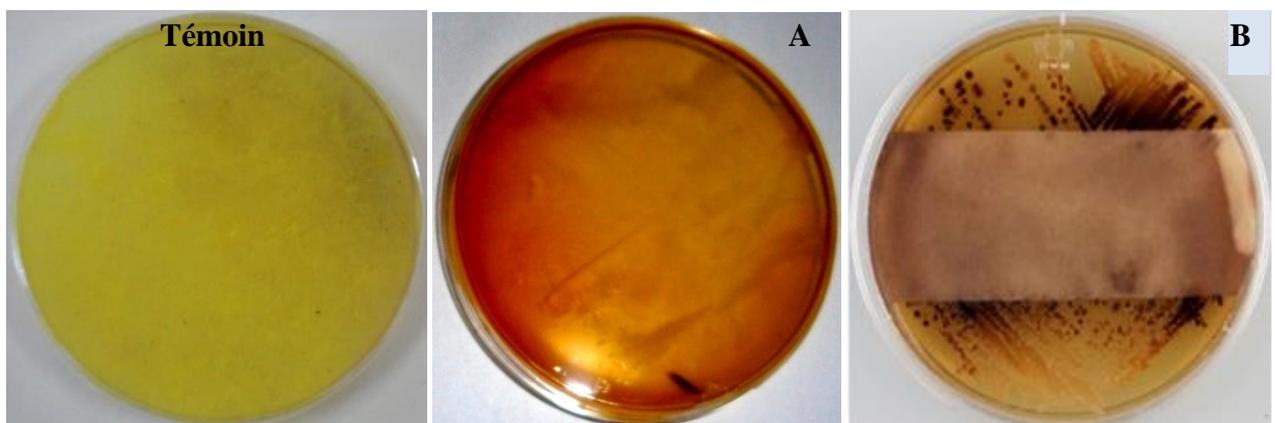
Le composé volatil, l'acide cyanhydrique (HCN), est parmi les métabolites secondaires produits par certains microorganismes antagonistes.

La capacité des antagonistes à produire l'acide cyanhydrique (HCN) est vérifiée selon la méthode de Wei *et al.* (1991). Cette méthode est employée pour obtenir une réponse visuelle qualitative. L'apparition d'une coloration allant de l'orange jusqu'au marron ou au marron-rougeâtre indique la production de HCN.

L'antagoniste est inoculé à l'aide d'une anse sous forme de stries pour les bactéries ou sous forme d'une pastille gélosée pour les champignons, sur une boîte de Pétri contenant le milieu Trypticase de soja (TSA) ou autres favorables au développement des champignons, additionné de glycine comme un précurseur.

Un papier filtre stérile est déposé dans le couvercle de chaque boîte de Pétri en position inversée. Ce papier est par la suite imprégné d'une solution de couleur jaune contenant l'acide picrique et le carbonate de sodium (Acide picrique : 2,5g ; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : 12,5g mis dans 1L de l'eau distillé stérile) (Rangarajan *et al.*, 2002). Les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm afin de contenir le métabolite gazeux produit par les antagonistes et permettre une réaction chimique avec de l'acide picrique. Les boîtes sont gardées en position inverse dans un incubateur à 28°C pendant 5 jours. Les boîtes sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les isolats HCN<sup>+</sup>.

La production d'acide cyanhydrique (HCN) est évaluée par le changement de couleur observée sur le papier filtre virée du jaune au marron ou au marron-rougeâtre (Figure 28).



**Fig. 28** : Production d'HCN par la rhizobactérie antagoniste *Bacillus subtilis* (A) (Zaim, 2016) et *Paenibacillus* sp. (B) (Xu et Kim, 2014) en comparaison avec le témoin

### 3. Protection des plantes par des traitements de semences avec des microorganismes antagonistes (Bio-essai)

#### 3.1. Méthodologie de travail

Dans le but de tester l'effet antagoniste d'un microorganisme sur un phytopathogène, un essai de lutte *in vivo* peut être mis en place.

Pour effectuer ce bio-essai, il nous faut un modèle d'étude de *plante-pathogène-antagoniste*. On va prendre comme exemple le modèle suivant :

- **Plante** : Pois chiche (*Cicer arietinum* L.), le cultivar ILC 482 est choisi sur la base de sa sensibilité vis-à-vis le pathogène afin d'effectuer des inoculations artificielles.
- **Pathogène** : *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC : agent causal du flétrissement vasculaire du pois chiche). Une concentration de suspension en conidies (macro-et microconidies) du FOC est préparée et ajustée par dilution avec de l'eau distillée stérile afin d'obtenir une concentration de  $10^6$  conidies/ml, concentration qui s'était révélée suffisante pour provoquer la manifestation des symptômes de la maladie (Westerlund *et al.*, 1974).
- **Antagoniste** : la concentration de la suspension en conidies de *Trichoderma* est ajustée par dilution avec de l'eau distillée stérile afin d'obtenir une concentration de  $10^8$  conidies/ml, concentration qui s'était révélée suffisante pour la protection (Bailey *et al.*, 2008).

Les graines du pois chiche sont désinfectées par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 3 minutes puis rincées 3 fois dans l'eau distillée stérile et séchées entre deux papiers filtres stériles (Belabid *et al.*, 2004).

Les graines subissent par la suite des inoculations et/ou traitements comme suit :

1. Pathogène	2. Antagoniste	3. Pathogène + Antagoniste	4. Témoin
inoculées par immersion dans une suspension conidienne de FOC pendant 30 min.	traitées par trempage dans une suspension conidienne de <i>Trichoderma</i> pendant 30 min.	plongées dans un mélange (v/v) constitué d'une suspension de spores de FOC et de <i>Trichoderma</i> .	immergées dans l'eau distillée stérile (graines du témoin).

En suite, un semis est réalisé en pot contenant un substrat composé du mélange terre végétale – tourbe (2v : 1v) stérilisé à l'autoclave pendant 1 heure à 120°C ; l'autoclavage est répété 3 fois à 24 d'heures d'intervalle.

Les pots ainsi préparés sont ensuite placés dans le laboratoire et arrosés une fois par semaine avec une photopériode de 12 heures sous un flux énergétique fourni par des tubes fluorescents émettant une lumière blanche, disposés à une hauteur d'environ 75 cm au dessus des plantules.

Après 40 jours d'incubation à la température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , la sévérité des symptômes induits par le pathogène est estimée en se référant à une échelle de notation proposée par Landa *et al.* (1997) allant de 0 à 4 :

- 0** = 0% (plantule saine, pas de symptômes) ;
- 1** = 1-33% (léger jaunissement) ;
- 2** = 34–66% (jaunissement important des feuilles) ;
- 3** = 67–100% (jaunissement avec nécrose) ;
- 4** = mort de la plantule.

L'incidence de la maladie (IM) a été calculée par la formule suivante (Landa *et al.*, 1997):

$$\text{IM (\%)} = (\text{nombre de plantes infectées} / \text{nombre total de plantes}) \times 100$$

Le pourcentage de réduction de la maladie (RM) a été calculé en fonction de l'indice de gravité de la maladie (Villajuan-Abgona *et al.*, 1996) :

$$\text{RM (\%)} = [ (A - B) / A \times 100 ]$$

**Où :** **A** est l'indice de gravité de la maladie dûe uniquement par FOC

**B** est l'indice de gravité de la maladie après une inoculation par FOC et un traitement

La maladie a été évaluée en fonction de la gravité des symptômes, en utilisant une échelle de notation proposée par Landa *et al.* (1997) allant de 0 à 4 ; ce classement est basé sur le pourcentage de feuillage avec jaunissement ou nécrose. Cette échelle comprend :

- 0** = 0% (plantule saine) ;
- 1** = 1-33% (léger jaunissement) ;
- 2** = 34–66% (jaunissement important des feuilles) ;
- 3** = 67–100% (jaunissement avec nécrose) ;
- 4** = mort de la plantule.

### 3.2. Lecture des résultats

Au bout de 40 jours, une bioprotection des plantes *in vivo*, révélatrice d'un pouvoir antagoniste des isolats de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de FOC, est induite (Figure 29). Des taux d'infection faibles ont été enregistrés chez les plantes traitées avec l'antagoniste *Trichoderma* avec des symptômes atténués principalement un jaunissement foliaire qui correspond à des indices de maladie moins de 1,8.

L'analyse de l'incidence de la maladie (IM) lors de ce test montre que l'isolat testé réduit significativement l'incidence de la maladie (IM) par rapport au témoin.



**Fig. 29 :** Essai de lutte biologique en pots :

(1) plantes traitées seulement par *Trichoderma harzianum*, (2) plantes inoculées seulement par FOC, (3) plantes traitées par *Trichoderma harzianum* et inoculées par FOC, (4) témoin sain.

## Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- Abe C.A.L., Faria C.B., de Castro F.F., de Souza S.R., Santos F.C., da Silva C.N., Tessmann D.J. and Barbosa-Tessmann I.P., 2015.** Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 15328–15346.
- Allal L. et Kaddour Benali A., 2009.** Contribution à l'étude de l'activité antagoniste de *Trichoderma* spp. contre quelques champignons phytopathogènes. Mémoire d'ingénieur, université de Mascara, 86p.
- Arunodhayam K., Eswara Reddy N. P. and Madhuri V., 2014.** Pathogenicity and management of Fusarium wilt of chickpea, *Cicer arietinum* L. – A review *Current Biotica* 7(4): 343-358.
- Bailey B.A., Bae H., Strem M.D., Crozier J., Thomas S.E., Samuels G.J., Vinyard B.T. and Holmes K.A., 2008.** Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46: 24-35.
- Bekkar A.A., 2016.** Pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma* vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes. Thèse de doctorat, université de Mascara, 150p.
- Bekkar A.A., Belabid L. et Zaim S., 2016.** Biocontrol of Phytopathogenic *Fusarium* spp. by Antagonistic *Trichoderma*. *Biopestic. Int.* 12(1): 37-45.
- Belabid L., Baum M., Fortes Z., Bouznad Z. and Eujayl I., 2004.** Pathogenic and Genetic Characterization of Algerian Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* by RAPD and AFLP analysis. *Afr. J. Biotechnol*, 3: 25-31.
- Benbrook C.M., Groth E., Halloran J.M., Hansen M.K. and Marquardt S., 1996.** Pest management at the crossroads, Consumers Union, Yonkers. 272.
- Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R.A., Ulrich A., Hallmann J., 2002.** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol*, 51(2):215–229.
- Besri M. et Diatta F., 1985.** Résistance de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la tomate aux benzimidazoles, dicarboximides et sulfamides. *Bull. OEPP*, 15(3) : 379-386.
- Ceska M., 1971.** Enzyme catalysis of solidified media. *Eur. J. Biochem.*, 22, 186–192.
- Chandrakala A., Chandrashekar S.C., Jyothi, G. et Ravikumar B.M., 2012.** Effect of cell-free culture filtrates of bio-control agents on the spore germination and infection by *Phytophthora infestans* causing late blight of potato. *G.J. B.A.H.S*, 1(2): 40-45.
- Cook R.J., 1993.** Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 31: 53-80.

- Correa S.O.** and **Soria A.M.**, **2011**. Potential of Bacilli for biocontrol and its exploitation in sustainable agriculture. In D.K. Maheshwari (ed.), Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Springer, Heidelberg, Berlin, pp. 197–209.
- Datta B.S.**, **Das A.K.** and **Ghosh S.N.**, **2004**. Fungal antagonists of some plant pathogens. *Mycopathology*, 1: 15-17.
- Dennis C.** and **Webster J.**, 1971b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 57: 25–39.
- Dennis C.** and **Webster J.**, 1971a. Antagonistic properties of specific group of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans Br MycolSoc*, 57: 41-48
- Dubey S.C.**, **Suresh M.**, **Singh B.**, 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusariumoxysporumf.spicicis* for integrated management of chickpea wilt. *BiolCont*, 40: 118-127.
- El Hassni M.**, **El Hadrami A.**, **Daayf F.**, **Cherif M.**, **Ait Barka E.**, **El Hadrami I.**, **2007**. Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. *Environmental and Experimental Botany* 59(2):224-234.
- Federici F.**, **1982**. Extracellular enzymatic activities in *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 74: 738 -743.
- Fiddaman P.J.**, **Rossall S.**, **1995**. Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Rhizocotonia solani* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathol.* 44(4): 695-703.
- Hankin L.** et **Anagnostakis, S.L.**, **1975**. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597–607.
- Harman G.E.**, **Howell C.R.**, **Viterbo A.**, **Chet I.**, and **Lorito M.**, **2004**. *Trichoderma* species oportunistic,avirulent plant symbionts. *Nature Reviews of Michrobiology*, 2:43-58.
- Hervas A.**, **Landa B. B.**, **Jimenez-Díaz R. M.**, **1997**. Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from *Fusarium* wilt by seed treatment with non pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 631-642.
- Howell C.R.**, **2003**. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*, 87: 4–10.
- Ji X.**, **Lu G.**, **Gai Y.**, **Gao H.**, **Lu B.**, **Kong L.**, **Mu Z.**, **2010**. Colonization of *Morus alba* L. by the plant-growth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1. *BMC Microbiol.*
- Kamala T.**, **IndiraDevi S.**, **2011**; Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythiumaphanidermatum* on common beans. *3. Biotech*, 1:217–225.

- Kasana R.C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt, A. Gulati. 2008.** A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Curr. Microbiol*, 57: 503–507.
- Kausar H, Sariah M, Saud HM, Alam MZ, Ismail MR, 2010.** Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. evaluation to accelerate the action of extracellular cellulases. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64 (7): 594-600.
- Kiio I.K., Jackim M.F., Munyali W.B., Muge E.K., 2016. Isolation and Characterization of a Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* Strain Vic Isolated from Geothermal Wells in the Kenyan Rift Valley. *The Open Biotechnology Journal*, 10 : 198-207.
- Korsten L., De Jager E.S., De Villiers E. E., Lourens A., Wehner F. C., 1995.** Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. *Plant Disease* 79: 1149-1156.
- Landa B. B., Hervas A., Bethiol W., Jimenez-Diaz R. M., 1997.** Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica* 25 (4): 305–318.
- Murthy N. et Bleakley B., 2012.** *Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase- Producing Microorganisms.* The Internet Journal of Microbiology. Volume 10 Number 2.
- Pandey S., Shahid M., Srivastava M., Sharma A., Singh A., Kumar V., Gupta S.J., 2014.** Chitinolytic assay for *Trichoderma* species isolated from different geographical locations of Uttar Pradesh. *African Journal of Biotechnology*, Vol 13(45) 4246-4250
- Paul B., 2000.** *Pythium contiguanum* nomen novum (syn. *Pythium dreschleri* Paul), its antagonism to *Botrytis cinerea*, ITS1 region of its nuclear ribosomal DNA, and its comparison with related species /FEMS Microbiology Letters, 183: 105-110.
- Rangarajan S., Saleena L.M. et S. Nair., 2002.** Diversity of *Azospirillum* strains isolated from rice plants in coastal agri-ecosystems. *Microb. Ecol.*, 44: 271-277.
- Sivan A, Chet I., 1989.** Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J General Microbiol*, 135:675–682.
- Stewart J.C., Stewart C.S. et Heptinstall J., 1982.** The use of tritiated cellulose in screening for cellulolytic microorganisms. *Biotechnol. Lett.*, 4: 459-464.
- Strange, R.N. and Scott P.R., 2005.** Plant disease: a threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol*, 43: 83–116.
- Suty L., 2010.** La lutte biologique: **Vers de nouveaux équilibres écologiques.** Eds Quae, 323 pages.
- Swain M. R., Ray R. C., 2007.** Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Microbiol. Res.* 164 (2): 121–130.

- Toussaint V., 1996.** Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF-76 antagoniste à *Phytophthora Fragariae* var. *rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de Maitrise ès science. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Villajuan-Abgona R., Kagayama K., Hyakumachi M., 1996.** Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of cucumber by non pathogenic binucleate *Rhizoctonia*. Eur. J. Plant Pathol, 102: 227-235.
- Vinale F. et al., 2007.** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry, 40, pp. 1-10.
- Wei G., Kloepper J. W. et S. Tuzum., 1991.** Induction of systemic résistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant-growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 81: 1508-1512.
- Westerlund F.V., Campbell R.N. and Kimble K.A., 1974.** Fungal root rot and wilt of chickpea in California. Phytopathology, 64: 432–436.
- Xu S.J. et Kim B.S., 2014.** Biocontrol of *Fusarium* Crown and Root Rot and Promotion of Growth of Tomato by *Paenibacillus* Strains Isolated from Soil. Mycobiology, 2(2):158-166.
- Zaim S., 2007.** Contribution à l'étude de *Trichoderma* spp. agent antagoniste de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* agents du flétrissement vasculaire du pois chiche et de la lentille. Mémoire de magister, université de Mascara, 103p.
- Zaim S., 2016.** Essai de lutte biologique contre le *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* à l'aide des microorganismes de la rhizosphère de la culture du pois chiche. Thèse de doctorat, université de Mostaganem, 201p.
- Zaim S., Belabid L., Bellahcene M. 2013.** Biocontrol of chickpea *Fusarium* wilt by *Bacillus* spp. rhizobacteria. J. Plant Prot. Res, 53 (2): 177–183.

## Annexes

## Annexe 1

- **Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Rapilly, 1968)**

<b>Pomme de terre</b>	200 g
<b>Glucose</b>	20 g
<b>Agar</b>	20 g

**Eau distillée** 1 000 ml

20 minutes. pH : 7,0-7,2

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant

- **Milieu liquide PDB (Potato Dextrose Broth) (Rapilly, 1968)**

<b>Pomme de terre</b>	200 g
<b>Glucose</b>	20 g
<b>Eau distillée</b>	1 000 ml

20 minutes. pH : 7,0-7,2

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant

## Annexe 2

- **Milieu utilisé pour la production de chitinase (Kamala et Indira Devi , 2011)**

<b>Glucose</b>	5 g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	3g
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	1g
<b>NaCl</b>	0,5 g
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,1
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,12g
<b>Chitine colloïdale</b>	1% (p:v)
<b>Agar</b>	20g
<b>Eau distillée</b>	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. pH a été ajusté à 4,7.

- **Milieu minimal utilisé pour la production de cellulase (Kausar *et al.*, 2010 ; Kamala et Indira Devi, 2011)**

*-Activité cellobiohydrolase*

<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	7 g
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	2 g
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0,1 g
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	1 g
<b>Extrait de levure</b>	0,6 g
<b>Cellulose microcristalline (MCC)</b>	10 g
<b>Agar</b>	15 g
<b>Eau distillée</b>	1L

**-Activité endoglucanase**

Carboxy-méthyl-cellulose(CMC)	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1L

Ces milieux ont été autoclavés à 121°C pendant 20 minutes.

- **Milieu utilisé pour la production de protéase (Berg *et al.*, 2002)**

Lait allégé (non gras)	300 mL
Agar	20 g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.

- **Milieu utilisé pour la production de lipase (Abe *et al.*, 2015)**

Tween 20	10 mL
Peptone	10 g
NaCl	5 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 g
Agar	17 g
Eau distillée	1L

Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.