

LISTE DES SIGLES ET DES ABREVIATIONS:

AA	: Acide Aminé
°C	: Degrés celcuis
cm	: Centimètre
Dox	: Czapek Dox
F.	: <i>Fusarium</i>
F1	: souche de <i>Fusarium sp.</i> 1
F2	: Souche de <i>Fusarium sp.</i> 2
g	: grammes
ha	: hectare
Kg	: Kilogrammes
LBC	: Laboratoire de Biotechnologies des Champignons
LPAG	: Licence professionnelle agro ressource et entrepreneariat
L	: longueur
l	: largeur
MA2	: Malt agar 2%
MEA	: Malt Extract Agar
mg	: milligrammes
mm	: millimètre
mn	: minutes
PDA	: Potato Dextrose Agar
pH	: potentiel hydrogène
µm	: micromètres
SB	: Sabouraud
T.	: <i>Trichoderma</i>
T1	: souche <i>Trichoderma sp.</i> 1
T2	: souche de <i>Trichoderma sp.</i> 2
T3	: souche de <i>Trichoderma sp.</i> 3
UCAD	: Université Cheikh Anta Diop de Dakar

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification de <i>Trichoderma</i>	6
Figure 2 : Sections systématiques de <i>Trichoderma sp.</i>	6
Figure 3: Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma</i>	10
Figure 4: Cycle de vie de <i>Trichoderma</i>	11
Figure 5 : Aperçu du Champ école LPAG.....	17
Figure 6 : Echantillonnage au niveau des racines de tomates.....	18
Figure 7 : Echantillons de sol prélevé	18
Figure 8 : Schéma de dilution.....	19
Figure 9: Boîtes de Pétri ensemencées avec les différentes dilutions	19
Figure 10 : Boîtes de Petri coulées avec les différents milieux de cultures.....	22
Figure 11 : Boîtes de Petri incubées à différentes températures	23
Figure 12 : Souche F1 sur milieu de culture PDA et sous microscope optique	24
Figure 13 : Souche F2 sur milieu de culture PDA et sous microscope optique.....	24
Figure 14 : Méthode de confrontation directe.....	25
Figure 15 : Méthode de confrontation à distance	25
Figure 16 : Aspect microscopique de la souche T1.....	27
Figure 17 : Aspect microscopique de la Souche T2	27
Figure 18 : Aspect microscopique de la Souche T3 : Grossissement : $\times 400$	28
Figure 19 a, b, c, d : Confrontation directe entre souches de <i>Trichoderma sp.</i> et souches de <i>Fusarium</i>	36
Figure 20 a, b, c, d, e : Confrontation à distance entre souches de <i>Trichoderma</i> et de <i>Fusarium</i>	38

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Croissance (mm) de différentes souches de <i>Trichoderma sp.</i> sur 4 milieux de cultures.....	29
Tableau 2 : Croissance (mm) de différentes souches de <i>Trichoderma sp.</i> en des températures d'incubations différentes.....	31
Tableau 3 : Croissance (mm) de différentes souches de <i>Trichoderma sp.</i> sur des pH différents.....	32
Tableau 4 : Croissance de différentes souches de <i>Trichoderma sp.</i> sur des % de salinités différents.....	34
Tableau 5 : Test de confrontation directe entre souches de <i>Fusarium</i> et <i>Trichoderma</i>	35
Tableau 6 : Test de confrontation à distance entre souches de <i>Trichoderma</i> et de <i>Fusarium</i> ...	37

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	3
1. Généralités sur <i>Trichoderma</i>	3
1.1. Historique de la classification.....	3
1.2 Ecologie.....	7
1.3 Morphologie.....	8
1.3.1. Conidiophores.....	8
1.3.2. Phialides.....	9
1.3.3. Conidies.....	9
1.3.4. Chlamydospores.....	9
1.4. Cycle de vie de <i>Trichoderma</i>	10
2. Importance de <i>Trichoderma</i>	12
2.1.Pouvoir antagonistes de <i>Trichoderma</i>	12
2.1.1. Antibiose.....	12
2.1.2. Compétition.....	12
2.1.3. Mycoparasitisme.....	12
2.2. Stimulation de la croissance de la plante.....	13
2.3. Production de métabolites intéressants.....	14
2.3.1. Production d'enzymes.....	14
2.3.2. Production de substances bioactives.....	14
2.3.3. Synthèses d'acides aminés.....	14
3. Aspect de <i>Trichoderma</i> en Culture	15
3.1.Patato dextrose agar.....	15
3.2.Malt extract agar.....	15
3.3.Czapek Dox.....	15
3.4.Sabouraud.....	16
Matériels et méthodes.....	17
1. Isolement de <i>Trichoderma</i>	17
1.1. Présentation du site d'échantillonnage.....	17
1.2. Technique de prélèvement des échantillons de sol.....	17
1.3. Technique d'isolement.....	18
2. Identification de <i>Trichoderma</i>	19

2.1. Au plan macroscopique.....	20
2.2. Au plan microscopique.....	20
3. Conservation des souches.....	21
4. Culture <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i>	21
4.1. Culture dans différentes conditions abiotiques.....	21
4.1.1. Milieux de culture.....	21
4.1.2. pH.....	22
4.1.3. Température.....	22
4.1.4. Degrés de salinité.....	23
5. Tests d'antagonisme <i>in vitro</i>	23
5.1. Méthode de confrontation directe.....	24
5.2. Méthode de confrontation à distance.....	25
Résultats	26
1. Identification de <i>Trichoderma</i>	26
1.1.Examen macroscopique.....	26
1.2.Examen microscopique.....	26
2. Effets des contraintes sur la croissance de <i>Trichoderma</i>	28
2.1.Effet des milieux de cultures	28
2.2.Effet de la Température d'incubation	29
2.3.Effet du pH	31
2.4.Effet de la salinité.....	33
3. Tests d'antagonismes <i>in vitro</i>	34
3.1.Confrontation directe.....	34
3.2.Confrontation à distance.....	37
Discussion.....	39
1. Isolement de <i>Trichoderma sp</i>	39
2. Culture <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma sp</i>	39
3. Tests d'antagonismes.....	40
Conclusion et perspectives.....	41
Références bibliographiques.....	44
Annexes.....	51

INTRODUCTION

Dans la nature, la plupart des micro-organismes sont utiles, tandis que d'autres constituent de véritables ennemis et entravent le développement de la plante et de son système racinaire. Certains agents pathogènes du sol sont responsables d'importantes pertes de récoltes en causant diverses maladies dont les pourritures des semences, des fruits et des racines, les flétrissements des plantes, les chancres de tiges, les taches foliaires. Les méthodes conventionnelles utilisées pour lutter contre ces pathogènes sont basées sur l'utilisation de produits chimiques avec des effets secondaires sur l'environnement et les microorganismes associés utiles parce que non sélectifs. Les maladies sont complexes et difficiles à combattre parce que souvent initiées par des blessures ce qui facilite l'entrée et la progression des champignons pathogènes (Caron *et al.*, 2006).

Cette situation conduit à une utilisation abusive de pesticides chimiques de synthèse. Ces derniers entraînent une pollution des eaux de surfaces et souterraines soit directement par infiltration des eaux de pluies entraînant les produits phytosanitaires ou bien indirectement par ruissellement et lessivage des sols contenant les résidus des pesticides. Au Sénégal par exemple, dans la zone périurbaine des Niayes, plus importante zone de culture maraichères du pays, les concentrations de résidus mesurées dans la nappe phréatique dépassent les normes de potabilité de l'eau (Cissé *et al.*, 2003). Ce même phénomène a été observé dans d'autres pays comme la Côte d'Ivoire, où une contamination de l'eau souterraine par les pesticides organophosphorés et organochlorés a été montrée dans les régions agricoles où sont cultivés le cacao, le café, la banane et les légumes (Traoré *et al.*, 2006). Un autre phénomène accroissant la contamination de l'espace rural par les pesticides est lié à la création des conditions favorables au développement de la résistance des ennemis (insectes, bactéries, nématodes et champignons) et la destruction des organismes utiles (Harman, 1992). Ainsi, plusieurs cas d'accoutumance des prédateurs aux pesticides ont été constatés (Georghiou, 1986). L'utilisation abusive des pesticides a aussi de nombreuses conséquences sur la santé humaine. On observe ainsi après l'application des pesticides des cas d'irritation de la peau, des céphalées, un rhume, des bouffées de chaleur ou des vertiges (Ahouangninou *et al.* ; 2011). On a constaté également un lien entre la présence de produits chimiques « perturbateurs endocriniens » et un taux accru de cancers du sein, de la prostate, du testicule, d'endométriose, de malformations congénitales de l'appareil reproducteur masculin et de réductions du nombre de spermatozoïdes (Hileman, 1994). Certaines pratiques, telles que le non-respect des dosages recommandés et des délais avant récolte, constituent également des facteurs de risque pour le consommateur, qui sont souvent à l'origine de nombreux cas d'intoxication alimentaire.

Plusieurs micro-organismes peuvent, par contre, avoir un effet bénéfique dans le contrôle des champignons pathogènes et ainsi minimiser l'effet délétère des pesticides. La découverte de tels agents de lutte biologique et la démonstration de leur capacité à réduire l'incidence et la gravité des maladies ont tracé la voie à plusieurs recherches prometteuses (Lewis et Papavizas, 1987). Dans ce contexte, une attention particulière a été portée aux champignons antagonistes, principalement à cause de leur potentiel à diminuer la densité de l'inoculum des champignons pathogènes (Elad *et al.*, 1982).

Parmi les champignons antagonistes qui ont démontré un bon potentiel de lutte, *Trichoderma* *sp.* est sans doute le plus rapporté dans la littérature (Elad *et al.*, 1982; Harman, 2000).

Cependant, malgré son importance dans la protection des plantes contre les maladies racinaires et son intérêt économique, aucune étude officielle n'a été réalisée au Sénégal sur l'isolement ou l'utilisation de ces champignons dans l'industrie agroalimentaire ou comme agent de lutte biologique.

L'objectif général de notre étude est de comprendre la biologie des *Trichoderma*, champignons imparfaits en vue de leur utilisation dans les itinéraires techniques agricoles.

Pour ce faire, il s'agira :

- d'isoler des *Trichoderma* associés à la tomate ;
- d'observer leurs comportements *in vitro* dans différentes conditions abiotiques ;
- et d'étudier la compétitivité des souches isolées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur *Trichoderma*

Les *Trichoderma* sont des microorganismes cosmopolites répartis dans tout le monde et appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Roquebert, 1996 ; Genilloud et *al.*, 1994).

Le genre *Trichoderma* regroupe de nombreuses espèces réparties dans différents écosystèmes (terrestre ou aquatique). En milieu terrestre il joue un rôle important dans l'industrie agroalimentaire et est une matière de choix pour l'exploitation industrielle de manière générale à cause de leur capacité de production d'enzymes, de substances bioactives, d'acides aminés et leur développement rapide.

De nos jours près de 100 espèces de *Trichoderma* ont été isolées et certaines de ces espèces du genre *Trichoderma viride* et *Trichoderma harzianum* sont d'intérêt économique pour leur production d'enzymes cellulolytiques et sont utilisées dans la lutte biologique. Ainsi grâce à leurs nombreuses propriétés antagonistes vis-vis des autres espèces fongiques pathogènes (antibiose, mycoparasitisme, compétition, lyse, promotion de la plante hôte), ces espèces sont capables de protéger les plantes contre les pathogènes et de permettre une stimulation de la croissance des plantes (Mouria et *al.*, 2007). Ce qui permet de réduire l'utilisation abusive des traitements chimiques contre les champignons pathogènes pour une agriculture plus respectueuse des normes environnementales.

Dans ce contexte de nombreuses espèces de *Trichoderma* ont été isolées partout dans le monde notamment en Afrique dans des pays comme la cote d'ivoire (Kebe et *al.*, 2009), la Tunisie (Daami-Remadi M., El Mahjoud M., 2001 ; Hibar et *al.*, 2005), au Kenya (Okoth et *al.*, 2009), en Libye (Attitalla et *al.*, 2012) au Cameroun (Tondje et *al.*, 2007).

Les espèces de *Trichoderma* ont été utilisées pour la lutte biologique contre différents champignons pathogènes tels que *Phytophthora palmivora* (Kebe et *al.*, 2009) *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Verticillium dahliae* (Caron et *al.* ; 2002) pour la protection de certaines cultures comme la tomate, le concombre (Caron et *al.* ; 2002, Mouria et *al.* ; 2007) l'oignon, l'aubergine (Caron et *al.* ; 2006).

1.1. Historique de la classification

Les *Trichoderma* sont des champignons imparfaits saprophytes qui se retrouvent dans divers milieux : sol, bois mort, débris des végétaux. Le terme a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon et désigne des champignons microscopiques considérées depuis 200 ans

comme étant des Gastéromycètes. L'histoire de la classification des *Trichoderma* est caractérisée par de nombreuses controverses. Les champignons du genre *Trichoderma* sont des espèces anamorphes et n'ont pas de mode de reproduction sexué connu, ce qui fait que ce caractère ne peut pas être utilisé dans la classification de ces espèces. Ainsi on se base alors sur les aspects culturels, la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert., 1996) ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaires (Gams et Bissett., 1998)

Si on répertorie succinctement les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma sp*, on se rend vite compte que leur positionnement taxonomique n'a pas été chose facile.

En 1794, Persoon décrit le premier *Trichoderma sp.* et établit 4 espèces.

En 1821, Fries classa les *Trichoderma sp.* parmi les *Gastéromycètes*.

En 1860, débutent les controverses sur cette systématique, Tulasne contredit Fries puisqu'il ne trouve pas de forme téléomorphes (sexuées) à ce genre.

En 1871, devant le nombre croissant d'espèces rencontrées, Harz insiste sur l'importance des caractères morphologiques sous microscopie optique (surtout les phialides).

En 1916, Waksman décrit 6 nouvelles souches de *Trichoderma sp.* en utilisant des critères macroscopiques, différents de ceux préconisés par Harz.

En 1926, Abbot identifie 4 espèces de *Trichoderma* selon des critères différents des précédents. Le raisonnement d'Abbot reste en vigueur jusqu'à 1939. En 1939, Bisby tente de mettre de l'ordre dans ces systèmes en proposant une unique espèce : *Trichoderma viridae*. Durant 24 ans, toute espèce fongique à spores vertes était considérée comme étant un *Trichoderma sp.*

En 1963, les travaux de Gutter et Monbasher mettent fin au système précédant, en démontrant la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales.

En 1969, conscient de toute cette polémique, Rifai propose une classification « utilisable avec le concept d'« espèces agrégées », basé sur les caractères microscopiques. « Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer ». Neuf espèces agrégées sont créées (*T. aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Rifai., 1969).

En comparaison avec les nombreux critères précédents, ce système semble le plus facilement utilisable pour la communauté scientifique, d'autant plus qu'il a été amélioré récemment par Bissett (1984, 1991a et b).

En 1991, Bissett propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma sp.*, sans rapport avec les espèces agrégées.

Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (Figure 2) (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Leuchtmann., 1996)

Le système taxonomique de Bissett est aussi appuyé, entre autres, par des approches de biologie moléculaire (PCR), pour répondre au positionnement de nouvelles espèces de *Trichoderma* identifiées (dont les formes téléomorphes sont souvent non identifiées) et reste le plus fiable actuellement.

Les espèces de *Trichoderma* ainsi que leurs rares formes téléomorphes observées sont classées parmi les *Ascomycètes*.

Plus de 200 espèces du genre *Hypocrea* ont été identifiées, mais sont rarement cultivables, et de ce fait peu décrites en termes modernes (Gams and Bisset, 1998) Sous certaines conditions, méconnues, les *Hypocrea sp.* (téléomorphes) se transforment définitivement en *Trichoderma sp.* (anamorphes). On pense alors que l'évolution a conduit à la disparition du mode sexué pour l'établissement d'un genre à reproduction exclusivement asexuée (Roquebert., 1996).

Au cours des dernières années, l'identification sûre des nouvelles espèces de *Trichoderma* a été considérablement facilitée par l'élaboration d'un code à barres oligonucléotide (TrichOKEY) et un outil de recherche personnalisé (Tricho BLAST), tous deux disponibles en ligne à www.is+th.info (Druzhinina et al ;.2005).

La biologie moléculaire nous révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se chevauchent. C'est ce qui, d'une part explique la longue controverse connue par ce genre auparavant et d'une autre part, montre que les seuls critères morphologiques ne suffisent plus pour une classification incontestable et rigoureuse des formes anamorphes de *Trichoderma sp.* (Cournut., 1984 ; Sugiyama., 1987).

La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp.* (Figure 1) se présente comme suit (Bissett., 2004) :

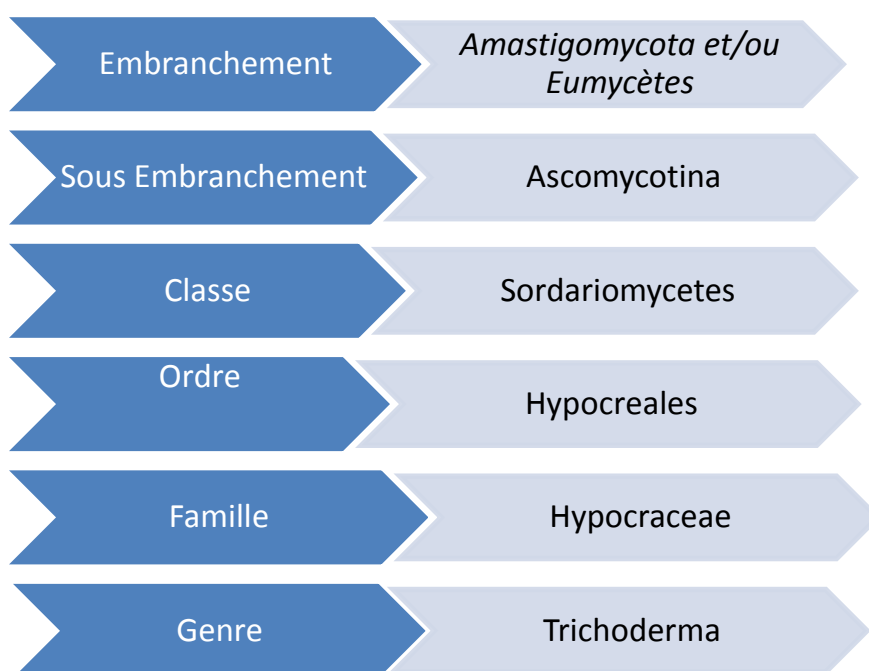


Figure 1 : Classification de *Trichoderma* (Bisset, 2004)

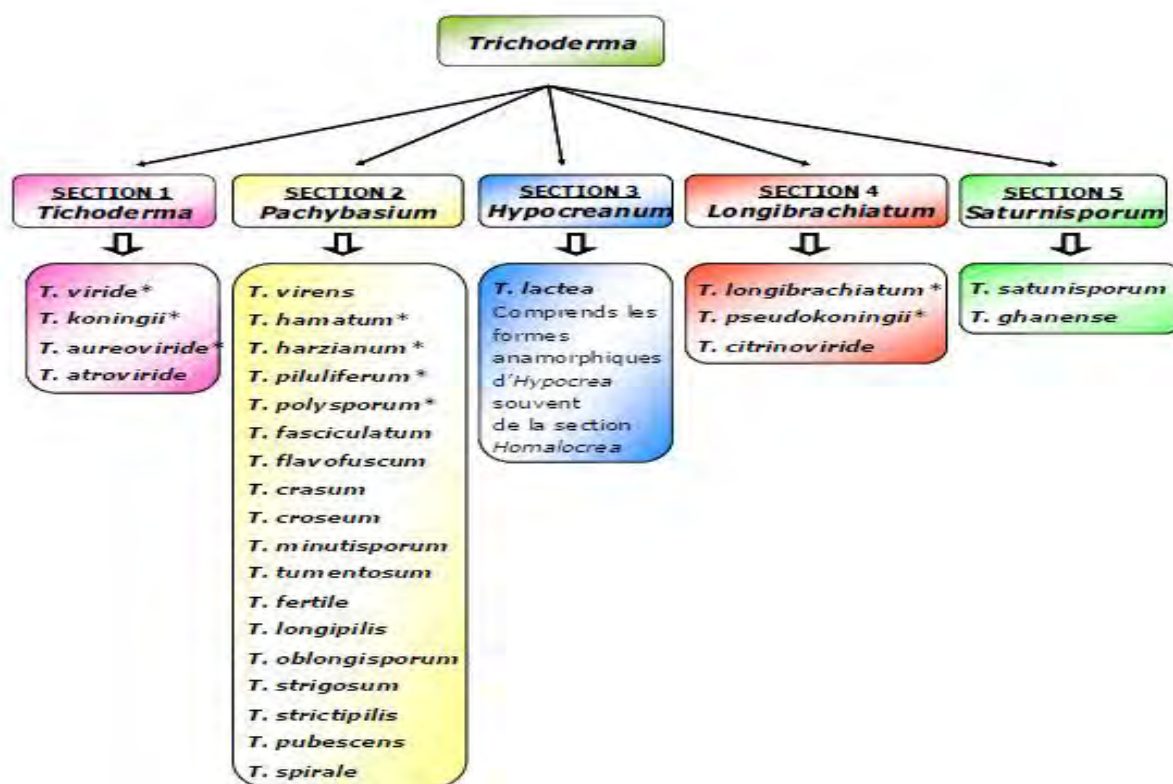


Figure 2 : Sections systématiques de *Trichoderma* sp. et quelques une des espèces y appartenant, selon Bisset (1991a et b).

* Les espèces agrégées de Rifai (1969)

1.2. Ecologie

Comprendre les facteurs écologiques qui affectent la distribution de *Trichoderma* dans leurs habitats naturels peut conduire à une meilleure compréhension de la dynamique, de la survie et de la prolifération des populations de ce champignon antagoniste dans le sol et la rhizosphère. Pour cette raison, une analyse minutieuse du comportement de ce champignon dans l'écosystème du sol est nécessaire.

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature. On le trouve aussi bien en milieu terrestre que marin. En effet, les *Trichoderma sp.* sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats et sont, par conséquent, l'élément majeur dans la microflore terrestre et marine.

Les *Trichoderma sp.* terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés), en particulier dans ceux contenant un important contenu en matière organique et sur les végétaux en décomposition. Il semble être un colonisateur secondaire à cause de son isolement fréquent dans la matière organique bien décomposée (Danielson et *al.*, 1973). *Trichoderma* se trouve également sur la surface des racines de diverses plantes; écorce en décomposition, surtout quand il est endommagé par d'autres champignons (Danielson et *al.*, 1973) et sur les sclérotés ou autres propagules d'autres champignons (Davet 1979, Wels et *al.*, 1972). Ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivantes.

Dans la mer, les *Trichoderma sp.* sont marins facultatifs. Ils y ont été identifiés à tous les niveaux. Ils ont été également isolés à partir d'algues marines prélevées de la côte Atlantique et méditerranéenne ibériques ainsi qu'à partir de moules au Canada. Leur présence dans le tractus digestif et la surface de plusieurs espèces de concombre des mers reste insolite, puisque ces derniers bio synthétisent des glycosides tri terpéniques aux fortes activités antifongiques et cytotoxiques (Pivkin., 2000).

La répartition de *Trichoderma* dans les écosystèmes varie en fonction des contraintes biotiques et abiotiques. Lorsque les conditions sec du sol sont maintenues pendant une longue période, les populations de *Trichoderma* diminuent (Davet, 1979). Danielson et Davey (1973) également ont conclu que certaines souches de *T. hamatum* et *T. pseudokoningii* sont adaptés à des conditions d'humidité excessive du sol et que *T. viride* et *T. polysporum* sont restreints à

des zones où les températures sont basses. *T. harzianum* est plus souvent présent dans les régions chaudes tandis que *T. hamatum* et *T. koningii* sont largement distribués dans les zones de conditions climatiques variées. Les déterminants supplémentaires physiques et chimiques qui agissent sur la répartition de *Trichoderma* sont le pH du sol, le CO₂, le HCO₃, le contenu en sel, en matière organique et la présence ou l'absence d'autres micro-organismes dans le sol. La teneur en fer du sol peut aussi être élément déterminant important de la micro préférence du site de *Trichoderma* (Papavizas, 1985).

Le genre *Trichoderma* est l'une des espèces fongiques prédominantes. Il vient à la 3^{ème} position après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. La présence des *Trichoderma sp.* en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (Landreau., 2001). L'abondance des *Trichoderma sp.* dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Mohamed-Benkada., 2006).

1.3.Morphologie

L'aspect macroscopique de *Trichoderma sp.* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Petri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour un feutrage épais se superpose à la culture. Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies).

1.3.1. Les conidiophores

Les conidiophores sont très ramifiées et donc difficile à définir ou à mesurer. Lâche ou compacte, ils sont souvent formés dans différents cercles concentriques ou au niveau de long hyphes peu aérienne. Les branches principales des conidiophores produisent des branches

latérales qui peuvent être appariés ou non. Les plus longues branches éloignées de la pointe et les phialides sont souvent insérés directement à l'axe principal près de la pointe. Les branches principales peuvent être ramifiées à nouveau en branches secondaires. Les branches principales et secondaire forment un angle de près de 90 ° par rapport à l'axe principal. Le conidiophore (figure 3) typique du genre *Trichoderma* est donc ramifiés et formé de branches ayant un aspect pyramidal ou conique. En général, le conidiophore se termine par une ou quelques phialides. Chez certaines espèces (par exemple, *T. polysporum*) les ramifications principales sont terminées par de longs crochets simples ou ramifiés, droite ou sinueuse avec des cloisonnements à paroi mince et terminés par des allongements stériles ou fertiles. L'axe principal peut être de même largeur que la base de la phialide ou elle peut être beaucoup plus large. Les conidiophores portent les phialides en formes de flasques ou de quilles (Samuel et al., 2013).

1.3.2. Les phialides

Les phialides hyalin sont généralement élargis au milieu en forme de bouteilles renflées à la base mais peuvent être cylindrique ou presque subglobuleuse. Ils sont souvent disposés en verticilles à un angle de 90 ° par rapport aux autres membres de la spire ou diversement pénicilliées. Les phialides peuvent être solitaires (par exemple *T. longibrachiatum*) ou disposés en grappes denses sur l'axe principal (par exemple, *T. polysporum*, *T. hamatum*). Ils portent à leurs extrémités les spores encore appelés conidies ou phialospores (Samuel et al., 2013).

1.3.3. Les conidies

Les conidies apparaissent généralement sec, mais chez certaines espèces, ils peuvent être détenus dans des gouttes de liquide vert ou jaune clair (par exemple, *T. virens*, *T. flavofuscum*). Les conidies de la plupart des espèces sont unicellulaires, ellipsoïdales de dimensions 3-5 x 2-4 um ($L / l \Rightarrow 1,3$). Il existe aussi des conidies de formes globuleuses mais qui sont rares. Les conidies sont généralement lisses, mais finement verruqueux. Cependant on peut observer aussi des conidies qui ont une forme tuberculée chez certaines espèces de *Trichoderma*. Ils ont une couleur verte et ont une paroi lisse ou rugueuse regroupés dans des têtes collantes à l'extrémité des phialides (Samuel et al., 2013)

1.3.4. Les chlamydospores.

Les chlamydospores peuvent être produites par toutes les espèces de *Trichoderma* lorsque les conditions du milieu le permettent. Les chlamydospores sont généralement subglobuleux,

unicellulaires et mettre fin à des hyphes court. Ils peuvent également être formés dans les cellules des hyphes. Chez certaines espèces de *Trichoderma* les chlamydospores sont multicellulaires (par exemple *T. stromaticum*) (Samuel et *al.*, 2013)

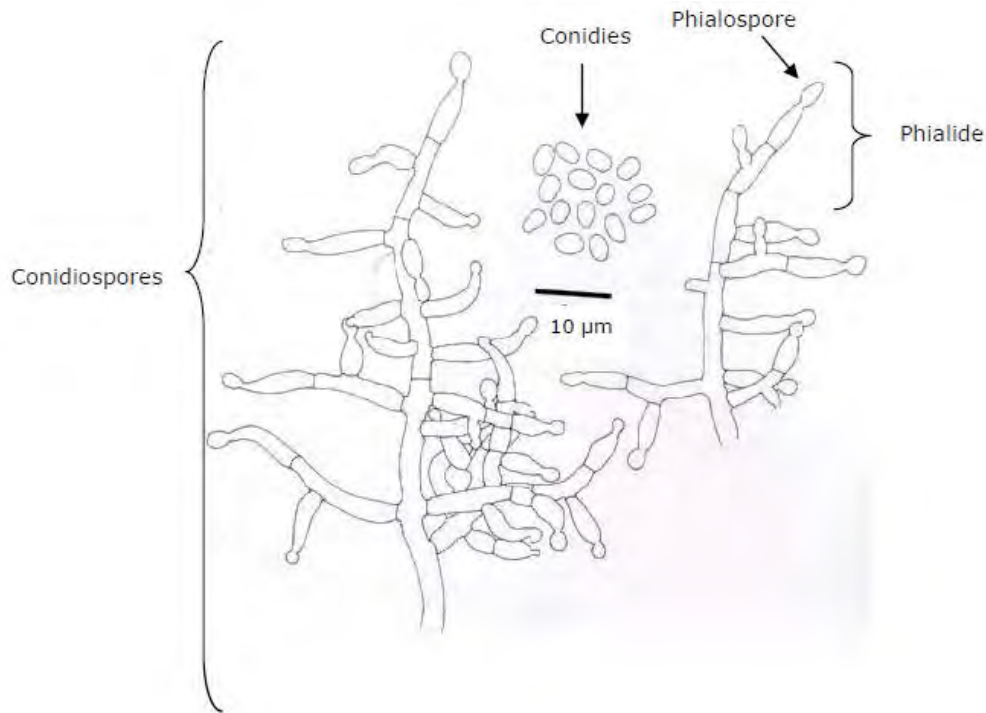


Figure 3: Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma* (Samuels et *al.*, 1994)

1.4.Cycle de vie

Trichoderma est un champignon asexué. Les Conidiospores (figure 4) représentent la phase dominante de la multiplication. Dans des conditions appropriées, les spores germent, donne un mycélium, constituent des hyphes ramifiés puis de nouvelles conidiospores sont formés dans des phialides. (Rifai., 2004) :

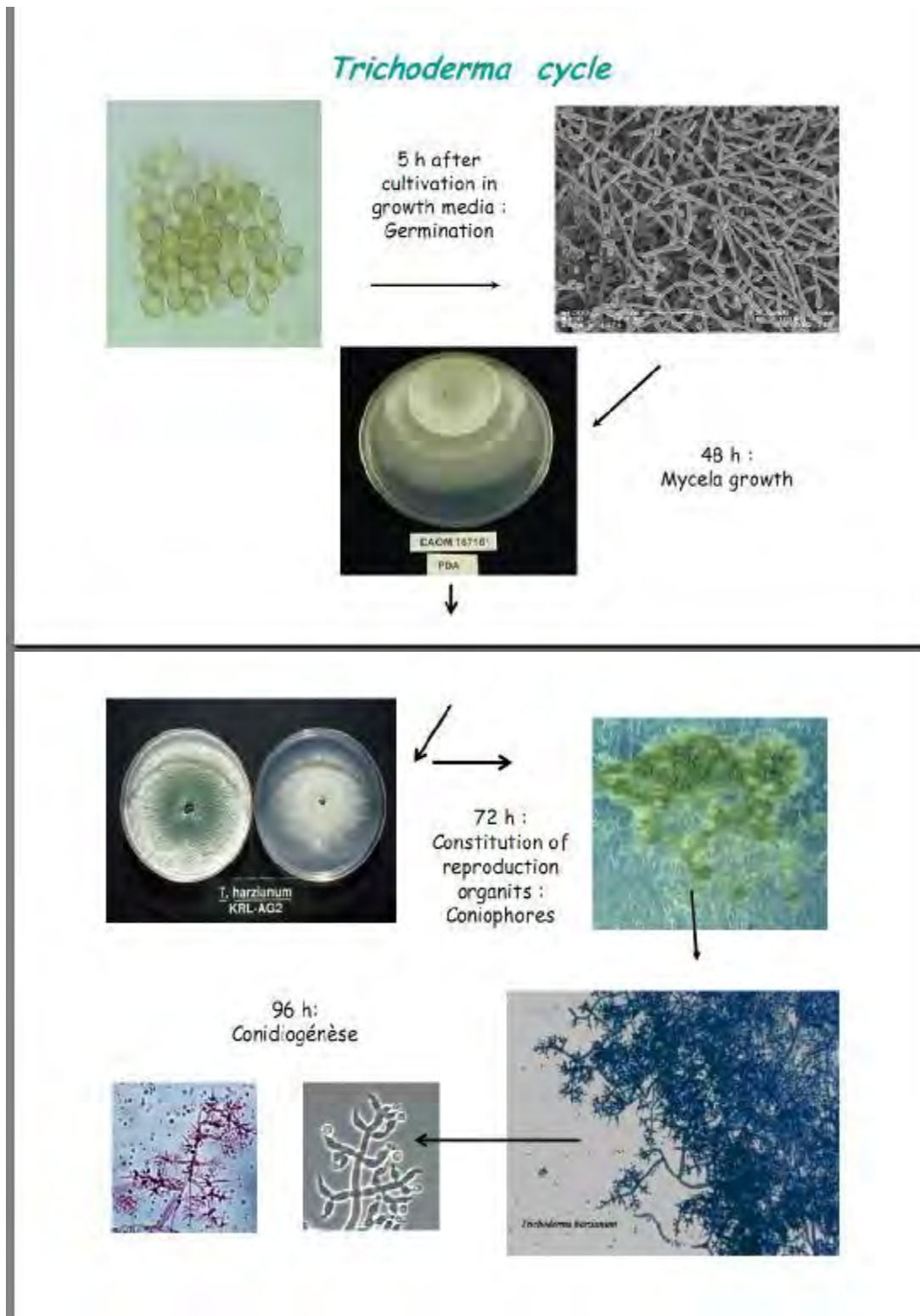


Figure 4: Cycle de vie de *Trichoderma* (Rifai, 2004)

2. Importance de *Trichoderma*

2.1. Pouvoir antagonistes de *Trichoderma*

Les propriétés antagonistes de *Trichoderma* sont connues depuis longtemps puisque la première publication qui en fait mention date de 1887. Cependant, l'étude approfondie du phénomène d'antagonisme et de son application comme moyen de lutte à l'égard des parasites des plantes cultivées n'a débuté qu'entre les deux guerres mondiales. Les modèles étudiés s'intéressaient essentiellement aux parasites du sol mais déjà, en 1952, Wood signalait l'efficacité de *Trichoderma* pour contrôler *Botrytis cinerea* sur la laitue. *Trichoderma* a la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action. Il peut utiliser l'antibiose, la compétition et le parasitisme.

2.1.1. Antibiose

Il résulte de la production de substances qui agissent comme des « antibiotiques » et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène;

2.1.2. Compétition

Se manifeste par l'aptitude de *Trichoderma* à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes mais *Trichoderma* emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables;

2.1.3. Mycoparasitisme

Se manifeste par la destruction de l'agent pathogène lorsque *Trichoderma* s'enroule autour de celui-ci soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur et/ou en lui « injectant » des substances (enzymes) qui le détruisent.

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

2.2. Stimulation de la croissance de la plante

La production d'agents de lutte biologique (ALB) à base de *Trichoderma* date depuis longtemps et a été révisée au cours des dernières décennies par plusieurs scientifiques qui lui ont attribué une importance en agriculture pour la lutte contre les maladies causées par les pathogènes. Les *Trichoderma* sont caractérisés par une croissance rapide, une grande capacité à la compétition saprophytique (Mouria *et al.* 2005) et parasite le mycélium d'autres champignons. Les *Trichoderma* sont très efficaces pour la lutte contre les maladies des plantes reliées aux sols, aussi bien que pour la dégradation de composés toxiques présents dans les sols. Les sols inoculés protègent les cultures et garantissent un milieu sain pour un développement normal de la végétation (Harman 2000). En effet, ce champignon secrète de multiples enzymes, antibiotiques, hormones qui sont utiles pour la croissance des plantes et leur confèrent une protection contre les pathogènes. Il en résulte aussi une amélioration du contenu du sol en nutriments. La présence de *Trichoderma* dans le sol joue à la fois un rôle préventif et curatif (Harman *et al.* 2004; Singh *et al.* 2007). Il a été prouvé que la souche T-22 de *Trichoderma* est capable d'augmenter le développement des racines chez le maïs et chez d'autres plantes (Harman 2000; Harman *et al.* 2004). Cet effet peut durer toute la vie des plantes annuelles et peut être induit par l'ajout de petites quantités de bioinoculants à base de *Trichoderma* appliqués sur les semences (moins de 1 g/ha). Les recherches récentes ont prouvé que les *Trichoderma* sont des opportunistes qui vivent en association bénéfique avec des plantes autant qu'ils sont des parasites pour quelques champignons. Au moins quelques souches établissent une colonisation robuste et durable au niveau des surfaces racinaires et pénètrent jusqu'à l'épiderme ce qui améliore la croissance racinaire, la productivité, la résistance au stress abiotique et l'assimilation et l'utilisation des nutriments (Harman *et al.* 2004).

Trichoderma a été connu comme producteur de substances antibiotiques et parasite d'autres champignons (Lindsey *et al.* 1967; Chang *et al.* 1986). Le parasitisme de *T. viride*, par exemple, est défini par la sécrétion d'un type d'enzyme incluant les cellulases, les chitinases et des antibiotiques, tel que la gliotoxine (Haran *et al.* 1996). Des récentes recherches ont montré que *T. viride* est un améliorateur de croissance chez le soja (Harman 2001), il protège la tomate, le piment (Verma 2007) et quelques cucurbitacées contre les phytopathogènes. Harman *et al.* (2004) ont ajouté que la colonisation des racines par *Trichoderma* améliore la croissance et le développement de ces derniers, la productivité, la résistance au stress abiotique et le prélèvement et l'utilisation des nutriments. Le maïs répond généralement à

l'ajout de fertilisants riches en azote par l'amplification de l'intensité de la couleur verte, une bonne croissance et un rendement maximum. Cependant, les plantes de maïs issues de semences traitées avec *Trichoderma T-22* ont donné un rendement maximum avec un fertilisant contenant 40% moins d'azote par rapport à des semences non traitées avec *T-22* (Harman 2000, 2001).

2.3. Production de métabolites intéressants

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma sp.* a été rapportée pour la première fois par Weidling (1936), concernant un antifongique (Papavizas, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino et al., 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990). La littérature cite que les métabolites importants de *Trichoderma sp.* sont principalement des enzymes et des molécules bioactives.

2.3.1. Production d'enzymes

La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre principalement les xylanases ou les cellulases (Sandgren et al., 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek et al., 2003).

2.3.2. Production de substances bioactives

Parmi les substances bioactives produites par les *Trichoderma* on a :

Métabolites volatils : 6 pentyl α pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes (Vizscaino et al., 2005).

Métabolites non volatils diffusibles : polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines.

Métabolites polypeptidiques ciclosporines immunosuppresseurs anti- inflammatoire; (et les peptaïbols, qui sont généralement assimilés à des mycotoxines peptidiques (Landreau., 2001).

2.3.3. Synthèses d'acides aminés

La biosynthèse des AA chez les micromycètes : Les champignons sont capables de synthétiser les 20 AA usuels des deux séries L et D, en plus d'autres particuliers, en partant de

l'ammoniaque environnant provenant soit de la dégradation enzymatique de composés azotés organiques ou inorganiques ou bien suite à la fixation bactérienne de l'azote atmosphérique. Le rythme de croissance élevé des *Trichoderma sp.* leur permet d'assimiler rapidement l'ammoniaque.

La biosynthèse des AA est initiée par la production de glutamate, rare et précieux dans la nature, car il est la trame de synthèse du reste des AA et se trouve de ce fait à des concentrations élevées dans les cellules vivantes (Ahmed et *al.*, 1995 ; Voet ., 1998).

3. Aspect de *Trichoderma* en culture

3.1. Patato Dextrose Agar (PDA)

Sur milieu PDA, les colonies sont à croissance très rapide et peuvent envahir la boîte de Pétri dans les 48h. Le mycélium est de couleur blanche au départ et devient verte plus tard marquant le début de la conidiation. Le revers de la culture est incolore. Un ou plusieurs cercles concentriques de couleur verte peuvent se former autour du pont d'inoculation. La conidiation peut se faire du centre vers la périphérie de la boîte et les conidies sont ensuite dispersées dans toute la boîte. Chez certaine espèces, par exemple *T. pseudokoningui*, il peut y avoir la formation d'une zone irrégulière sans formation de conidies autour du point d'inoculation (Shah et *al.*, 2012). On peut observer aussi la présence d'un pigment jaune sécrété typiquement sur milieu PDA (Samuels et *al.*, 2013)

3.2.Malt Extract Agar (MEA)

Sur milieu MEA, Colonies à croissance rapide d'aspect grumeleux, de couleur blanche au départ et devenant vert foncé par endroit. La moisissure se répartit de façon hétérogène sur la boîte de Pétri. Le revers est jaune-orange. La présence de chlamnydospore est possible et leur taille peut aller jusqu'à 14 µm. Des cercles concentriques peuvent se former ou non au niveau du mycélium cotonneux de couleur blanche.et conidies vertes d'aspects lumineux ou non peuvent se former sur toute la boîte. Le pH du milieu augmente légèrement mais reste acide.

3.3.Czapek Dox (Dox)

Sur milieu Czapek : Colonies à croissance un peu plus lente que sur les autres milieux, d'aspect gélatineux presque transparent (légèrement blanche). Le revers est de couleur crème. Les conidies peuvent se former dans toute la boîte de Pétri au niveau des cercles

concentriques. On peut observer aussi des grappes jaunes formées de conidies autour du point d'inoculation (Shah et *al.*, 2012). La croissance de l'espèce basidifie le pH du milieu.

3.4.Sabouraud (SB)

Sur milieu SB, les colonies compactées en touffes sont à croissance rapide. Le mycélium est cotonneux de couleur blanche tandis que le revers de la culture est crémeux. Des conidies peuvent se former dans toute la boîte avec la présence de cercles concentriques blanchâtres autour du point d'inoculation.

MATERIELS ET METHODES

1. Isolement de *Trichoderma*

1.1. Présentation du site d'échantillonnage

Les prélèvements de sols ont été effectués dans des parcelles de tomates au niveau du champ école de la licence professionnelle agro ressource et entrepreneuriat (LPAG). Ce champ (Figure 5) se trouve au niveau du jardin botanique du département de biologie végétale de la faculté des sciences et techniques de l'université cheikh Anta Diop de Dakar. Le sol est caractérisé : par un pH basique (8.4) mesuré à l'aide d'un pH-mètre à température ambiante avec agitation magnétique d'un mélange de 10 gr de sol dans 25 ml d'eau, et une teneur en phosphore assimilable d'environ 7.14 mg/Kg de sol (Ndiaye, 2007). Ce champ est créé par le département de biologie végétale dans le but d'apporter des solutions à la maîtrise de l'eau qui est un facteur clé dans le développement de l'agriculture d'un pays. Ainsi le champ école LPAG est entièrement équipé d'un système d'irrigation goutte à goutte et permet aux étudiants de mener leurs travaux de recherches.



Figure 5 : Aperçu du Champ école LPAG

1.2. Technique d'échantillonnage

L'échantillonnage est effectué au niveau des racines des tomates suivant différentes étapes. La surface du sol est d'abord débarrassée des feuilles mortes et des débris des végétaux. Puis à l'aide de spatules préalablement désinfectées à l'alcool, le sol est creusé jusqu'à des profondeurs allant de 10 à 30 cm correspondant à la rhizosphère. Ensuite les prélèvements

sont effectués à ces horizons et le sol est mis dans des sachets en plastique puis ramené au laboratoire. La terre ainsi récoltée est séchée à l'étuve à 30° pendant 2 jours et est immédiatement utilisée pour l'isolement des champignons du genre *Trichoderma*. Au niveau de ce site l'échantillonnage a été effectué dans trois zones différentes caractérisées par la présence de plants de tomate en différents stades de développement. Les deux premières parcelles sont constituées de plantes de tomate arrivées à maturité et en période de récolte tandis que la troisième parcelle est constituée de plants de tomates qui sont déjà récoltées. Pour chaque parcelle l'échantillonnage est effectué dans deux zones choisies de manière aléatoire. Ce qui correspond à un total de 6 échantillons de sol.



Figure 6 : Echantillonnage au niveau des racines
de tomates



Figure 7 : Echantillons de sol prélevé

1.3. Technique d'isolement

La technique utilisée pour l'isolement des *Trichoderma* est celle dite de « suspension dilution ». Le principe consiste à mettre le sol en suspension dans de l'eau stérile, puis à incorporer les différentes dilutions de cette suspension dans le milieu d'isolement. Cette technique comprend plusieurs étapes, allant de la préparation des dilutions jusqu'à l'interprétation des résultats (Rapilly, 1968). La préparation des dilutions consiste tout d'abord à ajouter 10g de sol à 90 ml d'eau physiologique stérile, puis à agiter pendant 30 mn, ce qui constitue la dilution 10^{-1} . L'agitation permet d'homogénéiser le milieu et de libérer les microorganismes des différentes particules. Des prélèvements successifs de 10 ml dans cette suspension, puis dans les suivantes sont ajoutés chaque fois à 90 ml d'eau stérile et vont constituer les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , ... jusqu'à 10^{-6} . (Figure 8) Rappelons que pour réaliser ces différents prélèvements, il est nécessaire d'utiliser des pipettes stériles qui sont changées à

chaque dilution. Au moment de l'analyse 1 ml de chaque dilution est incorporé à la surface des boîtes de pétri et on verse par dessus le milieu de culture. Deux milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement du champignon que sont le milieu PDA et le milieu MA2. Les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 121° pendant 20mn. Les boîtes de Pétri ensemencées sont homogénéisées par des mouvements circulaires et sont laissées sous la hotte jusqu'à leur parfaite durcissement. Les boîtes sont ensuite parafilmées puis incubées à la température ambiante. Trois boîtes sont ensemencées pour chaque dilution. Après 6 jours d'incubation les colonies individuelles présentant une couleur verdâtre et un aspect circulaire sont repiquées dans un nouveau milieu PDA.

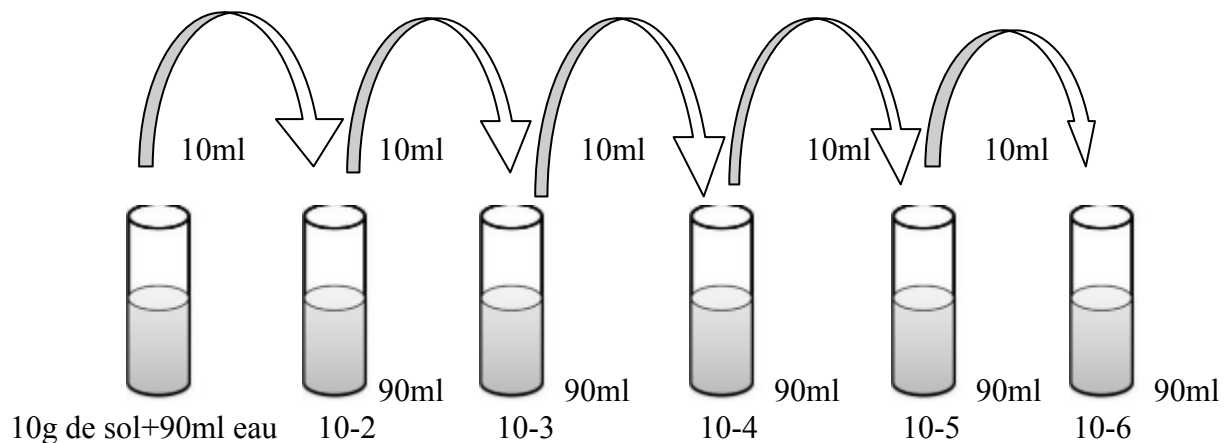


Figure 8 : Schéma de dilution



Figure 9: Boîtes de Pétri ensemencées avec les différentes dilutions : (a) : milieu PDA, (b) : milieu MA2

2. Identification de *Trichoderma*

Après envahissement mycélien total du milieu, on procède à l'identification des souches par une observation des caractéristiques macroscopiques et microscopiques et par comparaison

avec la clé de détermination de Samuel *et al.*, (2004). L'identification est basée sur les structures du mycélium notamment les conidiophores et les phialides, les éléments de la reproduction asexuée, (conidies : forme, cloisons, couleur, taille...), et sur les formes de résistance (chlamydospores solitaires, en paires ou en chaînes), avec l'aide de la clés d'identification de Samuel *et al.*, 2013.

2.1. Au plan macroscopique.

Les souches sont cultivées sur milieu PDA et incubées à 29°C. Les critères utilisés pour identifier les *Trichoderma* des autres espèces fongiques au plan macroscopique sont : la couleur des colonies recto et verso, la vitesse de croissance du mycélium et l'aspect du mycélium aérien.

Les colonies présentant les caractéristiques suivantes : vitesse de croissance mycélienne très rapide, croissance cyclique du mycélium sous forme de cercles réguliers, colonies légèrement floconneuses ou compactées en touffes (ou bien présentant les 2 aspects, sachant que les deux aspects peuvent exister en même temps) à surface lisse, translucide ou blanc aqueux, couleur des colonies qui varie du blanc au vert foncé ou au jaune sont sélectionnées pour l'identification au plan microscopique.

2.2. Au plan microscopique

On a prélevé superficiellement d'une boîte de pétri après trois jours d'incubation à la température ambiante, un échantillon du mycélium aérien à l'aide de l'anse de platine. L'échantillon prélevé est déposé sur une lame de verre. Ensuite deux gouttes d'eau sont ajoutées à la préparation et l'échantillon est bien homogénéisé afin d'éviter d'avoir une préparation dense et inobservable. La lame portant l'échantillon est chauffée doucement par le bec bunsen pour faciliter la réaction. Ensuite on fait couvrir la lame par une lamelle sans laisser des bulles d'air pour avoir une meilleure observation.

Ensuite on observe successivement les échantillons sous différents grossissements du microscope optique les lames ainsi préparées (Botton *et al.*, 1990). Ainsi l'observation vise d'une part la structure et la morphologie des conidiophores âgés de 7 jours. D'autre part la forme des conidies et des phialides âgés de 7 jours sont aussi observés.

3. Conservation des souches

Les souches obtenues sont cultivées sur un milieu PDA et incubées à la température ambiante. On procède ensuite à un repiquage toutes les 2 à 3 semaines avant le dessèchement du milieu de culture car cette technique ne permet pas une conservation des souches pour une longue durée.

4. Culture *in vitro* de *Trichoderma*

4.1. Culture dans différentes conditions

Pour comprendre la biologie des différentes souches de *Trichoderma sp*, nous avons étudié leur comportement *in vitro* en les cultivant dans différentes conditions : milieux de Culture, pH, Température, Salinité.

4.1.1. Milieux de culture

Pour étudier l'effet du type de milieux de culture sur la croissance des différentes souches de *Trichoderma* obtenues, quatre milieux de cultures de composition chimique différente (annexe1) ont été choisis: PDA, MEA, SB et DOX.

Ce sont les milieux les plus utilisés pour la culture des champignons et ils permettent le développement d'un large spectre de champignons. Les milieux sont autoclaves à 121°C pendant 20 mn puis sont coulés dans des boîtes de Pétri stériles de 90mm de diamètre. Après durcissement sous la hotte un disque d'un cm de diamètre est prélevé de chaque souche et est déposé au centre de la boîte de Pétri. Les boîtes ainsiensemencées sont parafilmées puis incubées dans une étuve exposée à la température ambiante.

Au cours de cette expérimentation, pour chaque milieu, cinq boîtes de Petri ont étéensemencées pour chaque milieu et pour chaque souche (Figure 10).

L'évolution de la croissance mycélienne est mesurée quotidiennement par mesure des deux diamètres perpendiculaire de chaque colonie. La couleur ainsi que la texture de colonies sont aussi observées (Botton et *al.*, 1990).



Figure 10 : Boites de pétri coulées avec les différents milieux de cultures : respectivement de la gauche vers la droite : PDA, MEA, Dox, SB

4.1.2. pH

L'effet du pH sur la croissance et la sporulation des souches de *Trichoderma* a aussi été étudié. Ainsi quatre pH différents ont été utilisés : 3, 5, 7, 9. Le milieu de culture utilisé pour cette étude est le milieu PDA. C'est un milieu non spécifique, riche en éléments nutritifs et convient à la croissance de nombreux champignons..

Après préparation du milieu de culture comme précédemment une pastille d'un cm de diamètre a été découpée puis déposée au centre de la boîte de Pétri. L'ensemble est parafilmé puis incubé à la température ambiante. Cinq répétitions ont été faites pour chaque pH et pour chaque souche. La vitesse de croissance du mycélium est estimée chaque jour par mesure des deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie jusqu' à envahissement total de la boîte par le mycélium.

4.1.3. Température

L'étude de l'effet de la température sur les différentes souches de *Trichoderma* a porté sur les paramètres de croissances et de sporulation. Quatre températures d'incubation différentes ont été choisies : 0°, 29 °, 35° et 40°. Le milieu de culture PDA a été utilisé pour cette étude et un disque d'un Cm de diamètre de chaque souche a été déposé au centre des boîtes de Pétri coulées préalablement avec le milieu PDA. Cinq boîtes de Petri ont étéensemencées pour chaque souche et pour chaque température (Figure 11). L'évolution de la croissance mycélienne est déterminée quotidiennement par mesure des deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie (Botton et al., 1990).

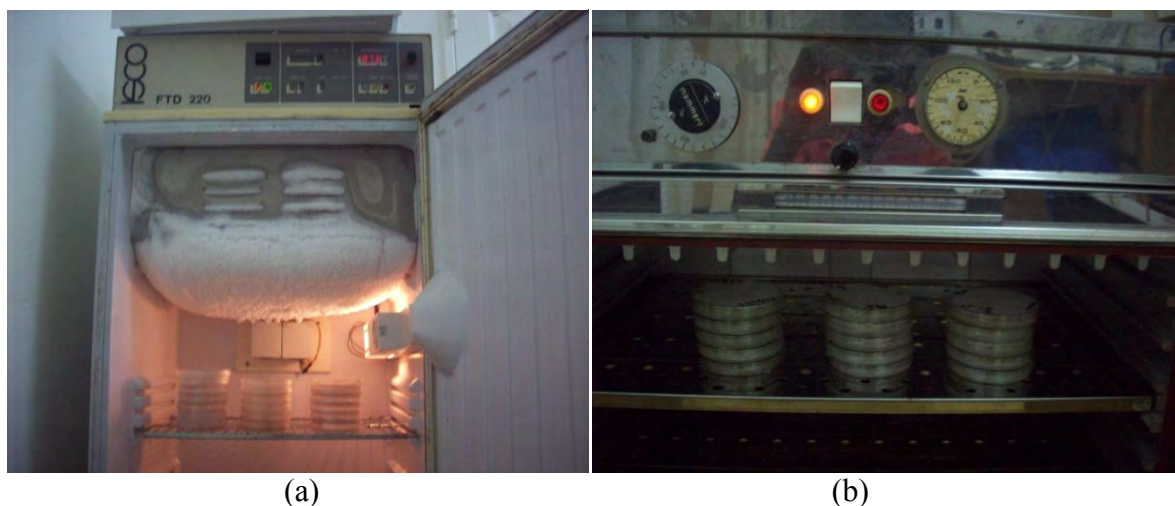


Figure 11 : Boîtes de Pétri incubées à différentes températures : (a) : 0°C, (b) : 40°C

4.1.4. Degrés de salinité

Afin de déterminer l'effet de la salinité sur la croissance et la sporulation des différentes souches de *Trichoderma* que nous avons isolées, cinq concentrations différentes de sel ont été utilisées : 0%, 1%, 5%, 7% et 9%. Ces différentes concentrations ont été ajoutées au milieu PDA puis autoclavé à 121° pendant 20mn. Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Pétri et après durcissement sous la hotte une pastille d'un cm de diamètre de chaque souche est déposée au centre de la boîte de pétri contenant le milieu de culture puis incubée à la température ambiante. Cinq boîtes ont étéensemencées pour chaque souche et pour chaque température. L'évolution de la croissance mycélienne est déterminée quotidiennement par mesure des deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie (Botton et *al.*, 1990).

5. Tests d'antagonisme *in vitro*

L'étude des propriétés antagonistes des différentes souches de *Trichoderma* isolées a été réalisée sur 2 souches de *Fusarium sp.*(figure 12) isolées a partir des plants de tomates au niveau du champ école LPAG du jardin botanique.

La première souche à été isolée à partir du collet des plantes tandis que la deuxième a été isolées a partir des feuilles de la tomate présentant des symptômes de la fusariose. Deux méthodes différentes ont été utilisées pour observer les propriétés antagonistes de ces différentes souches à l'égard de ces champignons pathogènes.

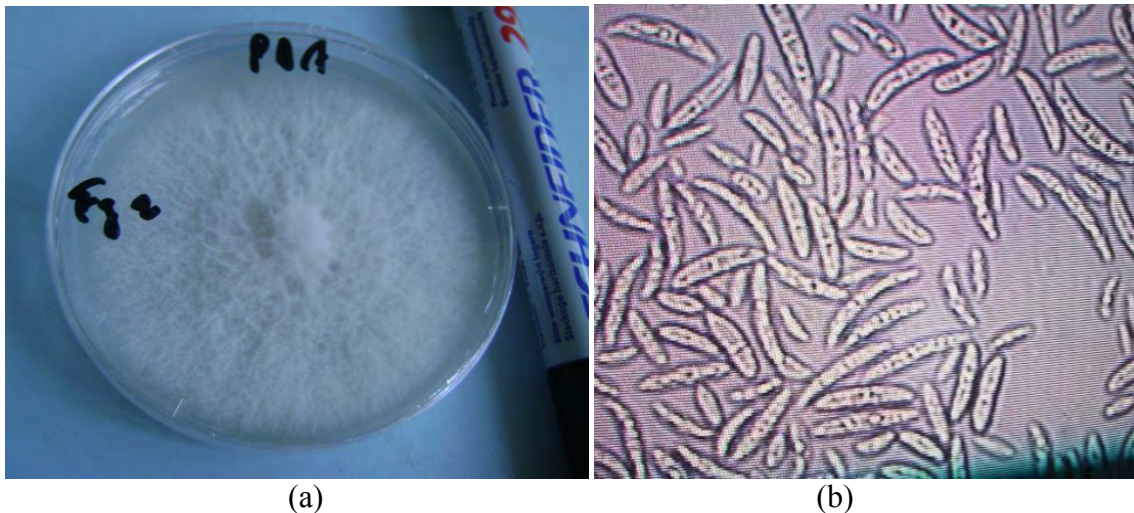


Figure 12 : Souche F1 sur milieu de culture PDA (a) Souche F1 sous microscopes optique Gr : $\times 400$ (b)

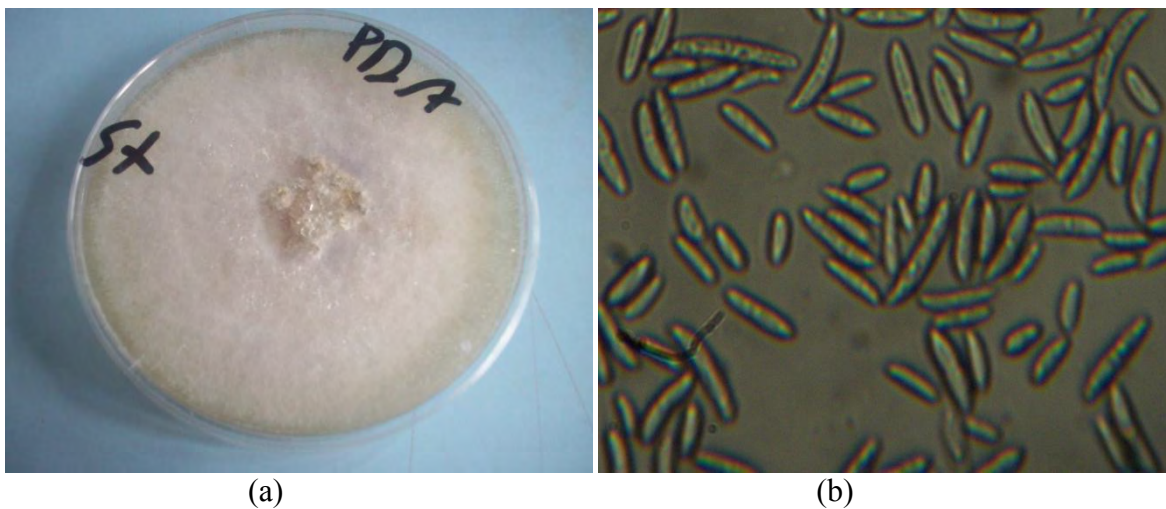


Figure 13 : Souche F2 sur milieu de culture PDA (a) F2 Sous microscopes optique Gr : $\times 400$ (b)

5.1.Méthode de confrontation directe

Cette méthode (Figure 14) appelée encore « technique des cultures opposées », consiste à déposer dans des boîtes de Pétri contenant 15 ml de milieu PDA à 3cm l'un de l'autre, deux explants de 8 mm de diamètre provenant des cultures des deux champignons (parasite et antagoniste)..

Au cours de cette expérimentation, trois répétitions ont été retenues pour chaque test. Les témoins sont représentés par des boîtes de Pétri contenant uniquement le champignon pathogène. L'ensemble des boîtes est placé à la température ambiante.

L'évolution de la croissance mycélienne est déterminée après 6 jours d'incubation par la mesure du diamètre de la colonie mycélienne du champignon pathogène.

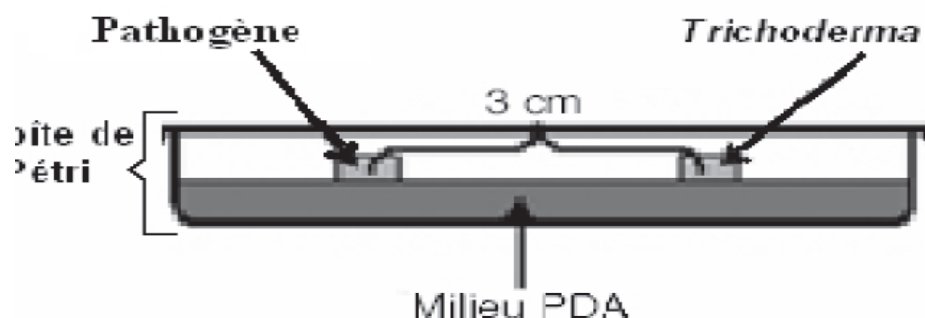


Figure 14 : Méthode de confrontation directe (Hibar et *al.*, 2005)

5.2.Méthode de confrontation à distance

Cette technique consiste à déposer au centre de chaque boîte de Pétri contenant le milieu PDA un explant de 1cm de diamètre prélevé à partir des colonies de *Trichoderma* et des agents pathogènes (Figure 15). Après 24 heures d'incubation, la partie inférieure contenant le *Trichoderma* est scellée avec une autre contenant le pathogène, par une bande de para film de façon à éviter toute contamination et toute perte de gaz. Comme pour la première expérimentation, trois répétitions ont été réalisées. Les témoins sont représentés par des boîtes contenant à la face inférieure uniquement le milieu de culture et la face supérieure l'agent pathogène.

Dans les deux cas de tests d'antagonisme l'évaluation de l'inhibition exercée par le *Trichoderma* est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante (Hmouni et *al.*, 1996) :

$$I (\%) = (1 - C_n/C_o) \times 100$$

Où : C_n est le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste et C_o le diamètre moyen des colonies témoins.

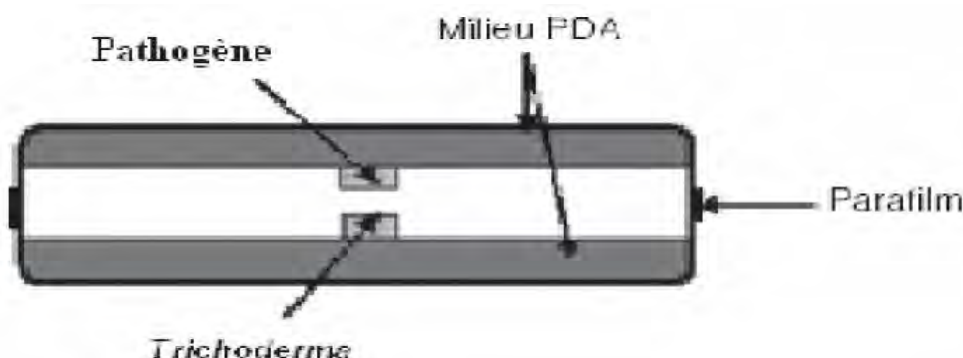


Figure 15 : Méthode de confrontation à distance (Hibar et *al.*, 2005)

RESULTATS

1. Identification de *Trichoderma*

Les *Trichoderma sp.* se développent facilement *in vitro*. Avec un rythme de croissance élevé, la taille des colonies de *Trichoderma sp.* est relativement plus importante que celle du reste des espèces fongiques présentes dans les échantillons.

1.1.Examen macroscopique

D'après les caractéristiques macroscopiques des différentes colonies purifiées, cinq souches ont été présélectionnées et supposées être des *Trichoderma*. Les souches présélectionnées présentent les caractéristiques macroscopiques suivantes :

- ✓ Colonies à croissance rapide
- ✓ Mycélium de couleur blanc au départ puis devient vert par endroit et à aspect farineux
- ✓ Croissance cyclique du mycélium sous forme de cercles réguliers
- ✓ Couleur des colonies qui varie du blanc au vert foncé ou au jaune

Les souches de *Trichoderma sp.* présélectionnées selon les critères macroscopiques sont observées sous microscopie optique pour confirmation.

1.2.Examen microscopique

Nous recherchons un mycélium constitué d'hyphes ramifiés à parois lisses et hyalines, portant des conidiophores de forme conique ou pyramidale ainsi que des phialides en forme de quilles ou de flasques, spécifique du genre *Trichoderma*. Les phialides portent à leur extrémité des phialospores de forme ovoïde ou ellipsoïdale en général. Ainsi après examen microscopique trois souches ont été confirmées être *Trichoderma sp.*

Les deux premières souches (T1 et T2) ont été isolées à partir du milieu PDA respectivement à partir des dilutions 10-4 et 10-2 tandis que la souche T3 a été isolée à partir du milieu MA2 à partir de la dilution 10-5.

La souche T1 (Figure 15) présente un conidiophore large, droite, peu ramifié et forme une structure pyramidale au sommet. Il porte à ses extrémités des phialides insérés directement sur l'axe principal du conidiophore formant des angles de 90°C avec ce dernier. De très nombreuses conidies ayant une forme arrondie sont aussi observées.

La souche T2 (Figure 17) présente un conidiophore flexueux et très ramifié. Il porte de très nombreux phialides insérées directement sur l'axe principal du conidiophore à interval régulier. Ces phialides ont la forme de quilles ou de bouteilles renflées à la base et portent à leurs extrémités des conides de forme arrondies.

L'examen microscopique de la souche T3 (Figure 18) montre qu'elle est formée d'un long conidiophore flexueux avec quelques ramifications secondaires. Des phialides sont insérées sur l'axe principal du conidiophore et formant à ses extrémités une structure pyramidale. Les phialides portent à leurs extrémités des conidies de formes globuleuses.

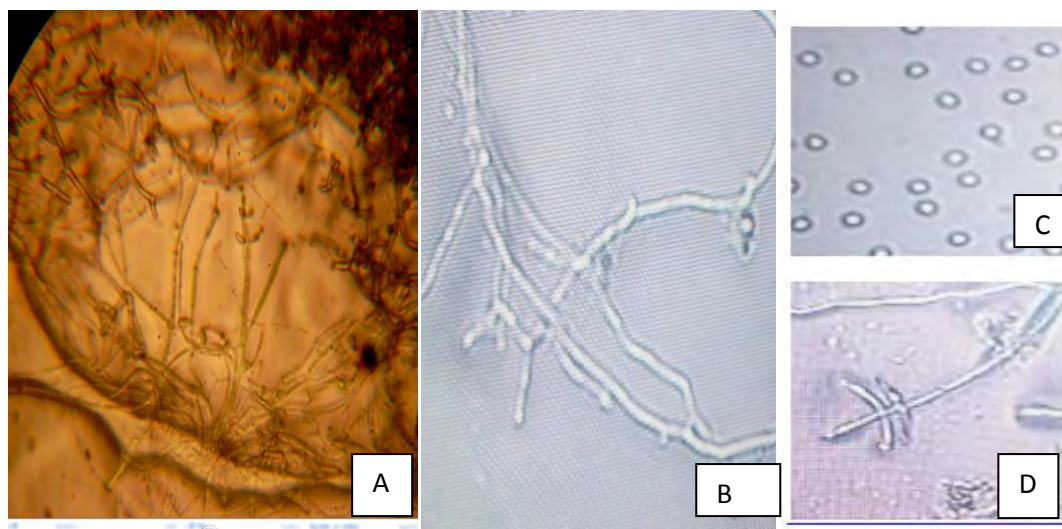


Figure 16 : Aspect microscopique de la souche T1 : Grossissement : $\times 400$

A : conidiophore portant des phialides au sommet B : conidiophore peu ramifié de *Trichoderma* ; C : conidies ; D : phialides

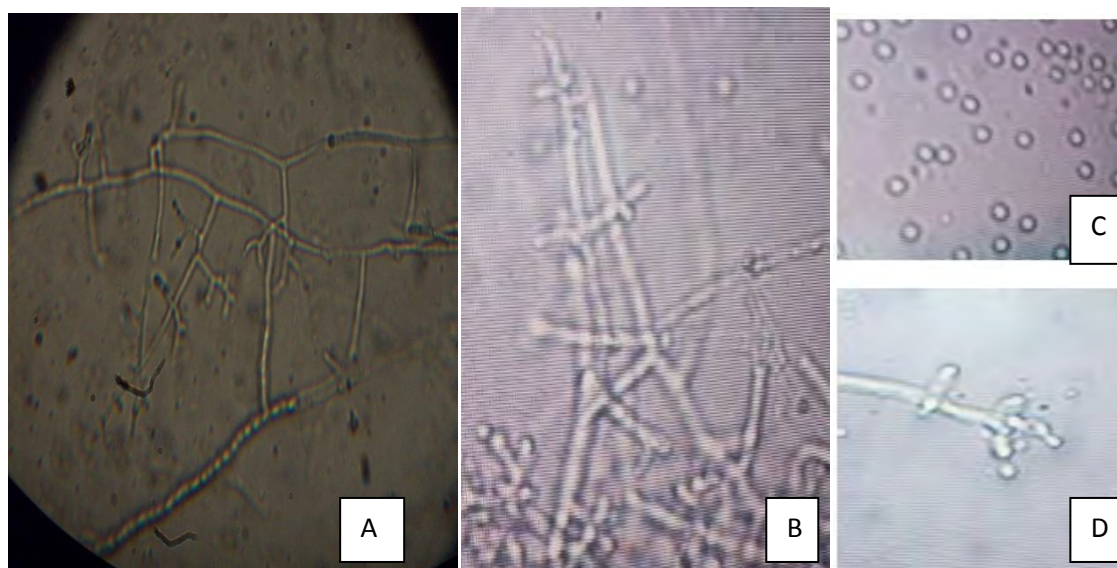


Figure 17 : Aspect microscopique de la Souche T2 : Grossissement : $\times 400$

A : Conidiophore très ramifié ; B : conidiophore portant des phialides ; C : conidies ; D : phialides de *Trichoderma*



Figure 18 : Aspect microscopique de la Souche T3 : Grossissement : $\times 400$

A : conidiophore avec quelques ramifications ; B : conidiophore portant des phialides ;
C : conidies ; D : Phialides de *Trichoderma*

2. Effets des quelques facteurs abiotiques sur la croissance de *Trichoderma*

2.1.Effet des milieux de cultures

Le tableau 4 représente l'effet de quatre types de milieux de cultures sur la croissance des trois souches de *Trichoderma*. L'analyse de la variance montre un effet hautement significatif des différents milieux de culture sur la croissance des trois souches de *Trichoderma* au test de Fischer LSD. Les différents milieux PDA, MEA, SB, DOX permettent une bonne croissance de toutes les espèces mais à des degrés différents.

Ainsi, après 24h d'incubation on observe une croissance plus importante sur le milieu PDA pour toutes les souches de *Trichoderma*. Le milieu MEA vient en deuxième position pour la souche T1 puis viennent les milieux SB et DOX ou on n'observe pas de différences significatives. La souche T2 ne présente pas de différence significative sur les milieux MEA, SB et DOX. Par contre la souche T3 présente une différence significative sur les différents milieux.

Après 48h d'incubation, on observe un envahissement de toute la surface de chaque boîte de Petri par les différentes souches sur le milieu PDA. Les souches T1 et T2 ne présentent pas de différences significatives sur les autres milieux de culture. Cependant la croissance de la souche T3 présente toujours une différence significative sur les 3 milieux de culture où le MEA vient en deuxième position et est suivi respectivement des milieux DOX et SB.

Après 72 h d'incubation un envahissement mycélien total de toutes les boîtes de Petri a été observé par les différents souches.

Le milieu de culture à base de pomme de terre (PDA) est plus favorable pour la croissance de toutes les souches et permet un envahissement mycélien total des boîtes de Petri seulement après 48h d'incubation et est suivi du milieu, MEA. La plus faible croissance a été observée sur le milieu DOX pour les souches T1, T2 et sur SB pour la souche T3.

Tableau 1 : Croissance (mm) de différentes souches de *Trichoderma sp.* sur 4 milieux de cultures

Milieux de culture	Souches de <i>Trichoderma</i>		
24h d'incubation	T1	T2	T3
PDA	34.60a	43.50a	41.00a
MEA	30.50 b	29.10b	33.20b
DOX	25.30 c	27.40b	22.40c
SB	25.70 c	30.50b	32.30b
48h d'incubation			
PDA			
	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a
MEA	50.40b	79.00b	80.60b
DOX	79.00b	79.20b	65.40d
SB	80.60b	79.20b	72.00c
72h d'incubation			
PDA	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a
MEA	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a
DOX	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a
SB	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a

Pour chaque colonne et pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD.

2.2.Effet de la Température d'incubation

L'effet de la température d'incubation sur la croissance des souches de *Trichoderma* est représenté dans le tableau 5. L'analyse de la variance au test de Fischer LSD montre que l'effet de la température est remarquable sur la croissance mycélienne des différentes souches de *Trichoderma*. Ainsi, une inhibition totale de la croissance mycélienne est observée à 0°C. Par contre, elle est maximale (optimale) à 29 °C pour toutes les souches. La croissance est

ralentie à 35°C et nulle à 40°C. Après 24h d'incubation à 29°C, la croissance mycélienne des souches T1, T2, T3 est nettement supérieure respectivement de 5, 3 et 2 fois à celle observée à 35°C. A 48h d'incubation à 29°C on a noté un envahissement mycélien total de toute les boites de Petri par toutes les souches alors qu'à 35°C une surface 17, 18 et 28% est occupée par respectivement les souches T1, T2 et T3. Une occupation de 68, 63 et 69% de la surface des boites de Petri est notée respectivement par les souches T1, T2 et T3. Après 15 jours d'incubation à 0°C toutes les souches ressorties et incubées à la température ambiante ont donné une bonne croissance. Cependant aucune des souches qui étaient incubées à 40°C n'a poussé après incubation à la température ambiante. Donc 29°C constitue la température optimale de croissance des différentes souches. 0 °C est une température d'inhibition et peut être utilisée pour la conservation des souches. A 40°C le mycélium de toutes les souches est détruit.

Tableau 2 : Croissance (mm) de différentes souches de *Trichoderma* sp. en des températures d'incubations différentes

T°C	Souches de <i>Trichoderma</i>		
24h d'incubation	T1	T2	T3
0	00.00c	00.00c	00.00c
29	53.30a	55.20a	49.60a
35	10.40b	15.60b	18.20b
40	00.00c	00.00c	00.00c
48h d'incubation			
0	00.00c	00.00c	00.00c
29	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a
35	15.00b	16.80b	24.21b
40	00.00c	00.00c	00.00c
72h d'incubation			
0	00.00c	00.00c	00.00c
29	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a
35	36.00b	30.30b	33.60b
40	00.00c	00.00c	00.00c
96h d'incubation			
0	00.00c	00.00c	00.00c
29	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a
35	58.40b	54.90b	59.90b
40	00.00c	00.00c	00.00c

Pour chaque colonne et pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD

2.3.Effet du pH

L'effet de différents pH sur la croissance des souches de *Trichoderma* est représenté dans le tableau 7. L'analyse de la variance au test de Fischer LSD montre un effet hautement significatif de l'effet des différents pH sur la croissance mycélienne des trois souches de *Trichoderma*. Après 24h d'incubation, la meilleure croissance a été observée au pH 5 pour les souches T1 et T2 et est suivi du pH 7. La souche T3 ne présente pas de différence de croissance significative sur les pH 5 et 7 ou on observe la meilleure croissance. Une différence significative dans la croissance des différentes souches n'a pas été observée au pH 3 et 9.

Après 48h d'incubation, on observe un envahissement mycélien total de toute la surface de la boîte de Petri aux pH 5 et 7. La croissance aux pH 3 et 9 est significativement différente et la croissance la plus importante a été observée au 9. Un envahissement mycélien par toutes les souches est observé après 72h d'incubation au pH et 96h au pH.

La meilleure croissance pour toutes les souches a été observée au pH 5 ou la vitesse de croissance de chacune des souches T1, T2 est nettement supérieure de 3 fois à celle obtenue aux pH 3 et 9 après 24h d'incubation.

Tableau 3 : Croissance (mm) de différentes souches de *Trichoderma sp.* sur des pH différents

pH	Souches de <i>Trichoderma</i>		
24h d'incubation	T1	T2	T3
3	14.40c	15.50c	30.30b
5	53.90a	55.60a	50.70a
7	44.30b	50.40b	42.40a
9	13.40c	16.20c	17.60b
48h d'incubation			
3	36.20c	48.10c	36.50c
5	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a
7	> 85.00a	> 85.00a	> 85.00a
9	44.40b	52.20b	62.30b
72h d'incubation			
3	66.40b	72.10b	55.40b
5	>85.00a	>85.00a	>85.00a
7	>85.00a	>85.00a	>85.00a
9	>85.00a	>85.00a	>85.00a
96h d'incubation			
3	>85.00a	>85.00a	>85.00a
5	>85.00a	>85.00a	>85.00a
7	>85.00a	>85.00a	>85.00a
9	>85.00a	>85.00a	>85.00a

Pour chaque colonne et pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD

2.4.Effet de la salinité

Le tableau 7 montre l'effet de différentes doses de sels sur la croissance de trois souches de *Trichoderma*. L'analyse statistique de la variance au test de Fischer LSD montre un effet hautement significatif de l'effet de la salinité sur la croissance des différentes souches de *Trichoderma*. En effet les concentrations élevées de sels diminuent considérablement la vitesse de croissance des différentes souches obtenues. Après 24h d'incubation à 1% de Salinité une diminution de 13, 23 et 24 mm est noté sur la croissance respectivement des souches T1, T2 et T3 comparée au milieu à 0% de NaCl. Cette réduction de la croissance s'accroît à 3% et à 5% de NaCl pour toutes les souches. Cependant entre 5, 7 et 9% aucune différence significative n'est observée sur la croissance des différentes souches par rapport au milieu. Cette diminution de la croissance des différentes souches est aussi observée après 48h d'incubation ou on a un envahissement mycélien de toutes les boîtes de Petri par les différentes souches. Après 72h d'incubation un envahissement mycélien est aussi observé dans les milieux à 1 et 3% de NaCl.

Tableau 4 : Croissance de différentes souches de *Trichoderma sp.* sur des % de salinités différents

% Nacl	Souches de <i>Trichoderma</i>		
24h d'incubation	T1	T2	T3
0	34.60a	43.50a	41.00a
1	20.70b	20.00b	14.90c
3	18.40b	13.10c	17.60b
5	00.90c	00.60d	01.70c
7	00.00c	00.00d	01.40c
9	00.00c	00.00d	01.20c
48h d'incubation			
0	>85.00a	>85.00a	>85.00a
1	50.80b	68.40b	63.50b
3	53.00b	50.50c	46.90c
5	14.50c	10.00d	17.20d
7	10.60d	09.50d	17.10d
9	05.00e	04.20 ^e	10.00 ^e
72h d'incubation			
0	>85.00a	>85.00a	>85.00a
1	>85.00a	>85.00a	>85.00a
3	>85.00a	>85.00a	>85.00a
5	33.15b	17.70c	41.50b
7	21.30c	20.10b	25.50c
9	07.80d	06.90d	17.40d
96h d'incubation			
0	>85.00a	>85.00a	>85.00a
1	>85.00a	>85.00a	>85.00a
3	>85.00a	>85.00a	>85.00a
5	49.10b	25.40c	48.50b
7	35.00c	32.30b	34.20c
9	18.50d	17.90d	25.50d

Pour chaque colonne et pour chaque temps d'incubation, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au test de Fischer LSD

3. Tests d'antagonismes *in vitro*

3.1. Confrontation directe

Les résultats obtenus (tableau 8) montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (Pathogène – Antagoniste). Après 6 jours d'incubation (Figure 19), une action inhibitrice exercée par les souches de *Trichoderma* vis à vis de la croissance mycélienne des pathogènes a été observée.

Nous avons constaté l'apparition d'une zone d'inhibition suivie par un arrêt de croissance pour l'ensemble des souches du pathogène. Le calcul du taux d'inhibition confirme ces résultats. Toutes les souches de *Fusarium* sont inhibées à plus de 50% et ce quelque soit l'antagoniste utilisé. La souche F1 se montre la plus sensible avec un taux d'inhibition de 57.09 % pour T1, 70.53% pour T2 et 73.05% pour la souche T3. Cette dernière se montre la plus efficace comparée aux 2 autres souches et permet une inhibition de 73.05% pour la souche F1 et 59.21% pour la souche F2.

Tableau 5 : Test d'antagonisme *in vitro* entre souches de *Fusarium* et *Trichoderma*

Souche : <i>Trichoderma-Fusarium</i>	Diamètre moyen des colonies en présence de <i>Trichoderma</i> (mm)	% d'inhibition
T1-F1	35.85	57.09
T1-F2	28.00	55.78
T2-F1	24.66	70.53
T2-F2	31.16	50.78
T3-F1	22.50	73.05
T3-F2	25.83	59.21
Témoin F1	83.50	
Témoin F2	63.33	

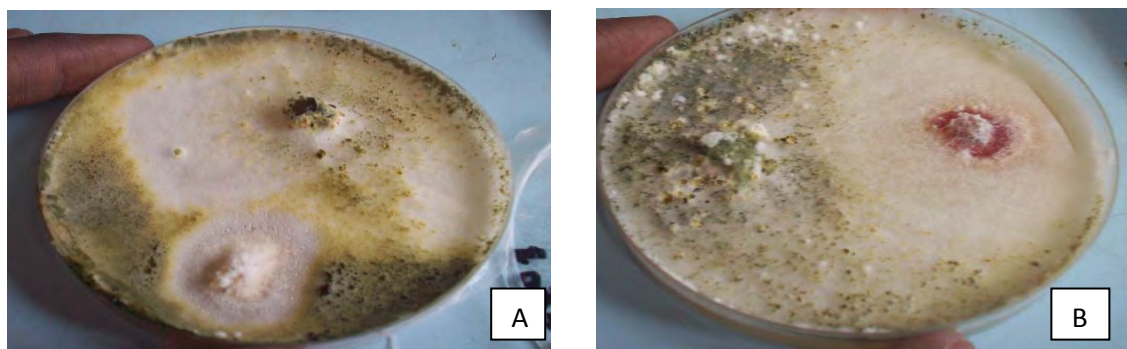


Figure 19a : Confrontation directe entre *Trichoderma* sp. souche T1 et souche de *Fusarium* F2 (A) et F1 (B)

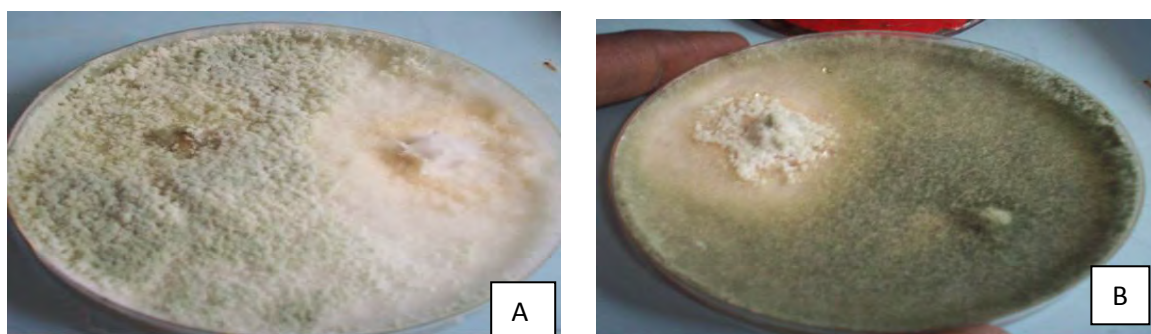


Figure 19b: Confrontation directe entre *Trichoderma* sp. souche T2 et souche de *Fusarium* F1 (A) et F2 (B)

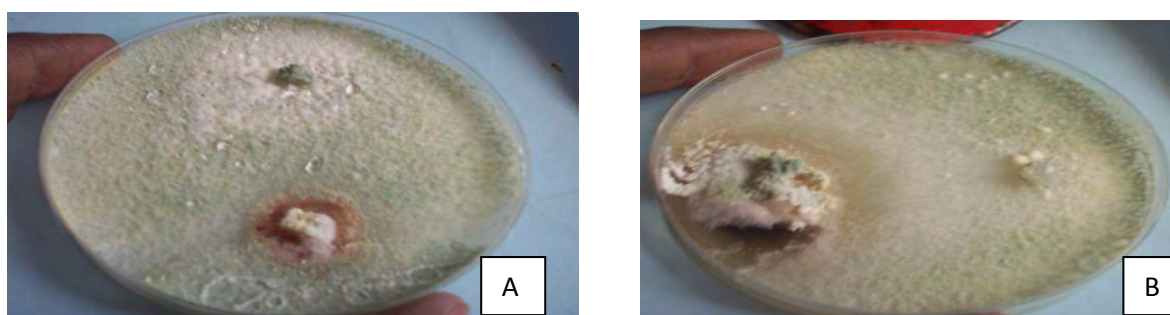


Figure 19c : Confrontation directe entre *Trichoderma* sp. souche T3 et souche de *Fusarium* F1 (A) et F2 (B)

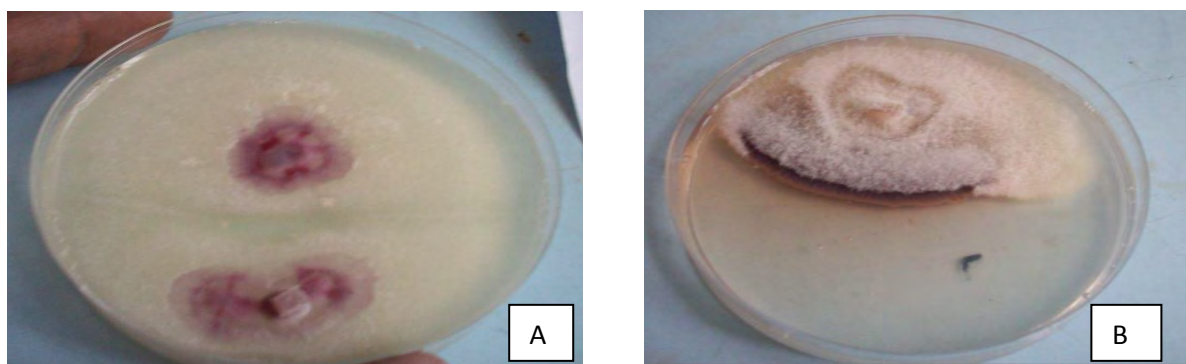


Figure 19d : Souches témoins de *Fusarium* sp. : F1 (A) et F2 (B)

3.2.Confrontation à distance

Les résultats obtenus de ce test (tableau6) montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches de *Fusarium* exercée par *Trichoderma sp.* comparativement aux témoins. Contrairement au test de confrontation directe (Figure 20), on remarque que l'inhibition de la croissance mycélienne des souches est moins importante pour le test de confrontation directe. Le taux d'inhibition obtenu montre que la souche T3 demeure toujours la plus efficace avec un pourcentage d'inhibition de 64.18% pour la souche F1 et 46.68% pour la souche F2. De même la souche F1 demeure aussi la souche la plus sensible avec un taux d'inhibition de plus de 50% par les souches T2 et T3. Toute fois aucune des souches de *Trichoderma* n'a inhibée à plus de 50% la souche F2. D'une manière générale on peut dire que les substances volatiles émises par ces souches de *Trichoderma* sont relativement faible ce qui traduit le faible pourcentage d'inhibition observé.

Tableau 6 : confrontation à distance entre souches de *Trichoderma* et de *Fusarium*

Souche : <i>Trichoderma-Fusarium</i>	Diamètre moyen des colonies en présence de <i>Trichoderma</i> (mm)	% d'inhibition
T1-F1	37.5	42.00
T1-F2	30.66	38.68
T2-F1	32.16	50.26
T2-F2	27	46.00
T3-F1	23.16	64.18
T3-F2	26.66	46.68
Témoin F1	64.66	
Témoin F2	50	



Figure 20a : Confrontation à distance entre T1 (B) et F2 (A)

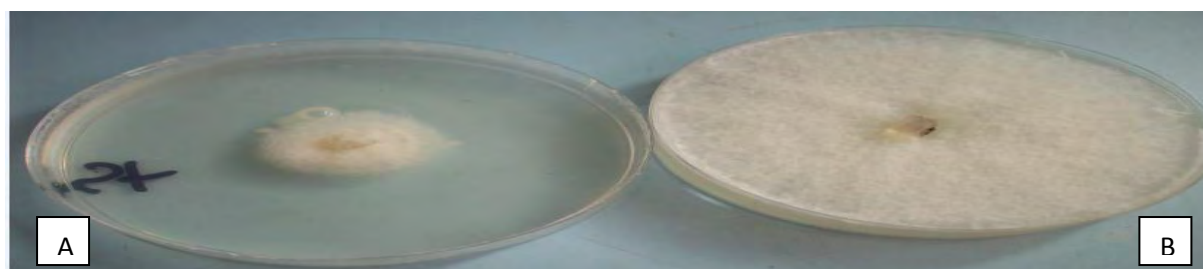


Figure 20b : Confrontation à distance entre T2 (B) et F2 (A)

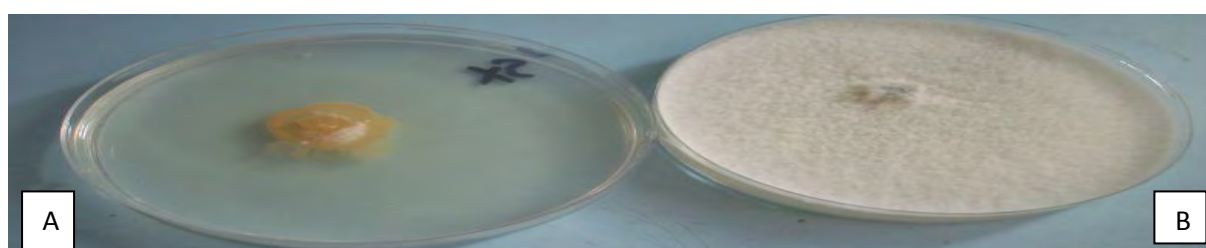


Figure 20c : Confrontation à distance entre T3 (B) et F1(A)

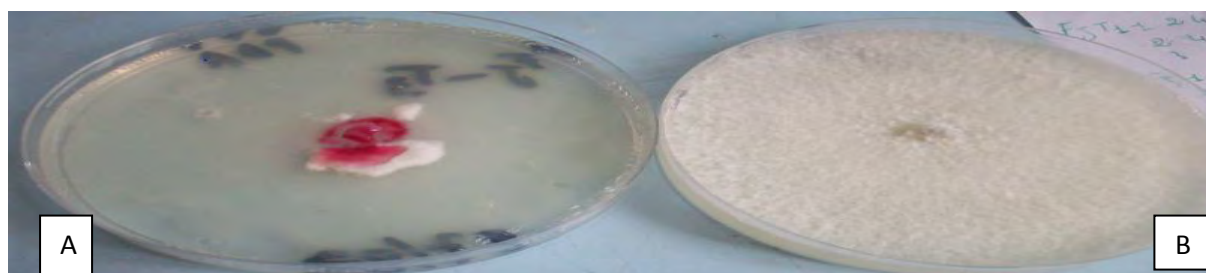


Figure 20d : Confrontation à distance entre T3 et F1

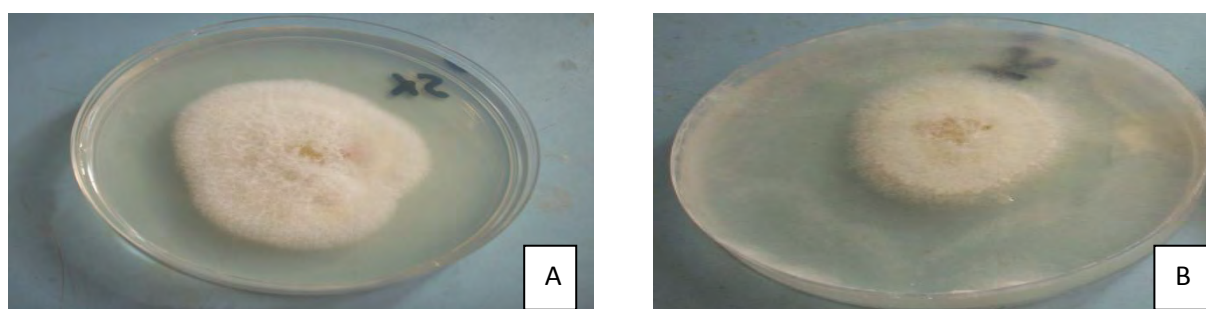


Figure 20e : Témoin F1 (A) et F 2 (B)

DISCUSSION

1. Isolement de *Trichoderma* sp.

Les résultats obtenus montrent que nos sols d'étude renferment des champignons imparfaits caractéristiques des *Trichoderma*. Ceci confirme le caractère ubiquiste décrit dans la littérature (Domsch et al., 1980, Danielson et al., 1973). Le nombre de souche isolé (trois) confirme l'influence des propriétés physico chimiques sur la biologie des *Trichoderma*. En effet, leur répartition et leur abondance varient en fonction des localisations géographiques, du type de sol, du mode d'utilisation des terres (Domsch et al., 1980, Danielson et al., 1973, Muya et al., 2005, Garbeva et al., 2004, Johnson et al., 1987) et des techniques et milieux d'isolement (Okoth et al., 2009). Hinde et al., 2009 ont montré que les *Trichoderma* sont plus abondant dans les milieux riches en matières organiques, à faible teneur en éléments nutritifs en particulier en phosphore et faiblement minéralisés.

L'observation des caractéristiques macroscopiques (colonies à croissance rapide sous forme de cercles concentriques réguliers, légèrement floconneuse ou compactées en touffes, à surface lisse, translucide ou blanc aqueux, couleurs variant du vert foncé au jaunâtre ou jaune) et microscopiques (mycélium constitué d'hyphes ramifiées à parois lisses et hyalines portant des conidiospores de formes pyramidales et des phialides en forme de flasques ou de quilles portant à leurs extrémités des phialospores de formes ellipsoïdales) confirme les caractéristiques typiques des *Trichoderma* décrits par Samuels et al., 2004. Ces caractéristiques taxonomiques sont aussi en accord avec celles obtenues par Bissett, 1984 ; Cournut, 1984).

2. Culture *in vitro* de *Trichoderma* sp.

Les différentes souches de *Trichoderma* sp. que nous avons isolées à partir de la rhizosphère de la tomate se développent facilement *in vitro*.; ce qui montre que les *Trichoderma* sont capable d'utiliser une large gamme de sources de carbone et d'azote pour stimuler leur croissance en accord avec les travaux de Papavizas, 1985. Cependant l'importance de la croissance des souches varie d'un milieu à un autre. Ainsi, la meilleure et plus importante croissance a été observée sur le milieu PDA. Donc le milieu naturel à base de pomme de terre se révèle être le milieu le plus adéquat pour la culture de *Trichoderma* vu les composés complexes qui le constituent par rapport aux milieux synthétiques (MEA, SB, DOX) qui sont moins favorable à la croissance des souches. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Azher et al., 2009 ; Moussaoui et al., 2010 ; Ubalua et al., 2007; Verma 2007 qui ont montré que les *Trichoderma* poussent sur le PDA que les autres milieux de culture.

Les résultats obtenus à partir de la recherche de la température optimale de développement des différentes souches montrent que les souches croient jusqu'à 35°C avec un optimum de croissance à 29°C. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Moussaoui *et al.*, 2010. Ceci confirme que les souches de *Trichoderma* présentent une grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques (Roquebert, 1996; Vining, 1990; Kubicek *et al.*, 2003).

Les résultats de l'effet des pH étudiés sur la croissance des souches de *Trichoderma sp.* ont montré que toutes les souches se sont bien développées et la formation de conidies a été observée aux différents pH. Cependant la meilleure croissance de chacune des souches a été observée au pH 5. Ces résultats sont confirmés par plusieurs chercheurs dont Moussaoui *et al.*, 2010 qui ont montré que les souches de *Trichoderma* peuvent croître à des pH allant de 1 à 9 mais leur pH optimum de croissance se situe entre 4.5 et 6.5.

Les résultats obtenus sur l'effet de différentes doses de sels sur la croissance et la conidiation de nos souches de *Trichoderma* montrent un ralentissement de la croissance et une suppression de la conidiation à des doses de sels supérieures à 3%. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature où il a été montré que des concentrations de sels de 5% entraînent un ralentissement de l'extension mycélienne, une sporulation réduite et une absence de coloration typique du recto des colonies de *Trichoderma*.

3. Tests d'antagonismes

Le taux d'inhibition des pathogènes observé dans les différentes confrontations montre que c'est la croissance importante des *Trichoderma* qui leur permet de se développer plus rapidement, de coloniser le milieu de culture et de mobiliser tous les éléments nutritifs à leur profit : c'est le phénomène de compétition (Alabouvette *et al.*, 1983; Davet, 1996). Ce phénomène réduit considérablement la croissance de l'agent pathogène. Cette inhibition de la croissance des souches peut être aussi due à la capacité des *Trichoderma* de produire des antibiotiques empêchant la croissance des pathogènes. Ce qui explique la présence des zones d'inhibition et l'arrêt de la croissance des *Fusarium*.

Dennis et Webster (1971) ont mis en évidence des antibiotiques sécrétés par les *Trichoderma*, solubles dans le chloroforme et extractibles à partir du milieu de culture qui permettent une inhibition à distance de la croissance des pathogènes.

D'après Comporata (1985), ce phénomène d'inhibition est dû à l'action des enzymes (β 1-3) gluconase- chitinase qui conduisent à la lyse du mycélium du parasite. L'envahissement des souches de *Fusarium sp.* par *Trichoderma* et la sporulation très abondante de

ce dernier traduit son pouvoir hautement mycoparasitaire (Benhamou, Chet, 1996; 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 entre une souche de *Trichoderma* et un autre champignon tellurique *Pythium ultimum* et ce au bout de quatre à cinq jours après l'inoculation.

Des observations microscopiques réalisées par Hibar et *al.*, 2005 au niveau de la zone de contact entre *T. harzianum* et *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, montrent une modification profonde au niveau du mycélium du pathogène se marquant par une lyse importante, une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium de *T. harzianum* sur celui de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*..

MESLOUHI (1989), DAVET (1983a et 1983b) ont montré que l'action inhibitrice observée avec les tests de confrontation à distance est due à des substances de nature chimique libérées par les souches de *Trichoderma* (phénomène d'antibiose). La capacité à produire de telles substances varie selon les isolats d'une même espèce ou d'espèce différente. D'après DENNIS et WEBSTERS (1971), les *Trichoderma* émettent des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine présents sous formes des substances volatiles importantes

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude ont montré que les *Trichoderma* sont aussi présents dans la rhizosphère de nos sols. Ainsi trois souches différentes de *Trichoderma* ont pu être isolées.

L'effet des milieux de cultures sur la croissance montre que les souches sont capables d'utiliser une large gamme de substrats pour leur croissance. Cependant le milieu PDA est plus adéquat pour la culture des souches. Concernant la recherche de la température optimale de croissance des différentes souches que nous avons isolées, les résultats obtenus montrent que la meilleure croissance a été obtenue à 29°C. Une inhibition de la croissance a été aussi observée à 0°C. L'incubation à la température de 40°C a entraîné une destruction du mycélium des souches.

Les pH basique à neutre (pH 5 et pH 7) permettent une meilleure croissance des souches de *Trichoderma* dans les différents milieux testés

L'étude de différentes doses de sel sur la croissance des souches révèle que les *Trichoderma* sont capables de supporter des doses de sels allant jusqu'à 3%. Au delà de ce taux, une nette diminution de la croissance est observée.

Cette étude a aussi montré l'effet antagoniste des trois souches de *Trichoderma* sur les isolats de *Fusarium sp.* responsable de la pourriture des racines et du collet chez la tomate.

En effet, les essais de confrontation directe et à distance sur milieu PDA ont révélé une inhibition de la croissance et de la sporulation du pathogène. S'il y'a contact entre les souches de *Trichoderma* et ceux du pathogène, les colonies de *Trichoderma* envahissent celles du parasite. La confrontation directe sur milieu de culture a montré aussi un arrêt de la croissance du mycélium et une réduction de la sporulation en bordure de la zone d'inhibition impliquant la sécrétion de substances antibiotiques diffusant dans le milieu de culture. Les 3 souches de *Trichoderma* testées se sont donc toutes révélées actives vis-à-vis du pathogène par l'inhibition de sa sporulation et de sa croissance mycélienne.

Pour compléter ce travail il serait intéressant de faire :

- ✓ des tests *in vitro* et au champ sur un nombre plus important de champignons pathogènes ;
- ✓ des tests sur différents substrats pour la production d'inoculum à base de *Trichoderma* utilisable par les agriculteurs ;
- ✓ des études sur les interactions entre les *Trichoderma* et les autres microorganismes d'intérêt agronomique comme les champignons mycorhiziens et les bactéries fixatrices d'azote dans différentes conditions de culture ;

- ✓ des analyses des composés secrétés par les *Trichoderma* efficaces dans la lutte biologique ;
- ✓ des isollements de *Trichoderma* dans d'autres zones agro écologiques du Sénégal ;
- ✓ des caractérisations morphogénétiques des différentes souches afin de définir leurs relations phylogénétiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed, I., Bissett, J. & Malloch, D.** (1995). Effect of phosphinothricin on nitrogen metabolism of *Trichoderma* species and its implications for their control of phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 53 : 49-59
- Ahouangninou Claude, Fayomi E. Benjamin, Martin Thibaud** (2011). Évaluation des risques sanitaires et environnementaux des pratiques phytosanitaires des producteurs maraîchers dans la commune rurale de Tori-Bossito (Sud-Bénin). *Cah Agric Volume 20, Numéro 3*, 216-22
- ALABOUVETTE C., COUTEAUDIER Y. ET LOUVET J.,** (1983). Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes, pp 7-16. XXIV. Colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).
- Attitalla Hamad Idress , Abdelrawaf S. Suliman , Omar Saeed Khawil , El-Komy M.A.Hand Muhammed Sarwar** (2012). Occurrence and Microbiological characteristic of *Trichoderma* in Al-Jabal Al –Akhdar Region , Libya. *Journal of Biological Sciences* 12 (4). pp. 209-2017
- Azher Mustafa, M. Aslam Khan, M. Inam-ul-Haq, *M. Aslam Pervez and Ummad-ud-Din Umar** (2009). *usefulness of different culture media for in-vitro evaluation of trichoderma spp. against seed-borne fungi of economic importance* *Pak. J. Phytopathol.*, Vol. 21(1): 83-88.
- 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.
- Bissett, J. .** (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. L. Section *Longibrachiatum* Can. J. Bot., 62 : 924-931.
- Bissett, J.**(2004). Commentaires de l'adresse internet suivante : [http ://www. Medicalglossary .org/fungi_ mitosporic _ fungi_ definitions.html](http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html).
- BISSETT, J.** (1991) A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. (a) Can. J. Bot., 69 : 2373-2417
- BISSETT, J.** (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. (b) Can. J. Bot., 1991, 69 : 2357-2372
- Botton ;Breton,A ;Fevre,M ;Guy,PH ;Larpeni,J ;P ;Veau.**(1990) .Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle.2°Edition Massan,Paris,New york, Million, Barcelone, Mixico,Saopawlo.

- Caron J., Laverdière L., Thibodeau O.P. et Bélanger R.R.**(2002). Utilisation d'une souche indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez le concombre et la tomate de serre au Québec. *PHYTOPROTECTION* 83 : 73-87
- Caron J., Laverdière J., Venne J., Bélanger R.R.** (2006). Recherche et développement de bio pesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les organismes non ciblés et respectueux de l'environnement – Rapport final – Volet Phytopathologie
- Chang, Y.C., R. Baker, O. Kleifeld et I. Chet.**(1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma Harzianum*. *Plant Disease*, 70: 145-148.
- Cissé I, Tandia AA, Fall ST, Diop EHS.** (2003). Usage incontrôlé des pesticides en agriculture périurbaine : cas de la zone de Niayes au Sénégal. *Cah Agric* 12 : 181-
- COMPORATA** ,(1985). « Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma spp* vis à vis de *Rhizoctinia solani*, pp. 613-620. INRA Paris (FR),.
- Cournut. B.** (1984).Le genre *Trichoderma hyphomycètes*. Th. : Pharmacie : Marseille; 77 p.-56
- 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, p. 167–186
- Danielson, R. M. , Davey, C. B.** (1973).The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. *Soil Bioi. Biochem.* 5:485- 94
- DAVET P.,** (1996). Vie microbienne du sol et production végétale, 383 p. INRA, Paris (FR).
- Davet, P.** (1979). Activite antagoniste et sensibilite aux pesticides de quelques champignons associes aux sclerotes du *Sclerotinia minor* Jagger. *Ann. Phytopathol.* 11 :53-60
- DAVET P.** (1983A). Les *Trichoderma*, exemple de champignon antagoniste d'agent pathogènes. Faune et flore auxiliaire en agriculture,pp. 193-204. ACTA, INRA- ENSAM- Montpellier (FR).
- DAVET P.,** (1983B). 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- ENSAMMontpellier (FR).
- 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.
- Domsch, K. H. , Gams, W., Anderson, T. H.** (1980). *Compendium of Soil Fungi*, Vol. 1 . London: Academic. 859 pp.

- Druzhinina S. Irina, Kopchinskiy G. Alexei, Komoj Minika, Bissett John, Szakacs George, Kubicek P. Christian**(2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology* 42 , 813–828
- Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Henis.** (1982). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology* 73: 85-88.
- GAMS, W. & BISSETT, J.**(1998) Morphology and identification of *Trichoderma* sp. *Trichoderma & Gliocladium*, Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Londres : KUBICEK, C.P. ; HARMAN, G.E. & ONDIK, K.L., CRC Press, 1998, pp. 3-34, 300 p.
- Garbeva P, van Veen, and van Elsas, J.D.** (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review Phytopathology*. 42: 243 – 270
- Genilloud, o. ; pelaez, f. ; gonzalez, i. & diez, m.t.** (1994) Diversity on actinomycetes and seaweeds from the Iberian coasts. *Microbiologia*, 10. P : 413-422
- Georghiou GH.** (1986) The magnitude of the resistance problem. In : National Research Council, ed. *Pesticide resistance - strategies and tactics for management*. Washington : Nat Acad Press, 1986 : 14-43.
- Haran, S., H. Schickler et I. Chet.** (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 2321-2331.
- Harman G.E.** (2001). Microbial tools to improve crop performance and profitability and to control plant diseases. Dans : *Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Diseases for the New Century: Mode of Action and Application Technology*. Tzeng, D.D.S. et J.W. Huang (éds). Taichung City, Taiwan, National Chung Hsing University, pp 71–84
- Harman, G.E.** (1992). Development and benefits of rhizosphere competent fungi for biological control of plant pathogens. *J. Plant Nut.* 15:835-843.
- Harman, G.E.** 2000. Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84 : 377-393
- Harman, G.E., R. Petzoldt, A. Comis et J. Chen.** (2004). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94: 147-153.
- Hibar Khaled , Daami-Remadi Mejda, Khiareddine Haifa, El Mahjoub Mohamed** (2005). Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium*

oxysporum f. sp. *Radiciislycopersici* *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9 (3), p. 163–171
Hileman B.(1994). Environmental Estrogens linked to Reproductive Abnormalities, *Cancer Chem. Eng. News*, 1994, 72 (5), pp 19–23

Hinde BOUDOUDOU, Rachida HASSIKOU, Amina OUAZZANI TOUHAMI, Alain BADOUC, Allal DOUIRA (2009).paramètres physicochimiques et flore fongique des sols de rizières marocaines *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*., **148**, 17-44
Hmouni A., Hajlaoui MR., Mlaiki A. (1996). Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO Bull.* 26, p. 697–705

Johnson, L. F., Bernard, E. C., and Quian, P. (1987). Isolation of *Trichoderma* spp. at low temperatures from Tennessee and Alaska soils. *Plant Disease* 71: 137-140
KEBE Ismaël B., MPIKA Joseph , N’GUESSAN F. Kouamé , HEBBAR K. Prakash , Gary S. SAMUELS & Severin AKE (2009). Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d’Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sciences & Nature Vol.6 N°1*: 71 - 82

Kubicek, C.P. ; Bissett, J. ; Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C. and Szakacs, G., (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biology*, 38 (3) : 310-319

Landreau, A. (2001). Métabolites d’une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Th. : Pharmacie : Nantes : 201 p.

Leuchtman, A. ; Petrini, O. & Samuels, G.(1996). Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia*, 88 (3) : 384-394

Lewis, J.A., and G.C. Papavizas. (1987). Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for controls of *Rhizoctonia solani* damping-off. *Plant Pathol.* 36: 438-446.
Lindsey, D. et R. Baker. (1967). Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 338: 1262-1263.

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)

Mohamed-benkada Mustapha. (2006). Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Th. : Pharmacie : Nantes : 9,10,11,12,13,p.

MOURIA Btissam, TOUHAMOUAZZANI Amina , BADOCA Alain , DOUIRA Allal . (2005) effet de diverses farines sur la compétitivité des inoculums de trois souches de *trichoderma* vis-à-vis des champignons phytopathogènes du sol *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 144, 211-224

Mouria Btissam , Ouazzani-Touhami Amina et Douira Allal. (2007). Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. *Phytoprotection*, vol. 88, n° 3, p. 103-110.

Muya E.M., Gicheru, P.T. and Kariuki, C.N. (2005). The current state of land degradation in SLM sites, Taita Taveta, District. Published by Kenya Soil Survey. Miscellaneous Paper No. M68. Kenya

Ndiaye Fatima, (2007). Etude de la solubilité et de la mobilité des ions phosphates à l'interface solide-solution et détermination de leur biodisponibilité au niveau de sols du Sénégal. Rapport de Stage

Okoth, Shella A. ; Okoth, P. ; Wachira, P.M.;Roimen, H. (2009). Spatial distribution of *Trichoderma spp.* In Embu and Taita regions, Kenya. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, vol. 11, Num. 2, pp.291-302

Papavizas, G. C . (1985). *trichoderma* and gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1985. 23:23-54

Papavizas, G. C . , Lewis, J. A. (1983). Physiological and biocontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. *Phytopathology* 73:407- 1 1

Pivkin, M. V.(2000). Filamentous fungi associated with holoturians from the Sea of Japan, off the Primorye coast of Russia. *Biol. Bull.*, 198 (1) : 101-109

Rapilly F., (1968). Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyt.*, 101 p. Bruxelles.

- RIFAI, M.A.**(1969) A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. Papers, 116 : 1-56
- Rifai, M.A.**(1969).A revision of the genus *Trichoderma*.Mycologia.Papers, 116 :120-
- Rifai, M.A.**(2004). Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* .Paris.pp55-56-58.
- Roquebert, M.-F** (1996) . Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. Compte-rendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, p. 13-15
- Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E.B.**(2013). *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved April 11, 2013, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm
- Sandgren, M.; Stahlberg, J. & Mitchinson, C. .**, (2005) Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. Prog. Biophys. Mol. Bio, 89 : 246-291
- Shah Shaiesta, Nasreen Sahera Nasera and P.A. Sheikh** (2012). Cultural and morphological characterization of *Trichoderma spp.* Associated with green Mold disease of pleurotus spp. in Kashmir. Research journal of Microbiology 7 (2): 139-144, 2012
- Singh, A., S. Srivastava et H.B. Singh.** (2007). Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. Bioresource Technology, 98: 470-473.
- Sugiyama, J. ,** (1987) Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications. Tokyo: Elsevier, pp. 29-56, 325 p.
- Tondje P.R. , Roberts D.P. , Bon M.C. , Widmer T., Samuels J.G. , Ismaiel A. , Begoude D.A. , TchanaT. , Nyemb-Tshomb E. , Ndoumbe-Nkeng M. , Bateman R. , Fontem D. , Hebbar P.K.** (2007) . Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. Biological control 43. P. 202-212
- Traoré SK, Mamadou K, Dembele A, Lafrance P, Mazelliert P, Houenou P,** (2006). Contamination de l'eau souterraine par les pesticides en régions agricoles en Côte-d'Ivoire (centre, Sud et Sud Ouest). *Journal Africain des Sciences de l'Environnement* 1 : 1-9
- Ubalua, A.O. et E. Oti.** (2007). Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post harvest cassava root rot pathogens. African Journal of Biotechnology, 6: 2447-2450.
- Verma, M.** (2007). Developpement d'un processus d'obtention d'agents biologiques à base

de *Trichoderma SPP* en utilisant des eaux usées ou des boues d'épuration comme substrats de fermentation. Thèse de doctorat, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada, 424 p.

Vining, L.C. (1990). Fonctions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44 : 395-427.

Vizcaino, J.A. ; Sanz, L. ; Cardoza, R.E. ; Monte, E. & Gutierrez, S. ., (2005). Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. *FEMS Microb. Lett.*, 244 : 139–148.

Voet, D. & Voet, J.G., (1998) , *Biochimie*, Paris Paris, Bruxelles : DeBoeck Université, pp. 56-69, 1360

Weindling, R. et H. Emerson. (1936). the isolation of toxic substance from the culture filtrates of *Trichoderma*. *Phytopathology*, 26: 1068-1070.

Wells, H. D . • Bell. D. K . • Jaworski. C. A . (1972). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 62:442-47

ANNEXES

Composition des milieux de culture

Milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Eléments	Concentration (g/l)
Pomme de terre	200
Eau distillée 500 ml	
Chauffage et filtration : le filtrat +.	
Glucose	20
Agar	15

pH 6 avant autoclavage

Milieu Malt Extract Agar (MEA)

Eléments	Concentrations (g/l)
Extrait de Malt	20
Glucose	5
Agar	15

pH 6 avant autoclavage

Milieu Czapek Dox (DOX)

Eléments	Concentrations (g/l)
NaNO ₃	10
KCl	0.5
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0.5
KH ₂ PO ₄	1
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.001
Saccharose	30
agar	15

pH 6 avant autoclavage

Milieu Sabouraud (SB)

Eléments	Concentrations (g/l)
Peptone	10
Glucose	20
Agar	15

pH 6 avant autoclavage

Milieu Malt Agar 2% (MA2)

Eléments	Concentrations (g/l)
Malt	20
Agar	20

PH 6 avant autoclavage