



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

N° d'ordre :

N° de série :

Thèse

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat sciences
En Biotechnologie, Biologie et Environnement / Option : Bioprocédés et
Biotechnologies, Applications Mycologique.

Par : ALMI Hiba.

Thème

*Etude des myco-pathogènes de *Lens culinaris* et évaluation de
l'effet de deux souches de *Trichoderma harzianum* : cas de la
Fusariose et de la *Cylindrosporiose*.*

Jury d'évaluation :

Président de jury : Mr. KACEM CHAOUCHE N.
Directeur de thèse : Mr. DEHIMAT L.

Prof. Univ. Frères Mentouri, Constantine.
Prof. Univ. Frères Mentouri, Constantine.

Examineurs : Mr. YAHIA A.
Mr. GUECHI A.
Mr. HAMIDCHI M. A.
Mr. OUFEROUKH A.

Prof. Centre Universitaire Mila.
Prof. Univ. Ferhat Abbas, Sétif.
Prof. Univ. Frères Mentouri, Constantine.
Directeur INRA, Constantine.

Année universitaire : 2015-2016

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ;

La lumière qui a toujours éclaircie ma vie, Ma Mère ;

Que le bon dieu de protège et te garde, Mon Père ;

Les princesses qui mon toujours soutenus ; Sonia et Lamia

Mes Frères Mohamed Ali et Abdelkahare ; Merci pour tous.

Mes trésors, mon neveu et mes nièces la source de mon bonheur Djad, Ines et Maya.

Mes beau Frères et sœur, Hakim, Aissa et Amira, Merci pour vos encouragements.

A tous ceux qui m'ont encouragé, soutenus et supporté pour que ce travail puisse s'accomplir



Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance à mon Dieu, que ta volonté soit faite. Tu as été ma lumière, mon guide et mon secours. Tu n'as cessé de me montrer le bon chemin, le chemin de la vérité, du travail et de la réussite. Que ce travail honore et glorifie ton nom.

*Je voudrais aussi par ces lignes, exprimer ma reconnaissance envers mon directeur de recherche, **Pr. DEHIMAT L.**, pour son encadrement, sa disponibilité mais surtout ses encouragements quel qu'ils soient sur le plan professionnel ou bien personnel.*

*J'aimerais bien souligner l'implication du **Pr. KACEM CHAOUCHE N.** qui, malgré ces multiples occupations, ces conseils et critiques apportés ont considérablement amélioré la réussite des travaux de recherche entrepris.*

*Je remercie également les membres de jury pour avoir aimablement accepté d'examiner ce travail, et pour les judicieux conseils qu'ils m'ont gracieusement offerts, chacun dans sa discipline : **Mr. YAHIA A.**, **Mr. GUECHI A.** et **Mr. HAMIDCHI M^{ed} A.***

*Je remercie gracieusement profondément **Mr. OUFROUKH A.** (INRA -Constantine-), pour son soutiens, sa gentillesse mais surtout son aide apporté durant la rédaction de ce travail.*

*De nombreuses personnes m'ont aidée ou encouragée pendant la réalisation de cette thèse. Un grand merci à **Mr. BENJOUDI A.** (Ministère d'agriculture Algérienne), **Mr. BOUZNAD Z.** (Professeur INA -Alger-), **Mr. BENLBJAOUI M.** (Société Axium -Constantine-), **Mr. NASSRAOUI B.** et **Mr SASSI K.** (INAT -Tunisie-).*

*Ma profonde reconnaissance s'oriente à **Mr. THONART P.** et **Mr. SABRI A.** (Université Liège -Belgique-) pour l'accueil et les orientations, qui m'ont apporté le support technique nécessaire à la réalisation d'une importante partie de mes expériences.*

En fin, un grand merci pour tous ce qui a contribué de prêt ou de loin à la réussite de ce travail.

Table des matières

- Dédicaces
- Remerciements
- Liste des abréviations
- Liste des figures
- Liste des tableaux

1- Introduction 1

| | |
|---|----------|
| 2- Revue bibliographique..... | 4 |
| 2.1. La plante hôte : La lentille (<i>Lens culinaris</i>)..... | 4 |
| 2.1.1. Origine et historique..... | 4 |
| 2.1.2. Données botaniques et génétiques..... | 4 |
| 2.1.3. Classification et taxonomie..... | 7 |
| 2.1.4. Cycle biologique de <i>Lens culinaris</i> | 7 |
| 2.1.5. Caractéristiques écologiques et agronomiques..... | 8 |
| 2.1.6. Multiplication, plantation et récolte..... | 9 |
| 2.1.7. Distribution et usages..... | 10 |
| 2.1.8. Intérêt nutritionne..... | 11 |
| 2.1.9. Situation de la culture de la lentille et son importance en Algérie..... | 12 |
| 2.1.10. Les stress Biotiques ou principaux problèmes phytosanitaires de la lentille en Algérie..... | 13 |
| 2.2. Les maladies étudiées : <i>Cylindrosporium sp</i> et <i>Fusarium solani</i> | 14 |
| 2.2.1. Généralités sur les mycètes..... | 14 |
| 2.2.2. Conditions de développement des mycètes..... | 15 |
| 2.2.3. <i>Cylindrosporium sp</i> | 16 |
| 2.2.3.1. Généralités..... | 16 |
| 2.2.3.2. Taxonomie..... | 17 |
| 2.2.3.3. Cycle infectieux..... | 18 |
| 2.2.4. <i>Fusarium solani</i> | 18 |
| 2.2.4.1. Généralités..... | 18 |
| 2.2.4.2. Taxonomie..... | 20 |
| 2.2.4.3. Cycle infectieux..... | 21 |
| 2.3. Interaction agent pathogène/ <i>Lens culinaris</i> | 22 |
| 2.3.1. La reconnaissance..... | 23 |
| 2.3.2. La transduction des signaux..... | 24 |
| 2.3.3. Les réponses de défenses..... | 24 |
| 2.4. Le sol..... | 25 |
| 2.4.1. Généralités sur le sol..... | 25 |
| 2.4.2. Propriétés physico-chimiques..... | 25 |
| 2.4.3. Propriétés microbiologiques..... | 26 |
| 2.5. Les antagonistes..... | 27 |
| 2.5.1. Généralités..... | 27 |
| 2.5.2. <i>Trichoderma harzianum</i> | 27 |
| 2.5.2.1. Généralités..... | 27 |
| 2.5.2.2. Morphologie..... | 28 |
| 2.4.5.3. Taxonomie..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5.2.4. Cycle biologique | 30 |
| 2.5.2.5. Mode d'action | 30 |
| 2.5.2.5.1. Antibiose | 30 |
| 2.5.2.5.1. Mycoparasitisme | 31 |
| 2.5.2.5.3. Complétion | 32 |
| 2.5.2.5.4. Induction de la résistance systémique | 33 |
| 2.5.2.6. Les fongicides du groupe Trichoderma | 34 |
| 2.6. Les fermentations | 35 |
| 2.6.1. La fermentation liquide | 35 |
| 2.6.1.1. Généralités | 35 |
| 2.6.1.2. Les paramètres influençant la FL | 36 |
| 2.6.1.3. Déroulement de la FL | 36 |
| 2.6.2. La fermentation sur milieu solide | 37 |
| 2.6.2.1. Généralités | 37 |
| 2.6.2.2. Les différents supports/ substrats de la FMS | 38 |
| 2.6.2.3. Les paramètres de la FMS | 39 |
| 2.6.2.3.1. L'activité de l'eau et l'humidité | 39 |
| 2.6.2.3.2. L'aération | 39 |
| 2.6.2.3.3. La température | 40 |
| 2.6.2.3.4. Le pH | 40 |
| 2.6.2.3.5. Les applications de la FMS | 40 |
| | |
| 3. Matériel et méthodes | 42 |
| 3.1. Matériel | 42 |
| 3.1.2. Microorganismes utilisés | 43 |
| 3.1.2.1. Les souches pathogènes | 43 |
| 3.1.2.2. Les souches antagonistes | 44 |
| 3.1.3. Les milieux de culture utilisés | 44 |
| 3.1.3.1. Les milieux d'isolement | 44 |
| 3.1.3.2. Les milieux de purification | 44 |
| 3.1.3.3. Les milieux pour étude de la compétition | 44 |
| 3.1.3.4. Les milieux de fermentation | 44 |
| 3.1.4. Solutions utilisés | 45 |
| 3.1.4.1. Solution d'identification | 45 |
| 3.1.4.2. Solution de récupération des spores (SRS) | 45 |
| 3.1.4.3. Solution nutritive des plantes | 45 |
| 3.2. Méthodes | 45 |
| 3.2.1. Méthodes d'échantillonnage | 45 |
| 3.2.1.1. Echantillonnage des Plantes | 45 |
| 3.2.1.2. Echantillonnage du Sol | 45 |
| 3.2.2. Méthodes d'isolement | 46 |
| 3.2.2.1. Isolement des Plantes | 46 |
| 3.2.2.2. Isolement du Sol | 47 |
| 3.2.3. Méthodes purification | 48 |
| 3.2.4. Méthodes d'identification | 48 |
| 3.2.4.1. Identification macroscopique | 48 |
| 3.2.4.2. Identification microscopique | 48 |
| 3.2.4.3. Identification moléculaire des souches antagonistes utilisées | 48 |
| 3.2.5. Méthodes de conservation | 49 |

| | |
|--|----|
| 3.2.5.1. Conservation de courte durée..... | 49 |
| 3.2.5.2. Conservation de longue durée..... | 49 |
| 3.2.6. Analyse Physico-chimique..... | 49 |
| 3.2.6.1. Dosage de l'Azote..... | 50 |
| 3.2.6.2. Dosage du Carbone et de la matière organique..... | 50 |
| 3.2.6.3. Conductivité électrique..... | 51 |
| 3.2.6.4. pH..... | 51 |
| 3.2.7. Les tests d'antagonisme..... | 52 |
| 3.2.7.1. Méthode de confrontation directe..... | 52 |
| 3.2.7.1.1. Principe..... | 52 |
| 3.2.7.1.2. Evaluation du pourcentage d'inhibition..... | 52 |
| 3.2.7.2. Méthode de confrontation indirecte..... | 53 |
| 3.2.7.2.1. Principe..... | 53 |
| 3.2.7.2.2. Evaluation du pourcentage d'inhibition..... | 53 |
| 3.2.8. Etude de la compétition pour le Glucose..... | 53 |
| 3.2.8.1. Principe..... | 53 |
| 3.2.8.2. Evaluation de la germination..... | 56 |
| 3.2.9. Méthodes de fermentation (production des spores)..... | 56 |
| 3.2.9.1. Principe et concept générale de la production..... | 56 |
| 3.2.9.2. Fermentation liquide..... | 56 |
| 3.2.9.2.1. Optimisation de la fermentation..... | 56 |
| 3.2.9.2.2. Préparation de l'inoculum et la pré-culture..... | 58 |
| 3.2.9.2.3. Conditions de fermentation..... | 58 |
| 3.2.9.2.4. Paramètres de contrôles..... | 59 |
| 3.2.9.3. Fermentation sur support solide..... | 60 |
| 3.2.9.3.1. Préparation du Son du Blé..... | 60 |
| 3.2.9.3.2. Préparation de l'inoculum et inoculation..... | 60 |
| 3.2.9.3.3. Paramètres de contrôles..... | 61 |
| 3.2.9.3.4. Purification des spores..... | 61 |
| 3.2.10. Evaluation de l'effet des produits obtenus..... | 62 |
| 3.2.10.1. Culture en terreau des lentilles..... | 62 |
| 3.2.10.2. Evaluation de la maladie..... | 63 |
| 3.2.10.3. Evaluation des paramètres physiologiques..... | 63 |
| 3.2.10.4. Evaluation des paramètres chimiques..... | 64 |
| | |
| 4. Résultats et interprétation..... | 67 |
| 4.1. Prospections et observations..... | 67 |
| 4.2. Isolements..... | 68 |
| 4.2.1. Isolement des mycètes à partir des plantes infectées..... | 68 |
| 4.2.2. Isolement des mycètes à partir du sol..... | 71 |
| 4.3. Relevés climatiques..... | 74 |
| 4.4. Analyses physico-chimiques..... | 75 |
| 4.5. Les tests d'antagonismes..... | 75 |
| 4.5.1. Les champignons pathogènes et antagonistes..... | 75 |
| 4.5.1.1. Les souches pathogènes..... | 75 |
| 4.5.1.2. Les souches antagonistes..... | 77 |
| 4.5.2. Les confrontations..... | 79 |
| 4.6. Etude de la compétition pour le glucose..... | 83 |
| 4.7. Les fermentations (production des spores)..... | 85 |

| | |
|--|-----|
| 4.7.1. Fermentation liquide | 85 |
| 4.7.1.1. Optimisation de la fermentation | 85 |
| 4.7.1.2. Les paramètres de contrôle | 90 |
| 4.7.2. Fermentation sur support solide | 93 |
| 4.7.2.1. Mesure et suivie du Poids | 93 |
| 4.7.2.2. Mesure et suivie de l'humidité..... | 94 |
| 4.7.2.3. Quantification des spores | 95 |
| 4.7.3. Purification des spores | 95 |
| 4.8. Evaluation de l'effet des produits obtenus..... | 96 |
| 4.8.1. Evaluation de la maladie | 96 |
| 4.8.2. Evaluation des paramètres physiologiques..... | 99 |
| 4.8.2.1. Teneur relative en Eau | 99 |
| 4.8.2.2. Teneur en Chlorophylle | 99 |
| 4.8.3. Evaluation des paramètres chimiques | 100 |
| 4.8.3.1. Teneur en Proline | 100 |
| 4.8.3.2. Teneur en sucres solubles | 101 |
| | |
| 5. Discussion | 102 |
| | |
| 6. Conclusion et perspectives | 115 |
| | |
| 7. Références bibliographique | 117 |

Résumé

Abstract

ملخص

Annexes

Liste des Abréviations :

BCAs: Biological Control Agents.

C/N: Carbone/ Azote.

C : Celsius.

CE : Conductivité électrique.

cm : Centimètre.

CO : Carbone organique.

Czp : Czapeck-Dox.

DO : Densité optique.

F : Feuille.

FL : Fermentation liquide.

FMS : Fermentation sur milieu solide.

g : Gramme.

h : Heure.

Km : Kilomètre.

KM : Kohlmeyer medium.

L : Litre.

min : Minute.

mL : Millilitre.

mm : Millimètre.

MO : Matière organique.

MS : Musharing et Skong.

nm : Nanomètre.

PDA : Potato dextrose agar.

pH : Point hydrogène.

R : Racine.

rpm : Rotation par minute.

Sab : Sabouraud.

SRS : Solution de récupération de spores.

T : Tige.

UFC : Union formant colonie.

V : volume.

Liste des Figures :

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Morphologie d'une plante de lentille : (1) Plante, (2) Feuilles, (3) Gousse, (4) Graine..... | 5 |
| Figure 2 : Cycle biologique de lentilles : (1) Graine, (2) Germination, (3) Croissance, (4) Floraison, (5) Fructification..... | 8 |
| Figure 3 : Zones d'aptitude de la culture de la lentille en Algérie (ITGC, 2013)..... | 12 |
| Figure 4 : Symptôme de la Cylindrosporiose sur tige de lentille (A) et agent pathogène responsable de maladie (B)..... | 16 |
| Figure 5 : Caractères morphologiques de <i>Cylindrosporium sp</i> : A et B : symptômes sur feuilles, C : pénétration du pathogènes dans le tissus de plante et D : macroconidies..... | 17 |
| Figure 6 : Cycle infectieux de <i>Cylindrosporium sp</i> | 18 |
| Figure 7 : La fusariose de lentille (A) et l'agent pathogène responsable de maladie (B) (Chabasse et al., 2002)..... | 19 |
| Figure 8 : Caractères morphologiques de <i>Fusarium solani</i> : a : conidiophores avec monophialides ; b : chlamydospores ; c: micro et macroconidies (Debourgogne, 2013)..... | 20 |
| Figure 9 : Cycle infectieux de <i>Fusarium Solani</i> (Agris, 1997)..... | 21 |
| Figure 10 : Illustration schématique des réactions de défense induites lors d'interactions plante/agent pathogène ou éliciteur/plante (Desender et al., 2007)..... | 22 |
| Figure 11 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Trichoderma harzianum</i> | 28 |
| Figure 12 : Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma harzianum</i> (Samuels et al., 1994)..... | 29 |
| Figure 13 : Quelques molécules bioactives en antibiose secrété par <i>Trichoderma harzianum</i> ; 1 : 6PP ; 2 : Harzianopyridone ; 3 : Koninginins A ; 4 : acide Harziamique ; 5 : Hazrianolide..... | 31 |
| Figure 14 : Mécanisme de mycoparasitisme exercé par les souches de <i>Trichoderma</i> (Irina et al., 2001)..... | 32 |
| Figure 15 : Les mécanismes d'induction de la résistance systémique par les souches de <i>Trichoderma</i> (Irina et al., 2001)..... | 34 |
| Figure 16 : Les différents paramètres régulés automatiquement à l'intérieur d'un fermenteur..... | 36 |
| Figure 17 : Courbe de croissance durant une fermentation standard..... | 37 |
| Figure 18 : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS (Rahardjo et al., 2006)..... | 38 |
| Figure 19 : Localité des sites d'étude : Ain Semara et El Baâraouia..... | 43 |
| Figure 20 : Méthode de suspension dilution..... | 47 |
| Figure 21 : Présentation schématique de la confrontation directe..... | 52 |
| Figure 22 : Présentation schématique de la confrontation indirecte..... | 53 |
| Figure 23 : Présentation du test <i>In Vitro</i> pour l'étude de la compétition pour la source de carbone en présence du contrôle biologique (A) et en absence du contrôle biologique (B)..... | 55 |
| Figure 24 : Présentation du fermenteur 20 L. Centre Wallon de Biologie Industriel Gembloux -Agro Biotch- « Belgique »..... | 59 |
| Figure 25 : Courbe d'étalonnage du dosage du Proline..... | 65 |
| Figure 26 : Courbe d'étalonnage du dosage du Glucose..... | 66 |
| Figure 27 : Symptômes observés su champ de lentilles prospecté de Ain Semara (A) ; de rouille sur feuille (B) ; de Cylindrosporiose de feuille (C) et système racinaire réduit (D)..... | 68 |
| Figure 28 : Fréquences comparatives des différents genres fongiques isolés à partir des plantes des sites d'Ain Semara et d'El Baâraouia..... | 70 |
| Figure 29 : Principales embranchements correspondant aux genres isolés des plantes de lentille..... | 71 |

| | |
|---|----|
| Figure 30 : Fréquences comparatives des différents genres fongiques isolés à partir des sols des sites d'Ain Semara et d'El Baâraouia..... | 73 |
| Figure 31 : Principales embranchements correspondant aux genres isolés des sols de lentille..... | 74 |
| Figure 32 : Données climatique de la région de Constantine pour l'année agricole 2011-2012 (ONM, 2013)..... | 74 |
| Figure 33 : Symptômes de la Fusariose sur racine de <i>Lens culinaris</i> (A), aspect macroscopique de <i>Fusarium solani</i> (B, C) et microscopique (D) (Objectif 40)..... | 76 |
| Figure 34 : Symptômes de <i>Cylindrosporium</i> sur Feuilles et tiges de <i>Lens culinaris</i> (A), aspect macroscopique de <i>Cylindrosporium sp</i> (B, C) et microscopique (D) (Objectif 40)..... | 77 |
| Figure 35 : Observation macro (A1, A2) et microscopique (A3) de <i>Trichoderma 127a</i> ; et de <i>Trichoderma 127b</i> (B1, B2, B3) (Objectif 40)..... | 78 |
| Figure 36 : Dendrogramme des isolats « Z127A0EF et Z127B0EF»..... | 79 |
| Figure 37 : Suivi de la croissance de <i>Fusarium solani</i> en présence et en absence de <i>Trichoderma harzianum 127a</i> et <i>T. harzianum 127b</i> (C : témoin, DM : confrontation directe, VM : confrontation indirect)..... | 80 |
| Figure 38 : Action inhibitrice de T-127a (A) et T-127b (B) sur <i>F. solani</i> : observation macro et microscopique (Objectif 40)..... | 81 |
| Figure 39 : Suivi de la croissance de <i>Cylindrosporium sp</i> en présence et en absence de <i>Trichoderma harzianum 127a</i> et <i>T. harzianum 127b</i> (C : témoin, DM : confrontation directe, VM : confrontation indirect)..... | 82 |
| Figure 40 : Action inhibitrice de T-127a (A) et T-127b (B) sur <i>C. sp</i> : observation macro et microscopique (Objectif 40)..... | 83 |
| Figure 41 : Le pourcentage de germination des conidies de <i>F. solani</i> et <i>C. sp</i> après 24h d'incubation sans (Témoin) ou avec les souches antagonistes <i>T. harzianum 127a</i> et <i>T. harzianum 127b</i> en fonction du milieu..... | 85 |
| Figure 42 : Evaluation de la croissance mycélienne de <i>T. harzianum 127a</i> et <i>T. harzianum 127b</i> sur cinq différents milieux de culture : PDA, M2, KM, Sab et Czp..... | 87 |
| Figure 44 : Evaluation de la croissance mycélienne de <i>T. harzianum 127a</i> et <i>T. harzianum 127b</i> sur des milieux de culture a différents concentration de Glucose : M2, M0, M5, M10, M15 et M20..... | 88 |
| Figure 45 : Evaluation de la croissance mycélienne de <i>T. harzianum 127a</i> et <i>T. harzianum 127b</i> sur le milieu M2 à différents pH: 3, 5, 7, 9 et 11. | 89 |
| Figure 46 : Evaluation de la croissance mycélienne de <i>T. harzianum 127a</i> et <i>T. harzianum 127b</i> sur le milieu M2 à différents température : 4, 25, 30, 37 et 55. | 90 |
| Figure 47 : Mesure de la concentration des sucres à l'intérieur du fermenteur au cours de la fermentation..... | 91 |
| Figure 48 : Mesure de la DO à l'intérieur du fermenteur au cours de la fermentation..... | 91 |
| Figure 49 : Suivie de la concentration sporale au cours de la fermentation..... | 92 |
| Figure 50 : Aspect du mycélium et apparition des spores au cours de la fermentation liquide ; A : T24 h ; B : T72 h et C : 144 h..... | 92 |
| Figure 51 : Mesures du poids au cours de la FMS. | 93 |
| Figure 52 : Mesure de l'humidité au cours de la FMS. | 94 |
| Figure 53 : Aspect des Barquettes de la FMS : avant fermentation (A), et après fermentation (B)..... | 94 |
| Figure 54 : Mesure de la concentration sporale au cours de la FMS..... | 95 |
| Figure 55 : Spores de <i>Trichoderma harzianum</i> obtenus après purification..... | 96 |
| Figure 56 : Evaluation du taux de la Fusariose et la Cylindrosporiose <i>In Planta</i> | 96 |
| Figure 57 : Evaluation de l'effet des spores de <i>Trichoderma harzianum 127a/127b</i> sur le nombre des feuilles des Lentilles..... | 97 |

| | |
|---|-----|
| Figure 58 : Evaluation de l'effet des spores de <i>Trichoderma harzianum</i> 127a/127b sur la longueur des tiges des Lentilles..... | 98 |
| Figure 59 : Evaluation de l'effet des spores de <i>Trichoderma harzianum</i> 127a/127b sur la longueur des racines des Lentilles..... | 98 |
| Figure 60 : Evaluation de l'effet des spores de <i>Trichoderma harzianum</i> 127a/127b sur la teneur en eau des Lentilles..... | 100 |
| Figure 61 : Evaluation de l'effet des spores de <i>Trichoderma harzianum</i> 127a/127b sur la teneur en chlorophylle des Lentilles..... | 100 |
| Figure 62 : Evaluation de l'effet des spores de <i>Trichoderma harzianum</i> 127a/127b sur la teneur en proline des Lentilles..... | 101 |
| Figure 63 : Evaluation de l'effet des spores de <i>Trichoderma harzianum</i> 127a/127b sur la teneur en sucres totaux des Lentilles..... | 101 |

Liste des Tableaux :

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Valeur nutritionnelle moyenne de la lentille sèche : Pour 1ààg (Souci et <i>al.</i> , 2008)..... | 11 |
| Tableau 2 : Evolution des productions de lentilles dans la région de Constantine (2006-2013)..... | 13 |
| Tableau 3 : Résumé des différents échantillons effectués..... | 46 |
| Tableau 4 : Fréquences des différents isolats identifiées de plantes de lentille (Sites : Ain Semara et El Baâraouia)..... | 69 |
| Tableau 5 : Fréquences des différents isolats identifiées de sols prospectés (Sites : Ain Semara et El Baâraouia)..... | 72 |
| Tableau 6 : Analyse pédologique des sols prélevés à partir de la région de Constantine..... | 75 |

1. Introduction

En Algérie, les légumineuses alimentaires sont cultivées dans pratiquement toutes les régions des hauts plateaux situés dans les zones semi-arides et les plaines intérieures subhumides à (isohyète 350 à 450 mm). Elles sont donc d'un grand intérêt national, et comprennent des espèces très importantes utilisées comme cultures vivrières qui viennent après les céréales et avec qui elles forment la base du régime alimentaire notamment pour une large couche de populations (Boudjenouia, 2003) en raison de leurs propriétés nutritionnelles riches en protéines permettant dans une large mesure de corriger les carences en protéines animales ainsi que le déséquilibre alimentaire.

Ainsi, parmi ces espèces, la lentille (*Lens culinaris*) est classée comme la troisième importante culture légumineuse après le haricot (*Phaseolus vulgaris*) et le pois (*Pisum sativum*). Elle joue aussi un rôle important dans les systèmes de cultures en contribuant à l'amélioration de la fertilité des sols par les reliquats d'azote qu'elle laisse à travers ses nodosités et constitue ainsi l'un des meilleurs précédents culturels lors des rotations de cultures.

Cette espèce est entrain de prendre de l'ampleur et rentre parmi les principales préoccupations du plan de développement des cultures de légumineuses initié par le MADR (Ministère d'agriculture et du développement rural –Algérie–). Malgré un faible taux d'occupation (1,5 %) parmi la totalité de la sole réservée aux légumineuses, la lentille est cultivée sur des grandes surfaces à l'Est, au Centre et à l'Ouest du pays (Ait Abdellah *et al.* 2011).

Ainsi, malgré les énormes progrès enregistrés dans la productivité qui ont permis d'améliorer les différents cultivars, la fertilisation et d'assurer une meilleure Protection, les productions de légumineuses et particulièrement de la lentille en Algérie demeurent toujours irrégulières et semblent être étroitement liées à un certain nombre de facteurs tant abiotiques (irrégularité dans les précipitations pluviales, techniques agricoles, nature des sols etc...) , que biotiques (potentiel génétique, maladies, ravageurs, etc...), d'où la persistance d'un déficit important dans la production (Mahrez *et al.*, 2010 ; Abdelguerfi *et al.*, 2001). Parmi ces causes, les problèmes phytosanitaires, occupent une place particulièrement importante et constituent l'un des facteurs limitant le développement et l'amélioration de cette culture.

Par ailleurs, les réductions de rendement causées par les maladies et ennemis naturels des légumineuses, font que ces productions ont tellement régressé pour atteindre des rendements encore plus faibles (Mahrez *et al.*, 2010 ; Abdelguerfi *et al.*, 2001).

Aussi la lentille est sujette aux attaques de nombreux bio-agresseurs plus ou moins graves, parmi lesquels les champignons phytopathogènes causent des maladies sur tous les organes de la plante (feuilles, tiges, racines etc.). De plus, les maladies cryptogamiques d'origine tellurique ont attiré l'intérêt des chercheurs pour la connaissance de la communauté microbienne associée, ainsi, le sol, plus que tout autre environnement est le siège de compétitions microbiennes importantes, notamment, au voisinage des racines ou zone rhizosphérique, de par l'apport de substrats carbonés. La plante et le pathogène ne sont donc jamais seuls à induire l'expression des maladies, qui conduisent à impliquer aussi fréquemment les bactéries non pathogènes (Cook et Rovira, 1976).

Le développement rapide et insidieux des agents phytopathogènes sur la culture de lentilles, engendre souvent des pertes de rendements plus ou moins graves. Aussi, à l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode permettant de lutter très efficacement contre ces bio-agresseurs, en dehors de la lutte chimique qui demeure l'outil le plus efficace mais générateur de nombreux inconvénients (Kouassi, 2001; Thakore, 2006), tels ; la pollution de l'environnement, l'apparition et la généralisation des mécanismes de résistance chez les pathogènes, le déséquilibre écologique, etc.

Au regard de ces inconvénients, il est important de trouver des solutions alternatives qui permettent de diminuer l'emploi de pesticides. Celles-ci peuvent faire appel à : la rationalisation des pratiques agricoles (fumigation-stérilisation en horticulture, désinfection des graines, rotation des cultures, contrôle du vecteur de la maladie, etc.), à l'utilisation de variétés végétales résistantes (croisements sélectifs, insertion de gènes, etc..) ou au développement de bio pesticides (Adam, 2008).

Ainsi la contribution de notre thèse est orientée vers l'étude des myco-pathogènes des plantes de *Lens culinaris* et l'évaluation de l'effet antagoniste de deux souches de *Trichoderma harzianum* vis à vis de la Fusariose et de la Cylindrosporiose.

La première partie de notre travail portera donc sur une synthèse bibliographique rassemblant les différentes connaissances relatives à notre plante modèle *Lens culinaris*, aux pathogènes *Cylindrosporium sp* et *Fusarium solani* et enfin une étude sur l'antagoniste *Trichoderma harzianum* et sa production par voie de fermentation.

La seconde partie a porté sur les travaux expérimentaux, réalisés au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'activité microbienne (Université des frères Mentouri Constantine). Cette partie concerne principalement les points suivants :

- Isolement de l'ensemble des souches du groupe des mycètes à partir des plantes de *Lens culinaris* cultivées dans deux zones (El Baâraouia et Ain Semara) de la région de Constantine. Ainsi que les souches fongiques présentes dans la zone rhizosphérique de ces plantes.
- Sélection des souches antagonistes du genre *Trichoderma* et l'évaluation de leurs effets fongicide/fongistatique *In Vitro*.

Enfin une troisième partie concernant :

- L'identification des deux souches d'antagonistes (*Trichoderma*) isolées et La production de leurs spores, par voie de fermentation). L'évaluation de l'effet de deux « bio fongicides élaborés », *In Planta*, a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie industrielle, Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) en Belgique.

2. Revue bibliographique

2.1. La plante hôte : La lentille (*Lens culinaris*)

La lentille, est une plante annuelle, herbacée à racine pivotante mince, érigée de couleur vert pale atteignant 60-65 cm de haut ; tige carrée avec des feuilles alternes composées pennées.

2.1.1. Origine et historique

La lentille (*Lens culinaris*) est une des plus anciennes plantes cultivées en Asie occidentale, en Egypte, et en Europe méridionale. Les premiers signes archéologiques de cette culture remontant aux débuts de l'âge de pierre. C'est une espèce végétale appartenant à l'une des plus importantes familles des légumineuses, en raison de ses hautes qualités nutritionnelles (Costa et al. 2006). Ses centres d'origine sont le proche orient et l'Asie de l'Ouest (Mc Vincer et al. 2010).

Dans l'antiquité la lentille faisait régulièrement partie de l'alimentation des Grecs, des Juifs et des Romains et c'était le plat de subsistance des pauvres en Egypte. Elle a été associée à de nombreuses légendes, comtes et coutumes. Les plus anciens restes archéologiques de la lentille étaient retrouvés en Grèce et datées de 11 mille ans avant J.C, ainsi qu'en Syrie, datées de 8500 avant JC., mais on ne savait pas bien s'il s'agissait de plantes sauvages ou cultivées .Ce n'est qu'à partir du 5^{ème} millénaire avant J.C que l'on trouve des graines identifiées sans conteste comme domestiques (Yunnus et Jackson ,1991). La lentille a acquis son nom scientifique (*Lens culinaris*) en 1787 par le botaniste Allemand Medikus (Cubero, 1981 ; Sehirali, 1988 ; Henelt, 2001).

2.1.2. Données botaniques et génétiques

D'un point de vue morphologique (Figure 1), les lentilles ont des tiges minces et atteignent rarement 45 cm de hauteur et ont une croissance indéfinie (Saskatchewan, 2002 ; Saskatchewan Pulse Growers, 2000). Les deux premiers nœuds de la tige sont vestigiaux et se situent au niveau du sol ou sur la surface. Si la dominance apicale est brisée ou si les conditions de croissance sont favorables, la plante peut produire jusqu'à quatre rameaux basilaires à partir des bourgeons dormants du deuxième de ces nœuds et jusqu'à cinq rameaux aériens à partir des cinq nœuds situés immédiatement sous la première fleur. Si les conditions de croissance sont extrêmement favorables, les rameaux aériens peuvent produire des rameaux secondaires. Les feuilles sont

pennées et comportent jusqu'à 10 paires de folioles. La première fleur de la tige principale est située à l'aisselle du 11e, 12e ou 13e nœud non vestigial. Les gousses, aplaties, sont isolées ou disposées en paires et apparaissent à l'aisselle du 11e, 12e ou 13e nœud et des nœuds suivants (Slinkard, 1990, Street *et al.* 2008).

Chaque gousse possède un court pédicelle et renferme une ou deux petites graines en forme de loupes. La couleur du tégument séminal est variable, allant du blanc (absence de tannins) au vert pâle, au gris, au brun et au noir, et porte souvent des mouchetures violacées de grandeur variable (Vandenberg et Slinkard, 1990). par ailleurs leurs graines sont classées selon leur poids (les Microsperma : ≤ 40 gr / 1000 grains ; les Macrosperma : $\geq 50/1000$ grains) et leur couleur ,vertes ou rouges selon les exigences commerciales (Wenger ,2004 ; Sexana, 2009).



Figure 1 : Morphologie d'une plante de lentille : (1) Plante, (2) Feuilles, (3) Gousse, (4) Graine.

Par ailleurs, Le genre *Lens* appartient à la famille des Légumineuses, ou Fabacées, et à la tribu des Viciées, plantes dicotylédones, diploïdes ($2n=14$ chromosomes), autogames (Blaine, 2007 ; Omar, 2013 ; Muehlbauer, 1991 ; Cokkizgin et Shtaya, 213), comprenant les espèces suivantes :

- *Lens culinaris* Medikus ;
- *L. orientalis* (Boiss.) Hand.-Maz., ancêtre du *L. culinaris* ;
- *L. nigérians* (M. Bieb.) Grand. ;
- *L. ervoides* (Bring.) Grand. ;
- *L. odemensis* Ladiz. ;
- *L. lamottei* Czefranova, et
- *L. tomentosus* Ladiz. (Ladizinsky *et al.*, 1984; van Oss *et al.*, 1997).

La plupart des génotypes du *L. orientalis* s'hybrident librement avec le *L. culinaris*, et ces deux espèces sont isolées des autres sur le plan génétique. Le *L. culinaris* peut aussi s'hybrider avec les autres espèces du genre *Lens*, mais ces croisements se caractérisent par une fréquence élevée d'embryons avortés, d'embryons albinos, de plantules albinos et de réarrangements chromosomiques entraînant la stérilité des semis hybrides atteignant la maturité (Ladizinsky, 1993). Toutes les espèces du genre *Lens* sont des plantes herbacées annuelles diploïdes ($2n = 14$).

Aujourd'hui, les programmes d'amélioration de la lentille complétés par des programmes de croisement, l'objectif principal étant le rendement, mais on s'intéresse également à l'adaptation générale, à la tolérance aux stress écologiques, à la résistance aux maladies et aux ravageurs, et à la qualité nutritionnelle. D'énormes progrès ont été accomplis en matière de résistance à la rouille, à la Fusariose, à l'Ascochytose et à la Stemphyliose .

L'ICARDA a été mandaté au niveau mondial pour effectuer les recherches sur l'amélioration de la lentille. Les programmes nationaux d'amélioration de la lentille dans les pays producteurs utilisent leurs propres collections de ressources génétiques ainsi que des introductions provenant d'autres instituts. Ces programmes nationaux de pays producteurs de lentilles ont mis sur le marché de nombreux cultivars (ICARDA, 2001).

2.1.3. Classification et taxonomie

D'un point de vue taxonomique, la classification classique des lentilles se présente comme suit, (Cokkizgina, 2013 ; Anonyme 1, 2012) :

Règne : *Plantae* ;

Sous Règne : *Tracheobionta* ;

Embranchement : *Spermatophyta* ;

Sous Embranchement : *Magnoliophyta* ;

Classe : *Magnoliopsida* ;

Sous Classe : *Rosidae* ;

Ordre : *Fabales* ;

Famille : *Fabaceae* ;

Genre : *Lens* ;

Espèce : *Lens culinaris*.

2.1.4. Cycle biologique de *Lens culinaris*

Lorsque les températures sont optimales, les graines de lentilles germent en 5 à 6 jours et la floraison débute entre la 6^{ème} et la 7^{ème} semaine après le semis. Le cycle de croissance est de 80 à 110 jours pour les cultivars à cycle court et de 125 à 130 jours pour les cultivars à cycle long (Begiga, 2006) .Celui-ci comprend deux phases (Schwartz et Langham ,2012).

- **Phase végétative** : cette phase comprend deux stades : la croissance et la production des feuilles.
- **Phase reproductive** : elle est représentée par la floraison, la fructification et la production des graines (Figure 2).



Figure 2 : Cycle biologique de lentilles : (1) Graine, (2) Germination, (3) Croissance, (4) Floraison, (5) Fructification.

2.1.5. Caractéristiques écologiques et agronomiques

La lentille est cultivée comme une annuelle d'été dans les zones tempérées et comme une annuelle d'hiver dans les régions subtropicales. Sous les tropiques, elle est cultivée à des altitudes élevées (1800 ; 2500 et 2700 m) ou comme plante de saison froide (Sehirali, 1988 ; Ozdemir, 2002). Elle pousse à des températures moyennes de 6 à 27°C, mais elle ne convient pas aux régions tropicales chaudes et humides. Un gel intense ou prolongé et des températures bien supérieures à 27° C affectent énormément la croissance.

La lentille nécessite une pluviométrie annuelle d'environ 750 mm et un temps sec au moment de la récolte, mais des précipitations annuelles de 300 à 2400 mm sont tolérées. Elle tolère modérément la sécheresse, mais il existe des différences entre les cultivars.

La lentille a normalement besoin de jours longs pour fleurir, mais là aussi la réponse varie selon les génotypes, et il existe des cultivars indifférents à la longueur du jour. En Ethiopie, la lentille se cultive au cours de la brève saison des pluies (février mai) et pendant la principale saison des pluies (juin décembre), la seconde étant prédominante (Hawatin et *al.* 1980).

La lentille peut se cultiver sur de nombreux types de sol, depuis les sols sableux à argileux assez lourds, mais elle ne supporte pas les sols inondés ou engorgés. Un pH avoisinant 7,0 est optimal pour la production de la lentille, mais elle tolère des pH de 4,5 à 9,0. (Saskatchewan, 2002). La lentille est généralement très sensible à la salinité. Pour éviter l'asphyxie racinaire, la culture

est semée sur des vertisols à la fin de la saison des pluies (en septembre) et croît sur l'humidité résiduelle du sol (Sehirali, 1988 ; Ozdemir, 2002).

2.1.6. Multiplication, plantation et récolte

La lentille se multiplie par graines. Le poids de 1000 graines est de 10 à 90 g. Stockées dans un endroit frais et sec, les graines restent viables pendant plus de 5 ans. Une période de dormance de 4 à 6 semaines est courante, et on a découvert que certains cultivars répondaient à la vernalisation. La température minimale de germination est de 15°C et la température optimale se situe vers 18 à 21°C ; des températures supérieures à 27°C sont nocives. Le lit de semis de la lentille doit être ferme et lisse. Les graines sont semées à la volée, ou plantées en lignes espacées de 20 à 90 cm en ménageant 5 à 25 cm entre les plantes sur la ligne. Les densités de semis vont de seulement 10 kg/ha en culture associée à 150 kg/ha pour les cultivars à grosses graines en culture pure. La profondeur de semis est de 1 à 6 cm (Polhill, 1990).

Selon la taille des graines et l'humidité disponible. La lentille est le plus souvent cultivée seule, mais il arrive qu'elle soit associée à d'autres cultures.

La lentille ne concurrence pas bien les adventices, surtout à l'état jeune. Elle doit être semée dans un champ propre et un désherbage doit généralement être effectué dans les 3 semaines après le semis. La lentille répond normalement bien aux engrais phosphorés. Une lentille qui a bien nodulé réagit rarement à l'application d'azote. La lentille est souvent produite en rotation avec les principales céréales à petits grains, dans une rotation, il faut éviter de semer des lentilles après d'autres *légumineuses*, des *Brassica*, du *tournesol* ou de la pomme de terre, car ils sont sensibles aux mêmes maladies (Yunnus et Jackson, 1991).

On récolte la lentille lorsque les gousses virent au jaune-brun et que les plus basses sont encore fermes. Si l'on attend davantage, cela peut conduire à l'égrenage. Dans de nombreuses régions, la plante est coupée à la main au niveau du sol et on la laisse sécher une dizaine de jours avant de procéder au battage et au vannage. Actuellement, la récolte est mécanisée, et s'opère de préférence lorsque l'humidité est de 18 à 20%, de façon à éviter qu'il y ait trop d'égrenage et de graines abîmées.

La récolte de lentilles doit être séchée à un taux d'humidité de 11 à 14% ; à un taux inférieur, les graines ont tendance à se briser. Les graines nettoyées sont conservées entières ou

décortiquées. A cause des insectes des greniers, surtout *Callosobruchus* spp., les graines de lentilles ne sont pas conservées plus de six mois, sauf si le stockage se fait dans une fosse (sous terre). Les graines récoltées mécaniquement peuvent être séchées dans des séchoirs à air chauffé, mais la température ne doit pas excéder 43°C, afin de réduire l'éclatement du tégument (Yunnus et Jackson, 1991).

2.1.7. Distribution et usages

Actuellement la culture de la lentille est très largement répandue à travers les régions du monde, après son introduction aux Amériques en Nouvelle Zélande et en Australie Elle est maintenant largement cultivée dans les régions tempérées et subtropicales (Omar et *al.* 2013).

Selon la FAO (2010), la production mondiale des lentilles a atteint 4.2 millions de Tonnes pour une superficie cultivée de 4.6 millions d'Hectares soit un rendement moyen de 10,95qx/Ha. Ces rendements considérés comme faibles, sont le résultat de l'induction de certains facteurs biotiques et abiotiques (Omar et *al.* 2013). Les principaux pays producteurs de la Lentille sont : Le Canada, la Turquie, l'Iran, l'Australie, la Chine et la Syrie alors que les principaux importateurs sont : l'Egypte, l'Algérie, la Colombie, la France, le Pakistan et l'Espagne. (Ahlawat, 2012).

La lentille est aussi surtout cultivée pour ses graines mûres, qui sont consommées principalement en sauces et en soupes. De nombreux autres plats à base de lentilles sont préparés dans différents pays. Les graines sont réduites en une farine qui sert à fabriquer des galettes et des pains, ou à préparer des aliments spéciaux destinés par ex. aux nourrissons ou aux invalides. Les jeunes gousses, les graines germées et les feuilles se consomment comme légume (Yunnus et Jackson, 1991).

On nourrit parfois les animaux, en particulier les volailles, avec des graines de lentille pour leur procurer des protéines. Elles sont parfois employées comme source d'amidon dans l'industrie textile et dans l'imprimerie. Les cosses, les téguments et les tiges feuillées fraîches ou sèches fournissent du fourrage pour le bétail (Yunnus et Jackson, 1991).

2.1.8. Intérêt nutritionnel

La lentille est une culture d'un grand intérêt par ses propriétés nutritionnelles dont la composition de ses graines mûres sèches se présente comme suit (Tableau 1) :

Tableau 1 : Valeur nutritionnelle moyenne de la lentille sèche : Pour 100 g (Souci et *al.*, 2008).

| Apport énergétique | | Principaux composants | | Minéraux & Oligo-éléments | | Vitamines | | Acides aminés | |
|--------------------|----------|-----------------------|---------|---------------------------|-----------|---------------------|----------|------------------|---------|
| Joules | 1146 kJ | Glucides | 40,6 g | Bore | 0,70 mg | Provitamine A | 0,100 mg | Acide aspartique | 3160 mg |
| Calories | 270 kcal | Amidon | 39,48 g | Calcium | 65 mg | Vitamine B1 | 0,480 mg | Acide glutamique | 4490 mg |
| | | Sucres | 1,12 g | Chlore | 84 mg | Vitamine B2 | 0,265 mg | Alanine | 1290 mg |
| | | Fibres alimentaires | 17,0 g | Chrome | 0,0051 mg | Vitamine B3 (ou PP) | 2,5 mg | Arginine | 2240 mg |
| | | Protéines | 23,4 g | Cobalt | 0,016 mg | Vitamine B5 | 1,6 mg | Cystine | 250 mg |
| | | Lipides | 1,60 g | Cuivre | 0,763 mg | Vitamine B6 | 0,550 mg | Glycine | 1300 mg |
| | | Eau | 11,40 g | Fer | 8,0 mg | Vitamine B9 | 0,168 mg | Histidine | 710 mg |
| | | Cendres totales | 2,51 g | Magnésium | 129 mg | Vitamine C | 7,0 mg | Isoleucine | 1190 mg |
| | | | | Manganèse | 1,5 mg | Vitamine K | 0,123 mg | Lysine | 1890 mg |
| | | | | Nickel | 0,300 mg | | | Méthionine | 220 mg |
| | | | | Phosphore | 408 mg | | | Phénylalanine | 1400 mg |
| | | | | Potassium | 837 mg | | | Proline | 1220 mg |
| | | | | Sélénium | 0,0098 mg | | | Sérine | 1510 mg |
| | | | | Sodium | 6,6 mg | | | Thréonine | 1120 mg |
| | | | | Zinc | 3,4 mg | | | Tryptophane | 250 mg |
| | | | | | | | | Tyrosine | 840 mg |

Parmi les facteurs antinutritionnels ellébore par la lentille, on trouve les inhibiteurs de trypsine, les hémagglutinines, les tanins, les phytates et les oligosaccharides, mais leurs taux sont beaucoup plus faibles que ceux des pois et des fèves, par exemple, et la lentille a la réputation d'être plus facile à digérer.

Le foin de lentille contient 10,2% d'humidité, 4,4% de protéines, 1,8% de lipides, 50,0% de glucides, 21,4% de fibres et 12,2% de cendres.

2.1.9. Situation de la culture de la lentille et son importance en Algérie

En Algérie, la culture des lentilles n'occupe que 1.5% de la totalité des terres réservées aux légumineuses alimentaires (Ait Abdellah *et al.* 2011) ; elle s'étale sur de grandes surfaces dans les hautes plaines (Tiaret, Saïda, Sétif) et les plaines intérieures (Bouira, Médéa, Mila) (Figure 3).

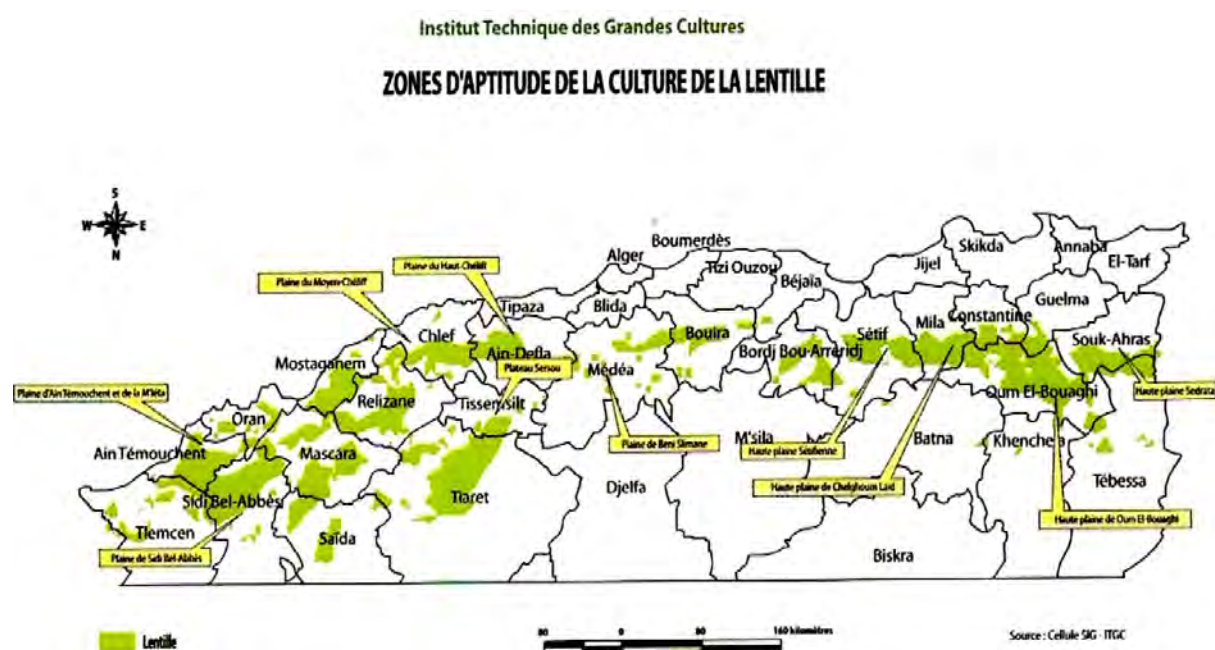


Figure 3 : Zones d'aptitude de la culture de la lentille en Algérie (ITGC, 2013).

Par ailleurs, compte tenu de leurs capacités fixatrices de l'azote atmosphérique (46 à 192 kg d'azote par hectare), les lentilles sont souvent cultivées en rotation avec les céréales comme le blé (Rennie et Dubetz, 1986 ; Smith *et al.*, 1987 ; McNeil *et al.*, 1996 ; Rochester *et al.* 1998 ; Shah *et al.* 2003), ce qui les soustrait d'ailleurs à une forte demande d'azote, mais elles ont besoin par contre d'apport de phosphore (engrais phosphorique) pour le développement de leur système racinaire (Sashatchewan, 2002).

Ainsi dans la région de Constantine, les productions de lentilles ont progressivement évoluées entre 2006 et 2011 ou l'on a pu noter des collectes brutes maximales (15523,04 Qx) (Tableau 2). Cette évolution est liée à l'élargissement des superficies destinées à cette culture ainsi qu'au nombre d'agriculteurs s'y intéressant.

Tableau 2 : Evolution des productions de lentilles dans la région de Constantine (2006-2013).

| Wilaya | Campagne | Superficie réalisée (Ha) | Collecte brut (Qx) | Nombre agriculteurs |
|----------------------|------------|--------------------------|--------------------|---------------------|
| CONSTANTINE | 2006-2007 | 42 | 371,7 | 3 |
| | 2007/-2008 | 460 | 4533,12 | 24 |
| | 2008/2009 | 1183 | 8733,68 | 69 |
| | 2009/2010 | 2074,5 | 15523,04 | 152 |
| | 2010/2011 | 4664,5 | 20879 | 231 |
| | 2011/2012 | 1602,5 | 8720,5 | 93 |
| | 2012/2013 | 1066,5 | 7100,74 | 59 |
| Total général | | 12194 | 65861,78 | 631 |

2.1.10. Les stress Biotiques ou principaux problèmes phytosanitaires de la lentille en Algérie

Durant la vie végétative, stockage ou commercialisation des lentilles plusieurs maladies peuvent survenir au produit provoquant ainsi de grave dégât et des pertes de rendement (Bayaa *et al.*, 1986). Ces maladies varient selon le type de pathogènes : virus, bactéries, nématodes, mycètes... (Muehlbauer *et al.*, 1995 ; Van Euden *et al.*, 1988).

Les contaminants fongiques des lentilles sont les plus importants d'un point de vue économique et phytosanitaire. Parmi les pathogènes les plus cités en littérature les genres : *Alternaria*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Phoma*, *Monilia*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* (Ahmed *et al.*, 1993), *Botrytis*, *Uromyces* (Richardson, 1979 ; Chen *et al.*, 2011), *Rhizoctonia*, *Sclerotium* (Muehlbauer *et al.*, 2002), *Aspergillus*, *Chaetomium* et *Nigrospora* (Hussain *et al.*, 2007).

Plusieurs maladies d'origine virales affectent également la lentille tels que : virus de la mosaïque du concombre (CMV), le virus de la jaunisse nécrotique de la fève (FBNYV), le virus de la mosaïque de la luzerne (AMV).

Les pucerons sont parmi les insectes ravageurs les plus importants de la lentille. Le puceron du pois (*Acrythosiphon pisum*) est le plus important, car il provoque jusqu'à 25% de perte de rendement. Les graines stockées attirent les bruches (*Callosobruchus* sp.). L'orobanche (*Orobanche* sp.) est un adventice parasite important de la lentille en Méditerranée et en Asie occidentale ; il est difficile de l'éliminer par des pratiques culturales ou des moyens génétiques.

La Fusariose, la rouille et le rhizoctone figure parmi les maladies les plus importantes signalées en Algérie (Belabid et *al.*, 2003). Aussi, bien qu'il n'existe pas encore de statistiques d'estimation de ces pertes, ces aspects sont certainement beaucoup plus prononcés.

2.2. Les maladies étudiées : *Cylindrosporiose* et *Fusariose*

2.2.1. Généralités sur les mycètes

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur Terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Ce groupe d'organisme ubiquistes comprend environ 120000 espèces, présentant des structures et caractéristiques biologique extrêmement diversifiées (Senal et *al.*, 1993 ; Kirket et *al.*, 2001).

Les mycètes sont des eucaryotes hétérotrophe (dépourvus de chlorophylle) (Redecker, 2002) ; ils peuvent être uni- ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) d'aspect filamenteux ou lévuriforme (Tabuc, 2007) ; ils sont aérobies strictes et rarement anaérobies (Mathew, 1995 ; Tortora et *al.*, 2003).

D'un point de vue morphologique, un mycète est constitué d'un thalle formant l'appareil végétatif (Hawksworth et *al.*, 1994). L'appareil végétatif se compose d'une structure de base appelé hyphes qui forme un réseau de filaments ramifiés : le mycélium (Mathew, 1995). Généralement, les hyphes sont divisés par des cloisons, ou Septa contenant un seule noyau, on les appelle des hyphes segmentés ou septés. Chez certaines classes de mycètes, les hyphes sont dépourvus des cloisons et ont l'aspect d'une longue cellule continues à noyaux multiples ; ils sont donc appelés cénocytes (Tortora et *al.*, 2003).

La grande majorité des champignons se reproduisent de manière sexuée (parfaite) et asexuée (imparfaite ou végétative) (Senal et *al.*, 1993). La plupart des espèces sont, en effet capables de

former des spores, soit à l'intérieur de sporocystes, soit sur des ramifications différenciées du mycélium (Davet, 1996).

Sur le plan classification, les mycètes sont divisés en deux grandes divisions : les *Myxomycota* et les *Eumycota*. Les *Myxomycota* sont à leurs tours subdivisées en trois classes à savoir les *Dictyosteliomycetes*, les *Myxomycetes* et les *Plasmodiophoromycetes*. On c'est qui concerne les *Eumycota*, ils regroupes les sous divisions : *Mastigomycotina* (*Oomycetes*, *Chytridiomycetes*), *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* et *Deuteromycotina* (Hawksworth *et al.*, 1994).

2.2.2. Conditions de développement des mycètes

Les mycètes sont capables de vivre dans un environnement rude (Tortora *et al.*, 2003) et ceci grâce à leurs grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées ; due à la présence d'une paroi cellulaire rigide (formé de chitine et cellulose).

En effet, les mycètes se développent à des valeurs de pH légèrement acide comprises entre 3 et 7 et à des températures optimale variantes entre 20 et 30°C (Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud, 1998 ; Tortora *et al.*, 2003).

Globalement, les mycètes sont peu exigeants sur les conditions environnementales du substrat (Tabuc, 2007). Ces micro-organismes assimilent les sucres facilement métabolisables comme le glucose, le maltose, le saccharose et les polymères tels que l'amidon (Nicklin *et al.*, 1999), et ceci comme source de carbone. Par ailleurs, les mycètes utilisent l'azote minéral (azote ammoniacal et azote nitrique) ou l'azote organique (sous forme de peptone souvent) (Davet and Rouxel, 1997). De plus, les mycètes ont besoin pour leurs croissances, de plusieurs sels minéraux tels que : KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et CaCl_2 (Larpen-Gourgand and Sanglier, 1992).

2.2.3. *Cylindrosporium sp*

2.2.3.1. Généralités

Le genre *Cylindrosporium* est peu étudié et les espèces appartenant à ce groupe de champignon sont peu connues (moins d'une dizaine d'espèces selon la littérature).

Les premières études portant sur ce genre date de 1851 par Preuss qui a essayé de caractériser *Cylindrosporium crassipes* isolée à partir de Colza. Par la suite, plusieurs auteurs ont aussi essayé de caractériser quelques espèces de ce genre en se basant sur les travaux de Preuss (1851).

Le *Cylindrosporium sp* est un champignon qui provoque la Cylindrosporiose chez les plantes de lentilles. Les premiers symptômes (Figure 4) de cette maladie, apparaissent sur les feuilles sous forme de plages décolorées avec des points blancs et les tiges présentent des taches beiges allongées (Anonyme 5, 2014). Tardivement, les taches deviennent jaunes verdâtre avec des fructifications noirs minuscules sur les feuilles (Anahosu, 1968).

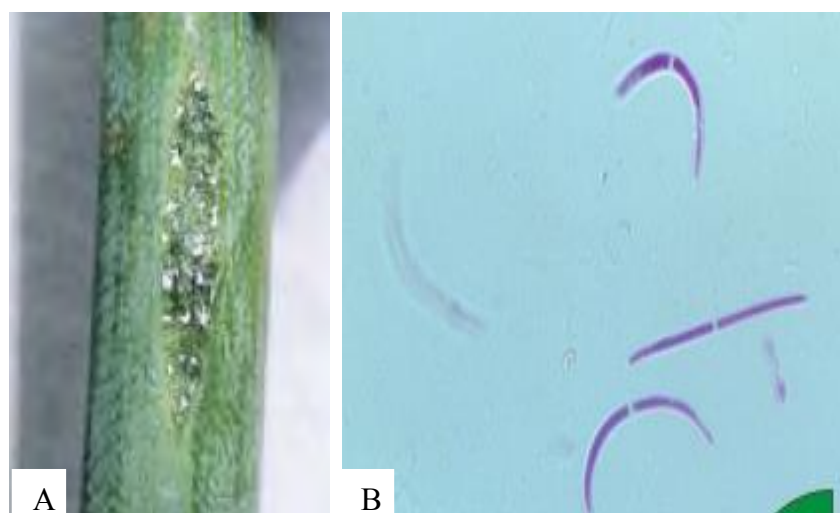


Figure 4 : Symptôme de la Cylindrosporiose sur tige de lentille (A) et agent pathogène responsable de maladie (B).

Le *Cylindrosporium sp* est un champignon phytopathogène, qui se conserve dans le sol grâce à ses spores (Zeitouni et Long, 1976).

Sur milieu de culture, *Cylindrosporium sp* forme des colonies brun clair (parfois blanchâtre) un revers crème (Nag Raj et Kendrick, 1971).

D'un point de vue morphologique (Figure 5), *Cylindrosporium sp* est caractérisé par la présence de macroconidies cylindriques et cloisonnées. Les conidiophores sont court (Anahosu, 1968), bondés, peut cloisonnées et solitaires (Nag Raj et Kendrick, 1971).

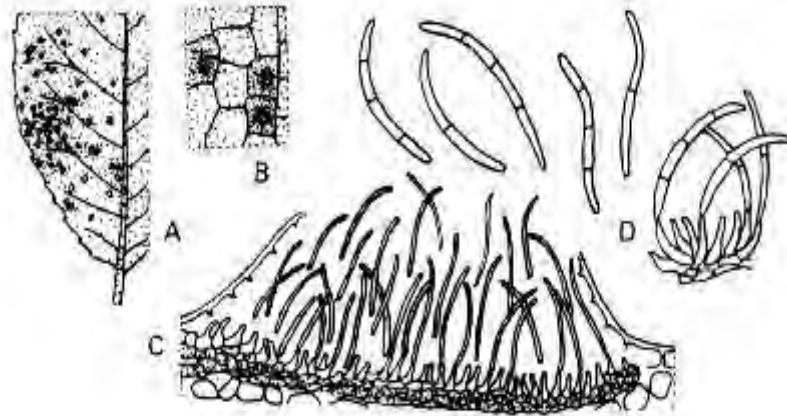


Figure 5 : Caractères morphologiques de *Cylindrosporium sp* : **A et B** : symptômes sur feuilles, **C** : pénétration du pathogène dans le tissu de plante et **D** : macroconidies.

2.2.3.2. Taxonomie

Les différentes données morphologiques et moléculaires, classifie *Cylindrosporium sp* comme suit :

Règne : Fungi ;

Division : Ascomycota ;

Famille : Dermateaceae ;

Classe : Leotiomycetes ;

Sous classe : Leotiomycetidae ;

Ordre : Helotiales ; et,

Genre : *Cylindrosporium*.

2.2.3.3. Cycle infectieux

Après une période d'hivernation dans les débris de récolte, les spores de *Cylindrosporium sp* pénètrent dans les feuilles des jeunes plantes par le biais des ouvertures naturelles (stomates par exemple), ou par les blessures et se développent à l'intérieur des tissus foliaires. Ce développement, donnera naissance aux premiers symptômes de la maladie (Figure 6). Par la suite, le mycélium continue se développé jusqu'à atteindre la tige puis la déformation total de plante.

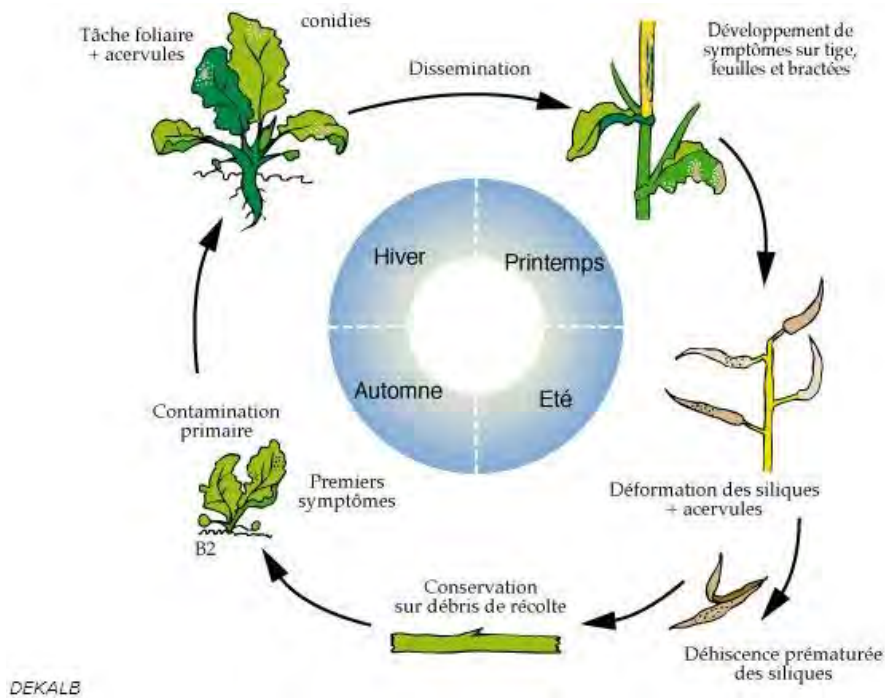


Figure 6 : Cycle infectieux de *Cylindrosporium sp*.

2.2.4. *Fusarium solani*

2.2.4.1. Généralités

Le genre *Fusarium* regroupe plusieurs espèces (44 espèces selon Booth (1971)) phytopathogènes susceptibles d'attaquer un grand nombre de plantes, et provoqué de grandes pertes économiques.

Le *Fusarium solani*, est l'un des espèces du genre *Fusarium* les plus importantes d'un point de vue phytosanitaire. Ce champignon est le responsable de la pourriture racinaire (fusariose également) des plantes de lentilles. Cette maladie (Figure 7) est caractérisée par un

brunissement suivie d'une dégradation du cylindre central et du cortex des racines. A un niveau plus loin, des jaunissements unilatéraux des folioles et des feuilles apparaissent à la base de la plante. Le système racinaire des plantes infectées présente aussi une réduction des ramifications secondaire (Kraft et al., 1994).

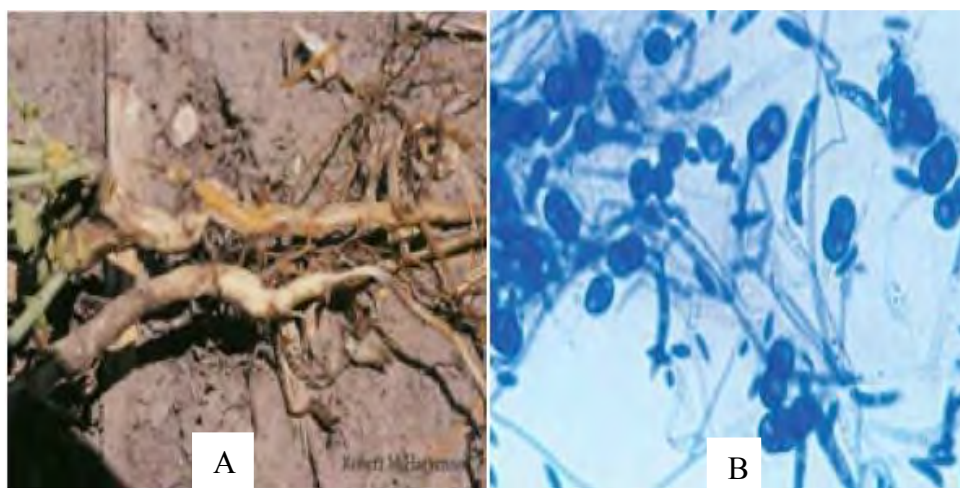


Figure 7 : La fusariose de lentille (A) et l'agent pathogène responsable de maladie (B) (Chabasse et al., 2002).

Le *Fusarium solani* est un champignon ubiquiste tellurique, le plus phytopathogène, il se conserve dans le sol grâce à ses chlamydiospores et au mycélium capable de survivre sur les débris végétaux (Erskine et Bayaa, 1996).

Sur milieu de culture, *Fusarium solani* forme des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur blanche à crème avec un revers pale (Chermette et Bussieras, 1993).

D'un point de vue morphologique (Figure 8), *Fusarium solani* est caractérisé par la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (d'où le nom latin « *fusus* » signifiant fuseau). Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores. Les phialides, sont plus ou moins allongées, présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extrémité d'un col allongé ; ils produisent deux types de conidies :

- Des microconidies : uni ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticille.
- Des macroconidies : conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant un sort de talon plus ou moins visible.

Les chlamydospores, sont parfois présentes, en position terminale ou intercalaire (Roquebert, 1998).

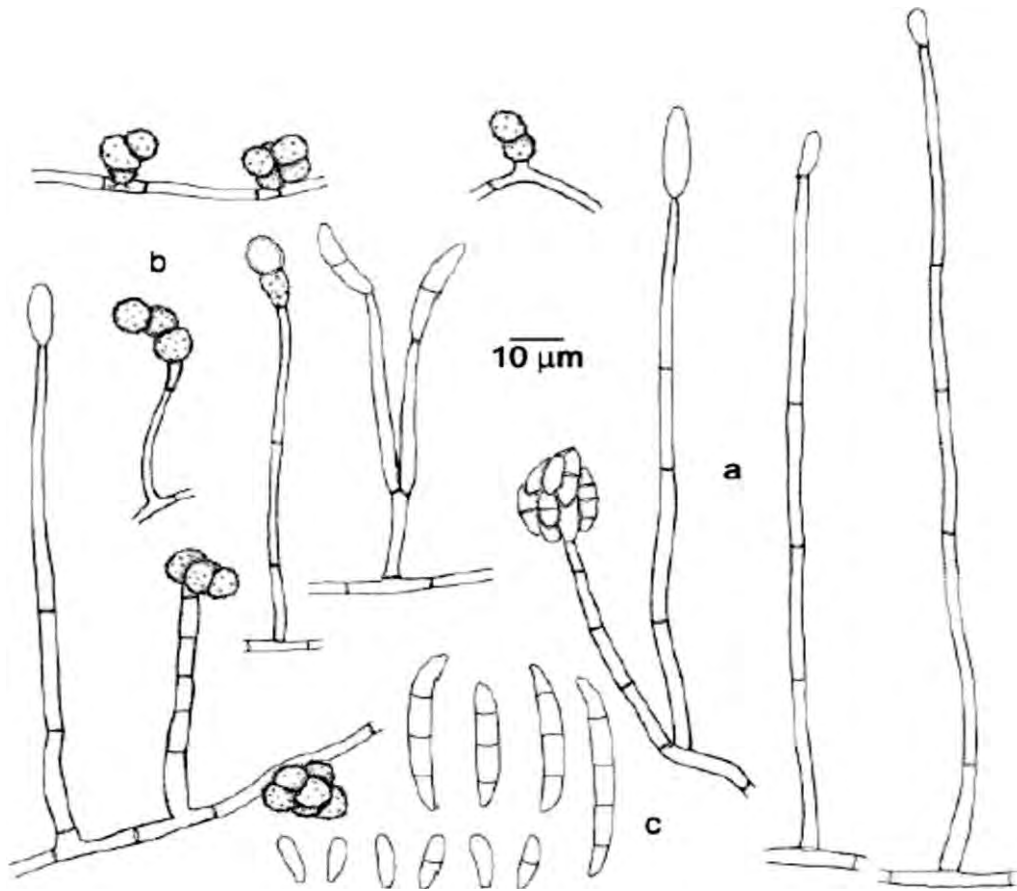


Figure 8 : Caractères morphologiques de *Fusarium solani* : **a** : conidiophores avec monophialides ; **b** : chlamydospores ; **c** : micro et macroconidies (Debourgogne, 2013).

2.2.4.2. Taxonomie

Depuis l'introduction du genre *Fusarium* par Linken en 1809, et de sa délimitation actuelle par Appel et Wollenweber en 1910, de nombreux travaux ont été consacrés à sa taxonomie : Wollenweber et Reinking (1935), Snyder et Hansen (1940), Railo (1950), Gordon (1952), Messien et Cassini (1968), Booth (1971), Joffe (1974), et Nelson et *al.*, (1983) (Belabid, 2003). Les différentes études morphologiques et moléculaires actuelles, classifient *Fusarium solani* comme suit :

Règne : Fungi ;
Division : Ascomycota ;
Subdivision : Pezizomycotina ;
Classe : Sordariomycetes ;
Sous classe : Hypocreales ;
Ordre : Nectriaceae ;
Genre : *Fusarium* ; et,
Espèce : *Fusarium solani*.

2.2.4.3. Cycle infectieux

Le cycle infectieux de *Fusarium solani* (Figure 9) débute par la germination des chlamydo-spores en présence d'une racine de lentille ; le filament mycélien pénètre le tissu vasculaire de la plante par le biais des blessures ou par les ouvertures naturelles du système racinaire. A ce moment-là, le champignon produit des toxines dans les racines qui seront transportés jusqu'aux feuilles (Roy et al., 1997).

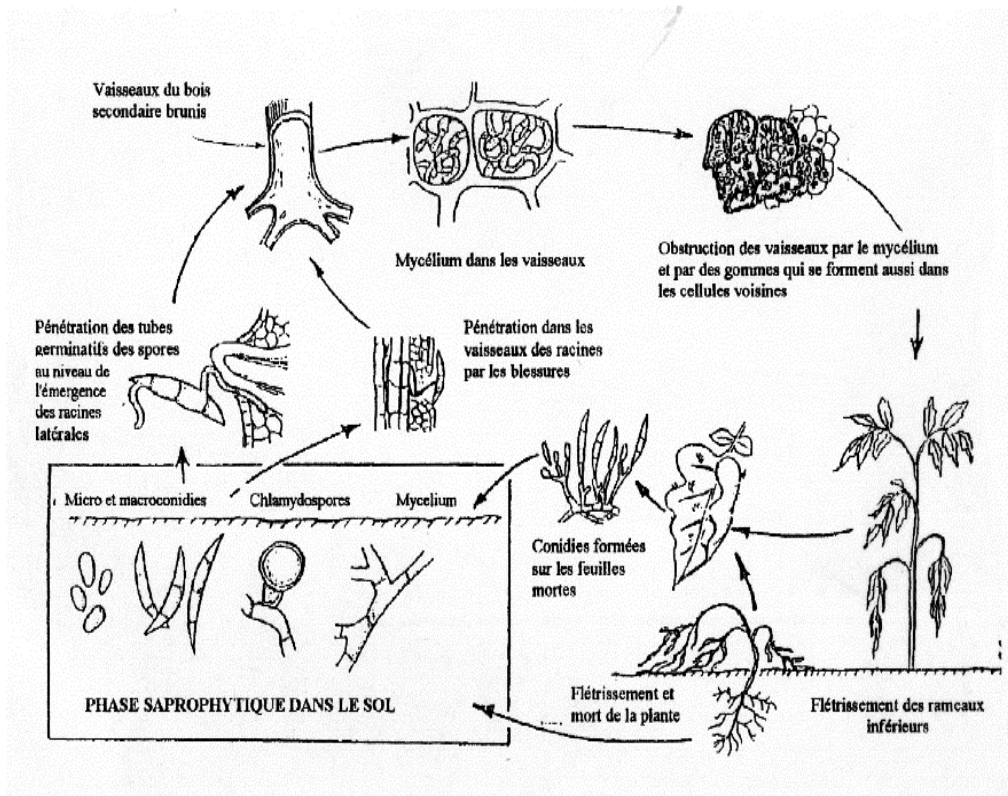


Figure 9 : Cycle infectieux de *Fusarium Solani* (Agrios, 1997).

2.3. Interaction agent pathogène/ *Lens culinaris*

Tel qu'il est décrit à l'heure actuelle, l'interaction entre l'agent pathogène et le système immunitaire des plantes se base sur la détection de l'agent pathogène comme étant du « non-soi » ou du « soi altéré » (Sanabria *et al.*, 2008). Une réponse immunitaire menée par une plante peut passer par trois étapes essentielles : la reconnaissance, la transduction des signaux et la réponse de défenses. Ces différentes étapes sont résumées dans la figure 10 :

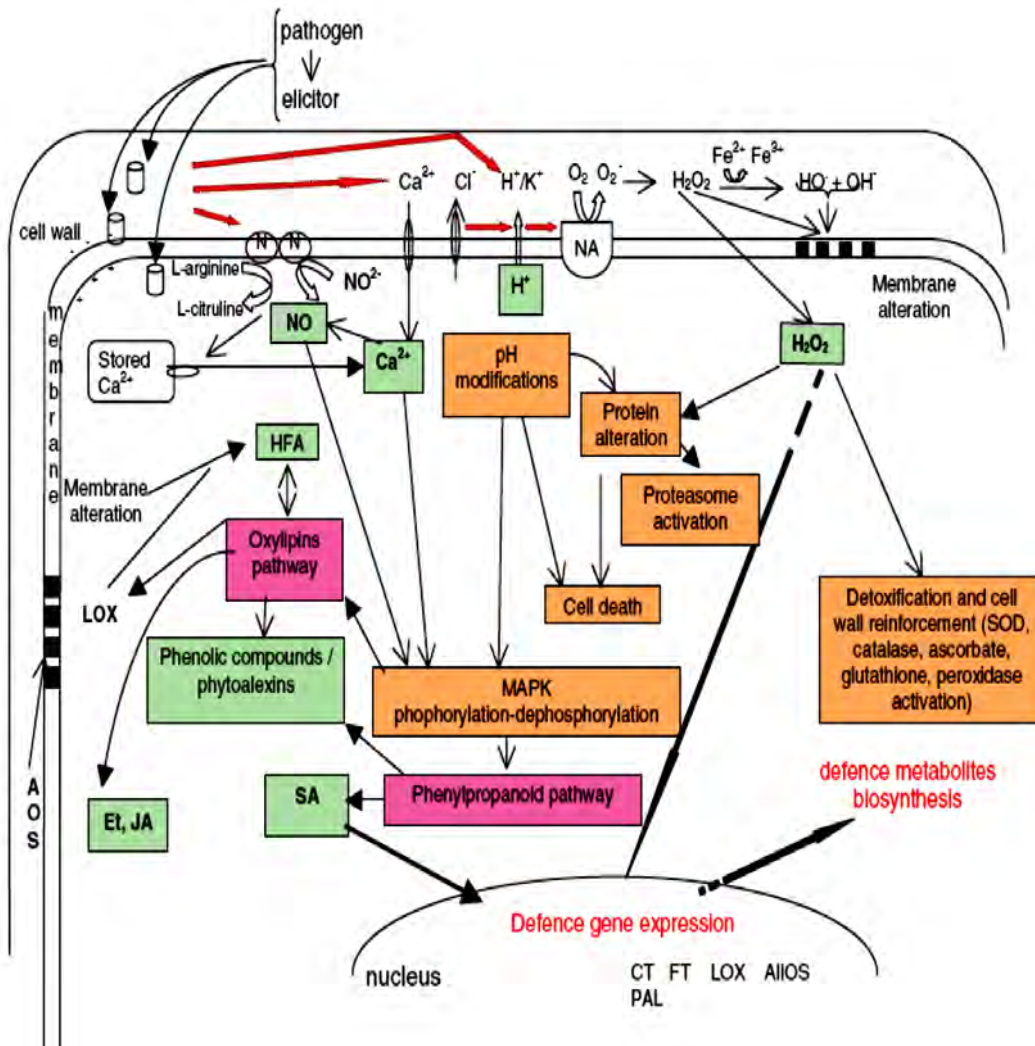


Figure 10 : Illustration schématique des réactions de défense induites lors d'interactions plante/agent pathogène ou éliciteur/plante (Desender *et al.*, 2007).

La reconnaissance d'éliciteurs issus d'agents pathogènes induit la production de molécules signaux (rectangles verts), qui activent à leurs tours les voies de défense (rectangles roses) ou de métabolismes cellulaires (rectangles orange). **NO** : nitric oxide ; **HFA** : hydroxy fatty acid ; **SA** : salicylic acid ; **CT** : coumaroyl tyramine ; **FT** : feruloyl tyramine ; **LOX** : lipoxygenase ; **AIOS** : allene oxide synthase ; **Et** : ethylene ; **P** : perception.

2.3.1. La reconnaissance

La reconnaissance des signaux par la plante (Figure 10), peut être spécifique ou non-spécifique. En effet, la reconnaissance non spécifique, est basée sur la reconnaissance d'éliciteurs généraux (PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern) communs à de nombreux agents pathogènes. Les PAMPs actuellement connus sont retrouvés dans des molécules polysaccharidiques ou protéiques. Les PAMPs de nature polysaccharidique sont représentés respectivement par les oligomères de β -glucanes communs aux parois végétales et fongiques, les oligomères de chitine ou de chitosan présents dans les parois des champignons et des insectes, et enfin, les oligogalacturonates des parois végétales (Shibuya et Minami, 2001).

Ainsi la reconnaissance des PAMPs comme «non soi» par la plante constitue donc le premier niveau d'activation des défenses végétales. Ce mécanisme, caractérisé sous le terme PTI (PAMP Triggered Immunity) correspond aussi à ce que l'on appelle le système d'immunité basal (Jones and Dangl, 2006). Il confère donc une protection à large spectre non spécifique d'hôtes et d'agents pathogènes.

Par ailleurs, la reconnaissance spécifique forme le deuxième niveau de reconnaissance des plantes, lorsque les parasites sont capables de franchir la barrière de la reconnaissance non-spécifique. Elle est liée à la détection spécifique de certaines races, appartenant à une espèce de microorganisme pathogène, par certaines variétés, appartenant à une espèce de plante hôte.

Dans ce système de reconnaissance qualifiée d'ETI (Effector-Triggered Immunity), la présence simultanée et spécifique du produit d'un gène de résistance (R) dans le génome d'une plante et du produit d'un gène d'avirulence (Avr) correspondant dans celui d'un parasite conduit à une résistance spécifique souvent caractérisée par la mort cellulaire programmée des cellules attaquées. Dans le cas où le parasite est capable de contourner tous les systèmes de reconnaissance de son hôte, il parvient à se développer et à accomplir son cycle en provoquant la maladie. Cette sensibilité de la plante due aux effecteurs du parasite est qualifiée d'ETS (Effector-Triggered Susceptibility) (Jones et Dangl, 2006).

2.3.2. La transduction des signaux

Quel que soit la nature de l'éliciteur, la détection de l'agent pathogène va induire une cascade de signalisation permettant la mise en place des défenses. Ces signaux peuvent être précoces ou secondaires.

Les réponses précoces sont activées après la perception du signal éliciteur, les récepteurs de plante vont alors pouvoir activer leurs effecteurs : canaux ioniques, protéines kinases, guanosine-5'-triphosphate (GTP) binding protein ou protéines G, qui vont à leur tour transférer le signal à des seconds messagers (adénosine monophosphate (AMP) cyclique, inositol triphosphate (IP3)...). La cascade d'évènements, s'organise alors comme suit (Figure 10): phosphorylations et déphosphorylations réversibles des protéines membranaires et cytosoliques (GTP binding protein ou protéines G), pic de calcium cytosolique, dépolarisation membranaire, efflux de K^+ et Cl^- /influx de H^+ résultant en une alcalinisation extracellulaire et acidification cytoplasmique, activation de Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK), production d'oxydes d'azote (NO), activation de Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase (NADPH) oxidase et production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) induisant notamment une peroxydation des lipides membranaires (Zhao *et al.*, 2005; Desender *et al.*, 2007).

Ces signaux précoces, assurent l'amplification et la spécificité du signal et vont entraîner la production d'éthylène (ET), de jasmonate (JA) et d'acide salicylique (SA) (signaux secondaires), qui permettront ensuite la mise en place de défenses appropriées (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

2.3.3. Les réponses de défenses

L'induction des voies de signalisation décrites plus haut va permettre la mise en place de mécanismes de résistance efficaces grâce à l'activation de réactions de défense qui peuvent être de plusieurs natures (Figure 10) :

- Renforcement des parois : le renforcement de la paroi cellulaire peut se faire par un cross-linking des protéines (Baker et Orlandi, 1995), l'accumulation de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP), (Esquerre-Tugaye, 1979 ; Esquerre-Tugaye *et al.*, 1979)...

- Synthèse de composés antimicrobiens : elle s'illustre par l'induction d'un type de protéines appelé ; protéine R (Sels et *al.*, 2008) et la synthèse des métabolites secondaires tel que les phytoalexines (Ahl-Goy et *al.* 1993 ; Hammerschmidt, 1999; Dixon et *al.*, 2002).
- Interaction entre les voies hormonales : cette interaction se fait entre les trois hormones décrits précédemment : ET, JA et SA (Robert-Seilaniantz et *al.*, 2007; Grant et Jones, 2009).
- HR ou réaction d'hyper sensibilité : qui se traduit par une mort cellulaire programmée, au point de pénétration de l'agent pathogène conduisant à une formation de nécrose.

2.4. Le sol

2.4.1. Généralités sur le sol

Le sol fait partie intégrante des écosystèmes terrestres et constitue l'interface entre la surface de la terre et le socle rocheux. C'est un milieu vivant très structuré (Gobat et *al.*, 1998), formant une entité naturelle (Baize, 1995 ; Girard, 1998), superficielle est souvent meuble, résultant de la transformation au contact de l'atmosphère et des êtres vivants (Biosphère), d'un matériau minéral (Lithosphère) issue le plus souvent d'une roche sous-jacente, sous l'influence de processus physiques, chimiques et biologiques (Girard, 2005) donnant naissance à plusieurs horizons correspondant à une organisation des constituants organiques et/ou minéraux.

Le sol est composé en moyenne de 38% de matière minérale, 12% de matière organique, 15 à 35% d'eau et 15 à 35% d'air. Le poids total de tous les organismes vivants (bactéries, champignons, algues, nématodes, insectes, protozoaires et amibes) contenus dans le sol peut atteindre jusqu'à 30 tonnes à l'hectare.

2.4.2. Propriétés physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques d'un sol, sont considérés comme des indicateurs de la qualité physique et chimique des sols (Tessier, 1999 ; Debeyser, 2003 ; Rahoui et *al.*, 2001). Le sol est un milieu minéral poreux, composé de trois compartiments physiques : un compartiment solide, un compartiment liquide et un compartiment gazeux (Schwartz, 2011) :

- Le compartiment solide : ce compartiment est formé de deux types de composants ; des composants minéraux classés selon plusieurs critères (la nature minéralogique : phyllosilicates, quartz, calcite, hydroxyde de fer. ; l'origine : minéraux hérités, transformés ou néoformés ; ou bien selon la taille : argiles, limons, sables ou éléments grossiers) et des composants organiques (débris végétaux de la litière, produits sécrétés par les racines, résidus de cultures, décomposition de la matière organique...).
- Le compartiment liquide : la quantité d'eau dans les sols varie selon plusieurs critères : climat, végétations, profondeur, structure... La composition d'eau est très variable en proportion, mais ces principaux ions sont : Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , NH_4^+ , Fe^{2+} , Al^{3+} , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , F^- , NO_3^- .
- Le compartiment gazeux : renferme plusieurs gaz dont : N_2 (78%), O_2 (10- 20%), CO_2 (1- 10%) et d'autres gaz tels que : O_3 , H_2O ... (1%).

2.4.3. Propriétés microbiologiques

Le sol est un milieu vivant, constitué d'un réservoir exceptionnel de microorganismes (Davet, 1996) formant des populations de différents genres. La distribution et l'activité de ces populations est variable d'une région à un autre et dépend du contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark et Zarnoch, 1992 ; Madigan et *al.*, 1997 ; Subler et Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith et *al.*, 2000 ; Katterer et Andoren , 2001).

Les bactéries (environ 500 kg par hectare) et les champignons (environ 1500 kg par hectare) (Bertrand et De Halleux, 2005), constituent les microorganismes les plus représentés dans les sols où ils sont les principaux responsables de la minéralisation des matières organiques (Quénéa, 2004). Ils participent aussi à un processus appelé humification qui conduit à la formation de l'humus (Paul et Clark, 1996) qui est un composé complexe et majeur du cycle de la matière organique tellurique et de la fertilité du sol. Au-delà de ça, ces microorganismes influence la santé des plantes, de façon négative dans le cas des agents phytopathogènes ou positive dans le cas de populations bénéfiques en réduisant la croissance et l'activité des pathogènes (antagonisme microbien) et en stimulant les réactions de défense des plantes (Duchaufour, 2001).

2.5. Les antagonistes

2.5.1. Généralités

La lutte biologique est limitée à l'utilisation des organismes antagonistes (généralement des microorganismes). Les effets d'antagonistes sont directs ou indirectes et peuvent être dus aux organismes introduits ou à la manipulation des organismes existants (Nasraoui, 2006).

Les agents de lutte biologique peuvent être de plusieurs types : des virus (*Cydia pomonella*, *Pandemis heparana*...), des bactéries (*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*...) et des champignons (*Metarhizium anisopliae*, *Coniothyrium minitans*...).

Parmi les champignons, les *Trichoderma* forment un important groupe d'antagonistes.

2.5.2. *Trichoderma harzianum*

2.5.2.1. Généralités

Le terme *Trichoderma* a été introduit dans la mycologie pour la première fois en 1794 par Person (Bisset, 1991). Les souches isolées du sol, ont été considérées comme des décomposeurs de matière organique (Persoon, 1794).

Les espèces de *Trichoderma* sont les plus étudiées autant que agents de biocontrol (BCAs) contre les pathogènes des plantes (Papavizas, 1985). Ces agents, ont une activité contre une large gamme de pathogènes de plantes.

Les *Trichoderma* sont des fungi ubiquistes (Roqubert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998). Ils sont des éléments majeurs dans la mycoflore terrestre (Widden et Abitrol, 1980 ; Kubicek et al., 2003).

2.5.2.2. Morphologie

La morphologie des espèces de *Trichoderma* est très proche, et ils ont été considérés pendant plusieurs années comme étant une seule souche *Trichoderma viride* (Bissy, 1939).

Les colonies (Figure 11) des souches de *Trichoderma harzianum*, sont floconneuses ou bien compactées en touffes (il existe des aspects intermédiaires). La coloration des colonies dépend de la pigmentation des phialides et le revers est généralement incolore.

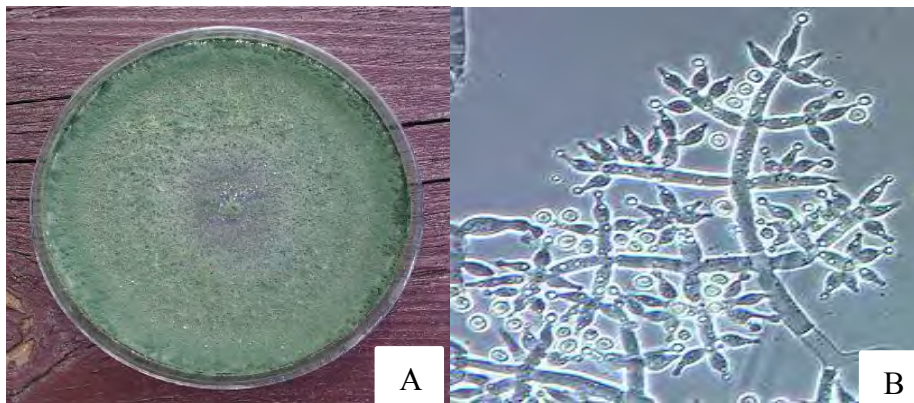


Figure 11 : Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de *Trichoderma harzianum*.

Sur le plant microscopique (Figure 12), le mycélium est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores sont forme conique ou pyramidale, ils sont ramifiés et portent des phialides en forme de flasque ou de quilles. A leurs tour, les phialides portent des spores (phialospores ou bien conidies) (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001 ; Kubicek et *al.*, 2003).

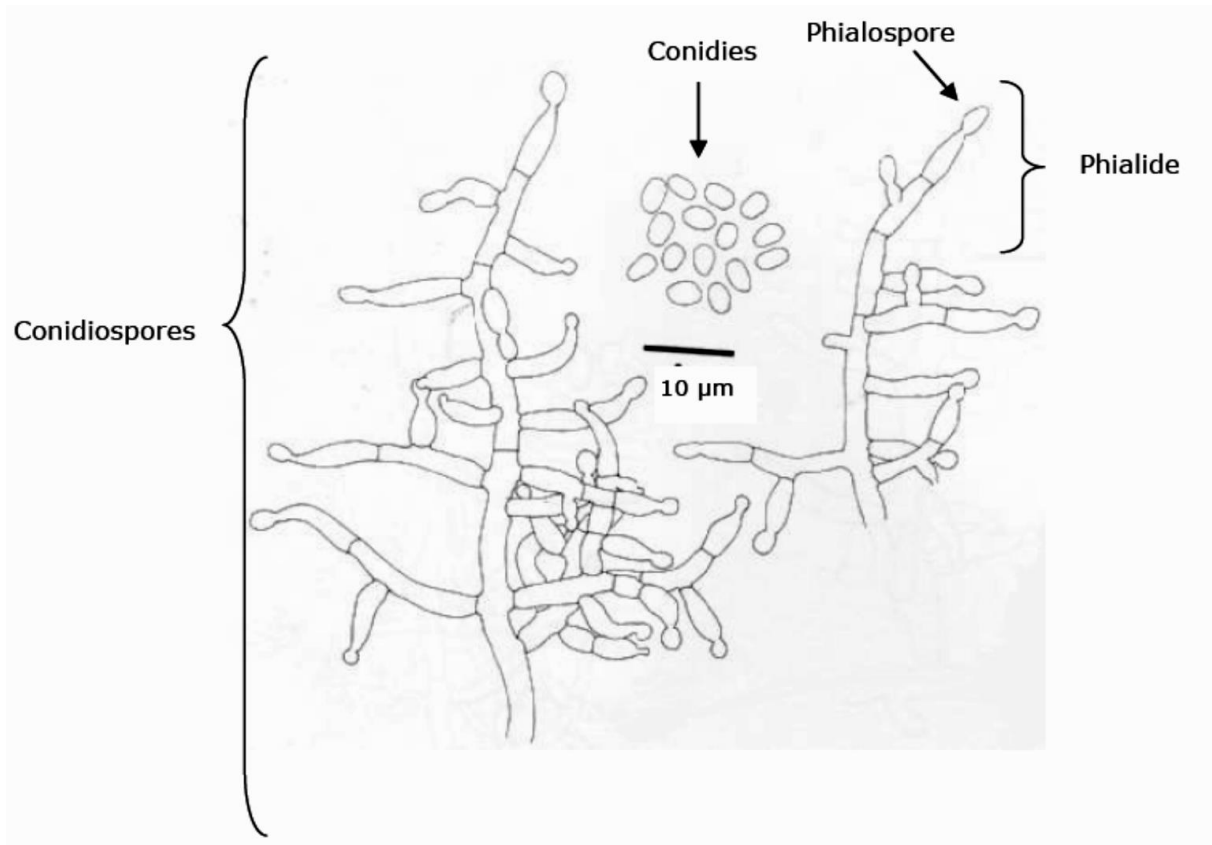


Figure 12 : Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma harzianum* (Samuels et al., 1994).

2.4.5.3. Taxonomie

Les travaux de Rifai (1969) et les méthodes d'ADN ont pu mettre en évidence une classification phylogénique pour le genre de *Trichoderma* (Kullnig-Gradinger et al., 2002 ; Lieckfeldt and Seifert 2000). De ce fait, *Trichoderma harzianum* est classé comme suit :

Régne : Fungi ;

Embranchement : Amastigomycota et/ou Eumycètes ;

Division : Ascomycota ;

Sous division : Pezizomycotina ;

Classe : Sordariomycètes ;

Sous classe : Hypocreomycetidae ;

Ordre : Hypocréales ;

Famille : Hypocraceae ; et,

Genre : *Trichoderma* (Bissett, 2004).

2.5.2.4. Cycle biologique

Les espèces du genre *Trichoderma* ont une reproduction exclusivement asexuée (Roquebert, 1996). En effet, 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 (Corbaz, 1990).

2.5.2.5. Mode d'action

Les mécanismes employés par *Trichoderma* pour contrôler les phytopathogènes des plantes sont : l'antibiose, le mycoparasitisme, la compétition et l'induction de la résistance systémique (Chet, 1987 ; Schirback et *al.*, 1994).

2.5.2.5.1. Antibiose

Plus de 100 métabolites secondaires avec des activités antibiotiques, sont produits par les différentes souches du genre *Trichoderma* (Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998).

La production des antibiotiques dépend des paramètres environnementales tels le substrat colonisé, le pH et la température (Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998 ; Vizcaino et *al.*, 2005). Ces antibiotiques, peuvent être classés en trois groupes : des composés volatiles, des composés solubles dans l'eau et les peptaïboles qui agit avec la membrane plasmique (Ghisalberti et Sivasithamparam, 1991). Néanmoins, les mécanismes par le quel ces antibiotiques agissent ne sont pas suffisamment connus (Song et *al.*, 2006).

En effet, les deux premiers groupes d'antibiotiques sont dérivés de plusieurs voies métaboliques. Par contre, le troisième groupe : les peptaïboles ; forme le plus important groupe d'antibiotiques (Degenklob et *al.*, 2003) ; il regroupe plus de 300 molécules dont 54 molécules sont isolées à partir de *Trichoderma harzianum* (Peptaïbol Database, 2007). Parmi les molécule bioactive en antibiose (Figure 13) en cite : 6-pentyl-2 α -Pyrone-2-one (6PP), les Koninginins (A, B, D, E et G), l'acide harzianique, Trichodermine, Harziamine, Trichodermal, Harzianolide (Kucuk, et Kivanc, 2004)...

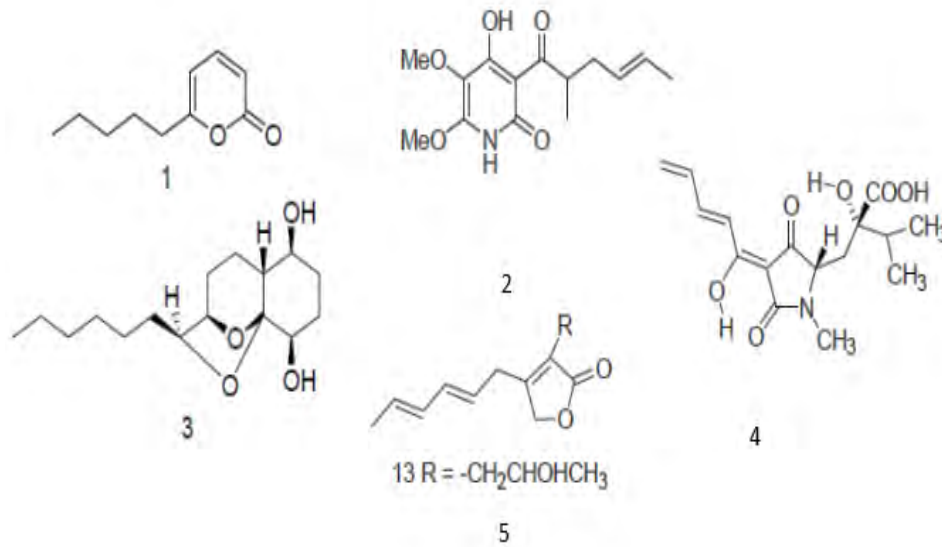


Figure 13 : Quelques molécules bioactives en antibiose secrétée par *Trichoderma harzianum* ; **1** : 6PP ; **2** : Harzianopyridone ; **3** : Koninginins A ; **4** : acide Harziamique ; **5** : Hazrianolide.

2.5.2.5.2. Mycoparasitisme

Durant le mycoparasitisme (Figure 14), les souches de *Trichoderma* reconnaissent le champignon pathogène par l'intermédiaire de petites molécules libérées par ce de dernier, certains d'entre ces molécules sont des fragments peptidiques qui sont libérés par l'action des protéases sécrétés par *Trichoderma* (Harman et al., 2004). Ces molécules peuvent se lier à un récepteur G couplés à une protéine ou à des récepteurs Gpr1 qui se trouvent sur la surface des hyphes de *Trichoderma*. En effet, cet attachement provoque une cascade de signalisation comprenant les protéines G et les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), qui peuvent moduler les activités des facteurs de transcriptions (TFs) qui ne sont pas encore connues.

Les facteurs FTs ainsi activé, augmentent l'expression constitutive de gènes de régulation qui codent pour la biosynthèse des métabolites secondaires été enzymes de dégradation appelé CWDEs (β -1,6, glucanases, β -1,3, glucanases, α -1,3, glucanases...), capable d'hydrolysé la paroi cellulaire et libérer des oligomères (Kubicek et al., 2004). A ce stade, *Trichoderma* s'enroule autour du pathogène. L'attachement du *Trichoderma* est médiée par la liaison des glucides dans la paroi cellulaire de *Trichoderma* et les lectines du champignon (Inbar et al., 1996). En même temps, le pathogène réagit en formant des métabolites secondaire et les ROS (reactive oxygen species) qui élicitent une réponse au stress et à la désintoxication dans *Trichoderma* (Irina et al., 2011).

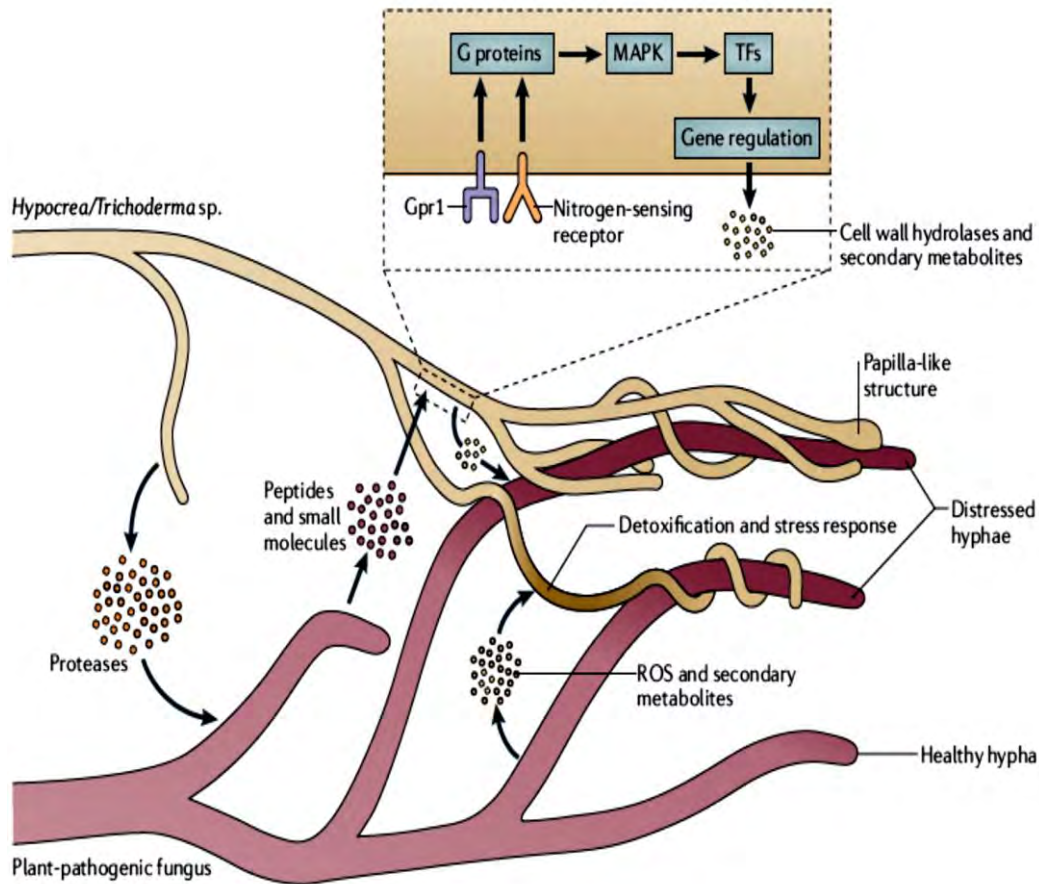


Figure 14 : Mécanisme de mycoparasitisme exercé par les souches de *Trichoderma* (Irina et al., 2001).

2.5.2.5.3. Complétion

Les souches de *Trichoderma*, sont des biodégradeurs (Wardle et al., 1993) et compétiteurs avec les gants pathogènes dans leurs phases saprophytique surtout lorsque les nutriments forment le facteur limitant (Simon et Sivasithamparam, 1989). En effet, pour qu'une espèce de *Trichoderma* soient compétente, elle doit coloniser la rhizosphère à une distance au-delà de 2 cm de profondeur de la graine (Ahmad et Baker, 1987). Une fois installé, *Trichoderma* établit une zone d'interaction dans la partie cortex des racines est sécrète des molécules tels que les sidérophores qui absorbent le fer et arrêtent la croissance du pathogène (Chet et al., 1997 ; Eisendle et al., 2004). Pour cette raison, la composition du sol influe sur l'efficacité de l'agent antagoniste. L'utilisation efficace des nutriments disponibles par les souches de *Trichoderma*, est basé sur la capacité de *Trichoderma* d'obtenir l'ATP à partir du métabolisme de différents sucres, tels que les dérivés de polymères (Grondona et al., 1997).

2.5.2.5.4. Induction de la résistance systémique

L'induction de la résistance systémique (Figure 15) dans les plantes par la synthèse des substances chimiques par *Trichoderma* a été démontré dans les années 90s (Elad, 1996 ; Enkerli et al., 1999). En effet, Les hyphes de *Trichoderma* libèrent plusieurs composants qui déclenchent la résistance systémique chez la plante. Seuls les effets positifs, tels que la résistance aux stress abiotiques des plantes, l'amélioration de l'efficacité photosynthétique et la meilleure utilisation de l'azote, sont déclenchées. Ces composants sont de plusieurs types ; les péptaiboles et le cerato-platanin Sm1 (EPL1 chez certaines espèces) ; induisent la résistance dans les plantes, aboutissant à la synthèse de l'hydroperoxyde lyase, la peroxydase et la phénylalanine ammoniacque lyase (qui induit la lignification) ; le Xylanase Eix élicite lui-même les défenses de plantes (voir II.3.). D'autre part, le 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique (AAC) désaminase inhibe la formation d'éthylène par la plante, ce qui conduit à l'amélioration de la croissance des racines ; une nitrilase sécrétée aussi de manière constitutive contribue à la formation de l'acide acétique indole-3 auxine (IAA). Par ailleurs, la fixation de *Trichoderma* aux racines des plantes nécessite la présence d'une hydrophobines et une swollénine. Enfin, *Trichoderma* tire profit du saccharose comme source de carbone ce qui permet une croissance fongique plus rapide de ce antagonisme. *Trichoderma* implique aussi des chitinases et des protéases.

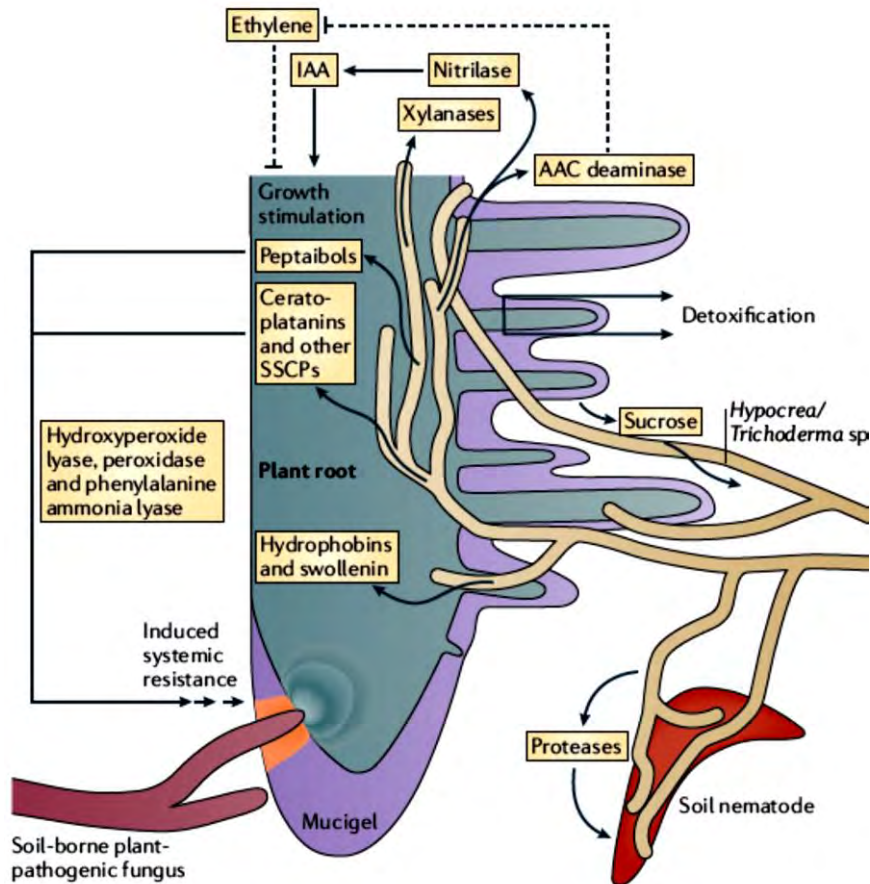


Figure 15 : Les mécanismes d'induction de la résistance systémique par les souches de *Trichoderma* (Irina et al., 2001).

2.5.2.6. Les fongicides du groupe *Trichoderma*

Comparées aux produits chimiques, la production et la commercialisation d'organismes antagonistes sont beaucoup plus difficiles parce que ces antagonistes doivent être récoltés, emballés et délivrés sous une forme viable et stable. Une fois appliquée à la culture ou dans le sol, les antagonistes doivent croître et persister dans l'environnement pendant suffisamment de temps pour exercer un contrôle contre les pathogènes (Nasraoui, 2006).

Une technique de production massive des spores de *Trichoderma sp* a également été mise au point (Caron, 2002). En production commerciale, *Trichoderma sp* a permis d'accroître les rendements de 7% par rapport aux parcelles traitées chimiquement. Par contre, pour que *Trichoderma sp* soit efficace, il doit être appliqué en prévention.

Selon Caron (2002), l'emploi de l'agent biologique *Trichoderma sp* tel qu'il est disponible actuellement, permettrait de :

- Restreindre l'utilisation de fongicides en agriculture : protection du consommateur et de l'environnement ;
- Favoriser le développement des plantes en l'absence d'agents pathogènes dans les substrats (Effet stimulant) ;
- Survivre et se multiplier dans les substrats pour toute la période de germination et de production des semis ;
- Lutter efficacement contre plusieurs agents pathogènes présents en même temps dans un substrat ;
- Offrir un produit facile à manipuler, disponible sous forme de poudre mouillable, pour les arrosages ou les incorporations directes au substrat.

2.6. Les fermentations

2.6.1. La fermentation liquide

2.6.1.1. Généralités

En microbiologie, le terme «fermentation» signifie l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes. Ce terme, décrit aussi une forme de métabolisme énergétique microbien dans lequel un substrat organique qui est le plus souvent un hydrate de carbone, est partiellement oxydé, et un hydrate de carbone organique agit en tant que accepteur d'électrons (Adams, 1990).

Les microorganismes utilisés en fermentation sont des bactéries (Acetobacter, Lactobacillus, Micrococcus...), des levures (Candida, Saccharomyces, Torulopsis...) et des moisissures (Aspergillus, Penicillium, Trichoderma... (Chojnacka).

Le substrat utilisé en FL, est un liquide libre dont la composition dépend des besoins de microorganisme a utilisé (Subramani et Vimala, 2012). Cependant, il doit contenir obligatoirement une source de Carbone et une source d'Azote.

2.6.1.2. Les paramètres influençant la FL

La fermentation liquide est influencé par plusieurs facteurs incluant la température, le pH, nature et composition de milieu de culture de fermentation, O₂ dissous, CO₂ ou Redox, le système de culture (Batch, fed-batch ou continue), l'agitation, le taux de cisaillement dans le fermenteur et la pression (Chisti, 1999). Tous ces paramètres sont contrôlés grâce à des sondes spécifiques annexés au bioréacteur (Figure 16).

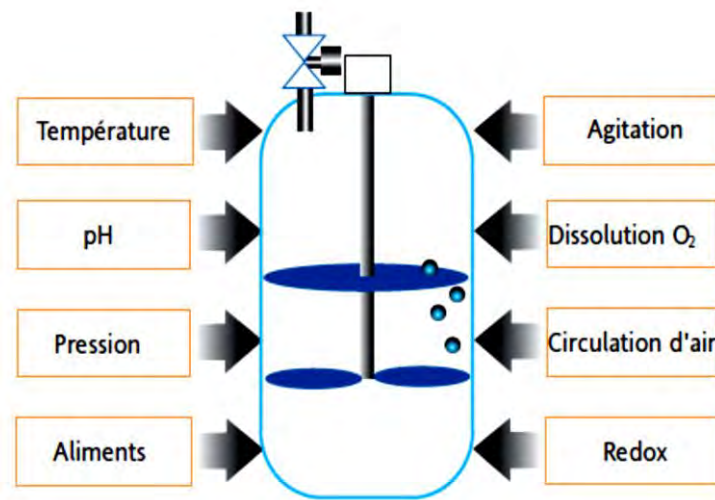


Figure 16 : Les différents paramètres régulés automatiquement à l'intérieur d'un fermenteur.

2.6.1.3. Déroulement de la FL

Au cours d'un procédé fermentaire dite standard, quatre phases se succèdent (Figure 17) :

- Phase de latence : elle correspond à une phase d'adaptation de microorganisme aux conditions environnementales (Perez-Tarrado et al., 2002). Elle est d'une durée variable (quelques heures à quelques jours) suivant les souches et les conditions de fermentation (Température, taux d'inoculation et de la présence d'inhibiteurs).
- Phase de croissance : durant la quel la population cellulaire augmente d'une façon exponentiel jusqu'atteindre le maximum (Bely et al., 1990). La vitesse de fermentation suit un profil semblable pour atteindre son maximum à peu près au même moment que la population cellulaire. La population comme la vitesse de fermentation sont principalement limité par la disponibilité des éléments nutritifs.

- **Phase stationnaire** : dans cette phase, les cellules cessent de se multiplier mais conservent une activité fermentaire. La viabilité cellulaire demeure élevée et la population cellulaire reste stable à son niveau maximum tandis que l'activité fermentaire diminue progressivement jusqu'à l'épuisement des sucres du milieu.
- **Phase de décroissance** : durant la quel la croissance et l'activité fermentaire s'arrêtent. Le taux de viabilité dans cette phase démunie vue le nombre important des cellules qui meurent grâce à l'action des enzymes libérés dans le milieu.

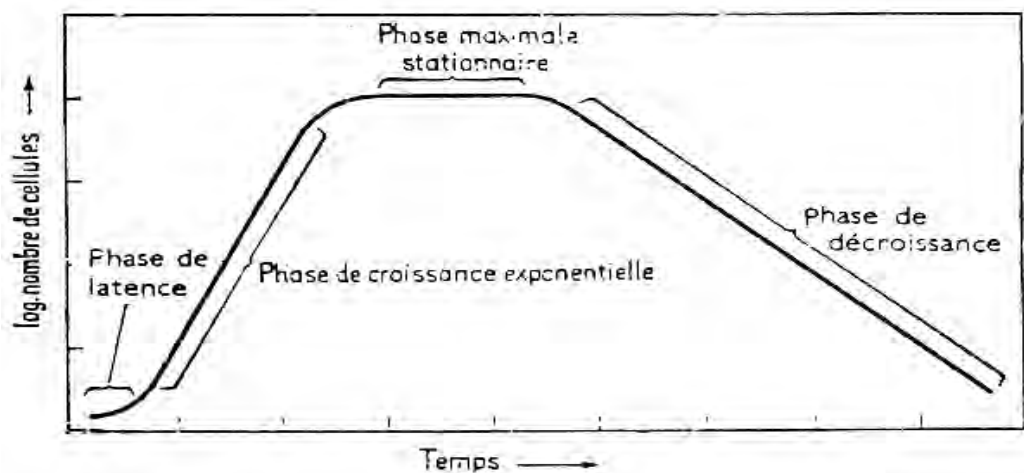


Figure 17 : Courbe de croissance durant une fermentation standard.

2.6.1.3. Les applications de la FL

Les applications de la fermentation liquide sont divers ; elle est établie pour la production de divers composés bioactifs (antibiotiques, enzymes, antioxydants, agents anti tumoraux...), ainsi que pour la production d'autres composés tels que les produits alimentaires (levure, vinaigre...).

2.6.2. La fermentation sur milieu solide

2.6.2.1. Généralités

La fermentation en milieu ou en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (Holker et Lenz, 2005).

La FMS est définie donc comme étant la croissance de micro-organismes sur des substrats solides en absence totale ou presque d'eau libre (Raimbault, 1980, Pandey *et al.*, 2000). Elle est constituée de trois phases : une matrice (phase) solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci (Prevot, 2013).

Le développement des champignons filamenteux en FMS (Figure 18) se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (Holker et Lenz, 2005 ; Rahardjo *et al.*, 2006).

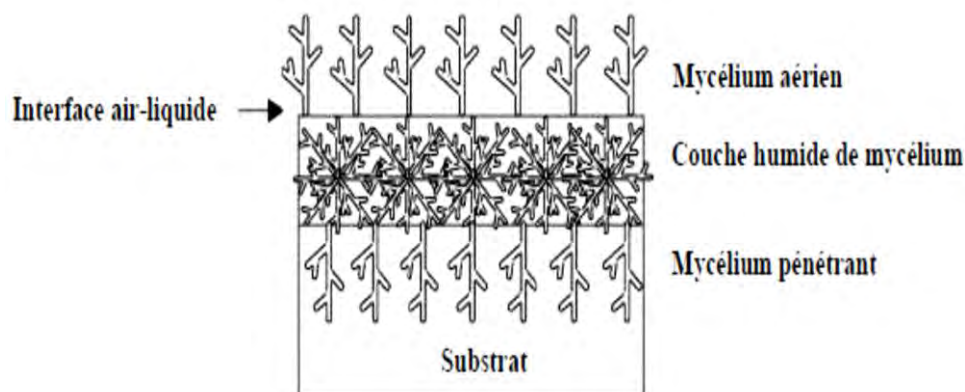


Figure 18 : Modèle de développement d'un champignon filamenteux en FMS (Rahardjo *et al.*, 2006).

2.6.2.2. Les différents supports/ substrats de la FMS

En fonction de la nature du support, on peut distinguer deux types de fermentations en milieu solide (Raimbault, 1980 ; Roussos, 1985, Saucedo-Castañeda, 1995) :

- Culture solide sur une phase substrat-support qui est constituée d'un matériau assurant une double fonction : support et source de nutriments.
- Culture solide avec une phase support constituée d'un matériau inerte, imprégné d'un milieu liquide nutritif.

La sélection du substrat dépend de son coût et de sa disponibilité. Sur le plan économique, il faut considérer le prix du milieu, le coût du fonctionnement de la fermentation et la valeur du produit final. Le plus économique est d'utiliser des substrats naturels comme les résidus de l'agriculture ou de l'agro-industrie (Lakhtar, 2009). Les supports sont classés en deux catégories, les supports inertes et organiques, et se présentent sous trois formes (Durand, 1998):

- Sous la forme de matériaux organiques naturels (amylacés ou lignocellulosiques). Ce sont généralement des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes (pulpes de betterave, paille, bois, **son de blé**,...). Ils servent à la fois de substrat (source de carbone) et de support ;
- Sous la forme de matériaux synthétiques (mousse de polyuréthane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif ;
- Sous la forme de matériaux minéraux (granulés d'argile, perlite, pouzzolane). Ils servent uniquement de support et nécessitent par conséquent l'apport d'un milieu nutritif.

2.6.2.3. Les paramètres de la FMS

2.6.2.3.1. L'activité de l'eau et l'humidité

En FMS, l'eau est présente sous deux formes : sous la forme d'eau complexée à l'intérieur de la matrice solide, et sous la forme d'une couche mince qui peut être absorbée à la surface des particules ou contenue dans les régions capillaires (Raimbault, 1998). La quantité d'eau doit être suffisante à la croissance des microorganismes sans détruire la structure solide ou réduire

la porosité du substrat ou du support (Oriol, 1987). Cependant, le développement microbien en FMS nécessite une humidité du substrat supérieure à 50 %.

2.6.2.3.2. L'aération

L'aération est un facteur important (essentiel) en fermentation en milieu solide puisqu'elle va permettre : l'oxygénation (surtout pour les organismes aérobies comme les champignons filamenteux), la dissipation de la chaleur métabolique (régulation de la température du milieu) et l'élimination des produits du métabolisme (CO₂, vapeur d'eau, composés volatils) (Raimbault, 1998 ; Duchiron et Copinet, 2011). L'aération dépend de type de microorganisme et sa demande en O₂.

2.6.2.3.3. La température

Les champignons filamenteux utilisés dans les procédés de FMS sont souvent mésophiles et se développent à des températures optimales comprises entre 25 et 30°C (Roussos, 1985). Cependant, la production de chaleur métabolique au cours de la FMS cause une augmentation importante de la température. L'élévation de la température dans les réacteurs de FMS s'explique par la faible teneur en eau, l'absence d'agitation et la faible conductivité thermique des matériaux biologiques (Lakhtar, 2009).

2.6.2.3.4. Le pH

Le pH est très difficile à homogénéiser et à contrôler en FMS. En effet, au cours de la culture, l'activité métabolique des souches va modifier le pH du milieu soit en l'acidifiant, par la production d'acides ou par l'absorption d'ions ammonium, soit en l'alcalinisant, par la libération d'ammoniac provenant de la dégradation de protéines, d'urée ou d'autres amines (Manpreet et *al.*, 2005). Les champignons filamenteux se développent bien dans des milieux acides et peuvent tolérer d'importants changements de pH (2,5 jusqu'à 7,5). Cependant le pH initial d'une culture doit être ajusté à son optimum par l'ajout d'une solution nutritive tamponnée (Saucedo-Castañeda, 1995).

2.6.2.3.5. Les applications de la FMS

Les applications des FMS pour la valorisation des sous-produits agro-industriels sont nombreuses et variées. Elle a été employée dans plusieurs domaines de recherche ; dépollution des sols, biodégradation de composés à risque, détoxification de résidus agro-industriels, biotransformation des cultures et de leurs résidus pour améliorer leurs qualités nutritionnelles. De même, la FMS a porté sur les procédés de Bio-raffineries (biogaz, bioéthanol) (Sukumaran et *al.*, 2005 ; Singhanian et *al.*, 2007), la fabrication des biocarburants. Aussi, la production d'hydrogène, d'acides organiques, d'éthanol et de biodiesel a été concrétisée avec succès en utilisant soit des substrats solides soit des supports solides (Hama et *al.*, 2007; Wu et *al.*, 2007; Jo et *al.*, 2008).

3. Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'étude des maladies de *Lens culinaris* et la mise en évidence de l'effet des agents de lutte biologique. Il a été mené au niveau de deux sites agricoles situés respectivement à Ain Smara et El Baâraouia (Figure 19), relevant de la wilaya de Constantine caractérisée par son altitude (694 mètre), un climat continental avec une précipitation moyenne annuelle de 500 mm, un taux d'humidité relative moyenne de 66.9% et par une température moyenne annuelle de 20°C. Par ailleurs, les données climatologiques de la région pour l'année agricole 2011/2012 sont collectées sur la base des données de l'office national de la météorologie. (ONM, 2012).

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) à Constantine et au Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI) en Belgique.

3.1. Matériel

3.1.1. Origine du matériel biologique et pédologique utilisé

Le matériel végétal (*Lentille* : *Lens culinaris*) et le sol utilisé au cours de nos différentes expérimentation proviennent de deux sites situées dans les localités de Ain Smara et El Baâraouia relevant (Figure 19) de la wilaya de Constantine. Par ailleurs des échantillons de lentille (Var. Métropole) nous ont été également et gracieusement fourni par la Société AXIUM pour certaines applications.

Les prélèvements des échantillons ont été effectués durant le mois d'Avril (pour le Sol), et la fin Mai (pour les Plantes) de l'année 2012. Par ailleurs, les données climatologiques de la région pour l'année agricole 2011/2012 sont collectées à partir des données de l'office national de la météorologie. (ONM, 2012).

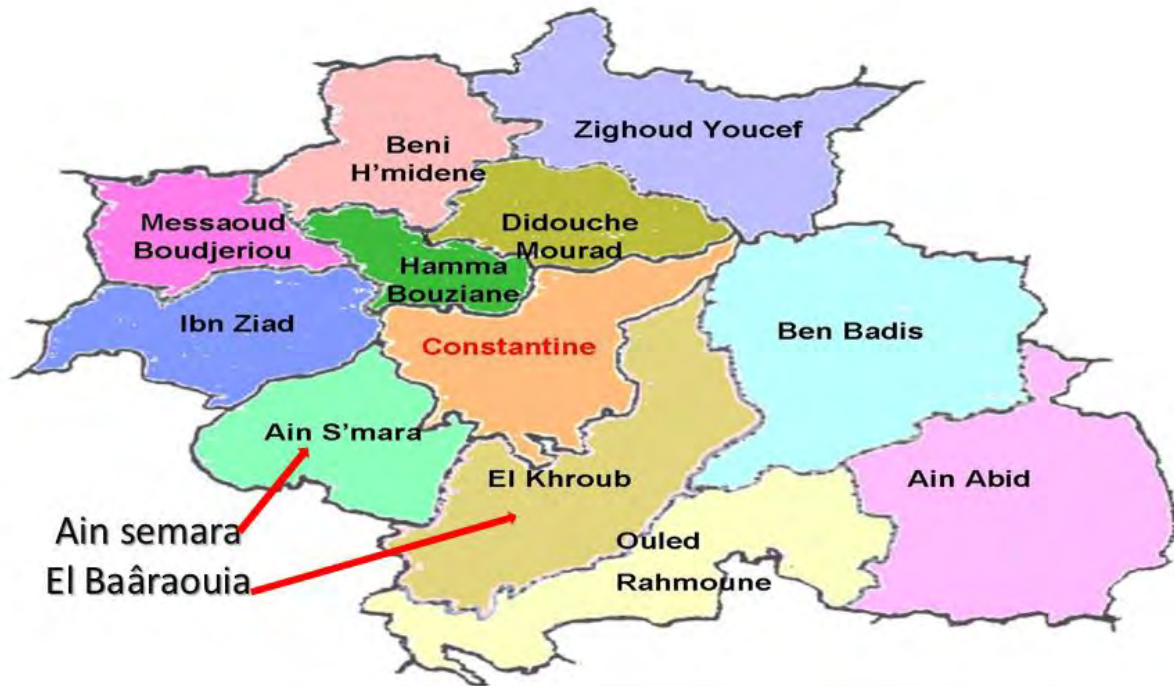


Figure 19 : Localité des sites d'étude : Ain Semara et El Baâraouia.

3.1.2. Microorganismes utilisés

3.1.2.1. Les souches pathogènes

Parmi l'ensemble des microorganismes que nous avons isolés, deux souches pathogènes ont été sélectionnés pour les besoins de notre l'étude, à savoir : *Cylindrosporium sp* et *Fusarium solani*.

- *Cylindrosporium sp* : c'est une espèce pathogène des parties aériennes des plantes (tige et feuilles). Elle a été isolée à partir des échantillons de plante de lentilles présentant des symptômes typiques de la Cylindrosporiose.
- *Fusarium solani* : le *F. solani* est un champignon pathogène des parties souterraines notamment (racines), mais peut également atteindre les parties aériennes des plantes (tiges et les feuilles). La souche de *F. solani* a été obtenue des différents fragments racinaires des lentilles atteintes par la Fusariose.

3.1.2.2. Les souches antagonistes

Les souches antagonistes (genre *Trichoderma*) utilisées dans les différents tests sont sélectionnées parmi les souches isolées à partir des sols agricoles prospectés des sites identifiés (Ain Semara et El Baâraouia).

3.1.3. Les milieux de culture utilisés (Annexes 1)

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés, au cours de nos différentes expérimentations. Pour toutes les manipulations réalisées, l'eau utilisée est de l'eau distillée, et tous les milieux autoclavés pendant 20 minutes à 121°C avant leurs utilisations.

3.1.3.1. Les milieux d'isolement

Pour l'isolement des mycètes du sol, le milieu Potato Dextrose Agar (PDA), a été choisi. Ce milieu est connu comme étant un milieu standard pour le développement des champignons.

Pour l'isolement des mycètes des différents fragments de la plante, en plus du PDA, nous avons utilisé le milieu spécifique Musharing et Skong (MS), dont la composition est proche de celle des végétaux.

3.1.3.2. Les milieux de purification

La purification des différents isolats a été effectuée sur plusieurs milieux de culture : le milieu Czapeck Dox, le milieu Sabouraud, le milieu gélose à l'extrait de malt (MEA) et le milieu Musharing et Skong (MS).

3.1.3.3. Les milieux pour étude de la compétition

Le milieu M2 a des différentes concentrations de glucose (de 0 g/L à 20 g/L), a servi de base pour l'évaluation de mécanisme de compétition pour la source de Carbone.

3.1.3.4. Les milieux de fermentation

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés en vue d'optimiser le procédé de fermentation pour les isolats de *Trichoderma*, en l'occurrence, le milieu PDA, le milieu M2 (Malt Extract Agar), le milieu KM (Kohlmeyer Medium), le milieu Sab (Sabouraud), et le milieu Czp (Czapeck-Dox).

3.1.4. Solutions utilisés (Annexes 2)

3.1.4.1. Solution d'identification

L'utilisation de la solution de Bleu de Coton de Lactophénol, à servi pour la visualisation et l'éclaircissement des caractères microscopiques (mycélium, spores.etc.) des isolats.

3.1.4.2. Solution de récupération des spores (SRS)

Une solution à base d'eau peptoné a été utilisée pour la récupération des spores dans les boite de Pétri.

3.1.4.3. Solution nutritive des plantes

La solution de Hoangland et Arno, composé principalement d'éléments minéraux, a été choisi pour arroser les plantes de lentilles durant les différents tests *In Planta*. Sa composition est détaillée dans la partie Annexes.

3.2. Méthodes

3.2.1. Méthodes d'échantillonnage

3.2.1.1. Echantillonnage des Plantes

Les échantillons de plantes sont pris de manière aléatoire (au nombre de cinq plantes/ site) dans les deux stations concernées. Différentes parties de plantes (Racines, tiges, feuilles) de lentilles présentant des symptômes typiques de maladies ont été prélevés dans sachets plastiques stériles puis ramenés au laboratoire pour analyse Mycologique (Tableau 3).

3.2.1.2. Echantillonnage du Sol

Les prélèvements de sol (au nombre de six prélèvements/ site) sont réalisés à l'aide d'une tarière tout en écartant la couche supérieure (Buhot, 1973 ; Mihail et Alcoren, 1987 ; Saadoune et Momani, 1997). Les sols prélevés (Tableau 3) sont ensuite recueillis dans des sacs en plastique stériles soigneusement fermés puis ramenés au laboratoire où ils subiront différents traitements : séchage à l'air ambiant ou à l'étuve à la température de 37°C, élimination des gros débris et

cailloux, tamisage et homogénéisation. Les analyses mycologiques sont effectuées dans les 24h qui suit l'échantillonnage (Mathieu et Pieltain, 2003 ; Rodriguez-Zarazoga et al. 2005).

La conservation des échantillons (sol) pour l'analyse physico-chimique, est effectuée à température ambiante pour une période maximale de six mois (Mathieu et Pieltain, 2003). Les analyses physico-chimiques, concernent notamment :

- Le Dosage d'Azote ;
- Le Dosage de Carbone ;
- Le Dosage de la matière organique ;
- La Conductivité Electrique (CE) ;
- Le pH.

Tableau 3 : Résumé des différents échantillons effectués.

| Type d'échantillons | Sites | |
|---------------------------|---|---|
| | A.Semara | E.Baâraouia |
| Plantes (Lentille) | Racines. Tiges. Feuilles. | Racines. Tiges. Feuilles. |
| Sol | 5 cm /Prof. 10 cm/Prof. 15 cm/Prof. | 5 cm /Prof. 10 cm/Prof. 15 cm/Prof. |

3.2.2. Méthodes d'isolement

3.2.2.1. Isolement des Plantes

Les plantes infectées collectées des sites prospectés (Ain Semara et El Baâraouia), ont été découpées en petites pièces d'environ 0.5 cm. Les pièces obtenues sont désinfectées à l'hypochlorite de potassium à 2% pendant 3 min, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile et séchées entre du papier filtre stérile puis, placées dans des boites de Pétri (5 pièces/boite) contenant le milieu PDA ou bien le milieu Musharing et Skong (MS). En fin, les boites sont incubées à 25-30°C pendant sept jours (Belabid et al. 2000).

Par ailleurs le taux de présence de chaque genre fongique isolé (sol ou plantes) est calculé selon la formule suivante :

$$G = (N_x / N_0) \times 100$$

Où :

G : Taux de présence (%) ;

N_x : Nombre des colonies isolées du même genre ;

N₀ : Nombre total des colonies isolées.

3.2.2.2. Isolement du Sol

L'isolement des mycètes à partir du sol, est réalisé selon la méthode de suspension dilution « Dilution plates » (Davet, 1996 ; Davet and Rouxel, 1997) sur le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA)

10 g d'échantillon de sol sont mis en suspension dans 90 mL d'eau distillée stérile. Le mélange est agité pendant 30 minutes afin d'homogénéiser la solution qui sert à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1 mL de la solution à 9 mL d'eau distillée stérile jusqu'à l'obtention de la dilution 10⁻⁶ (Figure 20), ensuite, un volume de 0.1 mL de chaque dilution est déposé dans une boîte de Pétri contenant l'un des milieux de culture cité précédemment. Les boîtes sont homogénéisées, par agitation manuelle de manière circulaire, sur un plan horizontal.

Les boîtes sont incubées à 25-30°C pendant sept jours (Botton *et al.* 1990). Par ailleurs, d'autres boîtes contenant les mêmes milieux de culture sontensemencées par des grains de sol sans passer par la suspension et les dilutions.

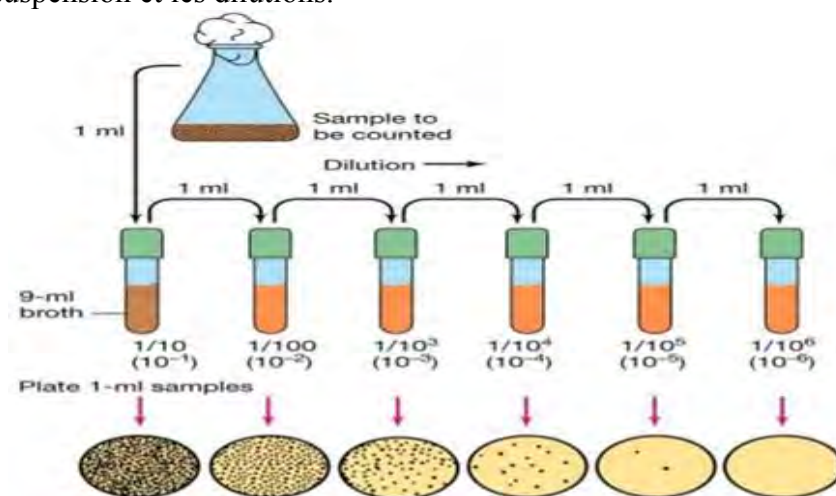


Figure 20 : Méthode de suspension dilution.

3.2.3. Méthodes purification

La purification a concerné principalement les colonies dont les caractères cultureux sont différents. Il s'agit donc de prélever quelques spores ou une petite bouture mycélienne à la marge du thalle et de l'ensemencer de manière aseptique dans des boîtes de Pétri contenant l'un des milieux suivant : PDA, Sabouraud, Czapeck Dox, MEA ou bien le milieu MS. Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte (Botton et *al.*, 1990).

3.2.4. Méthodes d'identification

3.2.4.1. Identification macroscopique

L'examen macroscopique des souches isolées, permet de déterminer les caractères cultureux suivants : la croissance et le développement du champignon, le diamètre de la colonie, sa texture, la couleur du thalle, la couleur du revers ainsi que son odeur (Harrigan et Mc Cance, 1976 ; Rinaldi et *al.*, 1998 ; Botton et *al.*, 1990).

3.2.4.2. Identification microscopique

L'observation microscopique s'effectue sur un petit fragment mycélien soigneusement prélevé à la marge du thalle à l'aide d'une Anse de Platine stérile. Le fragment prélevé est ensuite coloré avec de Lactophénole Bleu de Cotton (Packer et Thomas, 1990), ce qui permet ainsi de détecter la présence et la nature du mycelium, la présence ou l'absence du septum, les caractéristiques des fructifications et spores etc. (Samson et *al.*, 1988 ; Hawksworth et *al.*, 1994 ; Hoogand, 1995 ; Gams et *al.*, 1998).

3.2.4.3. Identification moléculaire des souches antagonistes utilisées

L'identification moléculaire des souches antagonistes utilisées dans notre travail a été effectuée à l'ULC (Université Catholique de Louvain-la-Neuve Belgique-). Celle-ci a été réalisée sur la base du séquençage du segment du gène Tef 1- α de l'ADN des deux souches de *Trichoderma* isolées. Par la suite, les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences référentielles déposées dans les bases de données publiques.

3.2.5. Méthodes de conservation

Plusieurs méthodes de conservation des souches ont été employées, elles sont regroupées en deux types :

3.2.5.1. Conservation de courte durée

- Les souches issues de purification sur boîtes de Pétri, sont conservées à une température ambiante du laboratoire pendant une période allant de deux à quatre semaine. ;
- Les souches purifiées ont été cultivées pendant une semaine sur gélose inclinée (PDA) et conservées à - 4° C pendant une période allant jusqu'à six mois.

3.2.5.2. Conservation de longue durée

- Les souches obtenues d'isolements ont été mise dans des micros billes pour une conservation de plusieurs années ;
- Les souches à intérêt obtenus suite aux purifications ont été lyophilisées dans un lyophilisateur.

3.2.6. Analyse Physico-chimique

L'analyse physico-chimique des échantillons du sol a été réalisé au niveau du Laboratoire de Chimie des Sols, « Agence National des Ressources Hydrauliques », Antenne Régionale EST, Constantine (zone industrielle Palma Constantine). Elles concernent notamment :

- Le Dosage d'Azote ;
- Le Dosage du Carbone ;
- Dosage de la matière organique ;
- Conductivité Electrique (CE) ;
- pH.

3.2.6.1. Dosage de l'Azote

Le dosage de l'azote est basé sur la réaction de Berthelot modifiée par Benlarache (2013). La technique consiste à additionner dans des tubes à essais une solution de 2.5 mL d'un mélange d'une « solution de digestion », composée : de 10.8 g d'Acide Salicylique, de 150 mL d'Acide Sulfurique additionné de Sélénium, à 0.4 g du sol préalablement broyé (0.2 mm).

Après agitation et un repos de 2h, les tubes contenant le mélange sont placés dans deux paniers dans un « digesteur » à une température de 100° C pendant 40 min pour le premier panier et 120 min pour le second panier.

Après attaque de l'azote par le « digesteur » et le refroidissement des tubes, 1 mL d'eau oxygéné (H_2O_2) à 30% est rajouté et suivie par une agitation. L'opération est répétée 11 à 12 fois, puis les tubes sont placés de nouveau dans le « digesteur » à 330° C pendant 2 h.

La digestion est arrêtée lorsque la solution devient transparente. Après refroidissement des tubes le volume est complété jusqu'au 75 mL par de l'eau distillée puis filtré.

Enfin, une analyse spectrophotométrique est réalisée à une longueur d'onde de 660 nm (Krom, 1980 ; Searle, 1984 ; EN ISO 11732 ; Benlarache, 2013).

3.2.6.2. Dosage du Carbone et de la matière organique

La matière organique est estimée à partir du carbone organique déterminé par la méthode de Walkley et Black (1934) décrite par Nelson et Sommers (1982). Cette technique ne peut être utilisée si les sols contiennent plus de 20% de matière organique (Anonyme 3, 2013). La technique consiste à oxyder 1g de sol en présence de 20 mL d'acide sulfurique et 10 mL de bichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$. Après agitation puis un repos de 30 minutes, la réaction est arrêtée avec 200 mL d'eau distillé, additionné de 10 mL de chlorure de baryum $BaCl_2$ et 5 mL d'acide orthophosphorique H_3PO_4 .

L'excès de bichromate de potassium est titré par le sulfate ferreux $FeSO_4$ (0.5N) en présence de quelques gouttes de diphénylamine jusqu'à l'obtention d'une couleur vert-clair. En fin, la mesure du carbone est réalisée par calorimétrie à la longueur d'onde de 590 nm (Benlarache, 2013).

La quantité de la matière organique est exprimée en % de matière organique ou de carbone organique (CO) selon l'équation suivante :

$$\text{MO (\%)} = \text{C (\%)} \times 1.72.$$

Où :

MO : Matière organique ;
C : Taux de Carbone ;
1.72 : Coefficient de valeur.

3.2.6.3. Conductivité électrique

La conductivité électrique donne une indication sur la teneur en électrolytes hydrosolubles (salinité). Son dosage, consiste à humecter 100 g de sol (2 mm) avec de l'eau distillée bouillie. Le mélange est malaxé jusqu'à avoir une pâte brillante, plus ou moins coulante ; celle-ci est ensuite centrifugée à 300 tours/min pendant 30 minutes. Le surnageant obtenu est recueilli dans des petits piluliers. La résistance est mesurée après correction de la température à 25° C, à l'aide d'un conductimètre. Le calcul de la conductivité est donné par la formule suivante (Anonyme 4, 1954) :

$$C_{25^\circ} = \frac{A}{KR}$$

Où :

A : Coefficient de correction de la température ;
K : Constante de cellule ;
R : Résistance affichée.

3.2.6.4. pH

Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre à électrode en verre. La méthode repose sur la préparation d'une solution (suspension diluée) de 10 g de sol et 25 mL d'eau distillé et après une agitation magnétique, le pH est mesuré à la température ambiante (Boudoudou et *al.* 2009).

3.2.7. Les tests d'antagonisme

3.2.7.1. Méthode de confrontation directe

3.2.7.1.1. Principe

La confrontation directe (ou test des métabolites diffusibles) est réalisée selon la technique décrite par Lundberg et Unestan (1971), et Dennis et Webster (1980).

Cette technique consiste à déposer sur la même boîte de Pétri contenant 15 mL de milieu (PDA), deux pastilles gélosées d'environ 6 mm, l'une portant la souche antagoniste à tester, (*Trichoderma harzianum*) et l'autre l'agent pathogène impliqué (*Fusarium solani* ou *Cylindrosporium sp*) suivant un axe diamétrale de 5 cm. L'incubation est réalisée à $28 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant une semaine (Figure 21).

La comparaison se fait alors par rapport à une boîte témoin en absence d'antagoniste.

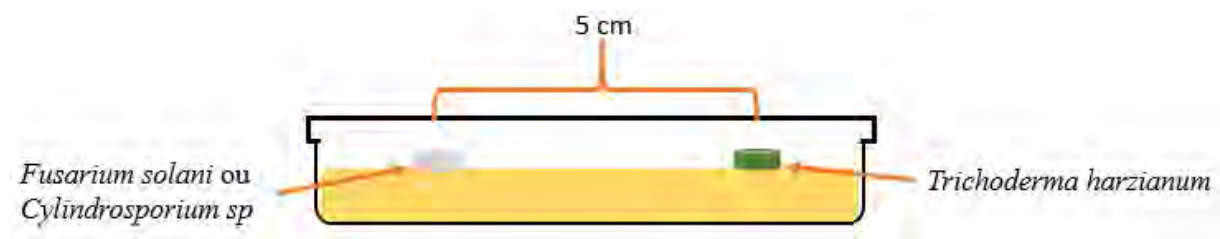


Figure 21 : Présentation schématique de la confrontation directe.

3.2.7.1.2. Evaluation du pourcentage d'inhibition

L'évaluation de l'inhibition exercée par *Trichoderma harzianum* est estimée par un pourcentage (%), calculé selon la formule proposée par Sy (1976) (Vincent, 1990) :

$$\text{IC}\% = \left(\frac{\text{DT} - \text{DPA}}{\text{DT}} \right) \times 100$$

Où :

DT : Croissance diamétrale du témoin ;

DPA : Croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste ;

IC%: Inhibition de la croissance.

3.2.7.2. Méthode de confrontation indirecte

3.2.7.2.1. Principe

Cette méthode est appelée également technique des « métabolites volatiles ». Le principe utilisé dans cette méthode repose sur la technique utilisée par Comporta (1985). Elle consiste à déposer les deux pastilles gélosées (comme dans la technique précédente), dans deux boîtes de Pétri différentes, contenant chacune 15 mL du milieu PDA. Les deux boîtes sont ensuite reliées de manière superposée par un Para film dans des conditions aseptiques. L'incubation se fait aussi à $28 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant une semaine (Figure 22).

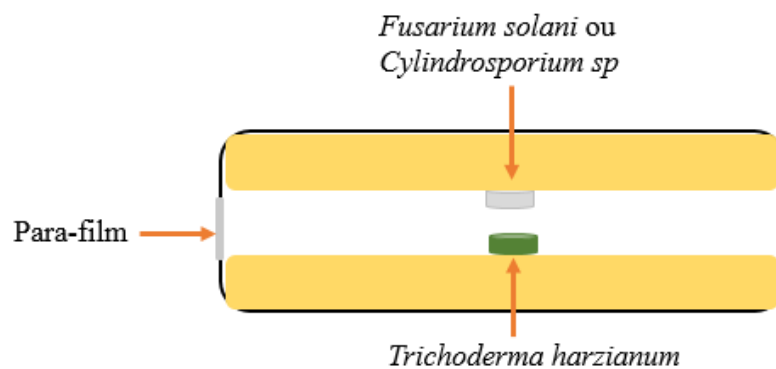


Figure 22 : Présentation schématique de la confrontation indirecte.

3.2.7.2.2. Evaluation du pourcentage d'inhibition

La notation du diamètre moyen des colonies traitées a été réalisée tous les jours pendant 7 jours (Hmouni *et al.*, 1996). L'évaluation de l'inhibition exercée par *Trichoderma harzianum* est également estimée par la formule de Sy (1976) (Vincent, 1990).

3.2.8. Etude de la compétition pour le Glucose

3.2.8.1. Principe

L'étude de la compétition pour la source de carbone *In Vitro*, a été réalisée par l'utilisation d'une méthode non destructive développée par Janisiewicz *et al.* (2000). Le dispositif de cette technique est constitué de plaques de cultures cellulaires à 24 puits (TC-tests plats) et d'inserts cylindriques (BD Falcon Cell Culture Inserts) dont la partie inférieure est attachée à une membrane à filtre de $0,4 \mu\text{m}$ de porosité. Ce type de système permet une séparation physique

de l'antagoniste et du pathogène avec un échange des éléments nutritifs et des métabolites produits dans le milieu (Krimi Bencheqroun, 2009).

Dans cette méthode l'effet de *Trichoderma harzianum* (127a et 127b) sur la germination des conidies de *Fusarium solani* et *Cylindrosporium sp* a été étudié, dans des milieux de culture à base d'extrait de malt additionné de glucose à des concentrations croissantes (0, 5, 10, 15 et 20 g/L). En effet, les suspensions préparées dans les milieux (M2, M0, M5, M10, M15 et M20), contenant *T. harzianum* (127a / 127b) à concentration de 10^7 UFC/mL, ont été déposées dans les plaques de culture à raison de 600 μ L/ puits. Ensuite, les inserts contenant séparément 400 μ L/ insert de suspensions de *F. solani* et de *C. sp* à raison de 10^5 UFC/mL ont été déposées à l'intérieur des puits des plaques de culture (Figure 23). Les témoins sont représentés par des cultures de pathogènes seuls avec les mêmes concentrations de milieu de culture. L'incubation des plaques et les inserts été effectué à $28 \pm 2^\circ$ C à l'obscurité, sous agitation à 80 rpm pendant 24 h.

Après l'incubation, les inserts ont été enlevés des puits et égouttés sur un papier absorbant stérile. La membrane de chaque insert a été coupée soigneusement à l'aide d'un scalpel et transférée sur une lame de microscope avec une goutte du colorant Bleu de Coton de Lactophénol pour examen microscopique.

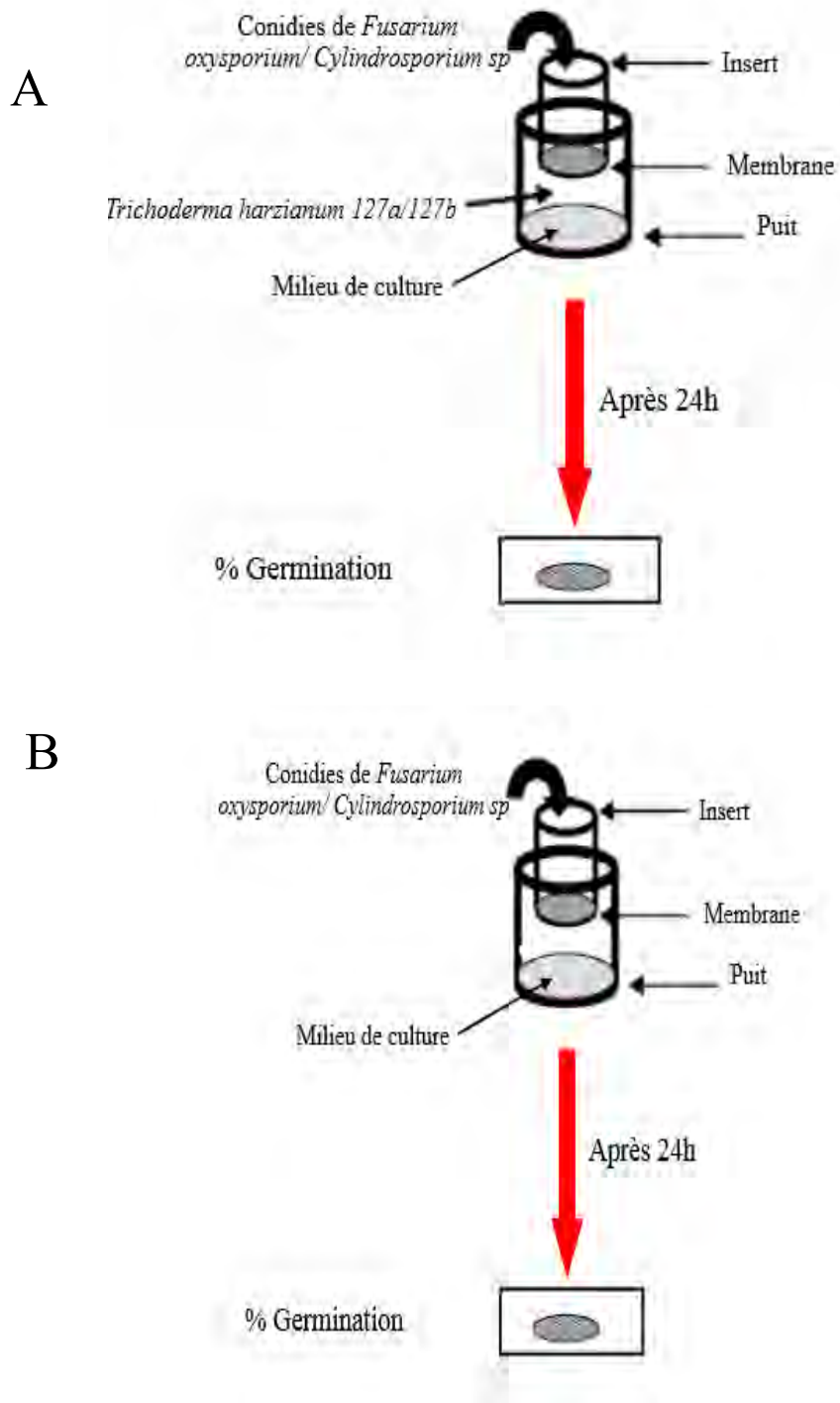


Figure 23 : Présentation du test *In Vitro* pour l'étude de la compétition pour la source de carbone en présence du contrôle biologique (**A**) et en absence du contrôle biologique (**B**).

3.2.8.2. Evaluation de la germination

Dans ce cas l'évaluation de l'effet des souches de *T. harzianum*, se fait par comparaison du taux de germination de conidies de chaque cas avec les témoins correspondants. Les conidies germées ont été quantifiées parmi un échantillon de 100 conidies et l'élongation du tube germinatif des conidies est évaluée selon une échelle de germination (Annexe 4), ci-après :

- (1) pas de germination ;
- (2) tube germinatif <4x taille de la conidie ;
- (3) tube germinatif >4x taille de la conidie.

3.2.9. Méthodes de fermentation (production des spores)

3.2.9.1. Principe et concept générale de la production

Harman et *al.* (1991) ont rapporté que la production de l'agent de control *Trichoderma harzianum* sous forme de conidies « spores » est plus performante que la production des « métabolites secondaires », dans la lutte contre les champignons pathogènes transmis par le Sol. De ce fait, nous avons orienté le choix de nos travaux particulièrement, sur la production des *spores* de nos souches de *Trichoderma harzianum 127a* et *T-127b*. La production des spores a été effectuée sous deux modes de fermentation différentes : la première en milieu liquide et la seconde est de consistance solide.

3.2.9.2. Fermentation liquide

3.2.9.2.1. Optimisation de la fermentation

Quatre paramètres ont été ciblés pour l'optimisation à savoir : la nature du milieu de culture, Concentration du Glucose, le pH et la température.

➤ Choix du milieu de culture

Cinq milieux de culture ont été testés pour le choix du milieu le plus adapté au développement et à la croissance des souches de *Trichoderma* (T-127a et T-127b) utilisées pour les besoins de l'étude : le milieu Potato Dextros Agar (PDA), le Malt Extract Agar (M2), le Kohlmeyer Mediu (KM), le Sabouraud (Sab), et le Czapeck-Dox (Czp).

Les repiquages sont effectués à partir de cultures âgées d'une semaine, à raison de deux répétitions par boîte. L'incubation est effectuée à $28 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant une semaine.

➤ Concentration du Glucose

Le Glucose forme une source d'énergie et de Carbone à la fois pour les microorganismes. De ce fait, il est important de connaître la concentration nécessaire à apporter dans un milieu de culture selon l'espèce mise en étude. En effet, la concentration en glucose a été étudiée ont élaborant des mini fermentations.

Des prélèvements (disques de 2mm de diamètre) pris sur des cultures de *Trichoderma* (*T-127a* et *T-127ba*), sont mis dans des ErlensMayer contenant 50 mL du milieu a une concentration connue de glucose (0, 5, 10, 15 ou 20 g/L) puis mis à incuber à $28 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant une semaine sur une plaque agitante de type Schüttelmaschine RO 20 (Gerharat).

Un suivi quotidien de la matière sèche a été effectué, en mesurant le poids de la biomasse initiale et celui de la biomasse après séchage à 105°C pendant 48h. Le calcul de la matière sèche se fait selon la formule suivante (Afnor, 1986) :

$$MS = (M2 - M1) - (100/V) \text{ mg/L}$$

Où :

M1 : Masse en gramme de la capsule vide (contenant l'échantillon) ;

M2 : Masse en gramme de la capsule et du résidu ;

V : Volume de l'échantillon en mL (50 mL).

➤ Optimisation du pH

Dans le but de déterminer le pH optimum, pour la production des spores de *Trichoderma harzianum*, un milieu de culture (M2) a été préparé à des différents pH (3), (5), (7), (9) et (11). Le procédé de fermentation ainsi que le suivie du pH a été effectué comme décrit précédemment (voir : Concentration de Glucose).

➤ Optimisation de la température

La température joue un rôle important dans la croissance et le développement des microorganismes, ainsi, il est important de définir l'intervalle de croissance d'un microorganisme donné. Pour cela, des mini fermentations ont été réalisées comme précédemment (voir : Concentration du Glucose). Aussi, l'incubation est réalisée à des températures variantes : 4, 25, 30, 37 et 55°C (Pham *et al.*, 2010).

3.2.9.2.2. Préparation de l'inoculum et la pré-culture

Les souches de *Trichoderma harzianum* (T127a et T-127b) ont été cultivées pendant 15 jours à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en boîtes de Pétri contenant le milieu M2. Après la période d'incubation, un aliquote de 10 mL d'eau distillé stérile est ajouté à chaque boîte de Pétri. Le mycélium est ensuite raclé à l'aide d'une spatule stérile jusqu'à la libération totale du mycélium. La suspension obtenue est filtrée. Le filtrat obtenu est ajusté à 10^5 UFC/mL à l'aide d'une cellule de Bürker (Niranjana *et al.* 2009). La suspension est ensuite introduite dans un Erlen Mayer, contenant 500 mL de milieu M2 et incubée sous agitation à 80 rpm, à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 h, avant d'être introduite dans le fermenteur (Pedreschi *et al.* 1997).

3.2.9.2.3. Conditions de fermentation

La production de la biomasse de nos souches de *Trichoderma harzianum* a été réalisée dans un fermenteur de 20 L (Figure 24), au sein du Laboratoire de Biologie Industriel du Centre Wallon en -Belgique-. Ce fermenteur est équipé par plusieurs sondes (pH, Température, aération etc.), permettant le maintien des conditions stables pour la fermentation (Jost Weber et Agblevor, 2004).

500 mL de pré-culture sont introduites dans le bioréacteur qui est maintenu pendant sept jours à une température de 30°C , un pH 5, une vapeur de 15 psi, une aération de 1 vvm et une agitation de 300 ou 500 rpm selon le régime de la fermentation (Felse et Panda, 2000 ; Syahiddin Dahlan, 2007).



Figure 24 : Présentation du fermenteur 20 L. Centre Wallon de Biologie Industriel Gembloux -Agro Biotch- « Belgique ».

II.2.9.2.4. Paramètres de contrôles

➤ Mesure et suivie de la concentration des sucres

La concentration des sucres a été suivie chaque 24 h, pendant les premiers et les derniers jours en utilisant un glucomètre de type YSI MODEL 2700 SELECT.

➤ Mesure et suivie de la DO

La Densité Optique à l'intérieur du fermenteur a été prise régulièrement après un prélèvement délicat dans des conditions aseptiques. La DO est mesuré grâce à un spectrophotomètre de marque VWR® V-1200 Spectrophotometer.

➤ Quantification des spores

La quantification de spores indicatrices de l'état de croissance du microorganisme est réalisée à chaque prélèvement du fermenteur par la méthode classique en utilisant la cellule de Bürker. En effet un volume de 10 mL prélevé du fermenteur est vortexé pendant 2 min avant d'être filtré à travers un papier Wattman N°1 (Pitt and Poole, 1981). Une quantité de filtrat d'environ 0.1 mL est transféré sur la cellule de Bürker et le nombre des spores est calculé dans 10 carrés. Le calcul de la concentration se fait comme suit :

$$N = (m \times D) / 4.10^{-6}$$

Où :

N : Concentration sporale (UFC/mL).

m : Moyenne du nombre des spores dans 10 carrés.

D : Facteur de dilution.

3.2.9.3. Fermentation sur support solide

Du son du Blé a servi comme support pour la multiplication et production des spores de *Trichoderma harzianum 1127a* et *127b*. Cette fermentation a été menée dans des barquettes en Aluminium stérile.

3.2.9.3.1. Préparation du Son du Blé

Le « son de Blé » est un substrat carboné, riche en cellulose, provenant des fragmentations des caryopses de blés (résidu agro-alimentaires). En effet, avant son utilisation, le « son de blé » a subi un traitement thermique par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

3.2.9.3.2. Préparation de l'inoculum et inoculation

La préparation de l'inoculum pour la fermentation sur support solide, a lieu directement à la fin de la fermentation liquide. En effet, à la fin du procédé fermentatif du bioréacteur, le contenu de ce dernier a été vidé dans des conditions aseptiques dans des Erlèns Mayer stérilisés de 3 L, qui sont ensuite transférés sous une hôte biologique et leurs contenus filtrés à travers du papier Wattman N°1 stérile. La biomasse obtenue suite au procédé de filtration a été mesurée et additionnée à un poids égal de son du Blé. L'ensemble biomasse et son du Blé a été bien mélangé avec une cuillère stérile et repesé de nouveau. Enfin les barquettes ainsi préparées ont été couvertes par du papier Aluminium stérile et incubées à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à la maturation des spores et séchage du son de Blé.

3.2.9.3.3. Paramètres de contrôles

➤ Mesure et suivie du Poids

Le poids du mélange Biomasse et « son du Blé » a été suivi quotidiennement par simples pesées en balance ordinaire. Cette étape clé de la fermentation solide nous renseigne sur le développement du champignon.

➤ Mesure et suivie de l'humidité

L'humidité, facteur essentiel de la croissance mycélienne est un indicateur parfait de la sporulation. L'humidité est mesurée par prises de poids d'une quantité donnée de mélange Biomasse et son du Blé avant et après un séchage de 24 h à 105°C. Le taux d'humidité se calcule selon la formule suivante :

$$H (\%) = (P2/P1) \times 100$$

Où :

H : Pourcentage d'humidité ;

P1 : Poids pris avant séchage ;

P2 : Poids pris après séchage à 105°C.

➤ Quantification des spores

La connaissance de la concentration sporale est indispensable pour la production des spores. L'augmentation de ce paramètre est un indicateur d'une bonne fermentation.

3.2.9.3.4. Purification des spores

La purification des spores des souches de *Trichoderma harzianum 127a* et *T-127b* à partir du support son du Blé, a été faite suivant une technologie qui reste une confidentialité du Laboratoire de Biologie Industriel Agro-biotech (Gembloux) et la société Artechno (Belgique).

3.2.10. Evaluation de l'effet des produits obtenus

L'efficacité et la fiabilité des bio fongicides *T-127a* et *T-127b*, obtenus par voie fermentative a été testée *In Planta*. Les tests effectués ont consternés les paramètres liés à la physiologie, le développement et fonctionnement de la plante modèle *Lens culinaris*.

3.2.10.1. Culture en terreau des lentilles

Culture des plantes testées : Lentilles « *Lens culinaris* ». Les plantes qui ont servi aux tests *In Planta* sont obtenues après quelques étapes de préparation.

Avant leur semis en pots sur un support de terreau, les graines de lentilles vont subir une stérilisation à l'hypochlorite de calcium à 5 % pendant 10 minutes, suivie par un lavage à l'eau distillé stérile (Belabid et al., 2000). Ces semences qui seront partagées en deux lots vont subir pour une partie un traitement à l'inoculum (*T-127a/T-127b*) dans lequel elle sera plongée pendant 10 minutes, alors que l' autre partie est trempée dans 30 millilitres d'eau distillée stérile pendant 10 minutes et servira pour les futures plantes témoins. Les graines ainsi traitées sont mises à pré-germer pendant cinq jours dans du papier filtre imbibé d'eau stérile. Les graines germées ayant donné des plantules de tailles identiques, sont choisies puis cultivées dans des pots contenant chacun 500 g de terreau stérile a raison de 15 graines / pot.

Remarque : Les solutions de contaminations préparé (15 mL) à partir de *Fusarium solani* et *Cylindrosporium sp*, ont servis à humidifié le terreau au moment du semis des plantules traités.

Les pots préparés sont placés dans une serre contrôlée (Berber et al., 2009), et les plantes maintenues sous humidité par arrosage ,chaque deux jours à l'aide de la solution nutritive de Hoagland et Arnon (1950).

Au stade deux feuilles (environ dix jours), les plantes subissent un deuxième traitement avec respectivement les antagonistes « T-127a et T-127b » à raison de 15mL, d'une suspension concentrée à 2.10^7 UFC/mL. Les plantes témoins ne subissent pas de traitement par contre elles sont arrosées par une solution nutritive de Hoagland et Arnon.

3.2.10.2. Evaluation de la maladie

La maladie est évaluée par dénombrement des lésions nécrotiques sur les parties concernées (racine, tige, feuille). Une lecture se fait quotidiennement (dès le jour d'infection), en relevant pour chaque isolat les symptômes correspondant sur la plante, jusqu'à la mort totale.

Pour vérifier l'implication de *F. solani* et *C. sp* dans l'infection, un ré isolement a été effectué à partir des lésions correspondant à chaque pathogène. Les champignons obtenus sur PDA sont comparées à leurs cultures mères. Par ailleurs d'autres paramètres tels ; le nombre de feuilles, la longueur des tiges et la longueur de racines ont été pris en considération.

3.2.10.3. Evaluation des paramètres physiologiques

➤ Teneur relative en Eau

La teneur relative en eau a été déterminée par la méthode décrite par Barrs, (1968). Selon cette méthode, les feuilles sont coupées à la base du limbe, elles sont pesées immédiatement pour obtenir leur poids frais (PF) ; ensuite, ces feuilles sont introduites dans des tubes à essai remplis d'eau distillée et placées à l'obscurité dans un endroit frais (4°C) pendant 24h. Les feuilles retirées, sont séchées sur du papier Buvar d puis repesées pour obtenir le poids de la pleine turgescence (PPT).

Les échantillons sont enfin mis à l'étuve à 80°C pendant 48 h puis pesés pour avoir leurs poids sec (PS). La teneur relative en eau est calculée par la formule proposée par Clark et Mac-Caig, (1982) :

$$\text{TRE \%} = [(\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PPT} - \text{PS})] \times 100$$

Où :

TRE : Teneur relative en eau ;

PF : Poids frais ;

PS : Poids sec ;

PPT : Poids de la pleine turgescence.

➤ Teneur en Chlorophylle

La teneur en Chlorophylle est déterminée par la méthode d'Arnon (1949). Dans cette méthode, 50mg de feuille prélevés sur les tiers médians des plus jeunes feuilles, sont broyés en présence de Carbonate de Calcium (CaCO₃) et d'acétone à 80 % (pour neutraliser l'acidité du suc vacuolaire) Le broyage est répété plusieurs fois afin d'extraire la totalité des pigments chlorophylliens. L'extrait obtenu est filtré à travers un papier Wattman n°1 et la densité optique de la totalité des filtrats obtenus est mesurée à 663 et 645 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration en chlorophylle totale (Chlorophylles A et B) est exprimée en mg/g MF qui est donnée par la formule suivante :

$$\text{Chl (a+b) mg/L} = 20, 2 (\text{D.O. 645}) + 8, 02 (\text{D.O.663})$$

Où :

Chl : Chlorophylle,
D.O : Densité optique.

3.2.10.4. Evaluation des paramètres chimiques

➤ Teneur en Proline

La méthode utilisée est celle proposée par Monneveux et Nemmar (1986), 100 mg de matière fraîche sont immédiatement pesés puis placés dans un tube à essai. Un volume de 5 mL de Méthanol à 40 % est ajouté à l'échantillon et le tout est chauffé, pendant 1 h, dans un bain-marie à 85 °C. Après refroidissement, 1 mL de la solution d'extraction est ajouté à 1 mL d'acide acétique, 25 mg de Ninhydrine et 1 mL du mélange eau distillée Acide acétique Acide-orthophosphorique de densité 1,7 (120, 300, 80 : v /v/ v). La solution préparée, est portée à ébullition pendant 30 mn au Bain-Marie, puis refroidie et additionnée de 5 mL de Toluène. Après agitation au vortex, deux phases se séparent, une phase supérieure (contient la proline) qui a été récupérée et sa densité optique déterminée à 528 nm.

Les valeurs obtenues après dosage au spectrophotomètre sont comparées aux valeurs exprimées par une courbe d'étalonnage (Figure 25) préparée à partir des solutions de L-Proline allant de 0 à 1.2 mg/mL de. Les teneurs en Proline sont exprimées en mg/g MF.

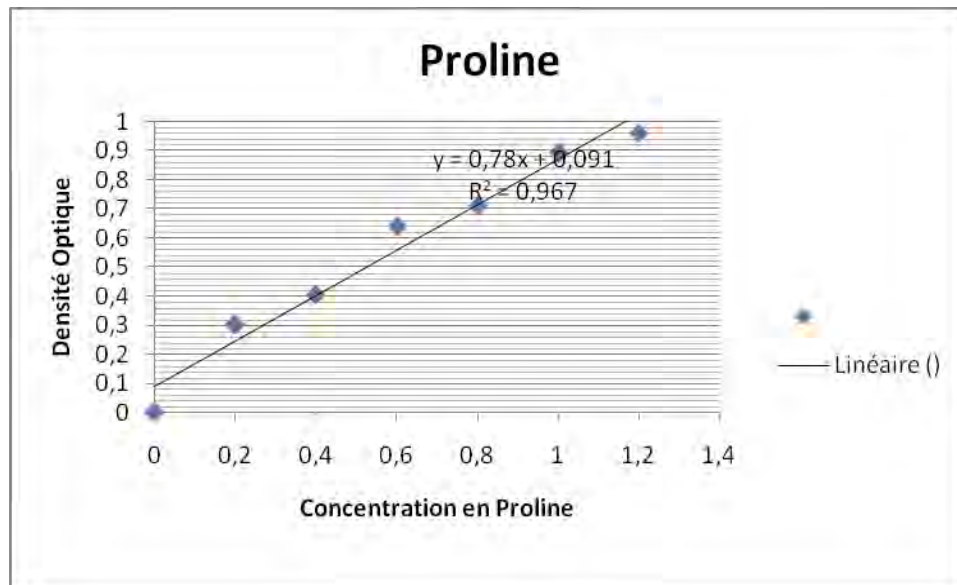


Figure 25 : Courbe d'étalonnage du dosage du Proline.

➤ Teneur en sucres solubles

La méthode utilisée est celle décrite par Dubois et *al.* (1956) 100 mg, de matière végétale fraîche, sont macérés dans 3 mL d'Ethanol à 80% pendant 48 h à une température ambiante pour extraire les sucres. Ensuite, l'Alcool est évaporé dans une étuve à 80°C et un volume de 20 mL d'eau distillée a été additionné à l'extrait qui constitue la solution à analyser. Par ailleurs, 5 mL de phénol (5%) et 5 mL d'Acide sulfurique concentré (96%) sont ajoutés à 1 mL de la solution à analyser qui vire à la couleur jaune orange. Celle-ci est ensuite homogénéisée au Vortex pendant 1mn

La concentration en sucres solubles est déterminée par dosage au Spectrophotomètre à une longueur d'ondes de 490 nm. Enfin les résultats des densités optiques ont été comparés sur une courbe d'étalonnage (Figure 26) des sucres solubles (exprimés en Glucose).

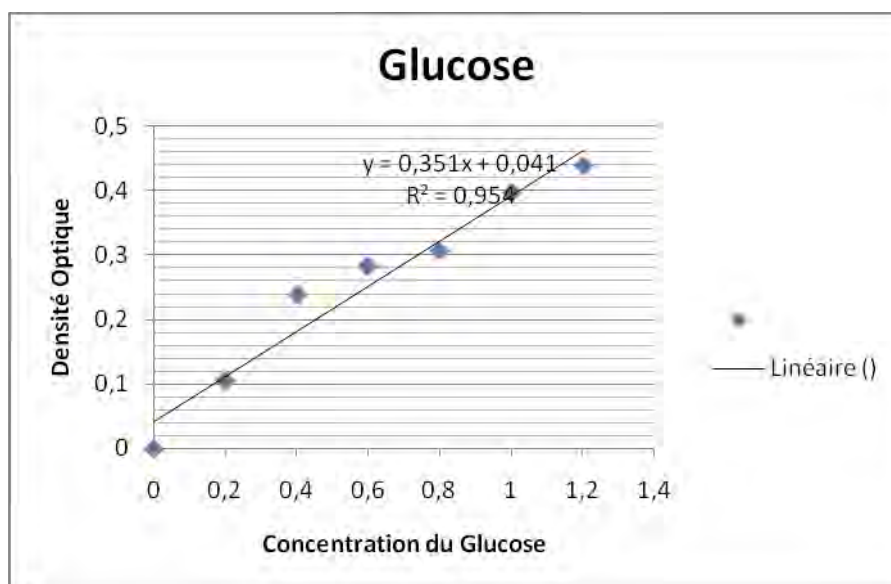


Figure 26 : Courbe d'étalonnage du dosage du Glucose.

4. Résultats et interprétation

Le travail qui suit, porte sur l'évaluation de l'effet fongicide de deux souches du genre *Trichoderma* vis-à-vis de deux pathogènes (*Fusarium solani* et *Cylindrosporium sp.*) sélectionnés parmi la gamme de champignons inféodés à la culture de lentille « *Lens culinaris* » et isolés dans la région de Constantine.

4.1. Prospections et observations

Des prospections ont été réalisées sur plusieurs champs dans la région de Constantine notamment au niveau de deux sites (Ain Semara et El Baâraouia) pré identifiés pour leur cultures de lentilles « *Lens culinaris* ». Les premières observations effectuées à l'œil nue montraient que les champs visités avaient subis une forte attaque de rouille .En effet les examens effectués sur place sur les cultures à l'aide d'une loupe manuelle montraient que les plantes portaient de nombreuses pustules marrons qui éclatent au contact de la main sous forme d'une poudre (spores) de couleur rouille salissante. D'autres symptômes (Figure 27), ont été également observés portant principalement sur la présence de taches grisâtres ovales entourées d'un halo blanchâtre sur les tiges et les feuilles de dimensions plus petites, en nombre inférieur, par rapport à d'autres plantes normales (saines). Par ailleurs les examens effectués sur les plantes récoltées et portant le syndrome de la maladie précédemment décrit, présentaient un système racinaire plus réduit de taille et de nombre de racines secondaires, en comparaisant avec les plantes saines et vigoureuses .Tous ces symptômes observés, laissent supposer que nous sommes en présence de deux maladies connues (*Fusariose* et *Cylindrosporiose*) comme pouvant affecter les cultures de lentilles.

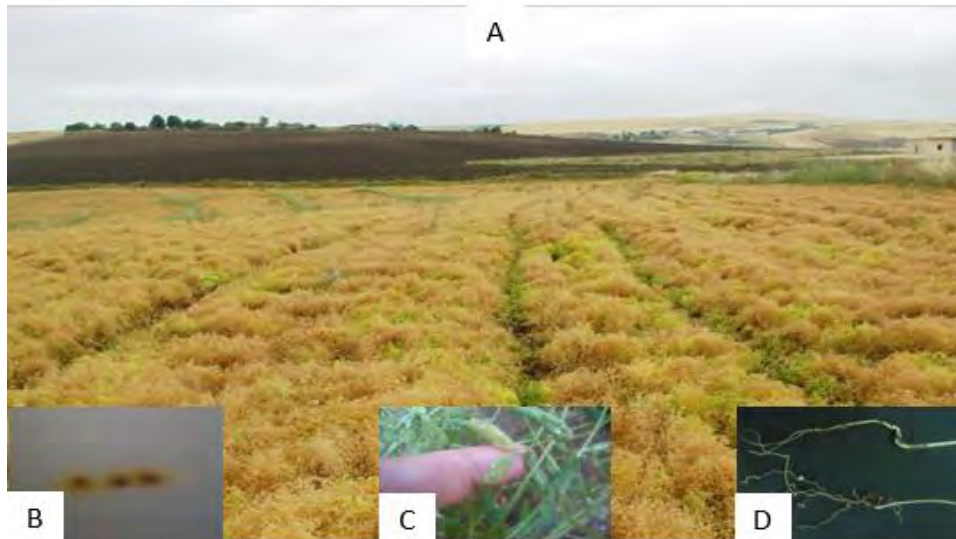


Figure 27 : Symptômes observés su champ de lentilles prospecté de Ain Semara (A) ; de rouille sur feuille (B) ; de Cylindrosporiose de feuille (C) et système racinaire réduit (D).

4.2. Isolements

4.2.1. Isolement des mycètes à partir des plantes infectées

Les isolements sont effectuées sur des plantes supposées malades échantillonnées dans nos sites d'étude (Ain Semara et El Baâraouia).

Leurs identification macro et microscopique réalisés sur les différents fragments (Feuilles, Tiges et Racines) ont révélés la présence de 110 isolats fongiques dont 56 isolats (Tableau 4) proviennent des plantes issues du site El Baâraouia et représentant 16 genres, entre autres : *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Cylindrosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Peronospora*, *Phytophthora*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* et *Ulocladium*, et ou le genre *Fusarium* est représenté en majorité avec une fréquence de 16.07% alors que le genre le moins représenté est *Rhizoctonia* avec 1,78%.

Par ailleurs, la recherche des mycètes dans les plantes infectées et provenant du site d'Ain Semara, a permis l'obtention de 54 isolats fongiques (Tableau 4) groupés en 14 genres : *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Cylindrosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Penicillim*, *Phytophthora*, *Pseudallesheria*, *Onychocola*, *Trichoderma*, *Rhizoctonia* et *Ulocladium*.

Tableau 4 : Fréquences des différents isolats identifiées de plantes de lentille (Sites : Ain Semara et El Baâraouia).

| Sites Partie plante | | Ain Semara | | | | El Baâraouia | | | | |
|--|-------|------------|-------|---------|-------|--------------|-------|---------|-------|-------|
| | | Feuilles | Tiges | Racines | Total | Feuilles | Tiges | Racines | Total | |
| Isolats identifiées sur les plantes de lentilles | Ab. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 | 00 | 01 | 02 |
| | | % | 00 | 00 | 00 | 00 | 1.78 | 00.00 | 1.78 | 3.57 |
| | Acr. | nb. | 00 | 00 | 02 | 02 | 00 | 02 | 00 | 02 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 3.70 | 3.70 | 00.00 | 3.57 | 00.00 | 3.57 |
| | Alt. | nb. | 04 | 06 | 01 | 11 | 04 | 03 | 01 | 08 |
| | | % | 7.39 | 11.10 | 1.86 | 20.37 | 7.14 | 5.36 | 1.78 | 14.28 |
| | Asp. | nb. | 05 | 00 | 01 | 06 | 03 | 02 | 03 | 08 |
| | | % | 9.25 | 00.00 | 1.86 | 11.11 | 5.36 | 3.57 | 5.36 | 14.28 |
| | Bot. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 | 00 | 01 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 1.78 | 00.00 | 1.78 |
| | Chae. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 02 | 00 | 00 | 02 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 3.57 | 00.00 | 00.00 | 3.57 |
| | Cla. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 | 01 | 01 | 03 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 1.78 | 1.78 | 1.78 | 5.35 |
| | Cyl. | nb. | 01 | 00 | 00 | 01 | 00 | 00 | 01 | 01 |
| | | % | 1.86 | 00.00 | 00.00 | 1.86 | 00.00 | 00.00 | 1.78 | 1.78 |
| | Cur. | nb. | 01 | 04 | 01 | 07 | 02 | 01 | 00 | 03 |
| | | % | 1.86 | 7.70 | 1.86 | 12.96 | 00.00 | 1.78 | 00.00 | 3.36 |
| | Eur. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | Fus. | nb. | 01 | 01 | 06 | 08 | 00 | 03 | 06 | 09 |
| | | % | 1.86 | 1.86 | 11.10 | 14.81 | 00.00 | 5.36 | 10.71 | 16.07 |
| | Myr. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 | 00 | 01 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 1.78 | 00.00 | 1.78 |
| | Ony. | nb. | 00 | 01 | 01 | 02 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | | % | 00.00 | 1.86 | 1.86 | 3.70 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | Pen. | nb. | 04 | 00 | 01 | 05 | 01 | 00 | 03 | 04 |
| | | % | 7.39 | 00.00 | 1.86 | 9.25 | 1.78 | 00.00 | 5.36 | 7.15 |
| | Per. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 | 00 | 00 | 01 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 1.78 | 00.00 | 00.00 | 1.78 |
| Phy. | nb. | 01 | 00 | 04 | 05 | 02 | 02 | 03 | 07 | |
| | % | 1.86 | 00.00 | 7.39 | 9.25 | 3.57 | 3.57 | 5.35 | 12.50 | |
| Pseu. | nb. | 00 | 00 | 01 | 01 | 00 | 00 | 00 | 00 | |
| | % | 00.00 | 00.00 | 1.86 | 1.86 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | |
| Rhi. | nb. | 00 | 01 | 00 | 01 | 01 | 00 | 00 | 01 | |
| | % | 00.00 | 1.86 | 00.00 | 1.86 | 1.78 | 00.00 | 00.00 | 1.78 | |
| Tri. | nb. | 00 | 01 | 00 | 01 | 00 | 00 | 00 | 00 | |
| | % | 00.00 | 1.86 | 00.00 | 1.86 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | |
| Ulo. | nb. | 03 | 01 | 00 | 04 | 00 | 03 | 00 | 03 | |
| | % | 5.55 | 1.86 | 00 | 7.41 | 00.00 | 5.36 | 00.00 | 5.36 | |

L'analyse des résultats montre que le genre *Alternaria* est majoritaire avec une fréquence de 20.37%, alors que le et ou bien les mois représentés sont : *Cylindrosporium*, *Eurotium* et *Rhizoctonia* avec un pourcentage équivalant de de 1.86% (Tableau 4). Par ailleurs les fréquences comparatives des isolats identifiés entre les deux sites d'étude (Ain Semara et El Baâraouia) (Figure 28), sont représentées par la figure 28 qui révèle en gros la présence des genres communs qui sont au nombre de (10) dans les mêmes sites à savoir *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Cylindrosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* et *Ulocladium*.

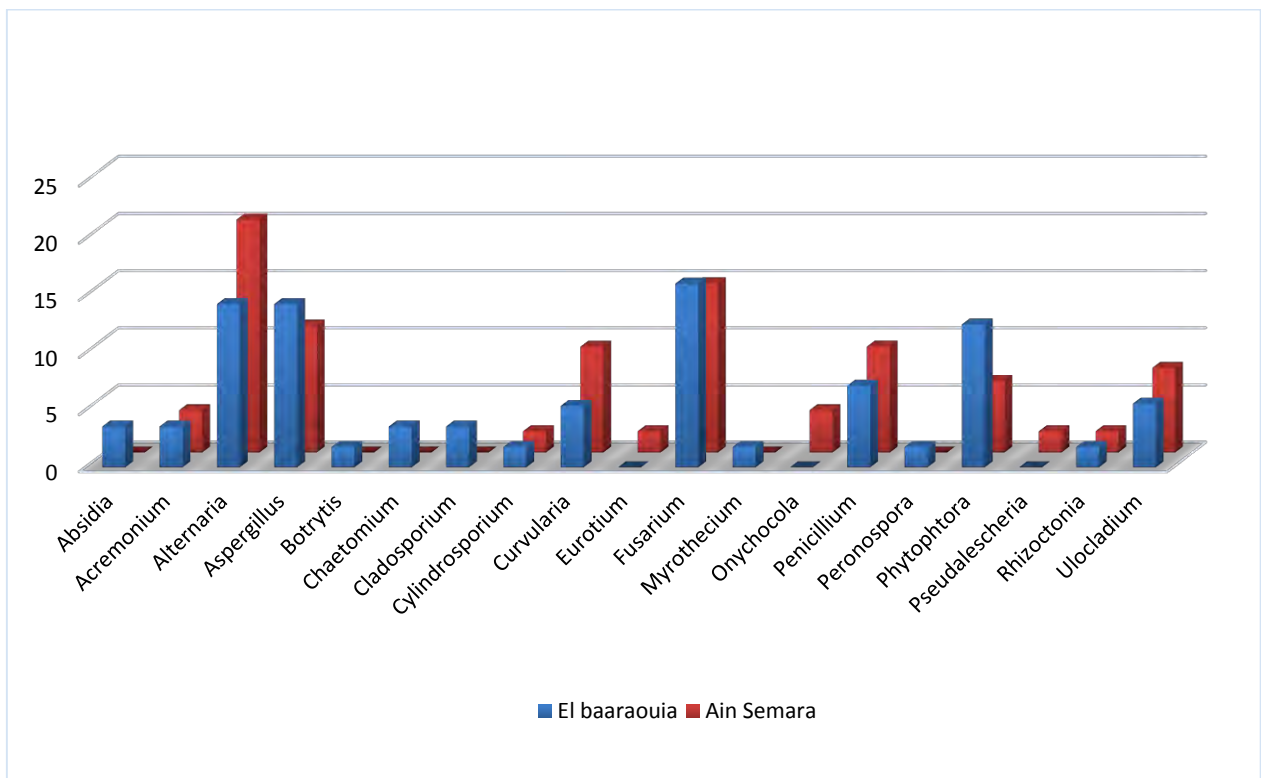


Figure 28 : Fréquences comparatives des différents genres fongiques isolés à partir des plantes des sites d'Ain Semara et d'El Baâraouia.

Aussi les résultats obtenus montrent que les 19 genres identifiés sont dominés particulièrement par les embranchements d'*Ascomycètes* (72,93%), *Deutéromycètes* (10,88%) et *Phycomycètes* (10,88%). Cependant la représentation des autres embranchements identifiés *Oomycetes*, *Phycomycetes* et *Zygomycetes* semble être insignifiante et est de l'ordre d'environ 2,24% en moyenne (Figure 29).

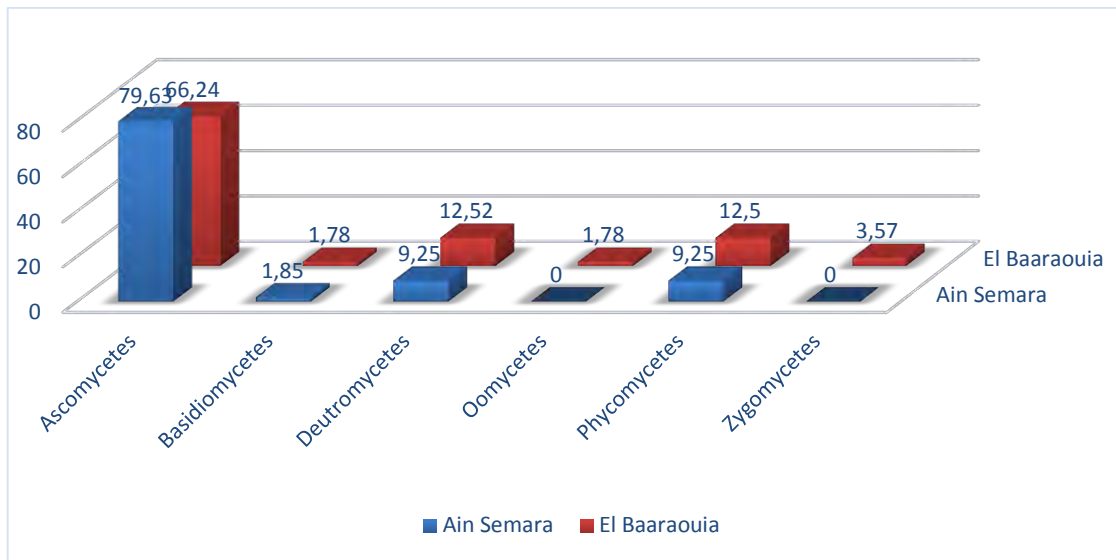


Figure 29 : Principales embranchements correspondant aux genres isolés des plantes de lentille.

4.2.2. Isolement des mycètes à partir du sol

Au total, six échantillons de sol provenant des deux champs situés sur les sites (Ain Semara et El Baâraouia), ont été examinés pour l'étude de la diversité fongique. Les résultats obtenus au cours des différents isolements réalisés, sont représentés dans le tableau 5 et révèlent la présence de 87 isolats fongiques, répartis en 14 genres : *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Perenospora*, *Phytophthora*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma* et *Ulocladium*, groupant 44 isolats pour le site El Baâraouia et 16 genres groupant 42 isolats pour le site de Ain Semara en l'occurrence : *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bysochlamyces*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Pseudallesheria*, *Scytalidium*, *Trichoderma* et *Ulocladium*

Ainsi, dans le site El Baâraouia les genres majoritaires sont *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* avec une fréquence de 20.45%, suivie par le genre *Phytophthora* (6.83%), puis les genres *Acremonium*, *Alternaria*, *Chaetomium* et *Paecilomyces* sont équivalents avec une présence de 4.54% et enfin les genres *Cladosporium*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Perenospora* et *Ulocladium* représentent les genres les moins représentatifs avec 2.27% (Tableau 5).

Tableau 5 : Fréquences des différents isolats identifiés de sols prospectés (Sites : Ain Semara et El Baâraouia).

| Sites Partie plante | | Ain Semara | | | | El Baâraouia | | | | |
|---|-------|------------|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 5 cm | 10 cm | 15 cm | Total | 5 cm | 10 cm | 15 cm | Total | |
| Isolats identifiés sur les plantes de lentilles | Ab. | nb. | 01 | 02 | 01 | 04 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | | % | 2.38 | 4.76 | 2.38 | 9.52 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | Acr. | nb. | 00 | 00 | 01 | 01 | 00 | 01 | 01 | 02 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 2.38 | 2.38 | 00.00 | 2.27 | 2.27 | 4.54 |
| | Alt. | nb. | 01 | 01 | 00 | 02 | 00 | 02 | 00 | 02 |
| | | % | 2.38 | 2.38 | 00.00 | 4.76 | 00.00 | 4.54 | 00.00 | 4.54 |
| | Asp. | nb. | 04 | 03 | 02 | 09 | 03 | 03 | 03 | 09 |
| | | % | 9.52 | 7.14 | 4.76 | 21.42 | 6.81 | 6.81 | 6.81 | 20.45 |
| | Bys. | nb. | 01 | 00 | 00 | 01 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | | % | 2.38 | 00.00 | 00.00 | 2.38 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | Chae. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 | 01 | 02 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 2.27 | 2.27 | 4.54 |
| | Cla. | nb. | 00 | 01 | 00 | 01 | 00 | 00 | 01 | 01 |
| | | % | 00.00 | 2.38 | 00.00 | 2.38 | 00.00 | 00.00 | 2.27 | 2.27 |
| | Emr. | nb. | 00 | 01 | 00 | 01 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | | % | 00.00 | 2.38 | 00.00 | 2.38 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | Eur. | nb. | 01 | 01 | 01 | 03 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| | | % | 2.38 | 2.38 | 2.38 | 7.14 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 |
| | Fus. | nb. | 01 | 01 | 02 | 04 | 06 | 03 | 01 | 09 |
| | | % | 2.38 | 2.34 | 4.76 | 9.52 | 00.00 | 6.81 | 2.27 | 20.45 |
| | Muc. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 | 00 | 01 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 2.27 | 00.00 | 2.27 |
| | Pae. | nb. | 00 | 01 | 01 | 02 | 00 | 01 | 01 | 02 |
| | | % | 00.00 | 2.38 | 2.38 | 4.76 | 00.00 | 2.27 | 2.27 | 4.54 |
| | Pen. | nb. | 03 | 01 | 01 | 05 | 03 | 03 | 03 | 09 |
| | | % | 7.14 | 2.38 | 2.38 | 11.90 | 6.81 | 6.81 | 6.81 | 20.45 |
| | Per. | nb. | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 | 01 | 00 | 01 |
| | | % | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 2.27 | 00.00 | 2.27 |
| Phy. | nb. | 00 | 01 | 00 | 01 | 01 | 01 | 01 | 03 | |
| | % | 00.00 | 2.38 | 00.00 | 2.38 | 2.27 | 2.27 | 2.27 | 6.81 | |
| Pseu. | nb. | 01 | 00 | 01 | 02 | 00 | 00 | 00 | 00 | |
| | % | 2.38 | 00.00 | 2.38 | 4.76 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | |
| Scop. | nb. | 00 | 00 | 01 | 01 | 00 | 01 | 00 | 01 | |
| | % | 00.00 | 00.00 | 2.38 | 2.38 | 00.00 | 2.27 | 00.00 | 2.27 | |
| Scy. | nb. | 01 | 01 | 00 | 02 | 00 | 00 | 00 | 00 | |
| | % | 2.38 | 2.38 | 00.00 | 4.76 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | 00.00 | |
| Tri. | nb. | 00 | 00 | 01 | 01 | 01 | 00 | 00 | 01 | |
| | % | 00.00 | 00.00 | 2.38 | 2.38 | 2.27 | 00.00 | 00.00 | 2.27 | |
| Ulo. | nb. | 01 | 01 | 00 | 02 | 00 | 01 | 00 | 01 | |
| | % | 2.38 | 2.38 | 00.00 | 4.76 | 00.00 | 2.27 | 00.00 | 2.27 | |

Par ailleurs, dans le site Ain Semara les résultats obtenus montrent que le genre *Aspergillus* est le plus dominant avec une fréquence de 21.42%, suivie par le genre *Penicillium* qui présente 11.90%, puis le genre *Absidia* et *Fusarium* avec 9.52%, *Eurotium* avec 7.14%, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Scytalidium Pseudalesheria*, et *Ulocladium* avec un pourcentage de 4.76% et enfin, les genres *Acremonium*, *Bysochlamyces*, *Phytophthora*, *Emericella*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium* et *Trichoderma* avec une fréquence de 2.38% (Tableau 5).

La comparaison des résultats entre les deux sites d'étude (Figure 30), révèle la présence de dix (10) genres en commun, à savoir : *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma* et *Ulocladium*.

Il est à signaler que tous ces résultats sont obtenus à partir d'analyses réalisés sur des sols prélevés à différentes profondeurs (5cm, 10cm et 15cm) pour les deux sites. En effet, la plus grande charge en mycètes se concentre dans la profondeur de 10cm (39.75%) suivie par la profondeur 5 cm (33.75%) et enfin la profondeur de 15cm à 26.78%.

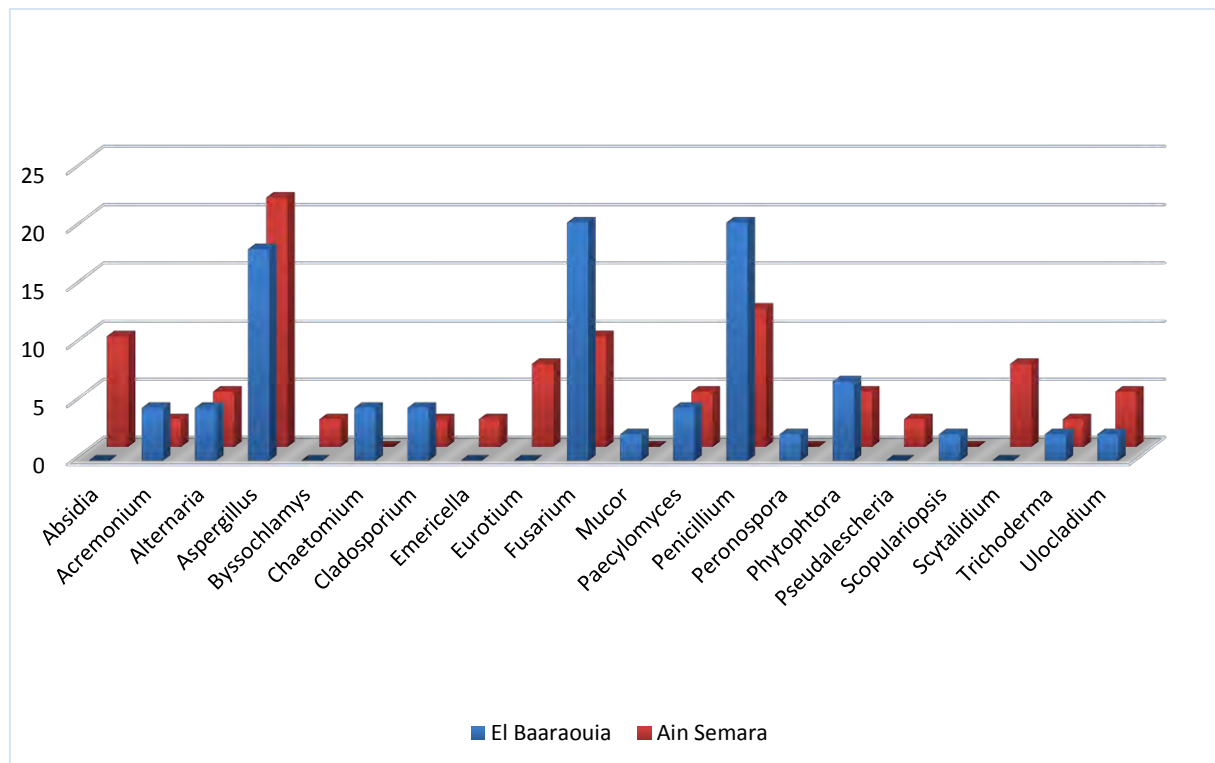


Figure 30 : Fréquences comparatives des différents genres fongiques isolés à partir des sols des sites d'Ain Semara et d'El Baâraouia.

Les résultats d'identification microscopique ont montré que les isolats identifiés appartiennent au plan de la classification aux embranchements suivants : *Ascomycetes*, *Deutéromycetes*, *Oomycetes*, *Phycomycetes* et *Zygomycetes*, avec une prédominance respectivement des *Deutromycetes* et des *Ascomycetes* (Figure 31).

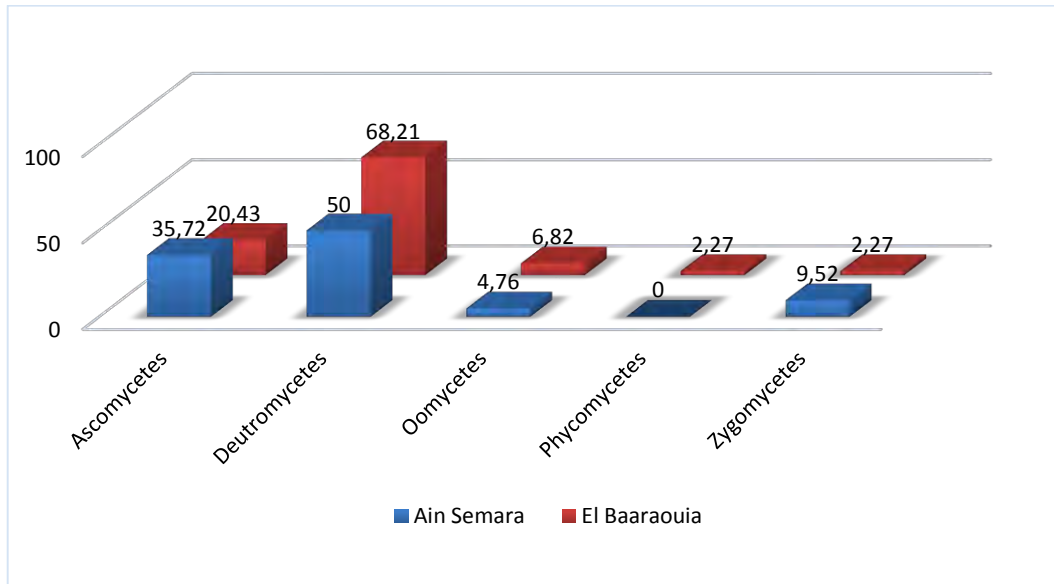


Figure 31 : Principales embranchements correspondant aux genres isolés des sols de lentille.

4.3. Relevés climatiques

Les périodes de prélèvement des échantillons (Avril et Mai), ont connus en moyenne, des précipitations de 68.4 et 19.5 mm, des températures de 19.6 et 24.4°C, avec des humidités de 71 et 62% (Figure 32).

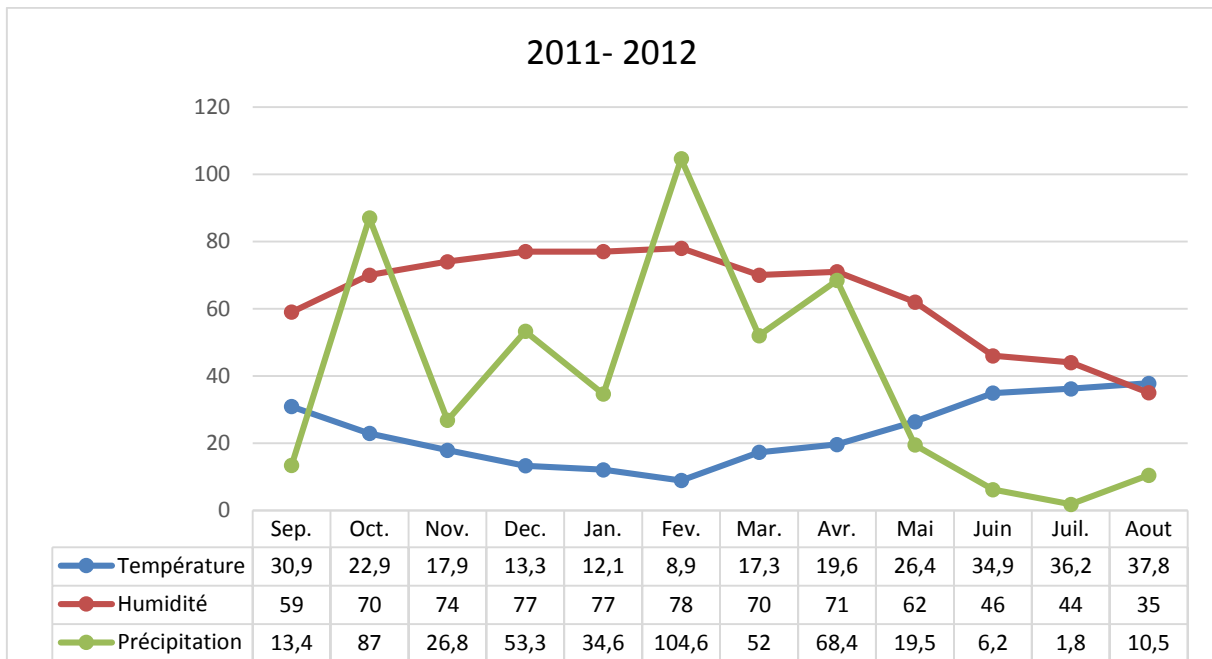


Figure 32 : Données climatique de la région de Constantine pour l’année agricole 2011-2012 (ONM, 2013).

4.4. Analyses physico-chimiques

Les résultats de l’analyse du sol (Tableau 6) révèlent que les sols d’Ain Semara et d’El Baâraouia sont riches en matière organique (MO) (supérieure à 1%) et par conséquent en Carbone et en Azote. Cependant le sol prélevé d’Ain Semara est légèrement plus riche en M.O (1.812%) en comparaison avec celui d’El Baâraouia. En outre, la M.O s’avère riche en Carbone et pauvre en Azote dans les deux zones d’échantillonnages. Par ailleurs, les résultats de l’analyse du pH montrent que ses valeurs sont légèrement alcalines (entre 7.69 et 7.86). La mesure de la conductivité électrique (CE), facteur indiquant le degré de la salinité, est inférieur à 1, c’est-à-dire la concentration en sel du sol est neutre.

Tableau 6 : Analyse pédologique des sols prélevés à partir de la région de Constantine.

| Sites | El Baâraouia | | | Ain Semara | | |
|--------------------------|--------------|-------|-------|------------|-------|-------|
| | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 |
| Profondeur (cm) | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 |
| M.O (%) | 1.720 | 1.978 | 1.686 | 1.892 | 1.858 | 1.686 |
| Carbone (%) | 10.0 | 11.5 | 9.8 | 11.0 | 10.8 | 9.8 |
| Azote (‰) | 0.76 | 0.89 | 0.70 | 0.95 | 0.82 | 0.80 |
| C/N | 13 | 13 | 14 | 12 | 13 | 12 |
| % de saturation | 63 | 60 | 56 | 59 | 54 | 52 |
| pH | 7.86 | 7.76 | 7.77 | 7.69 | 7.79 | 7.83 |
| CE (millimhos/cm) | 0.50 | 0.93 | 0.70 | 0.65 | 0.52 | 0.35 |

4.5. Les tests d'antagonismes

4.5.1. Les champignons pathogènes et antagonistes

4.5.1.1. Les souches pathogènes

Parmi les 110 souches fongiques isolées des différents organes des plantes de *Lens culinaris*, deux souches pathogènes ont été sélectionnées, (*Fusarium solani* et *Cylindrosporium sp*) en raison de leur présence dans toutes les parties de la plante, et ce pour servir aux différents tests menés avec les souches antagonistes. Ces souches présentent, les caractéristiques suivantes :

- *Fusarium solani* : cette souche a été isolée à partir des fragments racinaires présentant des lésions nécrotiques (Figure 33). L'observation macroscopique a montré une colonie unique colonisant la totalité de la boîte, de couleur blanche à crème à croissance rapide. Le revers est d'un aspect jaune brunâtre (Figure 33). Au niveau microscopique, les microconidies apparaissent de formes ovoïdes, les chlamydospores sont abondantes, et arrondis en ballonnet, quant au conidiophore, il porte des monophialides d'aspect cylindrique.

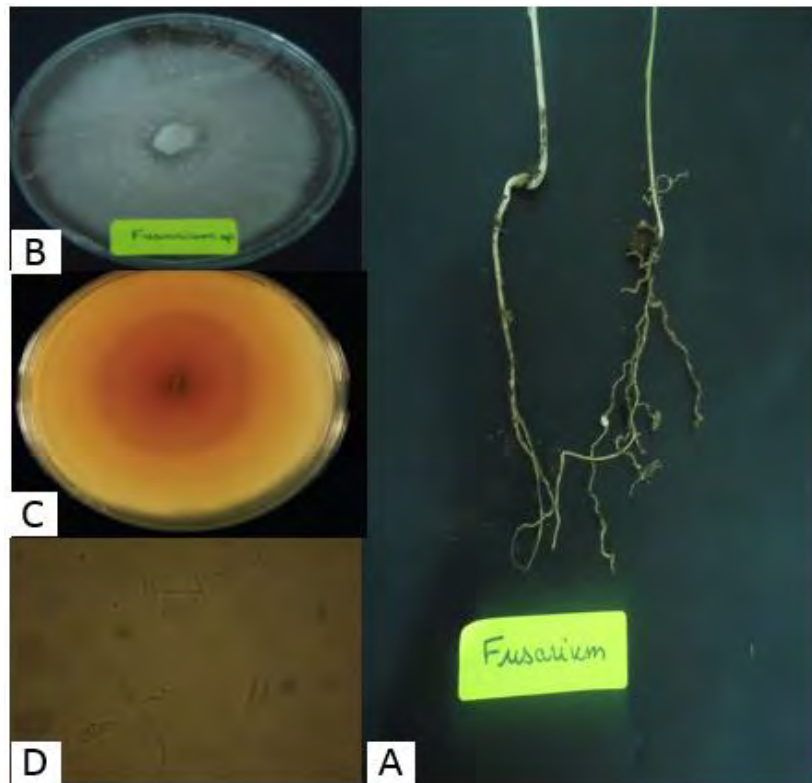


Figure 33 : Symptômes de la Fusariose sur racine de *Lens culinaris* (A), aspect macroscopique de *Fusarium solani* (B, C) et microscopique (D) (Objectif 40).

- *Cylindrosporium sp* : la souche de *Cylindrosporium sp* a été isolée à partir des fragments de feuilles contaminées. Elle a aussi été observée sur les tiges de *Lens culinaris* (Figure 34). La colonie de cette souche sur milieu PDA été de forme irrégulière, de couleur blanche jaunâtre, à croissance lente avec un revers crème. L'observation microscopique a révélé que les spores sont unies ou groupés et les phialides ont une forme cylindrique.

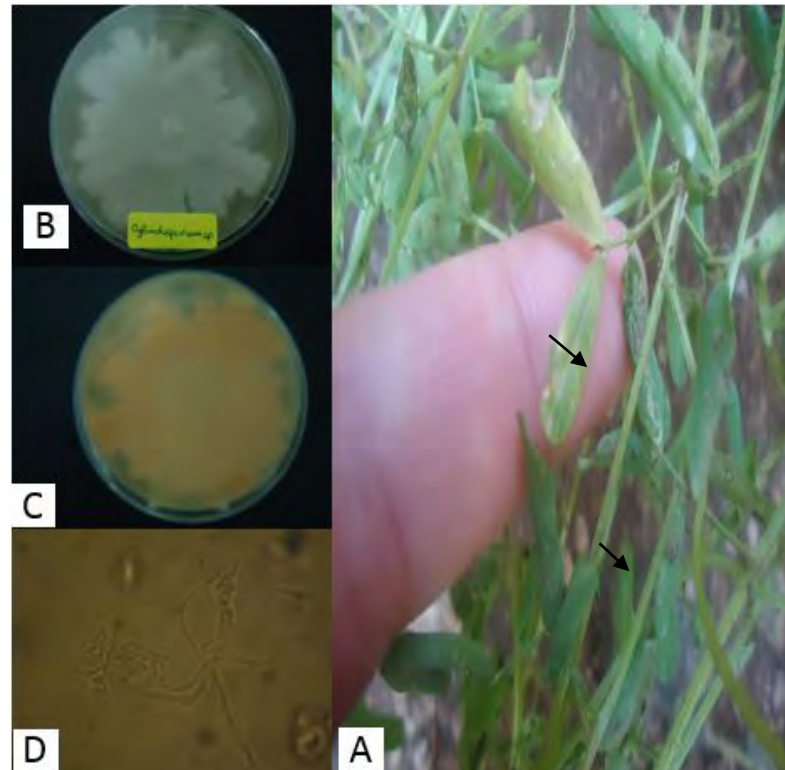


Figure 34 : Symptômes de *Cylindrosporium* sur Feuilles et tiges de *Lens culinaris* (A), aspect macroscopique de *Cylindrosporium* sp (B, C) et microscopique (D) (Objectif 40).

4.5.1.2. Les souches antagonistes

Les deux souches antagonistes du genre *Trichoderma*, utilisées dans les deux types de confrontation ainsi que, dans les tests qui suivent, sont celles isolées des sols agricoles des sites d'Ain Semara et d'El Baâraouia. Celles-ci isolées sur milieu M2, ont montré une coloration verte plus ou moins intense selon l'isolat utilisé (Figure 35).

L'observation microscopique a révélée des conidies unicellulaires globuleuses ; des phialides en forme de quille, verticillés sur des conidiophores ramifiés à angle droit ou sur leurs branches latérales.

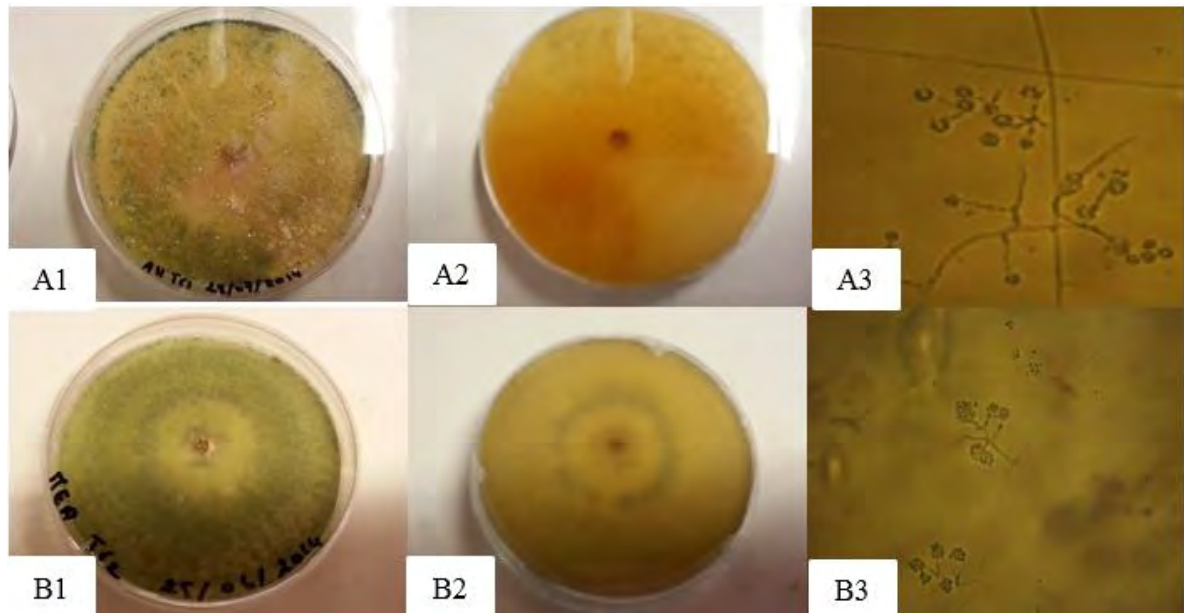


Figure 35 : Observation macro (A1, A2) et microscopique (A3) de *Trichoderma 127a* ; et de *Trichoderma 127b* (B1, B2, B3) (Objectif 40).

➤ Identification moléculaire

Les séquences des segments d'ADN (Annexe 3) du gène *Tef 1-α* élaboré par le laboratoire de Biologie moléculaire de l'université catholique de Louvain-La-Neuve, Belgique, ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base de données Genbank. L'analyse des séquences des souches fongique de la banque a permis de confirmer et d'affilier les deux souches à l'espèce *Trichoderma harzianum*.

Les séquences des deux isolats dénommées « Z127A0EF et Z127B0EF » correspondent 100% à l'identité de *Trichoderma harzianum* et 99% à celle de *Trichoderma sp.*

A partir de séquences obtenues, une étude phylogénétique a été réalisée. Des alignements des séquences sont réalisés par ClustalW et l'arbre phylogénétique est construit à partir de la méthode Neighbor-joining en utilisant le test de Bootstrap qui se base uniquement sur les identités correspondants à 100% (sur le nombre de branches), et ne dépassant pas 1000 réplifications en utilisant les distances de Tamura qui prend en compte les transitions et les traversions du programme MEGA5 (Tamura et al, 2007) (Figure 36).

Les deux souches de *Trichoderma* (127a et 127b) sont appariées dans le même cluster avec les souches apparentées. Il ressort que L'isolat « Z127A0EF » forme une ligne phylogénétique avec la souche « Z127B0EF » et avec les souches suivantes : gi/619533167/*Trichoderma harzianum*,

gi/619533159/Trichoderma harzianum, *gi/619533161/Trichoderma harzianum* et *gi/619533160/Trichoderma harzianum* appartenant au GenBank. Donc nos isolats « Z127A0EF et Z127B0EF » semblent apparentées aux souches de référence précédentes car ils occupent la même ligne phylogénétique avec une valeur de Bootstrap de 100%.

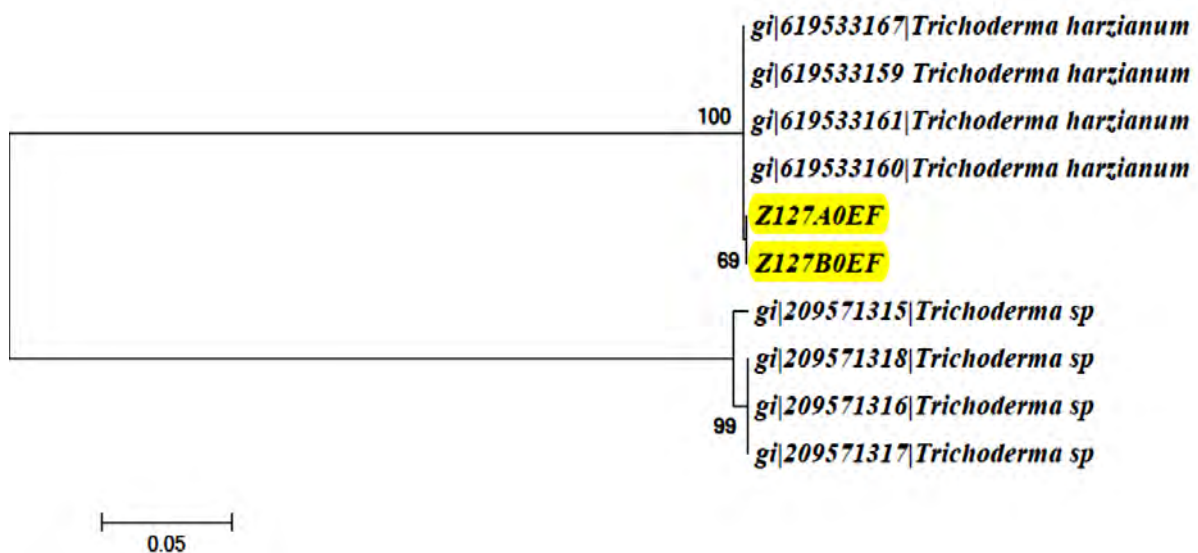


Figure 36 : Dendrogramme des isolats « Z127A0EF et Z127B0EF ».

4.5.2. Les confrontations

➤ Effet sur *Fusarium solani*

L'effet de *Trichoderma harzianum* 127a et *T. harzianum* 127b vis-à-vis de *Fusarium solani* a été confirmé *In Vitro* par deux méthodes de confrontations : la confrontation directe (test des métabolites diffusibles) et la confrontation indirecte (test des métabolites volatiles). Les résultats obtenus après une semaine (148 heures) d'incubation à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, ont montré que la croissance mycélienne de la souche témoin est plus importante que celle obtenue avec les différentes confrontations (pathogène / antagoniste). En effet, la croissance du pathogène *Fusarium solani* cultivé seule été de 58 mm, par contre, en présence d'antagonisme *Trichoderma harzianum* (127a ou 127b), la croissance de *F. solani* varie entre 34 et 39 mm selon l'antagoniste utilisé et le type de confrontation (Figure 37), ce qui correspond à un taux d'inhibition compris entre 48.71 % et 70.85%.

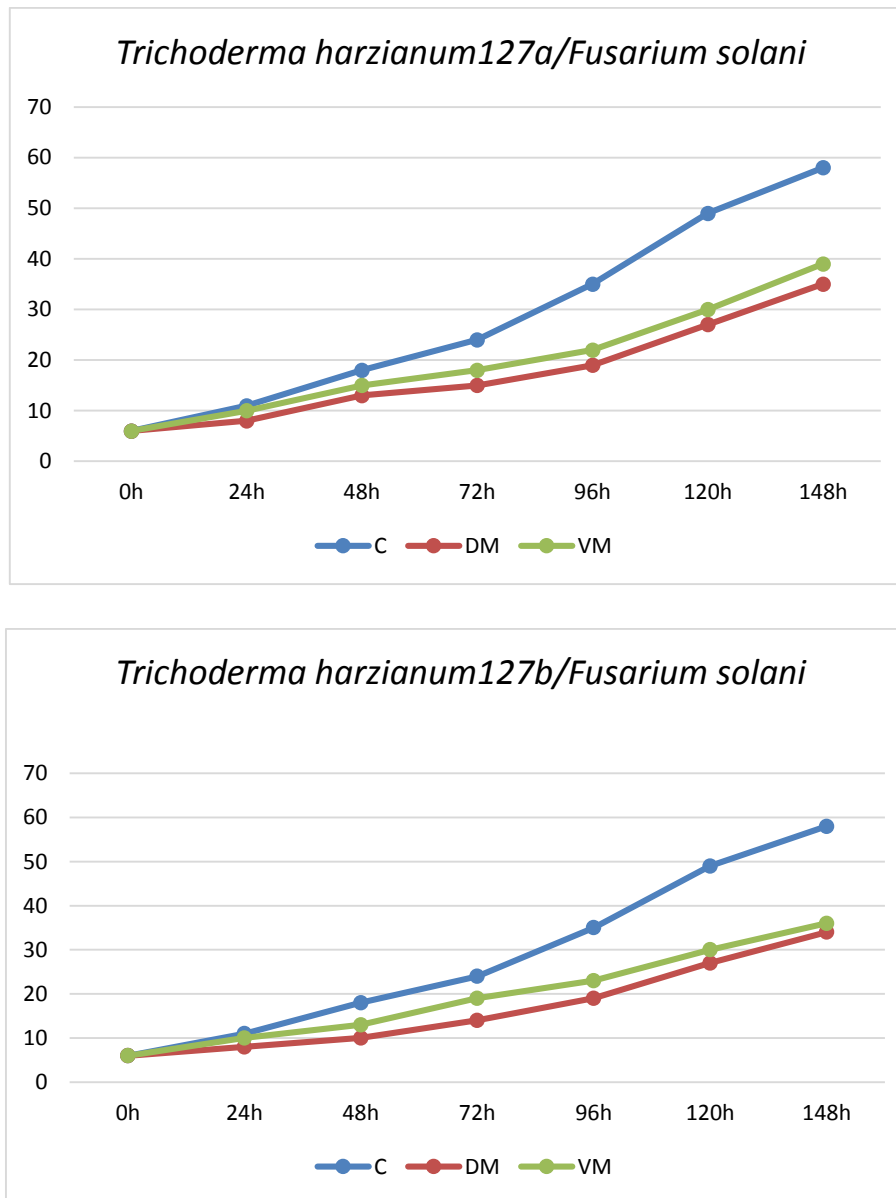


Figure 37 : Suivi de la croissance de *Fusarium solani* en présence et en absence de *Trichoderma harzianum* 127a et *T. harzianum* 127b (C : témoin, DM : confrontation directe, VM : confrontation indirect).

L'observation macroscopique (Figure 38) a montré un envahissement de la boîte de Pétri par l'antagoniste. Par ailleurs, l'analyse microscopique (Figure 38) à partir d'un prélèvement de la zone de contact entre *Trichoderma harzianum* 127a, *T-127b* et *Fusarium solani* a montré un surenroulement de l'antagonisme sur le pathogène.

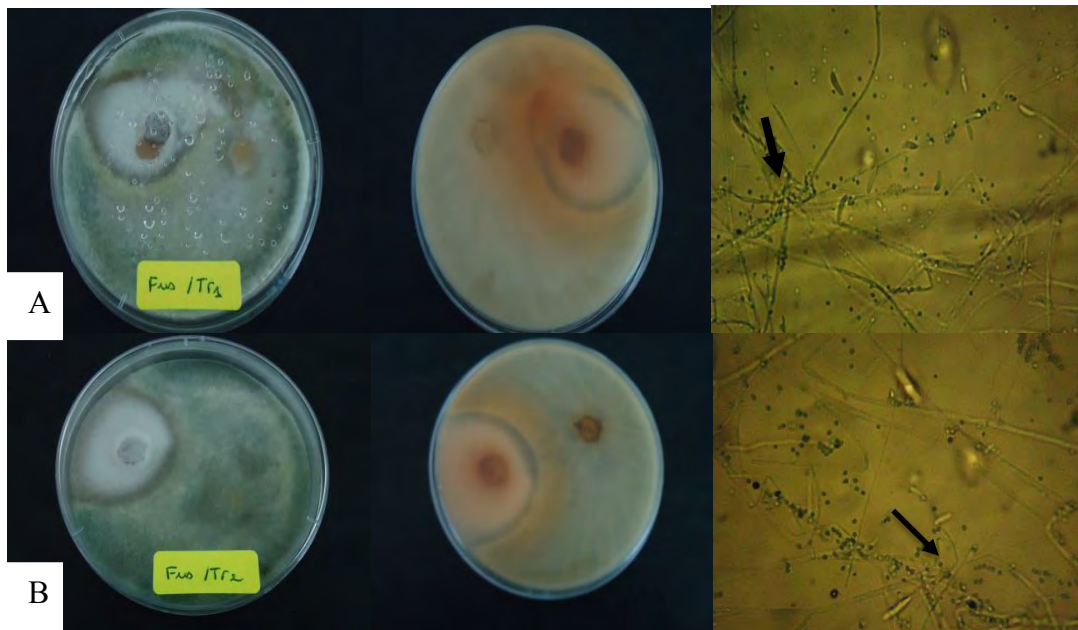


Figure 38 : Action inhibitrice de T-127a (A) et T-127b (B) sur *F. solani* : observation macro et microscopique (Objectif 40).

➤ Effet sur *Cylindrosporium sp*

Les résultats des différentes confrontations *Cylindrosporium sp* / *Trichoderma harzianum* 127a/127b, ont montré des effets d'inhibition positives variant de 68.75% et 92.95%. En effet, après une semaine (148heures) d'incubation à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, la mesure de la croissance mycélienne de *C. sp* cultivé seule sur milieu PDA a révélé une croissance de 81 mm, une mesure largement supérieur à celle du pathogène cultivé en présence d'antagoniste (*Trichoderma harzianum* 127a/127b), comprise entre 42 mm et 48 mm (Figure 39).

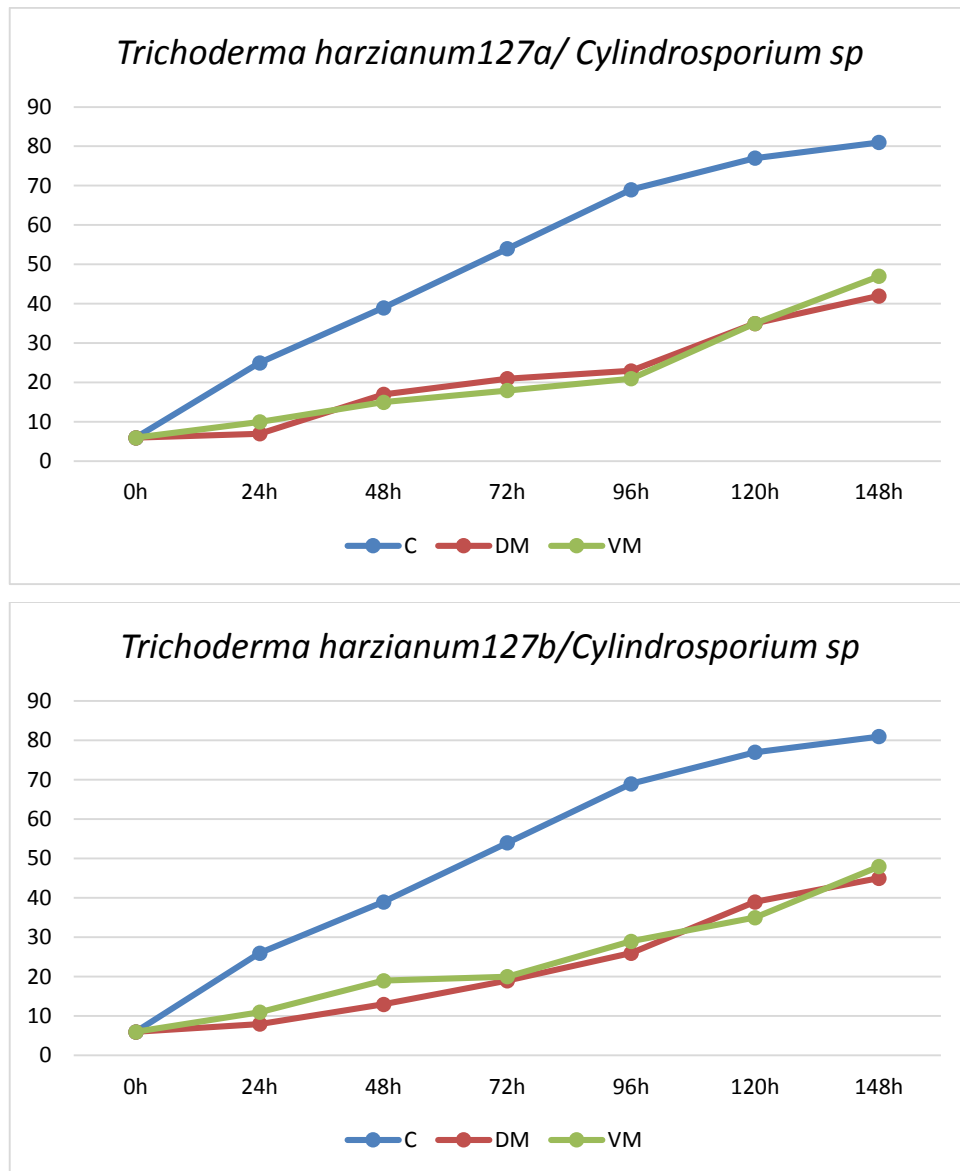


Figure 39 : Suivi de la croissance de *Cylindrosporium sp* en présence et en absence de *Trichoderma harzianum* 127a et *T. harzianum* 127b (C : témoin, DM : confrontation directe, VM : confrontation indirect).

L'observation macroscopique des boîtes portant *Cylindrosporium sp* et *Trichoderma harzianum* 127a et T-127b montrent que la zone de développement de ce dernier été largement supérieur à celui du pathogène. Au plan microscopique l'impact de *Trichoderma* vis-à-vis du pathogène se traduit comme dans le cas précédent par un surenroulement du mycélium du pathogène (Figure 40).

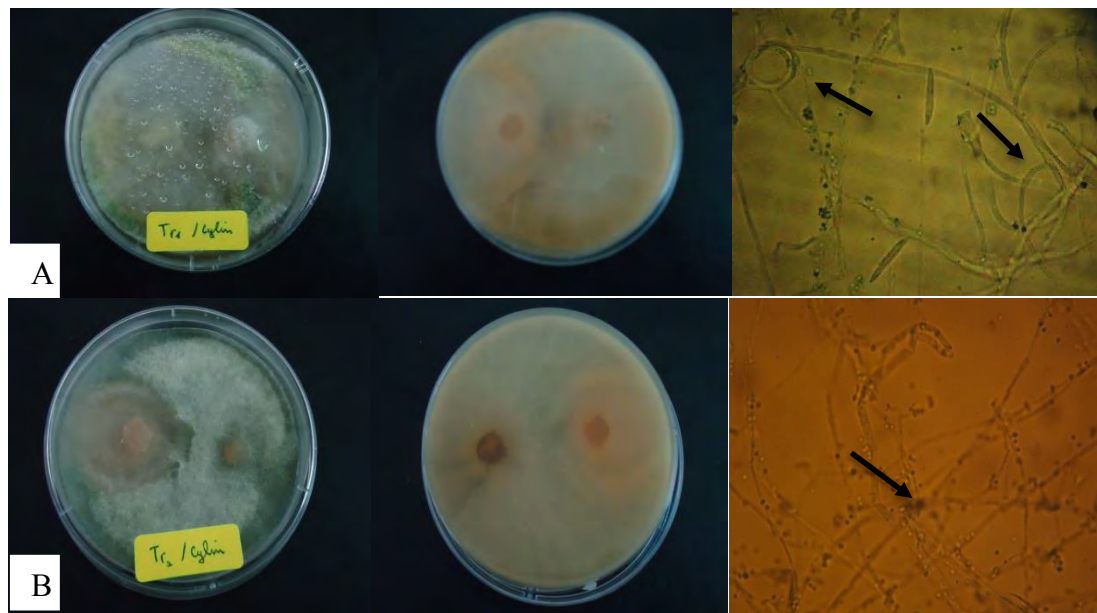


Figure 40 : Action inhibitrice de *T-127a* (A) et *T-127b* (B) sur *C. sp* : observation macro et microscopique (Objectif 40).

4.6. Etude de la compétition pour le glucose

L'effet des souches antagonistes *Trichoderma harzianum* 127a et *T. harzianum* 127b sur la germination des conidies de *Fusarium solani* et *Cylindrosporium sp* a été étudié, dans un système permettant une séparation physique entre le pathogène et l'antagonisme. Les deux souches sont mises en culture dans deux types de milieux, l'un à base d'extrait de Malt et Glucose (MEA) à des concentrations variantes (0, 5, 10,15, et 20g/L), l'autre, (M2) à base d'extrait de Malt et d'extraits de levure.

L'analyse des résultats (Figure 41) a montré un effet significatif de la concentration des milieux et des souches antagonistes sur le pourcentage de germination des conidies. Le plus faible pourcentage de germination des conidies du pathogène (*F. solani* et *C. sp*) a été obtenu avec le milieu (M2),

Par ailleurs, dans le milieu MEA, les cultures des pathogènes utilisés développent après 24 h d'incubation à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, une bonne germination des conidies .En effet les taux de germinations des conidies de *Fusarium solani* se situent entre (86-98%) quant à *Cylindrosporium sp*, il peut développer jusqu'à 90% et plus de conidies.

Nous remarquerons par ailleurs que dans tous les cas, et à concentration de 0g/L de Glucose, il est à noter une faible élongation du tube germinatif, donc un faible développement de conidies (Annexe 4).

Cependant, la présence des souches de *Trichoderma harzianum 127a* et *T. harzianum 127b* a significativement réduit la germination des conidies comparativement aux témoins, dans les milieux à base d'extrait de Malt. En effet, dans le milieu (M2), l'effet inhibiteur de ces deux antagonistes était le plus élevé avec des taux de réduction de germination par rapport aux témoins compris entre 71 et 79% pour *F. solani* et entre 69 et 73% pour *C. sp.* Alors que dans le milieu MEA, à concentration 0g/L (M0), les taux de réduction de germination sont compris entre 0 et 2% pour *F. solani* et entre 34 et 36 % pour *C. sp.* (Annexe 4).

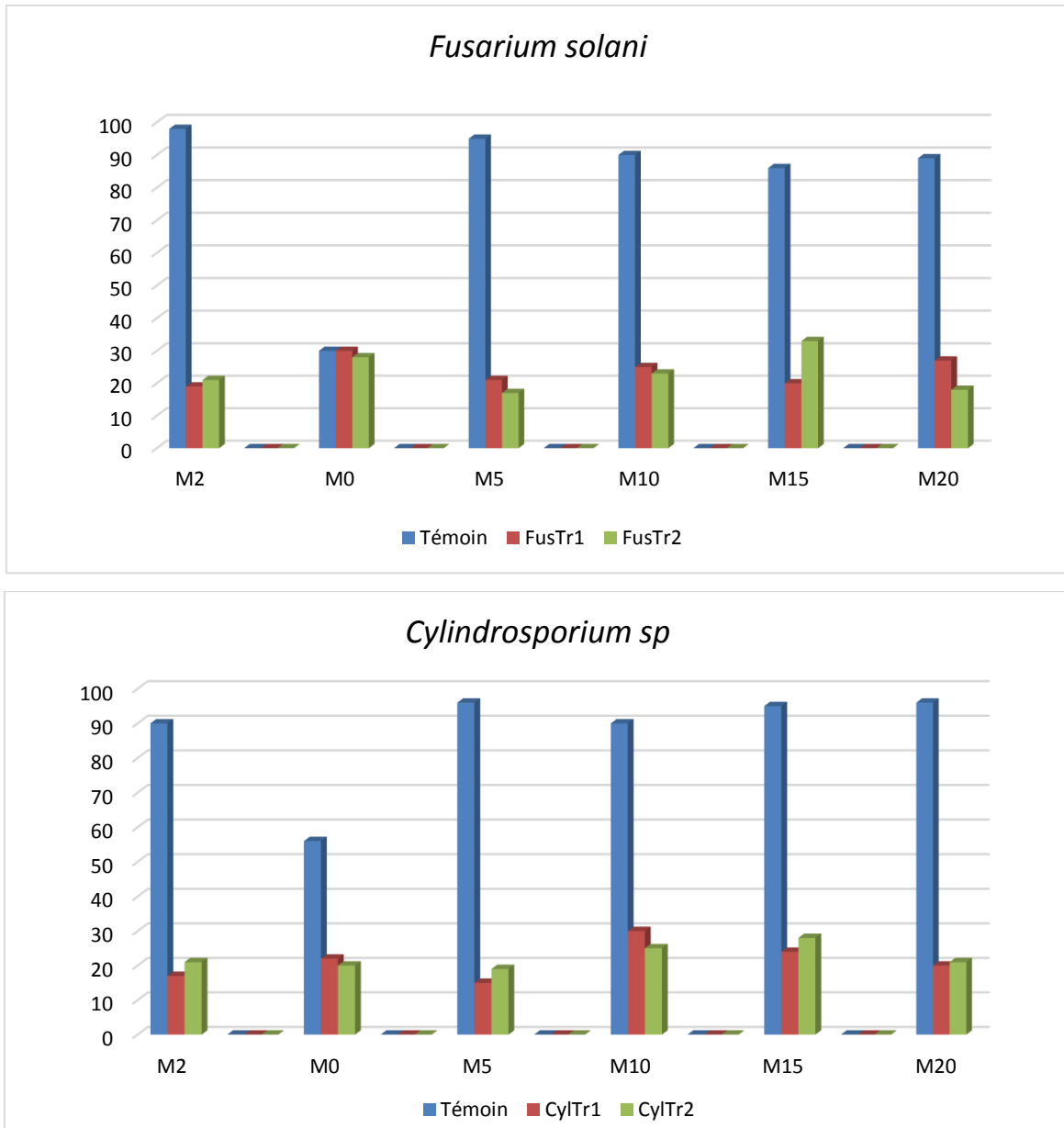


Figure 41 : Le pourcentage de germination des conidies de *F. solani* et *C. sp* après 24h d'incubation sans (Témoin) ou avec les souches antagonistes *T. harzianum 127a* et *T. harzianum 127b* en fonction du milieu.

4.7. Les fermentations (production des spores)

4.7.1. Fermentation liquide

4.7.1.1. Optimisation de la fermentation

L'optimisation du milieu de culture a pour objectif de cerner les conditions idéales pour la croissance des champignons et la production de biomasse à une concentration élevée.

➤ Choix du milieu de culture

La sélection du milieu de culture adéquat pour la production de la biomasse a une quantité élevée a été effectuée dans des boîtes de pétri contenant des milieux de culture conçus pour la croissance fongique. L'analyse des résultats après 144 h d'incubation à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ a montré, une importante croissance sur les milieux PDA, M2 et KM et une moindre croissance avec les milieux Sabouraud et Czapek Dox (Figure 42).

En effet, la croissance maximale a été observée sur le milieu M2 et le milieu PDA où le diamètre des colonies a été maximale (86mm environ) après 72h d'incubation pour les deux souches de *Trichoderma*., par contre, la croissance minimale a été relevée pour les milieux Sabouraud et Czapek Dox avec une croissance maximale d'environ 38mm.

Ainsi, la croissance des souches de *Trichoderma* a été exponentielle dans les premières 72h et presque linéaire dans les dernières heures.

Les résultats obtenus nous ont permis de constater, que le meilleur milieu pour la production de biomasse (croissance) est celui à base d'extrait de Malt (M2).

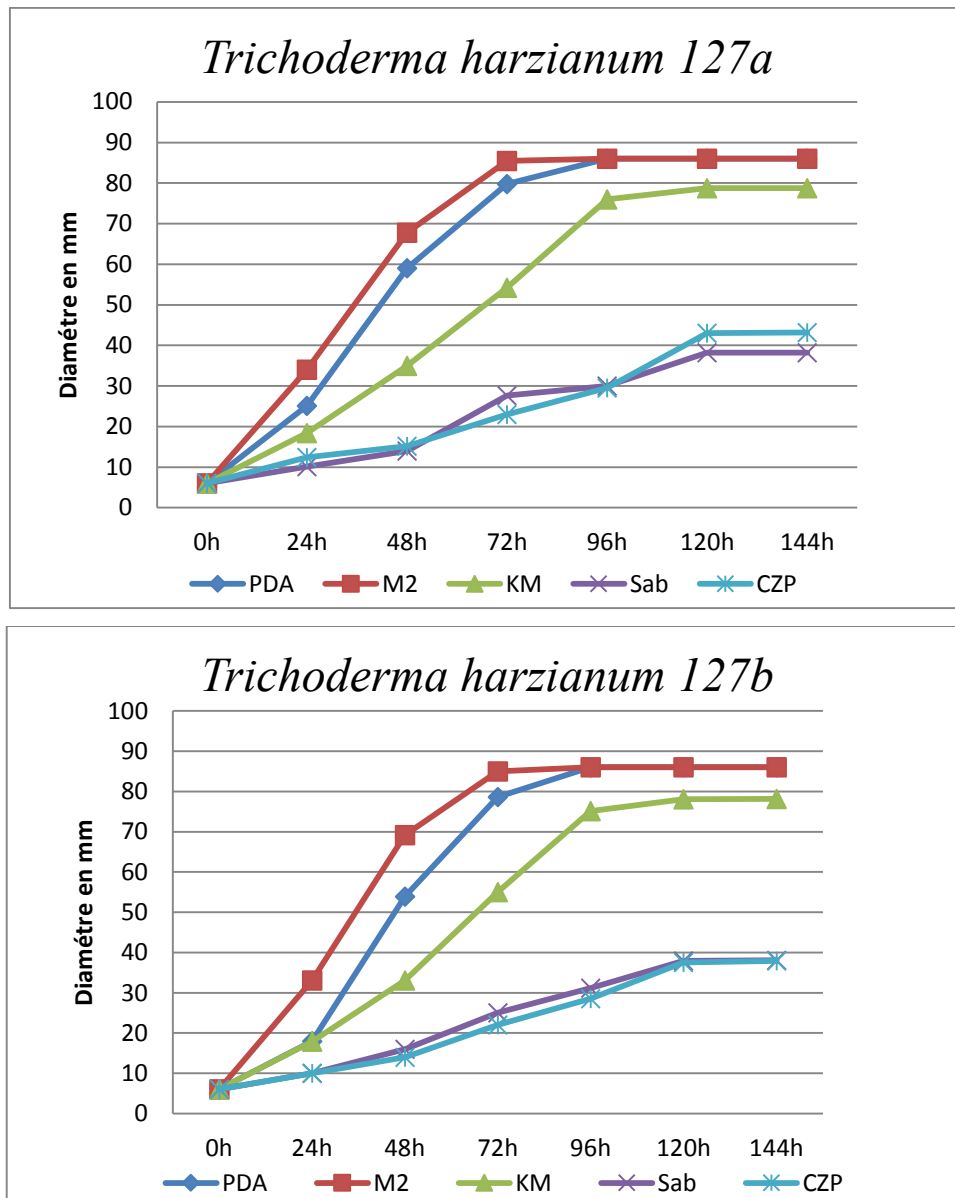


Figure 42 : Evaluation de la croissance mycélienne de *T. harzianum 127a* et *T. harzianum 127b* sur cinq différents milieux de culture : PDA, M2, KM, Sab et Czp.

➤ Concentration du Glucose

La concentration du glucose a été évaluée à partir de la mesure de la matière sèche. Les résultats montrent que la croissance mycélienne des deux souches antagonistes a variée selon le milieu de culture utilisé. En effet, la croissance mycélienne a été maximale dans le milieu de culture M2 (entre 1075 mg et 1086 mg) et minimale dans le milieu de culture M0 (entre 370 et 376 mg).

Les résultats révèlent aussi que le développement de *T. harzianum 127a* et *T. harzianum 127b* est possible sur les milieux de culture M0, M5, M10, M15 et M20 (Figure 44).

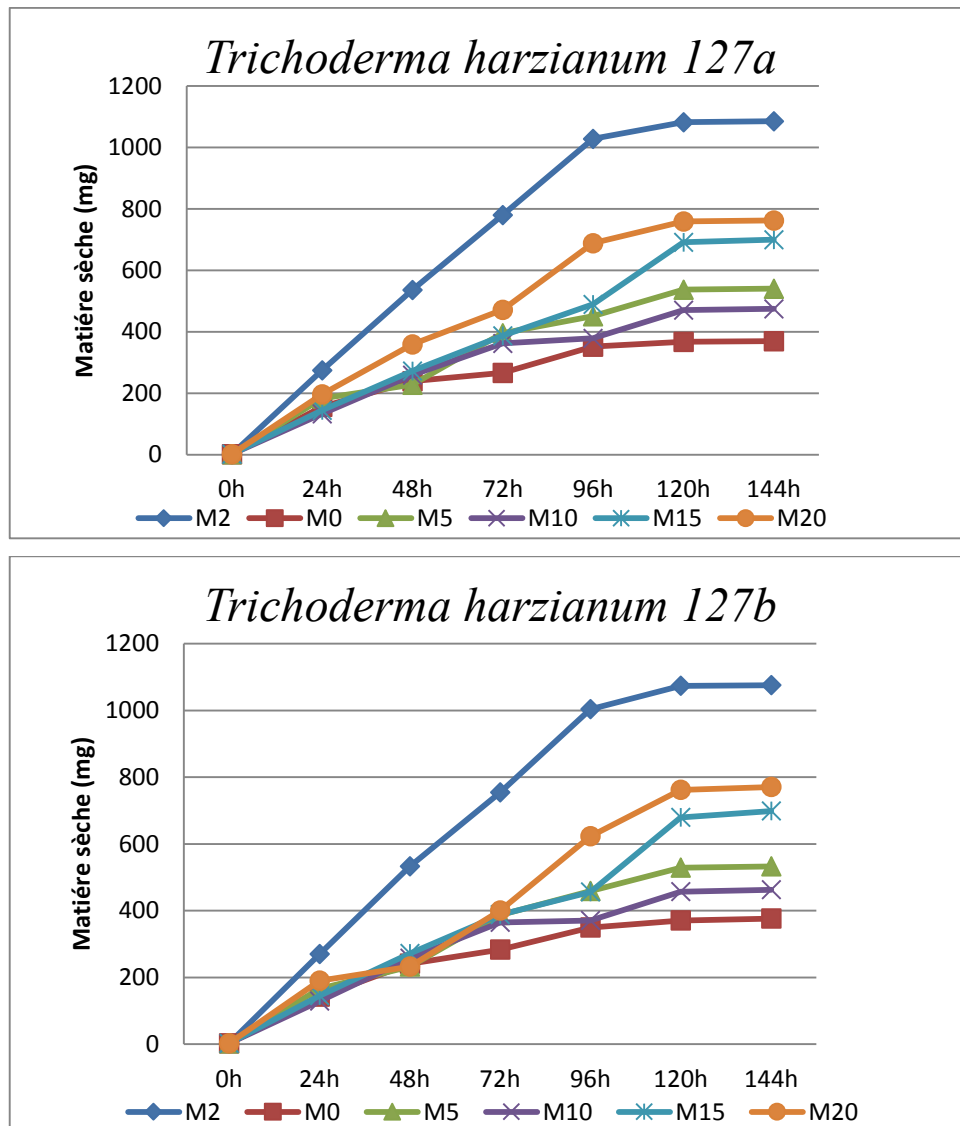


Figure 44 : Evaluation de la croissance mycélienne de *T. harzianum 127a* et *T. harzianum 127b* sur des milieux de culture a différents concentration de Glucose : M2, M0, M5, M10, M15 et M20.

➤ Optimisation du pH

Une série de fermentations en fioles à des pH varié (3 à 11) ont été réalisées pour la sélection d'un point hydrogène optimum pour le développement des souches de *Trichoderma*. Les résultats de la mesure de la matière sèche, révèlent que les souches antagonistes ont un large spectre de développement de pH (Figure 45). Par ailleurs, la croissance mycélienne maximale a été observée à une valeur de pH de 5 et la valeur minimale été à 11.

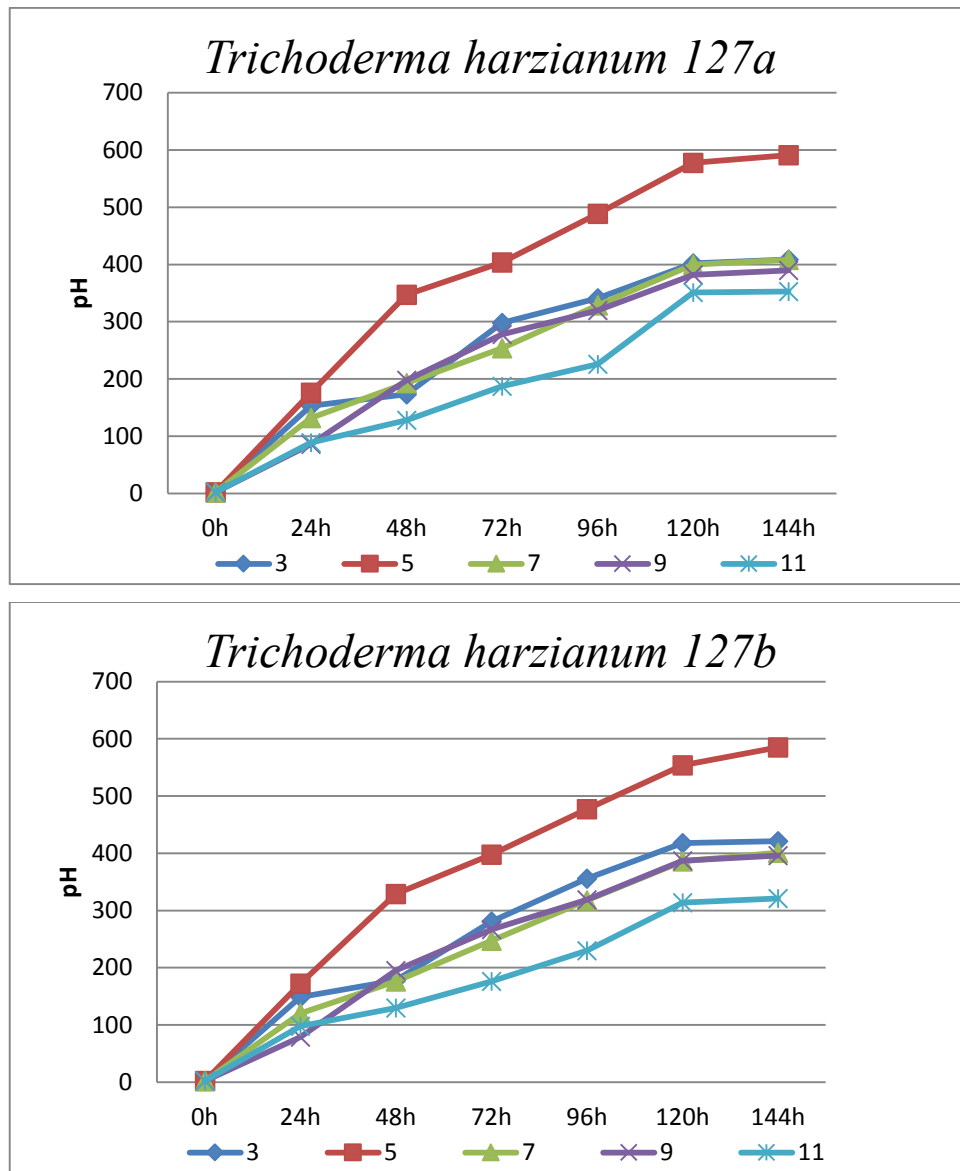


Figure 45 : Evaluation de la croissance mycélienne de *T. harzianum* 127a et *T. harzianum* 127b sur le milieu M2 à différents pH: 3, 5, 7, 9 et 11.

➤ Optimisation de la température

Les résultats de l'optimisation de la température montrent que les deux souches de *Trichoderma* peuvent se développer dans un intervalle de température situé entre 4 et 55°C. En effet, les résultats montrent qu'à 4°C la croissance mycélienne est trop réduite. Par contre, à 30°C la croissance mycélienne est maximale (Figure 46).

L'analyse des résultats révèle aussi que *T. harzianum* 127a et *T. harzianum* 127b peuvent se développer à une température élevée 55°C, ce qui signifie qu'elles sont thermorésistantes.

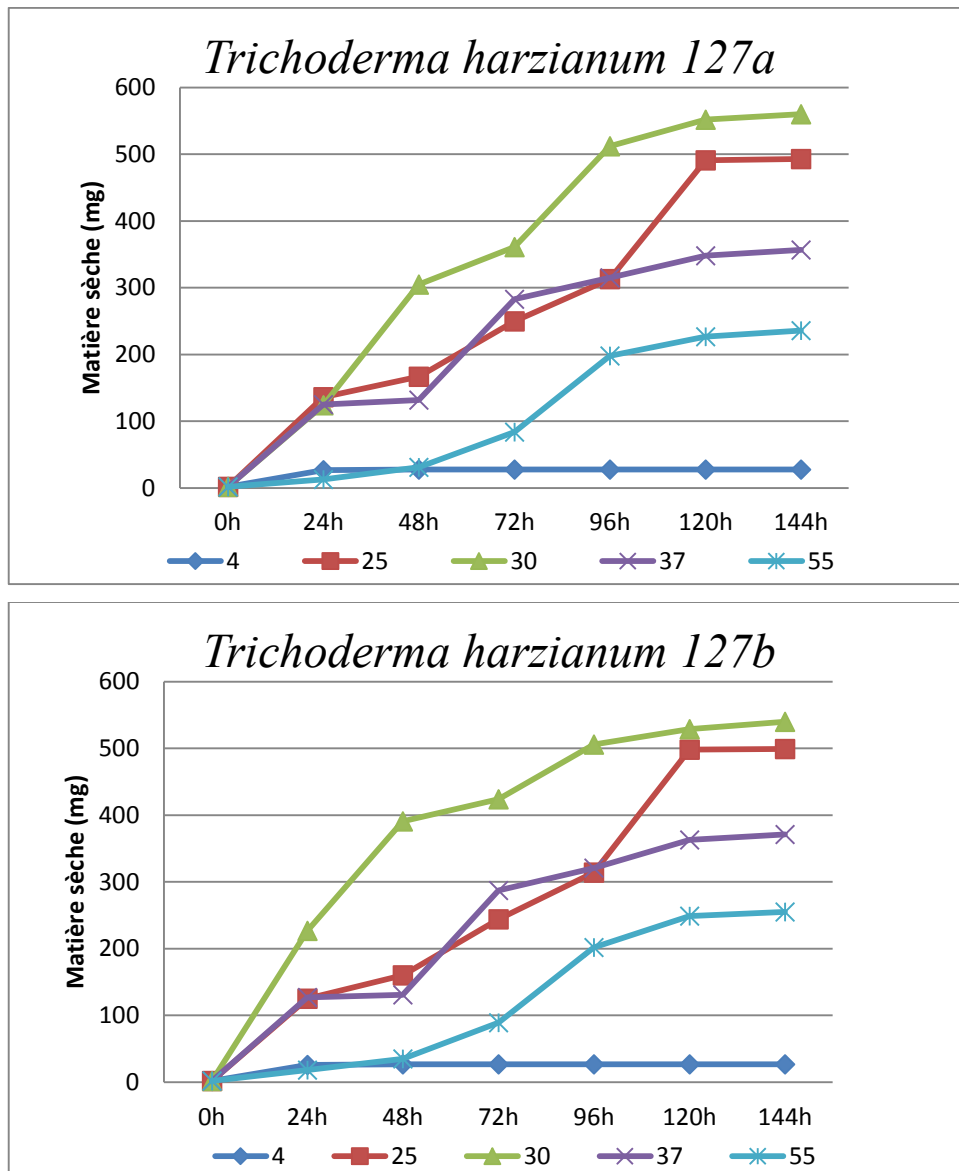


Figure 46 : Evaluation de la croissance mycélienne de *T. harzianum 127a* et *T. harzianum 127b* sur le milieu M2 à différents température : 4, 25, 30, 37 et 55.

4.7.1.2. Les paramètres de contrôle

Trois paramètres ont été considérés au cours de la fermentation liquide (20L) à savoir : la mesure de Glucose, la DO et la concentration sporale.

➤ Mesure et suivie de la concentration des sucres

La concentration des sucres à l'intérieur du fermenteur est un paramètre indiquant l'état du développement du mycélium (biomasse).

L'analyse des résultats montre une diminution régulière (Figure 47) de la concentration des sucres au cours des 144 h de fermentation pour les deux souches de *Trichoderma harzianum*.

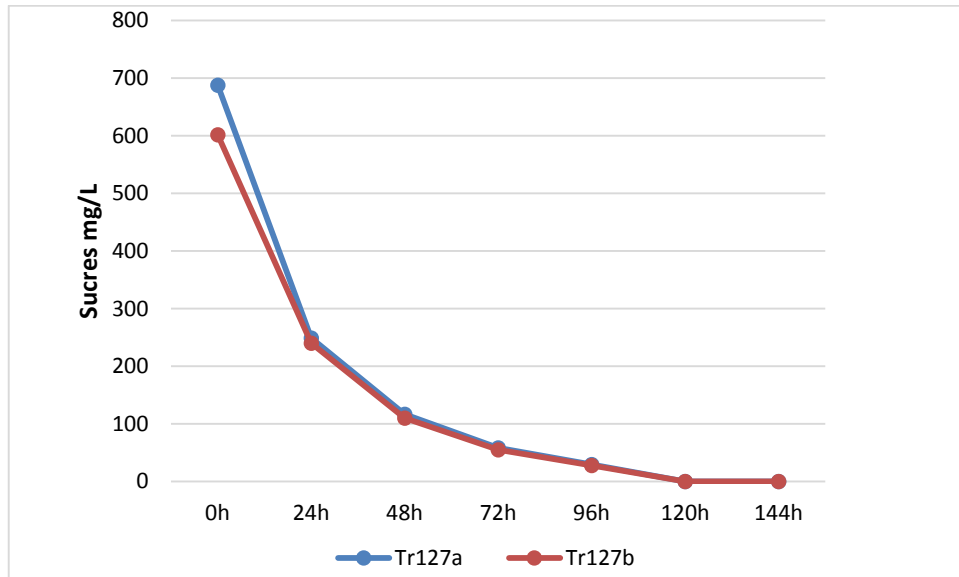


Figure 47 : Mesure de la concentration des sucres à l'intérieur du fermenteur au cours de la fermentation.

➤ Mesure et suivie de la DO

La mesure de la DO (Densité Optique) nous renseigne sur la multiplication mycélienne à l'intérieur du fermenteur. Le suivie de la mesure de la DO montre une augmentation rapide au cours des premières (48h) heures, par contre elle devient moins rapide dans les dernières heures de fermentation (Figure 48).

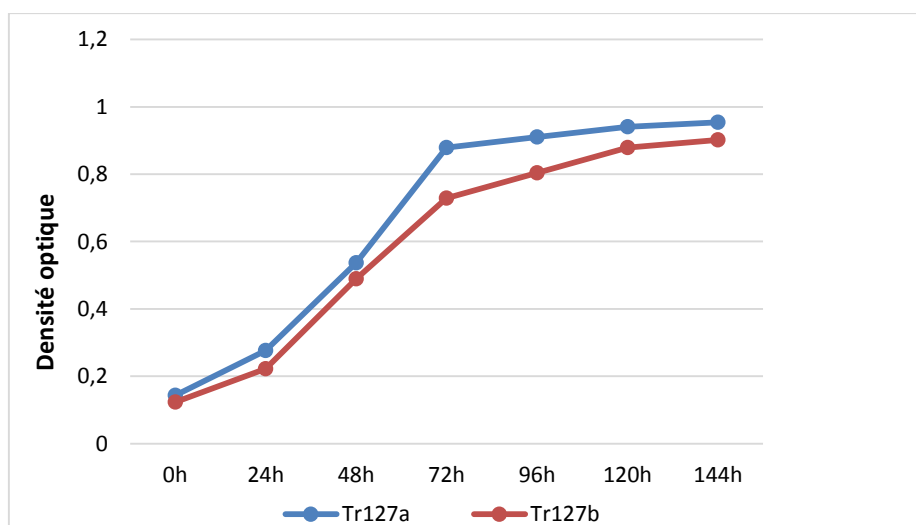


Figure 48 : Mesure de la DO à l'intérieur du fermenteur au cours de la fermentation.

➤ Quantification des spores

La quantification des spores permet de connaître l'état physiologique et biologique des antagonistes dans le fermenteur.

Les résultats des calculs notés (Figure 49) montrent que la concentration des spores est linéaire (stable) pendant les premières heures (48h) puis augmente rapidement dès les 48^{ème} heures jusqu'à la fin de la fermentation. La concentration maximale atteinte à la fin de la fermentation est de l'ordre de 10^6 UFC/ mL pour les deux souches antagonistes.

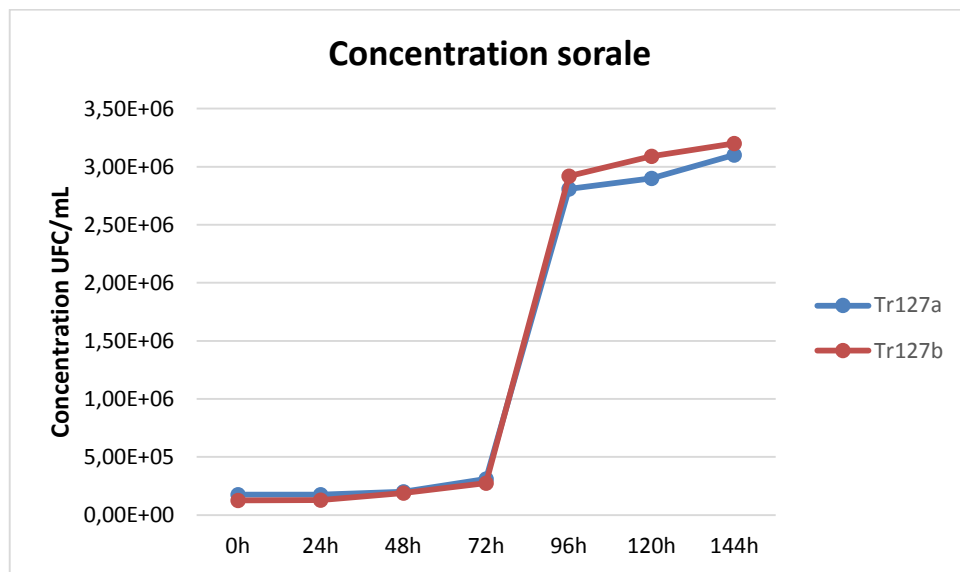


Figure 49 : Suivi de la concentration sporale au cours de la fermentation.

L'observation microscopique d'un échantillon pris du fermenteur après plusieurs heures de fermentation (24 h, 72 h et 144 h), montre une absence totale de spores après 24 h de fermentation (Figure 50). Par ailleurs, l'apparition des spores commence, à partir du troisième jour de fermentation et devient de plus en plus importante dans les dernières heures de la fermentation.



Figure 50 : Aspect du mycélium et apparition des spores au cours de la fermentation liquide ; **A :** T24 h ; **B :** T72 h et **C :** 144 h.

4.7.2. Fermentation sur support solide

La fermentation sur le son de blé a pour objectif de produire des quantités importantes des spores à des fins de « Tests » de leurs effets fongicides et ou bien fongistatiques *In Planta*. La durée de cette fermentation n'est pas précise, elle dépend de l'état hydrique du milieu (Humidité).

4.7.2.1. Mesure et suivie du Poids

Le poids des barquettes de la FMS est indicateur de l'état de fermentation. Les résultats (Figure 51) exprimés au cours de la FMS, indiquent que le poids des barquettes diminue progressivement jusqu'à l'obtention d'un poids stable (les mesures du poids après le 6^{ème} jour donne des valeurs très proches). La différence du poids initiale entre les deux isolats de *Trichoderma* est due à la différence de biomasse après fermentation liquide. En effet, la biomasse obtenue après fermentation sur milieu M2 pour la souche *Trichoderma harzianum* 127a est largement supérieur à celle obtenue par la deuxième souche (*Trichoderma harzianum* 127b).

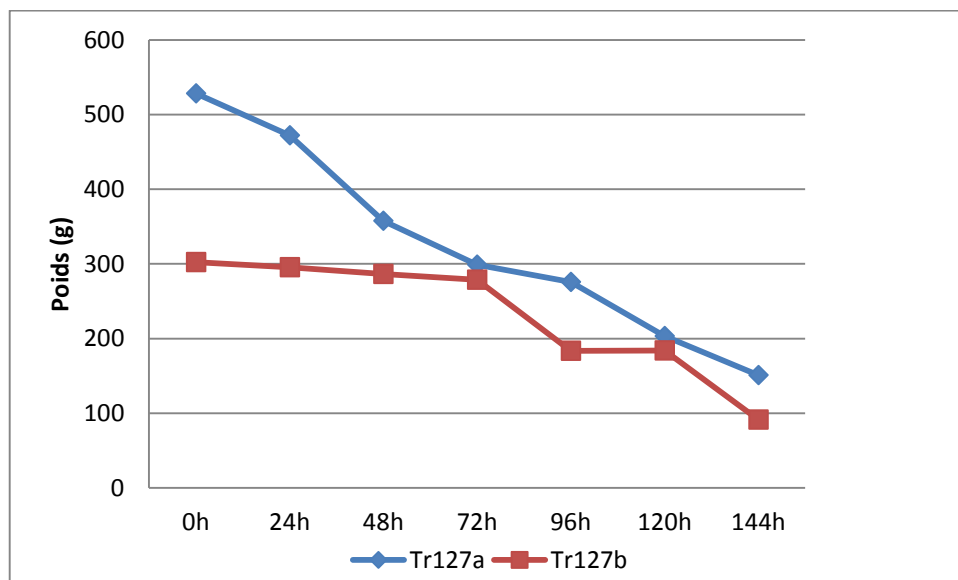


Figure 51 : Mesures du poids au cours de la FMS.

4.7.2.2. Mesure et suivi de l'humidité

L'humidité est le premier facteur qui intervient dans les phénomènes biologiques à l'intérieur des barquettes de FMS. Les mesures de l'humidité à l'intérieur des barquettes sont illustrées dans la figure 52. En effet, l'analyse des deux graphes montre que le pourcentage d'humidité a diminué au cours de la FMS.

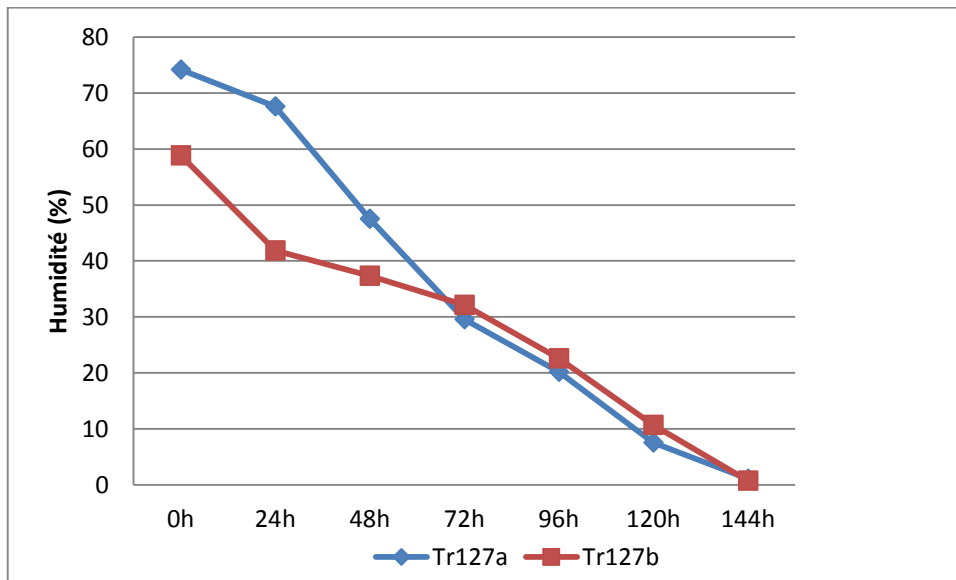


Figure 52 : Mesure de l'humidité au cours de la FMS.

A la fin du processus de fermentation, les valeurs d'humidité mesurées tournent autour de 1% environ. Les barquettes prennent un aspect de texture sèche, fissuré, solide, cassable et portant une coloration blanche à verdâtre (Figure 53).



Figure 53 : Aspect des Barquettes de la FMS : avant fermentation (A), et après fermentation (B).

4.7.2.3. Quantification des spores

La quantification des spores est une étape essentielle dans le suivi de la FMS. Les résultats de la mesure de la concentration sporale montre que cette dernière augmente régulièrement avec le temps. En effet, la concentration sporale du début a été de l'ordre de 10^5 (Figure 54) pour les deux isolats de *Trichoderma harzianum* 127a et T-127b, cette concentration a augmenté d'une façon exponentielle jusqu'à 96h où elle atteint une concentration de l'ordre de 10^9 UFC/g chez les deux antagonistes.

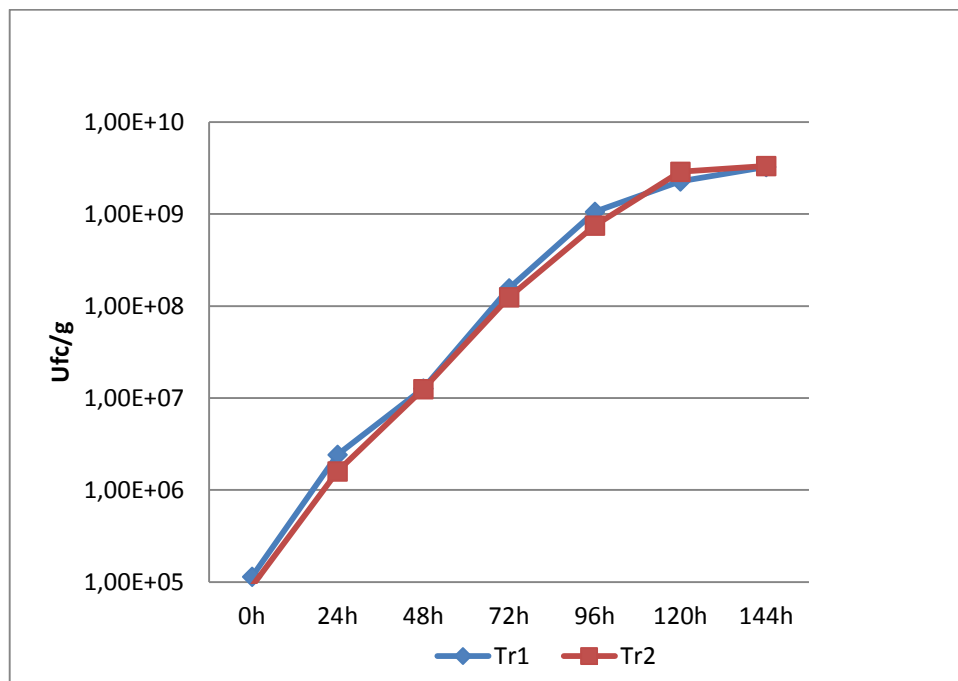


Figure 54 : Mesure de la concentration sporale au cours de la FMS.

4.7.3. Purification des spores

La purification des spores a pour objectif de séparer les spores de leur support fermentaire (Son du Blé). Le résultat que nous obtenons dans cette étape, est une poudre de couleur vert foncé et de texture lisse, correspondant aux spores de *Trichoderma harzianum* (Figure 55).



Figure 55 : Spores de *Trichoderma harzianum* obtenus après purification.

4.8. Evaluation de l'effet des produits obtenus

4.8.1. Evaluation de la maladie

L'application des bio fongicides T-127a et T-127b dans le cas de la Cylindrosporiose a réduit d'une façon importante le taux de contamination par *Cylindrosporium sp* et les taux de réduction de la maladie ont variés entre 66.66 et 75% (Figure 56). Par ailleurs, le traitement des pots par les mêmes antagonistes a diminué de 75 à 81.81% l'infection par *Fusarium solani* (Figure 56).

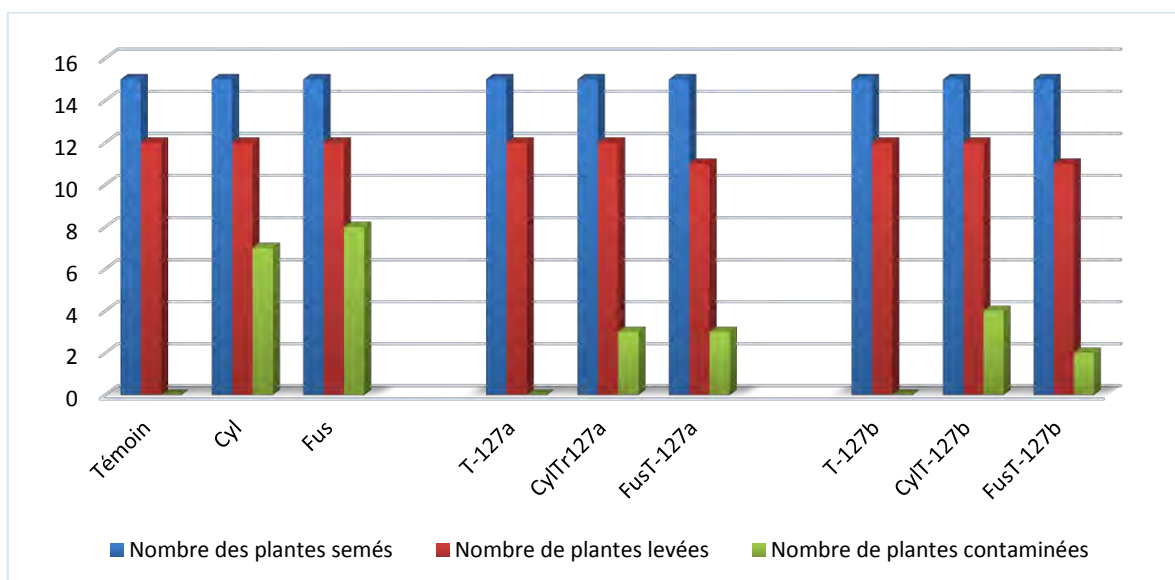


Figure 56 : Evaluation du taux de la Fusariose et la Cylindrosporiose *In Planta*.

Par ailleurs, Les résultats relatifs au nombre de feuilles sont présentés dans la figure 57. Ces résultats montre que, l'application de bio fongicide (spores de *Trichoderma harzianum* 172a et 1247b) a conservée partiellement le nombre des feuilles dans les plantes de *Lens culinaris*. En effet, le nombre des feuilles des plantes infectées et traitées par les souches de *T. harzianum* est légèrement inférieur au témoin, par contre, en absence d'un traitement par *T-harzianum*, le développement des feuilles sur les plantes est largement moins important. L'introduction des spores de *Trichoderma harzianum* dans les plantes de lentilles a montrée aussi une augmentation considérable de nombre des feuilles en comparaison au témoin.

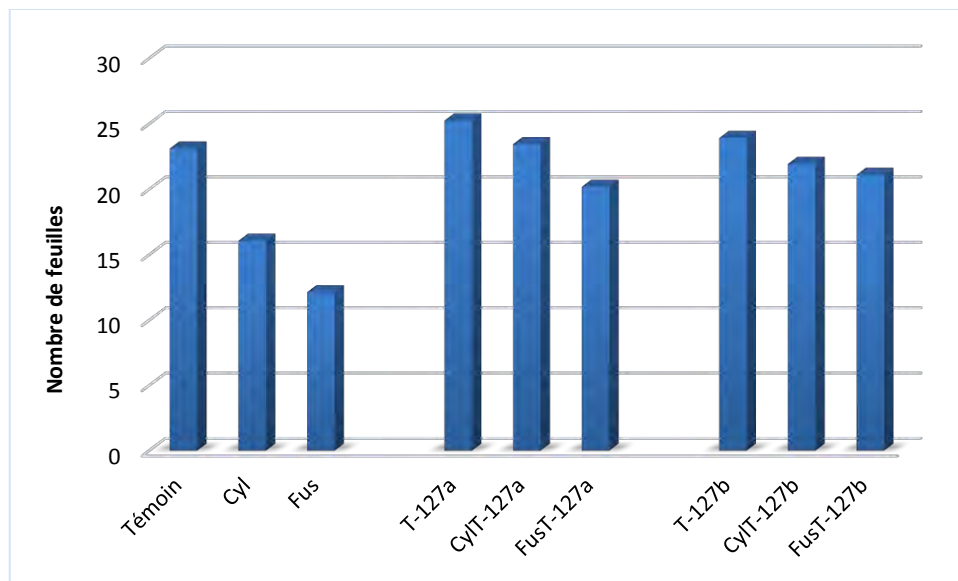


Figure 57 : Evaluation de l'effet des spores de *Trichoderma harzianum* 127a/127b sur le nombre des feuilles des Lentilles.

Aussi, les mesures des longueurs des tiges des plantes de lentilles obtenus, montrent que l'utilisation des souches de *Trichoderma harzianum* 127a et 127b réduits de 13.14 à 29.38 % la longueur des tiges par apport aux témoins (Figure 58).

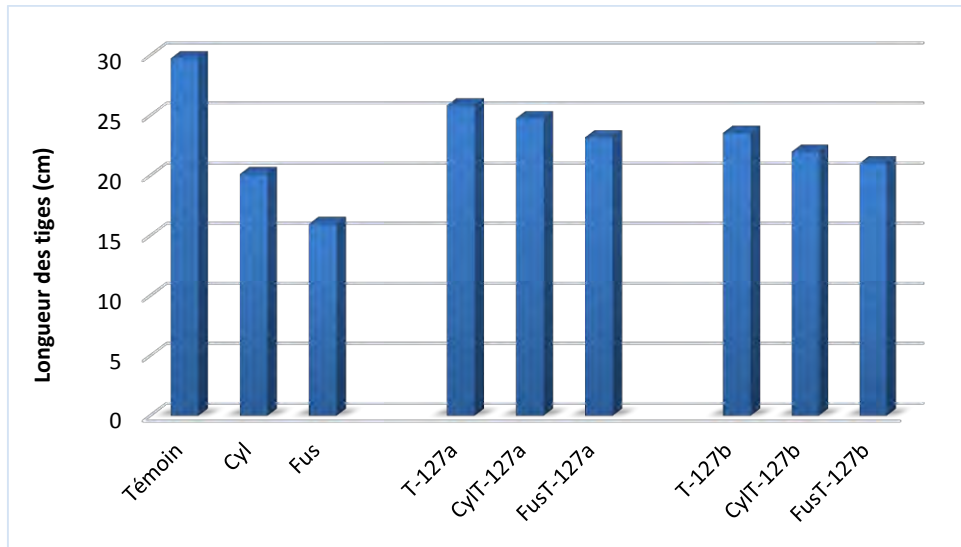


Figure 58 : Evaluation de l'effet des spores de *Trichoderma harzianum* 127a/127b sur la longueur des tiges des Lentilles.

La longueur des racines forme un critère important d'adaptation pour le fongicide. En effet, les plantes qui développent un système racinaire important peuvent pomper l'eau à des profondeurs considérables. Les résultats d'utilisation de *Trichoderma harzianum* 127a et 127b, ont montré un effet hautement significatif sur la longueur des racines dans le cas de la Fusariose, et moins significatif dans le cas de la Cylindrosporiose (Figure 59). Par contre, l'induction de *T-harzianum* sur des racines seines a permis un développement des racines proches ou légèrement supérieures à la longueur de témoin.

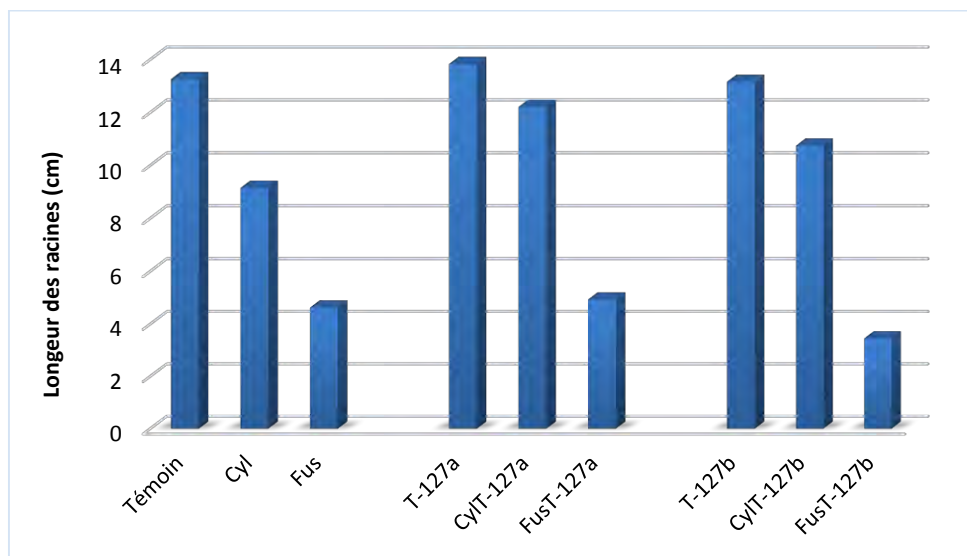


Figure 59 : Evaluation de l'effet des spores de *Trichoderma harzianum* 127a/127b sur la longueur des racines des Lentilles.

4.8.2. Evaluation des paramètres physiologiques

4.8.2.1. Teneur relative en Eau

L'analyse des résultats de la teneur en eau (TRE) illustrés dans la figure 60, montre que la teneur en eau subit une chute considérable dans les plantes infectées en absence de traitement par l'antagoniste. Par contre, l'utilisation de *Trichoderma harzianum* 127a et 127b entraîne une légère diminution de la teneur de l'eau.

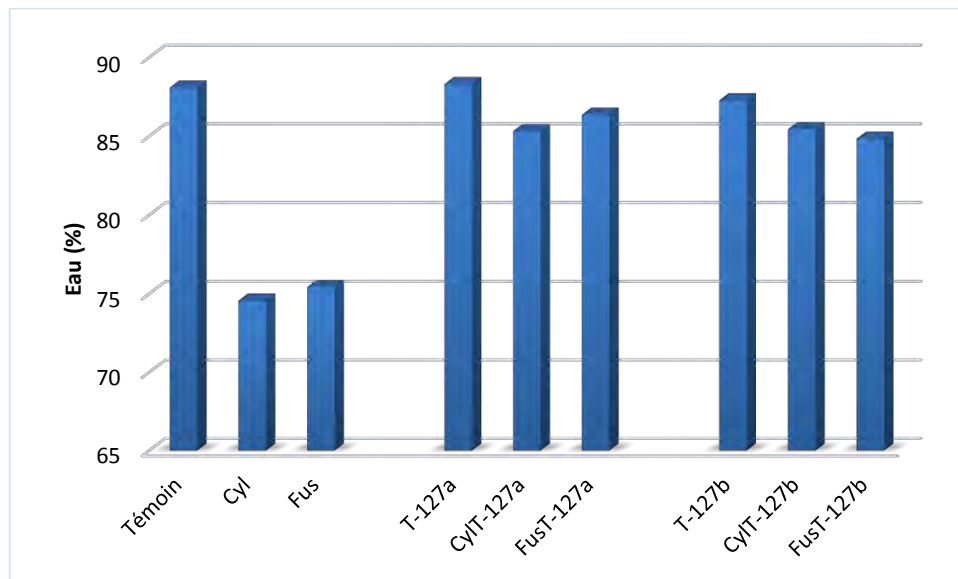


Figure 60 : Evaluation de l'effet des spores de *Trichoderma harzianum* 127a/127b sur la teneur en eau des Lentilles.

4.8.2.2. Teneur en Chlorophylle

L'analyse des résultats (Figure 61) de la teneur de Chlorophylle totale (Chlorophylles A et B) montre, une baisse dans les teneurs ces pigments dans la totalité des plantes infectées et traitées avec le bio fongicide, par contre, la teneur de Chlorophylle des plantes seines traitée avec les mêmes antagonistes été similaire (T-127b) ou supérieur (T-127a) a la teneur du témoin.

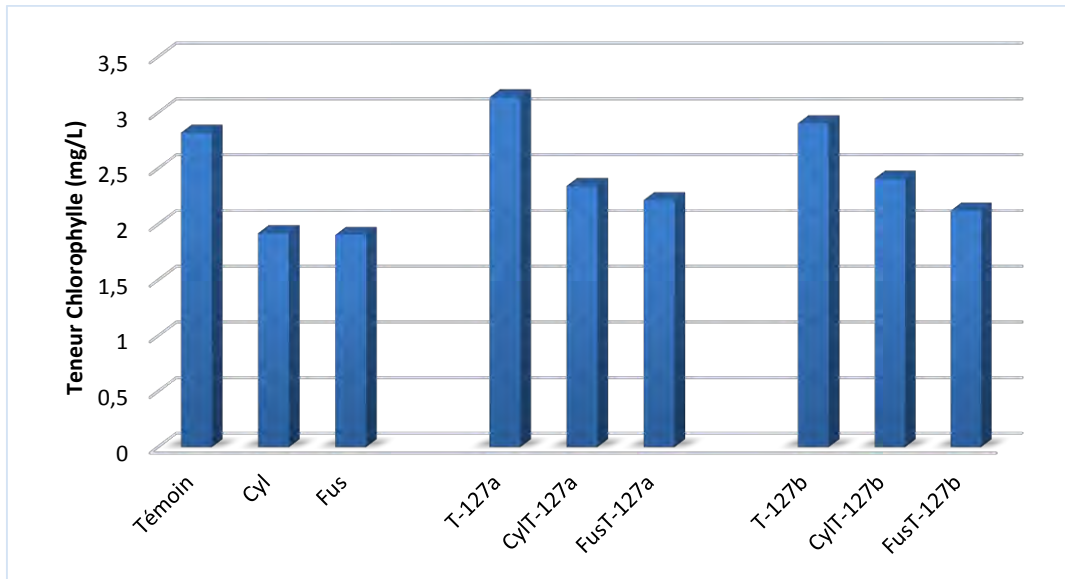


Figure 61 : Evaluation de l'effet des spores de *Trichoderma harzianum* 127a/127b sur la teneur en chlorophylle des Lentilles.

4.8.3. Evaluation des paramètres chimiques

4.8.3.1. Teneur en Proline

Le dosage de la proline libre montre qu'en absence de traitement par *Trichoderma harzianum* 127a et 127b, les plantes infectées présentent une accumulation importante de ce paramètre (Figure 62). Cependant, l'introduction des mêmes souches antagonistes cités précédemment, n'entraîne pas d'accumulation de proline est les valeurs sont moins importante que dans le témoin.

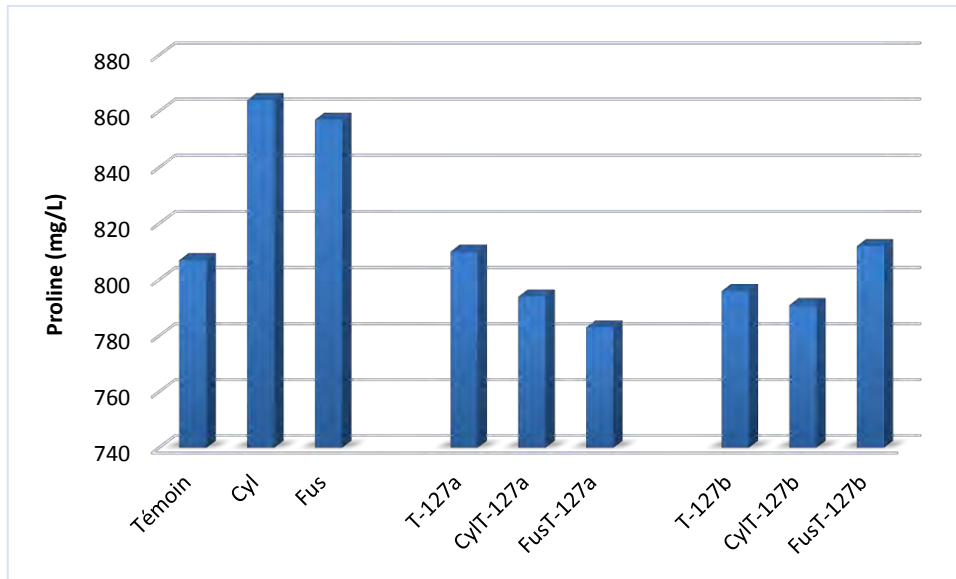


Figure 62 : Evaluation de l'effet des spores de *Trichoderma harzianum* 127a/127b sur la teneur en proline des Lentilles.

4.8.3.2. Teneur en sucres solubles

La quantité des sucres solubles dans la majorité des plantes tests été presque sémiulaire au témoin (Figure 63), par contre, la compraison des résultatsdans le cas des plantes contaminées et non traités par T-127a et T-127b, montre une dimunition inportante dans le taux de sucre totale par apport au témoin.

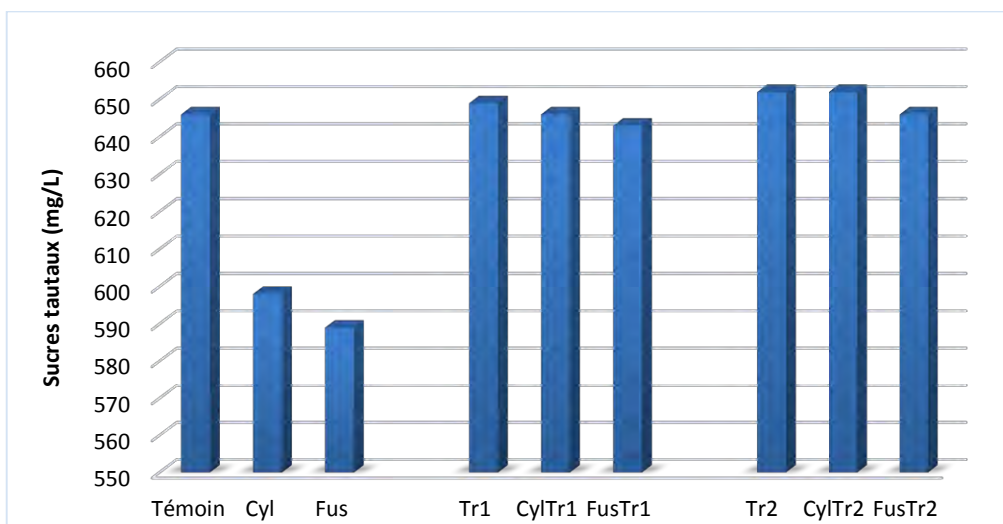


Figure 63 : Evaluation de l'effet des spores de *Trichoderma harzianum* 127a/127b sur la teneur en sucres totaux des Lentilles.

5. Discussion

L'incommodité et les inconvénients des agents de lutte chimique utilisés dans le domaine agricole, a permis à beaucoup de chercheurs dans le monde entier à s'orienter vers la recherche de l'utilisation des moyens biologiques (microorganismes, extraits des plantes etc..) dans la lutte phytosanitaire dans l'espoir de minimiser le danger des bio agresseurs tout en maintenant un environnement plus ou moins sain. Actuellement, parmi les « bios pesticides » utilisés à travers le monde, les « bio-fongicides » développés à base notamment de champignon antagoniste tel *Trichoderma*, sont maintenant largement utilisés dans la lutte des champignons parasites.

Il est établi que les sols agricoles en générale forment des réservoirs pour les espèces biotiques, néanmoins, elles abritent de nombreuses espèces fongiques bénéfiques jouant un rôle important dans la stimulation et la protection de la vie des plantes.

Aussi, la stratégie adoptée dans notre travail repose sur quatre axes d'étude principaux notamment :

- L'isolement et l'identification de nombreuses souches pathogènes du groupe des mycètes contaminants les plantes de *Lens culinaris* et leurs environnements ;
- La sélection de souches antagonistes du genre *Trichoderma* ainsi que l'évaluation de leurs effets fongicides et ou bien fongistatiques *In Vitro* ;
- La production par voie fermentaire des spores de deux souches antagonistes « *T-127a* et *T-127b* » isolées à partir de sols de cultures de lentilles « *Lens culinaris* », et enfin ;
- L'évaluation *In Planta* de l'effet de deux bio-fongicides produits, au cours de nos expérimentations.

Les prélèvements des échantillons du sol et des plantes proviennent de deux localités dans la région de Constantine : Ain Semara et El Baâraouia. Les résultats obtenus au cours des prospections sur champs ont révélé après observations, des anomalies symptomatologiques sur

les plantes de lentilles examinées. Les différences détectées sont dues à des infections par des champignons phytopathogènes à différentes sévérités.

Au laboratoire, et pour la réalisation de des différentes expérimentations, cinq milieux de culture ont été choisis pour l'isolement des mycètes : le milieu PDA, Czapeck Dox, Sabouraud, MEA et MS. Ces milieux sont utilisés sous la forme solide afin d'obtenir des colonies distinctes les unes des autres (Davet et Rouxel, 1997). En effets, les milieux PDA, Czapeck Dox, Sabouraud et le milieu MEA, sont des milieux standards conçus pour l'isolement d'un large spectre de mycètes. Ces milieux sont décrits par plusieurs auteurs (Moreau, 1991 ; Samson *et al.*, 2000 ; Leontopoulos *et al.*, 2002 ; Lund *et al.*, 2002), leurs compositions est simple et riche en matière glucidique (Chabasse *et al.*, 1999). Par contre, le milieu MS, est un milieu complexe, enrichi en vitamines et hormones ce qui lui confère une approche nutritive proche de celle des plantes. De ce fait, ce milieu de culture est conseillé pour l'isolement des moisissures phytopathogènes nécessitant des exigences nutritives élevées (Murashige et Skoog, 1962).

L'identification d'une espèce fongique est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturales, sous ses aspects, macroscopiques (développement de la culture, sa couleur, sa croissance, etc..) et microscopiques (mycélium, spores, conidiophores, conidies, etc...) (Tabuc, 2007). L'identification nécessite donc plusieurs jours de culture pour l'obtention des caractères essentiels nécessaires pour les études des champignons, ainsi on à tendance aujourd'hui à développer des méthodes plus rapides d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) (Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Peterson, 2006, Tabuc, 2007).

Aussi les résultats que nous avons obtenus lors de l'identification macroscopique et microscopique de l'ensemble des isolats (sols et plantes) utilisés au cours de nos travaux correspondent à 25 genres de champignons à savoir : *Absidia*, *Acromonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Bysochlamyces*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Cylindrosporium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fusrium*, *Myrothecium*, *Mucor*, *Onychocola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Peronospora*, *Phytophthora*, *Pseudallesheria*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma* et *Ulocladium*, appartenant aux trois embranchements suivants : *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutromycètes*.

Les différents critères microscopiques de nos souches présentés par les genres *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Bysochlamyces*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Cylindrosporium*, *Emericella*, *Eurotium* et *Fusarium* se rapprochent avec ceux décrits par Samson et ces collaborateurs (2000), Botton et al. (1990), Guiraud (1998), Layral et Joffin (1998) ainsi que celles de Chabasse et ces collaborateurs (2002). De même pour les genres : *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Onychocola*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Ulocladium* et *Scopulariopsis*.

Les critères d'identifications du genre *Chaetomium*, *Myrothecium*, *Peronospora* et le genre *Pseudallesheria* sont accord avec ceux cité par Guiraud (1998), Layral et al. (1998) et ceux de Nasraoui (2006). Par ailleurs, les critères d'identification cités par Aycock (1966) et Erwin et al. (1996) correspondent à celle obtenue dans les différents isolats de *Phytophthora*.

La technique, d'isolement des mycètes à partir des plante de lentilles préconisée par Belabid et al., 2000, a été prise en considération pour l'obtention des champignons phytopathogènes. Cette technique ne prend pas en considération les pathogènes obligatoires qui doivent être isolés par une culture axénique (Dougherty, 1953).

Les différents isolements effectués à partir des plantes de lentilles, a permis l'obtention de 110 souches fongiques des différentes étages végétatifs (Racines, Tiges, Feuilles). La distribution des isolats est presque homogène entre la partie souterraine (Racines) et les parties aériennes (Tiges et Feuilles). En effet, Bayaa et Erskine (1998) et Summiaya (2010) ont prouvé dans leurs recherches que les champignons phytopathogènes peuvent infectées n'importe qu'elle partie de la plante.

Par ailleurs, les échantillons du sol sont prélevés du premier horizon (0-20 cm) dans lequel se concentre l'essentiel de l'activité biologique. Cet horizon est le plus exposé à l'air et contient principalement des espèces aérobies.

La technique standard de microbiologie, utilisant la suspension dilution, a été choisie dans notre étude pour l'isolement de la flore fongique tellurique. Le seul inconvénient de cette technique est qu'elle surestime les espèces qui sporulent dans le sol aux dépens de celles qui sont présentes

seulement sous forme mycélienne (se trouvant dans les débris végétaux et autres) et, pour cette raison, rarement isolées (Warcup, 1955).

Ainsi les isolements effectués à partir des sols ont comptabilisé la présence de 87 souches fongiques et les profondeurs les plus peuplées sont situées à 5 et 10 cm avec un taux de présences d'environ 36.90% et à 15 cm de profondeurs le taux de présence est de 26.78% Ces résultats montrent que les souches fongiques isolées sont autochtones au site (Calvet, 2003) et sont souvent rencontrés dans les sols, ce qui nous rapproche des résultats rapportés par Alvarez-Rodriguez *et al.* (2002) et Prince *et al.* (2011). Cependant, une telle distribution des isolats est dû, à la nature et à la structure aérée du sol qui facilite le transport de l'oxygène et favorise le développement des moisissures, ainsi qu'à la richesse du sol en matière organique (>1) et donc en carbone et azote.

La comparaison des résultats des genres des mycètes isolées des deux sites montre que, 89.5% des souches isolées proviennent du site El Baâraouia ; *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Peronospora*, *Phytophthora*, *Penicillium*, et *Ulocladium*), alors que 83.31% sont isolés à partir du site Ain Semara ; *Acremonium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Eurotium*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Pseudallesheria*, *Ulocladium* et *Trichoderma*, et l'ensemble de tous ces genres sont isolées aussi bien à partir des différentes parties des plantes infectées que des sols analysés. Ces résultats montrent que les souches ont été transmises à partir du sol par le biais de la sève ou par des ouvertures naturelles ce qui permet considérer, le sol comme étant un milieu de stockage des spores fongiques. Ces résultats rejoignent ceux présentés par Estelle Levetin et PhD et ceux d'Abigail (2005).

Par ailleurs, 10.5% des genres restants (genres : *Absidia*, *Botrytis*, *Cylindrosporium*, *Myrothecium* et *Rhizoctonia*) proviennent du site El Baâraouia, et 16.69% des genres : *Curvularia*, *Cylindrosporium*, *Onychocola* et *Rhizoctonia*, du site Ain Semara et l'ensemble de ces genres sont isolés uniquement des plantes ce qui suppose qu'elles sont transmis par voie aérienne ou bien par le biais de la semence (Estelle Levetin et PhD).

En effet, l'étude des différentes isolats montre que, seulement 55.34% des souches prélevés du site El Baâraouia (genres : *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Cylindrosporium*, *Fusarium*, *Peronospora*, *Phytophthora* et *Rhizoctonia*) et 46.30% des souches obtenus du site Ain Semara (genres : *Alternaria*, *Cylindrosporium*, *Phytophthora* et *Fusarium*), sont des souches pathogènes pour les plantes de *Lens culinaris*. Ces résultats correspondent à ceux obtenus par Richardson (1979), Ahmed et al. (1993), Muhlabauer et al. (2002) et Hussain et al. (2007).

En effet, les conditions environnementales du milieu sont connues comme jouant un rôle déterminant dans la dynamique de la colonisation de ce milieu par des microorganismes. L'influence de ces populations sur leurs environnement est gouvernée par les paramètres physico-chimiques des sols, ainsi, les facteurs abiotiques peuvent affecter la composition spécifique des communautés microbiennes et leurs potentiel chimiques (Alexander, 1977).

L'analyse des données météorologiques relevées au niveau de la région de Constantine (Ain Semara et El Baâraouia, ont favorisés le développement des maladies cryptogamiques et en particulier les maladies fongiques. Ces résultats sont conformes à ceux des différentes études menés par Messiaen et Lafon (1970), Tivoli et al. (1996), Champion (1997), et Nasraoui (2006) qui ont montré que les maladies fongiques sont favorisées par des températures comprises entre 10 et 20°C et par des conditions d'humidité élevées permettant la germination des conidies du pathogène et sa pénétration dans la plante hôte.

Par ailleurs, l'étude des paramètres physico-chimique montre, qu'avec une teneur en matière organique total de 1.79% (El Baâraouia) et 1.81% (Ain Semara), les sols étudiés sont compris dans l'intervalle des taux normaux (1.5-2.5%) décrites dans les normes de Duthil (1970).

La comparaison des valeurs de pH de nos sols avec les normes donnée par Madagascar (cité dans le Mémento de l'agronome, 1974), montre que ces sols sont légèrement alcalins. De telles valeurs du pH mesurés caractérisent les sols calcaires. En effet, d'après Baise et Jabiol (1995) les sols calcaires ont un pH compris entre 7.3 et 8.5. Ces résultats expliquent aussi les valeurs de saturation qui sont supérieurs à 50%.

L'analyse des résultats des valeurs de la conductivité électrique (CE), mesurées des sols prélevés de El Baâraouia et de Ain Semara, révèlent que ces sols ne sont pas salins ($CE < 1$) et ceci d'après les normes décrites par Durand (cité par le Mémento de l'agronome, 1974).

Par ailleurs, le rapport C/N calculé suite au dosage de carbone et d'azote, a donné des valeurs < 15 ce qui signifie que la matière organique est rapidement minéralisée fournissant ainsi une importante quantité d'azote minérale.

La grande diversité mycologique observée après identification macroscopique et microscopique des isolats (sols et plantes), est due principalement à différentes conditions environnementales favorisant le développement des champignons phytopathogènes : taux de pluviométrie entre 19 mm et 68 mm, d'humidité 60 à 71% et une température entre 19 et 26°C.

L'importante charge des champignons phytopathogènes isolés à partir des plantes et des sols des sites d'El Baâraouia et d'Ain Semara explique probablement la chute des rendements de lentilles enregistrés dans la région de Constantine et en particulier durant la campagne agricole 2011/2012 (Benelbedjaoui, 2014).

L'utilisation des moyens chimiques, pour lutter contre les maladies fongiques de la culture des lentilles, n'a malheureusement pas permis de maîtriser l'évolution de ces pathogènes. De ce fait, il serait intéressant de mesurer l'action de *Trichoderma* dans une éventuelle résorption de l'action de ces maladies.

En effet, les souches de *Trichoderma* utilisées dans nos recherches, ont été sélectionnées parmi les isolats des sols d'El Baâraouia et d'Ain Semara. Ces souches ont été d'abord testés sur plantes de lentilles pour confirmer leurs effets non pathogènes.

Pour l'identification des deux souches isolées de *Trichoderma*, nous avons utilisé les critères proposés par Botton et al. (1990) et Guiraud (1998). Les deux isolats cultivés sur les quatre milieux de culture (PDA, Czp, Sab et MEA) ont formé de grandes colonies circulaire occupant la totalité de la boîte de Pétri, de texture lisse puis plus ou moins floconneux ou bien compacté en touffes. Les colonies été laineuses, de couleur blanche au départ, puis apparaissent en

vieillissant sous forme de touffes verdâtres isolées ou disposées en anneaux concentriques sur le milieu de culture. Ces résultats sont en accord avec ceux cités par Gams W. et Bissett J. (1998) Chaverri et Samuels (2003) et Kubicek et al. (2008). Les deux souches isolées ont été pré-identifiées dans le genre *Trichoderma*, ils se caractérisent par des hyphes jaunes, septés, ramifiés et parfois lisses ; les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale ; les phialides sont très ramifiés de forme de bouteilles renflées à la base, et sont directement insérées sur les conidiophores ; les phialides sont ovoïdes et les conidies sont unicellulaires, le plus souvent vertes et lisses. Les résultats d'observations du genre *Trichoderma* obtenues par Roquebert (1996) et Benkada (2006) confirment que nos observations expriment bien le genre *Trichoderma*.

Par ailleurs l'utilisation des technologies liées à la biologie moléculaire est une nécessité pour l'identification au niveau de l'espèce des souches de *Trichoderma* vue la complexité et la difficulté de l'identification morphologiques. En effet, les méthodes moléculaires sont basées sur l'étude d'un gène (locus), d'un fragment d'ADN (espaceur, intron, etc.) et bien de plusieurs gènes (multiloci) ou encore de l'ADN total.

L'identification des deux souches de *Trichoderma* utilisées au cours de cette étude a été effectuée par le Laboratoire de biologie moléculaire Université Louvain-La-Neuve (Belgique). Les séquences obtenues à partir de l'amplification d'un fragment d'ADN du gène *Tef-1 α* , ont été comparées avec ceux de la base de données GenBank.

L'analyse phylogénétique a montré que les deux souches de *Trichoderma* « T-127a et T-127b » sont situées sur une ligne phylogénétique commune et elles ont été placées dans la même branche avec leurs souches apparentées (*gi|619533167|Trichoderma harzianum*, *gi|619533159|Trichoderma harzianum*, *gi|619533161|Trichoderma harzianum* et *gi|619533160|Trichoderma harzianum*) avec un pourcentage de similarité de 100%. Le dendrogramme montre une bonne cohérence de classification entre les caractères morphologiques et moléculaires. **Ainsi, l'assemblage des données d'identification morphologique et moléculaire, a permis de classer les deux souches en tant que *Trichoderma harzianum*.**

Les propriétés antagonistes des *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 (Johanne, 2002). Les

souches du genre *Trichoderma* ont la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action : Antibiose, Mycoparasitisme et compétition.

Les tests d'antibioses, montrent que les deux souches antagonistes : *Trichoderma harzianum* « 127a et 127b », sont capables de produire des substances volatiles (confrontation indirecte) et des substances diffusibles (confrontation directe) inhibitrices de la croissance mycélienne des deux pathogènes : *Fusarium solani* et *Cylindrosporium sp.* Cependant, les métabolites diffusibles sont hautement plus efficaces que les métabolites volatiles. L'inhibition de *Fusarium solani* et *Cylindrosporium sp.* par les substances volatiles a été de 62.70% en moyenne pour les deux antagonistes, alors qu'avec les substances diffusibles, le taux d'inhibition a atteint environ 86.34%. Ces résultats sont conformes avec les travaux d'Asheafizad et al. (2005) ; Dubey et Suresh (2007), Akrami et al. (2011) et Saran Sundar (2013). Plusieurs autres travaux ont démontré que les espèces du genre *Trichoderma* peuvent agir par antibiose par la sécrétion d'une importante gamme de métabolites. Parmi les substances sécrétées par *Trichoderma harzianum* qui ont une activité inhibitrice, nous citerons des substances volatiles de type Alkyles pyrons (Claydon et al., 1987), Acétaldéhyde (Dennis et Webster, 1971) et des antibiotiques tels que la Trichodermine (Khasanov, 1962), la Dermadine, l'Alaméthicine, la Trichoticine et la Trichoziamine (Vial, 1989).

Par ailleurs, l'action mycoparasitaire des souches de *Trichoderma harzianum* a été mise en évidence grâce à des observations microscopiques au niveau de la zone de contact antagoniste-pathogène. En effet, l'observation microscopique a montrée un surenroulement du mycélium de *Trichoderma harzianum* autour des hyphes de l'hôte (pathogène). Par la suite, *T. harzianum* pénètre dans les cellules de *Fusarium solani*/*Cylindrosporium sp.* et consomme leurs contenus cytoplasmique. Ces résultats se rapprochent de ceux d'Elad et al. (1999) et Essalmani et Lahlou (2005). En effet, Kubicek et al. (2001) ont indiqué dans leurs travaux que les souches de *Trichoderma harzianum* possèdent un riche complexe enzymatique dégradant la paroi cellulaire (CWDES) apte d'hydrolyser la paroi cellulaire de divers hôtes, entre autres, la Chitinase (De La Cruz et al., 1992), la β -1,3- glucanases (De La Cruz et al., 1995b; Lorito et al., 1994; Noronha et Ulhoa 1996), la β -1,6-glucanases (De La Cruz et al., 1995a; De La Cruz et Llobell, 1999), la α -1,3-glucanases (Ait-Lahsen et al., 2001) et des Protéases (Geremia et al., 1993; Suárez, 2001).

Au niveau du test de compétition, le système des plaques avec inserts utilisé dans notre étude *In vitro*, présente de nombreux avantages qui permettent d'étudier le mécanisme de la compétition pour la nutrition, indépendamment de la compétition pour l'espace (comme la séparation physique entre l'antagoniste et le pathogène, la possibilité de transférer les conidies du pathogène d'un milieu à un autre d'une manière non destructive) (Janisiewicz et al., 2000). Les tests réalisés ont montré qu'en absence des souches antagonistes « *T-127a* et *T-127b* », la germination des conidies de *Fusarium solani* et *Cylindrosporium sp* a été meilleure en présence qu'en absence du glucose dans le milieu. Ceci confirme que ces souches sont dépendant des éléments nutritifs du milieu et ont besoin de suffisamment de nutriments pour germer et devenir infectieux. Par contre, en présence des souches de *Trichoderma harzianum*, la germination des deux pathogènes devient de plus en plus limitée (selon la concentration du Glucose). Ceci constitue des preuves de la possibilité d'implication importante de la compétition pour la nutrition dans l'activité antagoniste des souches « *T-127a* et *T-127b* » vis-à-vis de *F. solani* et *C. sp*. Ces résultats rappellent ceux de Chet, (1987) ; Simon et Sivasithamparam, (1989) ; Hajlaoui, (2001) et Biljana et Jugoslav, (2011) qui ont prouvé que les souches du genre *Trichoderma* agissent par mode de complétion contre l'agent pathogène dans sa phase saprophytique, surtout lorsque les nutriments forment un facteur limitant dans le milieu.

Droby et Chalutz (1994) ont montré aussi que, la croissance rapide d'un agent antagoniste peut intervenir dans la réduction des éléments nutritifs disponibles dans le milieu ou dans la restriction de l'espace pour la colonisation du pathogène, ce qui réduit la croissance de ce dernier et l'incidence de son infection. Toutefois, la méthode utilisée dans nos essais *In vitro* écarte l'effet de compétition pour l'espace et favorise plus la distinction de la compétition pour la nutrition, vu que le dispositif permet une séparation physique entre l'antagoniste et le pathogène avec un échange des éléments nutritifs du milieu.

Les résultats ainsi obtenus, nous laissent confirmer que l'efficacité des souches de *Trichoderma harzianum* s'avère plus importante en combinant les différents modes d'action : Antibiose, mycoparasitisme et Compétition .Pour cela l'utilisation de la technique de l'utilisation sporale semble être la mieux indiquée et la plus prometteuse.

Ainsi, la production des spores des souches de *Trichoderma harzianum* ne peut être effectuée que par fermentation. Pour cela deux types de fermentation ont été utilisées : une fermentation liquide ou submergée (FL) et une fermentation en milieu solide (FMS).

L'optimisation du milieu de culture pour la FL, a porté sur quatre paramètres principaux : la nature du milieu de culture, la concentration en glucose, le pH et la température. En effet, pour le choix du milieu de culture cinq milieux ont été pris en considération. Les résultats obtenus ont montré un bon développement des souches de *Trichoderma harzianum* sur les milieux M2, PDA et KM. Cependant, la croissance mycélienne a été plus rapide sur le milieu M2 suivie par le milieu PDA et enfin le milieu KM.

Généralement, la littérature consultée révèle que les champignons comme *Trichoderma harzianum* (Davet et Roxel, 1997) peuvent être isolés sur un milieu à base de dextrose et de pomme de terre (PDA). Ce champignon peut aussi avoir une bonne croissance sur le milieu KM (Landreau, 2002) quoique ce milieu soit préconisé surtout pour la production des métabolites secondaires (peptaïboles) (Benkada, 2006).

L'utilisation de l'extrait de Malt comme source de carbone et l'extrait de levure comme source d'azote a été cité dans les travaux de Papavizas et al. (1984) et Jakson et al. (1991). Ces deux types d'extrait forment les composants du milieu M2. Par ailleurs, la concentration de glucose a été aussi étudiée où cinq (05) concentrations de glucose ont été choisies pour le milieu MEA. Les résultats que nous avons obtenus ont confirmé que le milieu M2 donne une meilleure biomasse en absence d'addition du glucose. **Ceci présente un avantage pour la production de la biomasse de *T-harzianum* en fermentation liquide a faible coût.**

De même, le degré du potentiel hydrogène (pH) optimal a été sélectionné suite à une étude de cinq pH (3, 5, 7, 9 et 11), et les résultats montrent que nos souches de *T-harzianum* peuvent se développer dans un intervalle de pH compris entre 3 et 7. Ces résultats sont proches de ceux de Mohd et al. (2001) qui ont montré que les souches de *Trichoderma* peuvent se développer dans un intervalle de pH compris entre 4.5 et 7.5. L'optimum de croissance a été observé à une valeur de pH de 5 (pH acide), ce qui a été déjà prouvé par Agosin et al. (1997) et Jayaswal et al. (2003).

Les valeurs de température permettant le développement des souches « *T-127a* et *T-127b* » sont comprises entre 25 et 55°C ce qui est en accord avec les travaux de Sanogo et al. (2002) qui ont signalés que les souches du genre *Trichoderma* sont capables de se développer à des températures entre 20 et 40°C. Les résultats obtenus montrent aussi que la meilleure croissance est obtenue à une température de 30°C ce qui a été déjà observé par d'autres auteurs : Mohd et

al. (2011) et Jayaswal et *al.* (2003). Ces valeurs de températures montrent que nos souche tolèrent les basses températures (4°C) et par contre résiste à des valeurs allant jusqu'à 55°C.

En fonction de ces résultats, on peut déduire que les souches *T-127a* et *T-127b* peuvent croître d'une façon meilleure dans un milieu de culture à base d'extrait de Malt et d'extrait de levure (M2), a un pH de l'ordre de 5 et une température de 30°C.

Par ailleurs, pour la production de biomasse en FL, il a été constaté que la concentration sporale, la concentration en sucres et la DO, sont en relation étroite. D'après Tarus et *al.* (2003), le développement du mycélium est en augmentation au cours de la fermentation tant que la concentration des sucres et éléments nutritifs est suffisante. Cependant, dès le quatrième jour (96 h) de fermentation, cette concentration devient de plus en plus stable vue l'épuisement du substrat carboné et azoté et probablement l'influence de différents facteurs physicochimiques qui deviennent défavorables à la croissance. Ceci explique aussi le début de l'apparition de quelques spores à ce stade. Ces résultats concordent avec ceux de Papavizas et *al.* (1982).

A la fin de la fermentation liquide, une biomasse de couleur crémeuse, formée de mini pelletes est récoltée et pesée dans des conditions aseptiques. Il est à noter que la biomasse obtenue de la souche « *T-127a* » est plus importante que celle obtenus par la souche « *T-127b*. » Ceci peut être expliqué par la possibilité d'adaptation de la première souche aux conditions de fermentation en comparaison avec la seconde souche.

Par ailleurs, la mise en évidence de la FMS a été réalisée sur le son du Blé comme support fermentaire. Ce moyen a été préconisé par plusieurs auteurs pour la production des spores de *Trichoderma* (Tewari et Bhanu, 2004 ; Rosane et *al.*, 2008). L'analyse des résultats que nous avons obtenus, a montré une importante relation entre les différents paramètres étudiés : poids, humidité et concentration sporale. En effet, au cours de la FMS nous avons constaté que la concentration sporale est en augmentation rapide au détriment de l'humidité et du poids. La diminution de l'humidité est un facteur influençant sur le poids sec et l'activité de l'eau, menant à des conditions défavorables pour la croissance mycélienne ce qui oriente les souches de *T-harzianum* vers la sporulation. Aussi, il est à signaler que, la concentration sporale maximale a atteint l'ordre de 10^9 UFC/g, ce qui est en accord avec les travaux de Tewari et Bhanu (2004) et Zuriash et Tesfaye (2012).

L'application des spores de *Trichoderma harzianum* produite par fermentations a été effectuée sur des plantes de la variété Métropole, et dont l'objectif est de confirmer l'efficacité de ces souches *In planta* et de tester leurs effets sur la physiologie des plantes.

En effet, les résultats obtenus ont montré que la variété Métropole possède un taux de Chlorophylle total de 2,821 mg/L, une teneur de Proline de 807 mg/L, une quantité de sucre total de 646 mg/L et une TRE de 88.09%.

L'application des deux pathogènes : *Cylindrosporium sp* et *Fusarium solani* sur les plantes de Lentilles saines cultivées au laboratoire, a montré une réduction importante de la TRE (74.57-75.43%) ce qui a conduit les plantes a un déficit hydrique, ce qui se traduit par une augmentation dans la teneur de Proline (807-864 mg/L) et une diminution dans la concentration des sucres totaux (589-598 mg/L). La concentration de Chlorophylle a aussi diminuée (1.905-1.921 mg/L) et la croissance a été largement réduite (le nombre de feuilles, la longueur des tiges et la longueur des racines).

En effet, selon Lowlor (2002) et Lowlor et Cornic (2002), lors d'un déficit hydrique, l'activité physiologique de la feuille, et plus particulièrement la photosynthèse et la conductance stomatique sont affectées. La réduction de la photosynthèse, liée à la diminution du potentiel hydrique foliaire, est supposée dépendre à la fois de la fermeture des stomates, avec pour conséquence une diminution du transport et de la diffusion du CO₂ et d'une limitation biochimique des Chloroplastes à fixer le CO₂ (Tardieu et Simoneau, 1998 ; Escolana *et al.*, 1999 Flexas et Medrano, 2002). La diminution de l'activité photosynthétique influence sur la teneur en Proline et la concentration en sucres (Hussain, 2006), ainsi que sur la croissance végétative (Benmahammad *et al.*, 2001).

Par ailleurs, les résultats de stimulation des plantes (en absence des pathogènes) par les souches « *T-127a et T-127b* », ont montré que la croissance des plantes de lentilles est en augmentation (surtout au niveau de la longueur des racines et du nombre des feuilles). De même, la teneur en Chlorophylle a subi une augmentation importante, ce qui se traduit par une augmentation de la photosynthèse et donc du rendement des grains. Ces résultats sont en parfaite relation avec ceux de Monte et Llobell (2003), Kamala et Indira (2012) qui ont montré que les souches de *Trichoderma* ont un pouvoir stimulant de la croissance des plantes et contribuent à la résistance au stress hydrique.

Les résultats des différents tests avec les souches antagonistes et les deux pathogènes, ont montré des similitudes dans les différentes mesures (chimiques, physiques et morphologiques). Les faibles taux de différences enregistrées sont dus essentiellement au faibles taux d'infections obtenues lors des tests. En ce qui concerne, cette partie de notre travail, aucune étude n'est disponible pour confirmer ou controverser nos résultats.

La capacité de nos isolats fongique en l'occurrence, *Trichoderma harzianum* 127a et *Trichoderma harzianum* 127b, obtenus à partir des sols agricole Algérien ; a été confirmé *In Vitro* et *In Planta*, par les différentes expérimentations réalisées et dont les résultats ont été discutés précédemment. Ces points forts méritent, d'être pris en considération et forme l'originalité de ce travail.

6. Conclusion et perspectives

La recherche de nouvelles stratégies de lutte surtout biologiques, contre les champignons phytopathogènes est devenu un challenge principal d'un grand nombre de laboratoires dans le monde entier. L'objectif de ce challenge est de mettre en marché des produits biologiques efficaces en agriculture.

L'objectif de la présente thèse a porté sur l'étude des myco-pathogènes des plantes de lentilles, et la recherche d'une solution prometteuse pour freiner la prolifération de ces pathogènes, en particuliers *Cylindrosporium* et *Fusarium solani*.

La recherche des mycètes dans les échantillons des plantes et de sols prélevés des sites Ain Semara et El Baâraouia a été effectué sur des milieux standards et spécifiques. L'isolement a abouti à l'obtention de plusieurs souches fongiques, réparties en 25 genres à savoir : *Absidia*, *Acromonium*, *Altarnaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Bysochlamyces*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, ***Cylindrosporium***, *Curvularia*, *Eurotium*, *Emericella*, ***Fusarium***, *Mucor*, *Myrothecium*, *Onychocola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Peronopsora*, *Phytophthora*, *Pseudallesheria*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, ***Trichoderma*** et *Ulocaldium* ; environ 46% de ces genres sont des genres pathogènes pour les plantes de lentilles.

L'étude physico-chimique de la zone rhizosphérique des plantes jugées infectées a révélé que le taux de la matière organique a été supérieur à 1.50, le pH a été d'environ 7 et le rapport C/N a été inférieur à 15. Les paramètres cités précédemment, ainsi que des paramètres climato graphiques (Humidité 66.5%, Température 23°C et Précipitation d'environ 44 mm) ont joué un rôle important dans le développement des mycètes phytopathogènes.

L'identification macroscopique et microscopique confirmé par des tests moléculaires des deux souches de *Trichoderma* isolées de la zone rhizosphérique des plantes de *Lens culinaris* a révélé qu'elles ont une grande similarité avec l'espèce *Trichoderma harzianum*. Les deux souches ont été enregistrées au niveau de la base GenBank sous les numéros d'accèsion Z127A0EF et Z127B0EF.

Par ailleurs, les différents tests de confrontations effectués *In vitro* par les deux souches de *Trichoderma harzianum* ont révélé des taux d'inhibition variantes entre 62.70% et 86.34% selon l'antagoniste et/ou le pathogène. Ces résultats ont été complétés par des tests de

compétition qui a révélé que la croissance des pathogènes est mieux en absence de souches antagonistes « *T-127a* et *T-127b* ».

La multiplication de mycélium des souches de *Trichoderma harzianum* en fermentation liquide a permis d'obtenir une bonne masse mycélienne, où les conditions optimales ont eu un pH 5, une température de 30°C, et un milieu de culture à base d'extrait de Malt et d'extrait de levure. Cependant, la mise en conditions plus ou moins défavorable pour le développement du mycélium (FMS) a permis de favoriser l'apparition de la forme sporale de nos deux souches antagonistes, qui s'est traduit par une poudre verdâtre lisse à la fin de la fermentation, sur un milieu solide.

L'application des fongicides (spores de *Trichoderma harzianum*) *In Planta* sur des plantes de variété Métropole nous a permis de constater qu'en absence de pathogènes les souches « *T-127a* et *T-127b* » jouent un rôle important dans la stimulation de la croissance végétatives. Par contre, en présence de pathogènes les spores de *Trichoderma* induisent des effets protecteurs pour la plante.

En conclusion, les résultats obtenus à travers ce modeste travail nous ont permis de confirmer et de préciser l'importance des souches de *Trichoderma harzianum* à l'égard de *Cylindrosporium sp* et *Fusarium solani*. Cependant, il est à noter que l'efficacité de ces souches est plus considérable en rassemblant (effet synergétique) tous leurs types d'actions : antibiose, mycoparasitisme, compétition et induction de la résistance systémique ; chose qui ne sera possible qu'en appliquant des cellules entières : **Spores**.

Enfin cette étude qui a été menée et finalisée malgré toutes les difficultés rencontrées, n'est pas une fin en soi, mais une modeste approche à la connaissance des nombreux problèmes notamment phytosanitaires qui se posent à notre agriculture, aussi nous souhaiterions que ce travail soit un exemple pour d'autres études similaires, pour cela, plusieurs perspectives sont liées à ce travail, en l'occurrence

- L'application de « *T-127a* et *T-127b* » sur autres pathogènes de *Lens culinaris* ;
- Généraliser les applications de « *T-127a* et *T-127b* » sur d'autres plantes légumineuses ;
- Productions industriels de ces spores de *Trichoderma* ;
- Utilisations des spores de *Trichoderma harzianum* comme un fongicide local (Algériens), sur les cultures de lentilles.

Résumé

Dans l'objectif d'évaluer l'effet bio protecteur de deux souches de *Trichoderma harzianum* sur deux phytopathogènes *Cylindrosporium sp* et *Fusarium solani*, un pathosystème utilisant la légumineuse modèle *Lens culinaris* a été choisi. L'isolement des mycètes a permis d'obtenir 197 isolats fongiques des différents échantillons prélevés des sites Ain Semara et El Baâraouia dans la région de Constantine. En effet, 87 isolats fongiques ont été obtenus de différentes profondeurs du sol, avec une dominance fongique dans les profondeurs 5 et 10. Le reste des isolats (110) ont été obtenus des différents étages de plantes avec une distribution homogène en nombre d'isolats entre la partie aérienne et souterraine. L'identification macroscopique et microscopique de l'ensemble des isolats a permis de les sérier en 25 genres fongiques dont 55.34% des souches prélevés du site El Baâraouia et 46.30% du site Ain Semara sont des phytopathogènes. Deux isolats fongiques à activité antagoniste ont été présélectionnés après avoir développé des importantes zones d'inhibition sur le milieu PDA. L'identification préliminaire et moléculaire de ces isolats a montré qu'elles appartiennent à *Trichoderma harzianum 127a* et *Trichoderma harzianum 127b*. Les tests d'antagonismes menés *In vitro* contre deux pathogènes de *Lens culinaris* à savoir *Cylindrosporium sp* et *Fusarium solani* ; ont révélés que le taux d'inhibition par les métabolites volatiles est de 62.70% en moyenne et celui des métabolites diffusibles est de 86.34% en moyenne. L'évaluation du taux de compétition exercé par « *T-127a* et *T-127b* » a révélé que nos souches de *Trichoderma* ont la capacité de réduire de 70 à 83% la croissance de *C.sp* et de 67 à 82% et la croissance de *F.solani*. De ces résultats, il paraît que l'efficacité des souches de *Trichoderma* est plus importante en réunissant tous ces modes d'action (utilisation des spores). L'optimisation de milieu fermentation (FL) a révélé que les conditions optimales de production de biomasse de « *T-127a* et *T-127b* » sont : pH5, température 30°C et un milieu de culture à base d'extrait de Malt (M2). La culture de biomasse de « *T-127a* et *T-127b* » sur son du Blé (FMS) a permis d'obtenir une poudre lisse verdâtre dont la concentration avant purification est $3.27.10^9$ UFC/mL pour *T-127a* et $3.33.10^9$ UFC/mL pour *T-127b*. Par ailleurs, l'application de ces spores sur des plantes de lentilles a révélé qu'en absence de traitement avec les souches antagonistes, les plantes inoculés avec l'un des pathogènes (*C.sp* et *F.solani*) subissent un déficit hydrique conduisant à une augmentation de la teneur en Proline, une diminution dans la teneur Chlorophylle, la concentration en sucre et la croissance. Par contre, les plantes stimulées par les souches de *Trichoderma* avaient une teneur stable en Proline, une teneur élevée en Chlorophylle et sucre et une croissance est rapide. Les autres traitements ont pu conserver des valeurs de sucre, Proline Chlorophylle et aussi une croissance similaire aux témoins. En conclusion, nos spores de *Trichoderma harzianum* produisent à échelle laboratoire, possèdent des activités antifongiques importantes leurs permettant d'être exploités à l'échelle industrielle.

ملخص

بهدف تقييم الميكروبات الفطرية لوقاية الخبز من *Trichoderma harzianum* وفطريات مرضية *Cylindrosporium sp* و *Fusarium solani* تم استعمال فئات العدس لثلاثة نماذج من الخبز التي يتم اختبارها لدراسة تأثيرها. ان عملية عزل الفطريات من محتويات الحبوب الفطرية من مظهر العينات المأخوذة من منطقة البحرية وعين للمراقبة المتبعين لولبي فوسرين طينة. وعلى فان 71 عزل فطرية تم الحصول عليها من مظهر اعماق التربة وكان للثلاث حواذ الفطريات الفطرية العمق (5 و 71 سم ، اطلاق العزلات) 771 (تم الحصول عليها من اجزاء خفية من نباتات العدس المشترك والخبز لصيغتها وبتوفير نتائج سلبية عدداً في الفطريات الأجزاء الموهبة و الارضية للتهبات. ان الالحظات البحرية والدمج هي ال مظهر العزلات من محتويات حصرها وتربط هي 55 ونوع فطرية بلغت 55.55%. من عينات موقع البحرية و 53.51 % من عينات موقع عينات مارة ، هذه العزلات تعتبر من الفطريات الممرضة. ان دراسة الشايط الفطرية للوضوح عن استخدام بيئة PDA لمظهر العزلات تم لتخيار الخبز التي اظهرت نشاطاً فطرياً ضد الفطريات التي اعطت من اطلاق تنبؤ معبرة و من خلال التعرف الاولي والجزئية يتبين انه من المتعين ان لا *Trichoderma 127a* و *Trichoderma 127 b* ، في عينات تجارب التاليف بين الفطريات في المظهر ضد فطريات *Fusarium solani* و *Cylindrosporin Sp* ممرضين لفئات العدس *Lens culinaris* أظهر أن معدل التنشيط من طرف الموهبات البحرية الفطرية المتطير هي 35.11% و 73.51% لموهبات البحرية غير الفطرية ، هذا من جهة و من جهة اخرى كشفت نتائج تقييم التاليف من طرف *Trichoderma 127a* و *Trichoderma 127 b*. ان لعزلات *Trichoderma* قدرة في قضي نسبة نمو (11-75%) و (31-75%) لكل من *Cylindrosporin Sp* و *Fusarium solani* في التواليف بتخصف الخبز الالات *Trichoderma* مخالل التلخيص التحصيل على هبي حال الجمع بين مظهر طرق التهفح البيولوجي وقياس استعمال جزيئات الفطريات. ان للدراسات التي اجريت داخل المخرم (FL) اوضح ان الظروف البيئية التي تلتها التلخيص هي ذلك من *Trichoderma 127a* و *Trichoderma 127 b* كلت عن درجة حموضة 5 = pH ، درجة حرارة 51° في وسط استزراع بيضوي في مظهر الخصال شجر (M2) ، ام لتاليف التلخيص البيئية في عينات القمح (SMF) من محتويات الحبوب الفطرية من خبز 5.51 x 71⁹ خلية / مليليسب-تل- *Trichoderma 127 b* و 5.55 x 71⁹ خلية / مليليسب-تل- *Trichoderma 127a*. و عالوة على ذلك فان استعمال الجزيئات الفطرية الهولوية على عينات العدس ككشف عن عجز طائي، تنوعا في كمية البرولين، لخصائص في كمية الخبز والوروفيل (، م عتريكي زفيال سكريات وزياد في نمو نباتات العدس في غياب المظهر قبل جزييم في عينات المظهر قبل جزييم عزلات *Trichoderma* س ج لثبات في كولي بوليين ، و شو هدلثوفاع محسوس في كمية الخبز والوروفيل وسرعة في النمو و ان تقيمت التلخيصا هذه. من هذه الدراسات يستنتج ان جزييم *Trichoderma harzianum* التي تخرج في مظهر العدس من محتويات كقدرات معبر في التهفح الفطرية التي لم تكن ان تستغل في المظهر والخبز اعني.

Abstract

In order to evaluate the bio protector effect of two strains of *Trichoderma harzianum* on two *Cylindrosporium sp* and *Fusarium solani* phytopatogens, a pathosystem using the model legume *Lens culinaris* has been chosen. The isolation of mycetes allowed us to obtain 197 fungal isolates of the different samples taken from BARAOUIA and AIN SEMARA sites, in the region of Constantine. In fact, 87 fungal isolates were obtained from different soil depths, with a fungal dominance in the depths 5 and 10. The rest of isolates (110) were obtained from different levels of plants, with a homogeneous distribution in terms of the number of isolates between the air and the underground surface. The macroscopic and microscopic identification of the set of isolates allowed for trying them into 25 genus, whose 55.34% of trains taken from BARAOUIA site and 46.30% of AIN SEMARA site are phytopatogens. Two fungal isolates with an antagonist activity were preselected after having developed important zones of inhibition on the PDA medium. The preliminary and molecular identification of these isolates has shown that they belong to *Trichoderma harzianum 127a* and *Trichoderma harzianum 127b*. The conducted tests *In vitro* antagonism against both pathogens *Lens culinaris*, namely *Cylindrosporium sp* and *Fusarium solani*; have revealed that the inhibition rate by the volatile metabolites is 62.70% in average, and those by diffusible metabolites is 86.34% in average. The evaluation of the rate competition exerted by T-T-127b and 127a, revealed that our *Trichoderma* strains have the ability to reduce from 70 to 83% growth C.SP and from 67 to 82% F of growth .solani. From these results, it seems that the efficiency of the strains of *Trichoderma* is more important when gathering all the ways of action (the use of spores). The optimisation of the fermentation medium (FL) has revaluated that the optimal conditions of the biomass production of T-127a and T-127b are: pH 5, temperature of 30°C and a culture medium on a malt extract (M2). The cultivation of biomass T- 127a and T-127b on wheat bran (FMS) has achieved a smooth greenish powder, whose concentration before purification is $3.27 \cdot 10^9$ C/mL for T-127a and $3.33 \cdot 10^9$ C/mL for T-127b. Moreover, the application of these spores on lentil plants, has revaluated that, in case of no treatment with antagonist strains, the inoculated plants with one of the pathogens (*C. sp* or *F. solani*) receive a hydric deficit leading to rise in the prolin content, a decrease in the chlorophyll content, in the concentration of the total sugars and in the growth. However, the plants stimulated by the strains of *Trichoderma*, had a stable content of prolin, a high content of chlorophyll and sugars as well as a rapid growth. The other treatments were able to conserve values of sugars, chlorophyll, prolin and a growth similar to the samples. In conclusion, our strains of *Trichoderma harzianum* prodycing at the laboratory level have important antifungal activities, which allow them of being exploited and the industrial level.

7. Références bibliographique

1. Abigail Jenkis. (2005). Les champignons du sol. Etat de New South Wales.
2. Adam A. (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non-pathogènes, Thèse de Doctorat, Université de Liège. Belgique. P : 165.
3. Adams M.R. (1990). Topical aspects of fermented foods. Trends in Food Science & Technology **1**:141-144.
4. Agosin E., Volpe D., Munaoz G., Martin R.S and Crawford A. (1997). Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. World J Microbiol. Biotechnol. **13**: 225-232.
5. Agriculture et Agroalimentaire Canada. (2008). Aperçu statistique de l'industrie canadienne des légumineuses. <http://www4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/>
6. Agrios G. (1997). Plant Pathology. Ed. Academic Press. New York. P: 529.
7. Ahlawat, I. P. S. (2012). Agronomy – rabi crops, Lentil. Division of Agronomy Indian Agricultural Research Institute, New Delhi – 110 012 Agronomy.
8. Ahl-Goy P., Signer H., Reist R., Aichholz R., Blum W., Schmidt E. and Kessmann H. (1993). Accumulation of scopoletin is associated with high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi*. Planta, **191**: 200-206.
9. Ahmad I. and Baker R.(1987). Composition saprophytic ability and Cellulolytic activity of rhizosphere competent mutants of *Trichoderma harzianum*,” Phytopathology, vol. 77. P: 358-362.
10. Ahmed I., Iftikar S. et Bhulta A.R.(1993). Seed borne microorganism and their biocontrol by chilson. Phytoparasitica. **34(2)**:213-213.
11. Ait Abdallah. (2011). Culture et cout de production des grandes cultures. P 84. ISBN : 978-9961-881-18-7.
12. Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., De La Cruz J., Monte E. and Llobell A.(2001). An antifungal exo-a-1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol **67**: 5833-5839.
13. Akrami Mohammad, Hadi Golzary and Masoud Ahmadzadeh. (2011). Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. African Journal of Biotechnology Vol. 10(**14**). P: 2653-2658.
14. Alexander M. (1977). Introduction to soil microbiology. 2^{ème} éd. John Wiley. New York. P : 467.

15. Alvarez – Ropdriguez M.L., Lopez-Ocana L., Lopez C., Rodriguez N.E., Martinez M.J., Larriba G and Coque J-J.R. (2002). Cork taint of wines: role of filamentous fungi Isolated from rock in the function of 2,4,6- Trichloroanisol by O methylation of 2,4,6 – Trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (12) : 5860- 5869.
16. Anahosu K. H. (1968). A new Species of *Cylindrosporium* Unger from India. *Sydowia*, Vol. XXII.
17. Anonyme 1. (2012). Taxonomical database. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. Retrieved from <http://plants.usda.gov>.
18. Anonyme 2. (2013). Constantine –wikipédia. www.wikipedia.com.
19. Anonyme 3. (2003). Centre d'expertise en analyse environnemental du Québec. Détermination de la matière organique par dosage du carbone organique dans les sols agricoles : méthodes Walkley-Black modifiée. MA.1010-WB1.0, ministère de l'environnement du Québec. P-10.
20. Anonyme 4. (1954). Caractérisations et améliorations des sols salés à alcalis. Laboratoire de RIVERSIDE. U.S.A. P:270.
21. Anonyme 5. (2014). Cylindrosporiose. Nouveaux fongicide colza. CETIOM. Document en ligne.
22. Arnon D.L.(1949). A copper enzyme is isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Betavulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
23. Arumuganathan K.& Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol*, 9, 208-218.
24. Ashrafizadeh A., Etebarian H.R., Zamanizadeh H.R. (2005). Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Fusarium* wilt of melon. Iran. *J. Phytopathol*. 41: 39-57.
25. Attrassi Khaled, Selmaoui Karima, Ouzzani Touhami Amina, Badoc Alain et Douira Allal. (2005). Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'Azoxytroline. *Bull-Soc. Pharm. Bordeaux. France*.p: 47-62.
26. Aycock R. (1966). pourriture de la tige et d'autres maladies causées par *Sclerotium rolfsii*. NC Agr. Expt. Saint-Tech. Bull. n°174.
27. Baise D. et Jabiol B. (1995). Guide pour la description des sols. INRA. Paris. P : 375.
28. Baise D.(1995). Référentiel pédologique. AFES. Paris. P: 332.
29. Baker C.J. and Orlandi E.W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33: 299-321

30. Barrs H.(1968). Determination of water deficit in plant tissues. In: *Water Deficit and Plant Growth*. Koslowski T. *Academy Press*. New York.p: 235-368.
31. Barulina H. (1930). Lentils of the USSR and other countries. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*, **40**, 265–304.
32. Bayaa B., Erskine W. (1998). Diseases of lentil. In : Allen DJ, Lenné JM, eds. *The pathology of food and pasture legume*. CAB International.p : 423-71.
33. Bayaa B., Erakine W. and Khoury L. (1986). Survey of wilt damage on lentil in North West suyria. *Arab JPL prot* ; **4** :119 -4.
34. Bejiga G. (2006). *Lens culinaris Medik*. Fiche de Protabase. Brink, M. and Belay G. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical African/ Resources végétales de l’Afrique tropicale), Wageningen. Pays Bas.
35. Belabid L., Fortas Z., Dalli D., Khiare D. et Amdjad D. (2000). Flétrissement et pourriture racinaire de la lentille dans le Nord Ouest Algérien. *Cahiers Agricultures*, Volume 9, Numéro **5** : 518-8. Notes de recherche.
36. Belabid L. (2003). La fusariose vasculaire de la lentille (*Lens culinaris Med*) dans le nord-ouestAlgérien : morphologie et diversité génétique chez *Fusarium oxysporium* (Schlecht). Emend. Set H. F. sp. *Lentis* (Vasud. Et Srini) en relation avec la répartition géographique et le pouvoir pathogène. Thèse de Doctorat. Université d'Oran.
37. Belarache Monira. (2013). Technique de laboratoire pour dosage d’azote. Laboratoire de chimie des sols. Antenne régionale EST. Constantine.
38. Benelbedjaoui M. (2014). La relance de la culture des lentilles : les mecanismes d’une integration reussie. Conférence :AXIUM SPA. Constantine
39. Benkhada M.M.(2006). Evaluation des risques fongiques en zones conchylicole : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Université de Nante Faculté. France.
40. Benmahammed A., K.L. Hassous et H. Bouzerzour. (2001). Synthèse des performances des nouvelles sélections d’orge (*Hordeum vulgare L.*) réalisées par les stations ITGC de Saida, Sidi Bel Abbés, Tiaret, Beni Slimane, Oued Smar, Khémis Miliana, Sétif et Khroub, au cours de la période 1980/81 à 1996/97. *Céréaliculture*, **36**: 13-20.
41. Bertrand Yves et De Halleux Ghislain. (2005). Chevaux et prairies. France Agricole. France. P:205-223.

42. Biljana Gveroska and Jugoslav Ziberoski. (2011). *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. ATI - Applied Technologies & Innovations. Volume 7, Issue 2. P: 67-76
43. Bisby G.R. (1939). *Trichoderma viride* Pers. Ex Fries, and notes on *Hypocrea*. Trans Br Mycol Soc **23**: 149-168.
44. Bissett J. A. (1991). Revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. **69** : 2373-2417.
45. BISSETT, J. (2004). Communication personnelles. http://www.res2.agr.ca/ecorc/personnel/biss_j_f.htm.
46. Blaine F. and Davey. (2007). Green Seed Coat Colour Retention In Lentil (*Lens Culinaris*). Thèse de doctorat. University of Saskatchewan.
47. Booth C. (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey. P: 273.
48. Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y. and Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industriels. Edn. Masson. Paris.
49. Boudoudou Hinde, Hassaibou Rachida, Ouazzani Touhami, Badoc Alain et Douira Allal. (2009). Paramètres physico-chimique et flore fongique des sols de ramènes Marocaines. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. **148** :17-44.
50. Buhot D. (1973). Echantillonnage du sol. Conservation et préparation des échantillons. Problème statistiques. Ann. Phytopath. **5** :296-298.
51. Calvet R. (2003). le sol : propriétés et fonctions. Ed Dunod. Paris.p : 1-456.
52. Campora P. (1985). Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Agronomie **5(7)** : 613-620.
53. Caron, J.. (2002). Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.
54. Chabasse D., Bouchara J.P. et Degentdl L. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Paris : bioforma éd. 230 bd Raspail 75014 Paris. Cahier de formation N°25 biologie médicale.
55. Chabasse D., Guiguen C. et Contet-Audonneau N. (1999). Mycologie médicale. Masson. Paris.

56. Chabasse, Dominique, Bouchara, Jean-Philippe, De Gentil, Ludovic. (2002). les moisissures d'intérêt médicale. Cahier de formation N°25. Biologie médicale. Paris. éd bioforma 230 bd Rspail 75014.
57. Champion Rémi. (1997). Identifier les champignons transmis par les semences. (en ligne) éd : INRA. Chapitre 8, les champignons transmis par les semences. p : 104-303.
58. Chaverri P., Samuels G.J.(2003) *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud Mycol* **48**:1–116.
59. Chen W., Sharma H.C., Muehlbauer, F.J.(2011). Compendium of Chickpea and Lentil Diseases and Pests. APS Press, St. Paul, Minnesota.
60. Chermette R., Bussieras J. (1993). Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort
61. Chet I. (1987). *Trichoderma*: Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soil-borne plant pathogenic fungi. in: Innovative Approaches to Plant Disease Control. P:137-160.
62. Chet, in: I. Chet (ed.). (1987). Innovative approaches to plant disease control, Wiley, New York. P: 137-160.
63. Chet I., J. Inbar and I. Hadar.(1997). Fungal antagonists and mycoparasites," Wicklow DT, Soderstrom B(eds.). The mycota IV: Environmental and microbial relationships, Springer-Verlag Berlin. P: 165-184.
64. Chisti Yusuf. (1999). Fermentation (Industrial). Basic consideration. P: 663- 674.
65. Chojnacka. Fermentation products. Chemical engineering and chemical process technology. Vol V.
66. Chouaki S. (2006). Deuxième rapport national sur l'état des ressources Phylogénétiques. INRAA. P : 19-20.
67. Clark & Mac-Caig. (1982). Excised leaf water relation capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Can.J. Plant Sci.* **62**: 571-576 p.
68. Claydon N. M., Allan M., Hanson J. R.& Avent A .G.(1987). Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the british mycological society* **88**: 505-513
69. Cokkizgin Alihan et Munqez J. and Y. Shtaya. (2013). Lentil: Origin, Cultivation Techniques, Utilization and Advances in Transformation. Agricultural Science Volume 1, Issue 1. P: 55-62.
70. Cook R.J., Rovira A.D. (1976). The role of biological control of *Gaeumannomyces* by suppressive soils. *Soil Biology and Biochemistry.* **8**. P: 269-274.

71. Corbaz Roger. (1990). Principe de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. 1ère éd. Suisse. ISBN 2-88074-201-3.
72. Costa G.E., Queiroz-Monici K., Reis S. and Oliveira A.C. (2006). Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food chemistry*.**94**: 327-330.
73. Cournut B. (1984). Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th, Pharmacies. Marseille. P: 77.
74. Cubero, J. I. (1981). Origin, domestication and evolution. In C. Webb and G. C. Hawtin (Eds.), *Lentils*. Commonwealth Agricultural Bureau, Slough, UK. P : 15-38.
75. Davet P. (1996). *Vie Microbienne Du Sol Et Production Végétales*, (Edn) Inra.Paris.
76. Davet P. and Rouxel F. (1997). *Detection Et Isolation Des Champignons Du Sol* , (Edn) Inra .Paris.
77. De La Cruz J., Hidalgo-Gallego A., Lora J.M., Benítez T., Pintor-Toro J.A., Llobell A.(1992). Isolation and Characterization of Three Chitinases From *Trichoderma Harzianum*. *Eur J Biochem* **206**: 859-867.
78. De La Cruz J., Llobell A.(1999). Purification And Properties Of A Basic Endo-B-1,6-Glucanase (Bgn16.1) From The Antagonistic Fungus *Trichoderma Harzianum*. *Eur J Biochem* **265**: 145-151.
79. De La Cruz J., Pintor-Toro J.A., Benítez T., And Llobell A.(1995a). Purification And Characterization Of An Endo-B-1,6-Glucanase From *Trichoderma Harzianum* That Is Related To Its Mycoparasitism. *J Bacteriol***177**: 1864-1871.
80. De La Cruz J., Pintor-Toro J.A., Benítez T., Llobell A., Romero L.(1995b). A Novel Endo-B-1,3- Glucanase, Bgn13.1, Involved In The Mycoparasitism Of *Trichoderma Harzianum*. *J Bacteriol* **177**:
81. Debourgogne Anne. (2013). Typage moléculaire du complexe d'espèces *Fusarium solani* et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole. Thèse de doctorat. Université De Lorraine.
82. Debuyser, A.(2003). Différenciation des propriétés du sol par des apports d'engrais et d'amendements. Cas de l'essai de longue durée des 42 parcelles (versailles). Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne. Dijon. France.
83. Degenklob T., Berf A., Gans W., Schlegel B. and Grafe U. (2003). The occurrence of peptaibols and structurally related peptaiboliques in fungi and their fragment ions. *J. Peptide. Sci.***9**:666-678.

84. Dely M., Sablayrolles J.M., and Barre P.(1990). Description of alcoholic fermentation Kinetics: its variability and signification. *Am. J. Enol. Vitic.* 41.P: 319-324.
85. Dennis C.& Webster J. (1971) Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma*, Ii. Production of Volatile Antibiotics. *Transactions Of The BritishMycological Society* **57**:41-48
86. Dennis, C.; Webster, J. (1980). Antagonistic Properties of Species-Groups Of*Trichoderma*. I. Production of Non-Volatile Antibiotics. *Trans. Br.Mycol. Soc.*, **84**:25-39.
87. Desender S., Andrivon D. and Val F. (2007) Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity?.*Cell Microbiol***9**: 21-30
88. Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy MSS and Wang L.J.(2002) .The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* **3**: 371-390.
89. Dougherty E.C. (1953). Problems Of Nomoclature For The Growth Of Organisms Of One Species With An Without Associated Organisms Of Other Species. *Parasitology*, **42**: 259-261.
90. Droby S. and Chalutz E. (1994). Mode of action of biocontrol of postharvest disease. In Wilson C.L. and Wisniewski eds. *Biological Control of postharvest disease. Theory and practice*. CRC Press, Boca Raton. USA. P:63-75.
91. Dubey S.C., Suresh M.S. (2007). Evaluation of *Trichoderma* Species Against*Fusarium Oxysporum F. Sp. Ciceris* For Integrated Management Of Chickpea Wilt. *Biol. Contamin.* **40**: 118-127.
92. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton P.A., Ruberg A. & Smith F.(1956). Colorimetric Method for Determination Of Sugars And Related Substances. *Analytical Chemistry*.28.3. P: 350-356.
93. Duchaufour P..(2001). Introduction à la science du sol, végétation, environnement. END.DUNOD. Paris.
94. Duchiron Francis et Copinet Estelle. (2011). Fermentation en milieu solide (FMS).Techniques de l'ingénieur Référence BIO620.
95. Durand Alain. (1998). La fermentation en milieu solide. *Biofutur*. N°181. P : 41-43.
96. Duthil J. (1970). Element D'écologie et D'agronomie. Éd J-B, Baillièere et Fills .Paris. P:315.

97. Eisendle R., Oberegger P., Buttinger and H. Illmer Haas. (2004). Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the Pae C-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*,” *Eukaryotic cell*. Vol. 3. P: 561-563.
98. El Fiki, A.I.I., G. El Habaa, A.I. Badr et K.E.Eid. (1998). Successful isolation, growth and sporulation of *Uromyces fabae* in axenic cultures. *Annals of Agric. SC. Moshtohor*. Vol 36(2) .p: 901-912.
99. El Jaafari S.(1993). Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sécheresse chez le blé. Thèse de doctorat. Univ. Gembloux. Belgique. P : 214.
100. Elad Y.& Kapat A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* **105**: 177-189.
101. Elad Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *Eur J Plant Pathol* **102**: 719-732.
102. EN ISO 11732. Determination of ammonium by flow analysis and spectrometric determination.
103. Enkerli J., Felix G., Boller T.(1999). Elicitor activity of fungal xylanase does not depend on enzymatic activity. *Plant Physiol* **121**: 391-398.
104. Erskine W. et Bayaa B.(1996). Yield loss, incidence and inoculum density associated with vascular wilt of lentil. *Phytopathol. Medith* 35. p : 24-32.
105. Erwin, Donald C., Ribeiro and Olaf K. (1996). *phytophthora. Diseases worldwides*. Ed. st-Paul, (Minnesota): APS Press. P: 245-256.
106. Escalona, J.M., Flexas, J., Medrano, H. (1999). Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. - *Australian J. Plant Physiol*. **26**: 421-433.
107. Esposito E. & Silva, M. (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 24 (2) : 89-98.
108. Esquerre-Tugaye M.T. (1979). Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions: I. A Structural Investigation of Cell Wall Hydroxyproline-rich Glycoproteins Which Accumulate in Fungus-infected Plants. *Plant Physiol* **64**: 314-319.
109. Esquerre-Tugaye M.T., Lafitte C., Mazau D., Tappan A. and Touzé A. (1979). Cell surfaces in plant-microorganism interactions II. Evidence for the accumulation of hydroxyprolin glycoptoteins in the cell wall of diseased plants as a defence mechanism. *Plant Physio*. **64**: 320-326.

110. Essalmani Haiat et Houria Lahlou. (2005). Induction, par *Trichoderma harzianum*, de la résistance des plantes de lentille contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*. Actes Inst. Agrin. Maroc.Maroc.Vet. Vol. 24 (1 et 2). P : 51-58.
111. Estelle Levetin et PhD. Les champignons en suspension dans les environnements internes. Université de Tuba.
112. Fandohan, P., B. Gnonionfin, K. Hell, W.F. Marasas and M.J. Wingfield. (2005). Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin. *Int. J. Food Microbiol.* **99**, 173-183.
113. FAO. (2010). Faostat, Fao Statistical Database. Retrieved from <http://www.fao.org>
114. Felse, P. A., Panda, T. (2000). Submerge culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors-the influence of agitator speed, *Biochemical Engineering Journal*, 115-120.
115. Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B., Medrano. H. (2002). Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Funct. Plant Biol.***29**: 461-471.
116. Gams W. and Bissett J. (1998) Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Harmann GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London. P: 3–34.
117. Gams W. Haekstra E.S. and Aptroot A. (1998). CBS. Course of mycology. Centraal bureau voor. Schimmelcultuur Baarns. The Netherland.
118. Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D. and Pugin A.(2006).Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 711-724
119. Geremia Ra, Goldman Gh, Jacobs D, Ardiles W, Vila Sb, Van Montagu M, Herreraestrella A.(1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mol Microbiol* **8**: 603-613.
120. Ghisalberti E.L. and Sivasithamparam K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil. Biol. Biochem.***23** : 1011-1020.
121. Girard .C.(1998). A sound reference base for soil. INRA. Paris. P/32.
122. Girard . C. (2005). Diversité et organisation de la couverture pédologique. In: sols et environnement: cours, exercices et études de cas. Dunod. Paris. P: 1-31.

123. Gobat J.M., Aragno M. et Matthey W.(1998). Le sol vivant: bases de pédologie et de biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne, Suisse. P: 18.
124. Grant M.R., Jones J.D. (2009).Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* **324**: 750-752
125. Grondona, M.R. Hermosa, M. Tejada, M.D. Gomis, P.F. Mateos, P.D. Bridge, E. Monte and I. Garcia-Acha. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agents against soil borne fungal plant pathogens,” *Appl Environ Microbiol.* Vol. 63.p: 3189-3198.
126. Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Ed Dunod. Paris.
127. Hajlaoui M. R.r, Diop D. & Cherif M. (2001). Contribution à la lutte biologique contre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Al Awamia* 104. P :85- 103.
128. Hama S., Yamaji H., Fukumizu T., Numata T., Tamalampudi S., Kondo A., Noda H. et Fukuda H.(2007). Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles.*Biochemical Engineering Journal.* **34**: 273-278.
129. Hammerschmidt R. (1999).Phytoalexins: What Have We Learned After 60 Years? *Annual Review of Phytopathology* **37**: 285-306
130. Hanelt, P.(2001). *Lens* Mill. In P. Hanelt (Ed.), *Mansfeld’s encyclopedia of agricultural and horticultural crops*. Vol. 2. P: 849–852). *Lens culinaris Medicus* Vorl. Churpf. Phys.-Okon. Ges., 2, 361 (1787).
131. Harman G.E.C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts, *Nature Review Microbiology*. Vol. 2. P: 43-56.
132. Harman, Jin, X., G. E., Taylor and A. G.(1991). Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials, *Biological Control*, 237-243.
133. Harrigan W.F. and Mc Cance M.E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic press. London .P: 21-277.
134. Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N.(1994). *Ainsworth and Bysby’s dictionary of the fungi*, 8 thed. International Mycological Institute, Egham. Unitted .Kingdom.

135. Hawtin, G. C., Singh, K. B., & Saxena, M. C.(1980). Some recent developments in the understanding and improvement of Cicer and Lens. In R. J. Summerfield & A. H. Bunting (Eds.), *Advances In Legume Science*. P: 613-623.
136. Hmouni A.,Hajlaoui M.R. et 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.
137. Hoagland D. & Arnon D.(1938). The water culture method for growing plants without soil. *Calif Agric. Exp. Stn. (Berkeley)*, Cir N° 347.P: 39.
138. Hoagland D.R.& Arnon D.I. (1950). The water-culture method for growing plant without soil. *Circ. 347, Berkeley Calif. Agric. Exp. Station. Univ. Calif*
139. Holker, Udo, Lenz and Jürgen. (2005). Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 8, N°3.p: 301-306.
140. Hussain S.S. (2006). Molecular breeding for abiotic stress tolerance: drought perspective. *Proc Pak Acad Sci.*, **43**:189–210.
141. Hussain M. A., T. Mukhtar, M. Irfan Al Haqueet M. Z. Kayassi. (2007). Mycoflora associated with lentil (*lens culinaris* Moench) seeds from five localities of Punjab. *Pakistan. Pack. J. bot.* 39(3) : 903-996.
142. Inbar L.A. Menendez and I. Chet. (1996). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and **Sclerotium sclerotiorum** made its role in biological control,” *Soil Biol Biochem*. Vol. 28. P: 757- 763.
143. Irina S. Druzhinina ,Verena Seidl-Seiboth , Alfredo Herrera-Estrella , Benjamin A. Horwitz, Charles M. Kenerley, Enrique Monte, Prasun K. Mukherjee, Susanne Zeilinger, Igor V. Grigoriev and Christian P. Kubicek. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews. Microbiology*. Volume 9.
144. ITGC. (2013). Culture de lentille. Disponible sur le web : www.itgc.dz.
145. Janisiewicz W.J., Tworowski T.J., and Sharer C.(2000). Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, 90 (11), 1196-1200.
146. Jayaswal R.K., Singh R., Lee Y.S. (2003). Influence of Physiological and Environmental Factors on Growth and Sporulation of an Antagonistic Strain of *Trichoderma viride* RSR 7. *Mycobiol.* 31(1): 36-41.

147. Jo J.H., Lee D.S., Park D. et Park J.M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology*. **99**: 6666-6672.
148. Johanne Caron. (2002). Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*. Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.
149. Jones J.D., Dangl J.L.(2006).The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
150. Jost Weber et F.A. Agblevor. (2004). Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Process Biochemistry* **40**:669–676
151. Kamala Th. and Indira S. (2012). Prospect of *Trichoderma* as a potential fungicide. *International Journal of Human Genetics Medical Biotechnology and Microbiological Studies* ISSN (Online) 2319-1732 : Volume 1 , Issue 3.
152. Kattere T. and Andoren O.(2001). The ICBM of analytically solved models of soil carbon, nitrogen and microbial biomass. *Ecol. Model.* **130**: 199-207.
153. Khasanov O.K. (1962). The antibiotic properties of fungi of the genus *Trichoderma* Pers, found in the swamp soil of Usbekistan. *UsbekshellBiologichesll Zhmnal, Tashkend* **6**: 62-67
154. Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Egham U.K. and Stophes J.A.(2001). Ainsworth and Bysby's Dictionary of fungi, 9 th edn .CABI. Bioscience.UK. Center and central Bureau Voie. Utrecht. The Net.
155. Kouassi M. (2001). La lutte biologique alternative viable à l'utilisation des pesticides ?. *VertigO*.**2**(2)
156. Kraft J.M., Hawar M.P., Jmenez-Diaz R.M., Bayaa B., Harrabi M.(1994). Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. Ed. Kluwer academic publishers, Dordrecht. The Netherlands. P: 268-289.
157. Krimi Bencheqroun Sanae. (2009). Etude des mécanismes d'action impliqués dans le biocontrol d'une souche d'Aurobasidium pullulans (de bary) arnaud vis-à-vis de *Penicillium expansum* Link sur Pommes en poste- récolte. Thèse de doctorat Université de Liège. Gembloux Agro-Biotech.
158. Krom M. (1980). Spectrophotometric determination of ammonia; a study of modified Bethelot reaction using salicylate and dichloroisocymitrate. *The Analyst*, Vol105.p : 305-316.
159. Kubicek C.P.R.L. Mach, C.K. Peterbauer and M. (2001). Lorito. *Trichoderma*: from genes to biocontrol," *Journal of plant Pathology*. Vol. 83. P: 11-23.

160. Kubicek C.P., Komon-Zelazowska M., Druzhinina I.S. (2008) Fungal genus *Hypocrea*/*Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B* 9:753–763
161. Kubicek C.P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C. & Szakacs G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biol.*, 38 (3): 310-319.
162. Kucuk, and Kivanc. (2004). *in vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma hazrianum*. *Turk. J. Biol.* Vol 28. P: 11-128.
163. Kullnig-Gradinger C.M., Szakacs G., Kubicek C.P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: multigene approach. *Mycol Res.* **106**: 757-767.
164. Lakhtar Hicham. (2009). Culture du *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines. Thèse de doctorat. Université Paul Cézanne, Aix Marseille III.
165. Landreau, A. (2002). 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.
166. Landreau A., Pouchus Y.F., Sallenave-Namont C., Biard J-F., Boumard M.C., Robiou Du Pont T., Mondeguer, F., Goulard C. & Verbist, J-F. (2002). Combined use of LC/MS and a biological test for a rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. *J. Microbiol. Meth.*, **48** (2-3) : 181-194
167. 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.
168. Larpant Gourguand M. and Sanglier J.J. (1992). *Biotechnologie. Principe et methods*, (edn) Doin .Paris.
169. Lawlor D.W. (2002). Limitation to photosynthesis to water stressed leaves: stomata vs. Metabolism and the role of ATP. *Annals of Bot.* **89**: 871-885.
170. Lawlor, D.W., Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. - *Plant Cell Environ.* **25**: 275–294.
171. Layral, G., Joffin, J-N. (1998). *Microbiologie technique* 2ème éd. Bordeaux : CRDP, ISBN 2-86617-334-1. P: 285-297.
172. Leontopoulos D., Siafaka A. et Markaki P. (2002). Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. *Food Microbiol.* **20**, 119-126.

173. Lieckfeldt E., Seifert K.A. (2000). An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the Hypocreales. *Stud Mycol* **45**: 35-44.
174. Lorito M., Hayes C.K., Di Pietro A., Woo S.L., Harman G.E. (1994). Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3-b-glucosidase and an N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* **84**: 398-405.
175. Lund F., Nielsen A.B. et Skouboe P. (2002). Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting. *Food Microbiol.* **20**, 725-734
176. Lundberg, A.; Unestan, T. (1971). Antagonism against *Fomes annosus*. Comparison between different test methods "in vitro" and "in vivo". *Mycopathologia.*, **70**:107-115.
177. Madigan M.T., Matinko J.M and Parker J.. (1997). Brok biology of microorganisms, 8 th edn. USA.
178. Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S., Banerjee U.C. (2005). Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology.* vol. 1, n°2, p. 1-9.
179. Mathieu C. et pieltin F. (2003). Analyse chimique des sols. Methodes choisies. Editions. Editions TEC and Doc., LAVOISIER. Chapitre 1, 2, 3,6 et 10.
180. McNeill, A. M., Pilbean, C. J., Harris, H. C., & Swift, R. S. (1996). Seasonal variation in the suitability of different methods for estimating biological nitrogen fixation by grain legumes under rain fed conditions. *Australian Journal of Agricultural Research*, **47**, 1061-1073.
181. Mc Vicar R., Mc Call P., Brenzil C., Hartley S., Panchuk K., Mooleki P., Vandenberg A. and Banniza S. (2010). Lentils in Saskatchewan. Fact Sheet. Saskatchewan Ministry of Agriculture.
182. Mémento de l'agronome. (1974). Techniques rurales en Afrique. Publication du ministère de la coopération Française, Eyrolles. Paris. P : 1591.
183. Messiaen, C.M, Lafon R. (1970). Les maladies des plantes marichères. 2^{ème} éd. Paris : INRA. Chapitre 1 ; détermination des maladies. P :9-31.
184. Mihail j.d. and Alore S.M. (1987). *Macrophomina phaseolma spatila* patterns in cultivated ans sampling strategies phytopathology. **77**:1126-1131.
185. Mohd S., Anuradha S., Mukesh S., Mishra R.P., Biswas S.K. (2011). Effect of temperature, pH and media for growth and sporulation of *Trichoderma longibrachiatum* and self-life study in carrier based formulations. *Annals*

186. Monneveux P. and Nemmar M.. (1986). Contribution à l'étude de de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum L.*) et chez le blé dur (*Triticum durum desf.*) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement Agronomie 6 : 583-590.
187. Monte E. and Llobell A. (2003).Trichoderma in organic agriculture. Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial Del Aguacate). P: 725-733.
188. Moreau C.(1991). Les moisissures. Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaire. Contrôle microbiologique. Chap 6, 222-241.
189. Muehlbauer, F.J., R.J. Summerfield, W.J. Kaiser, S.L. Clement, C.M. Boerboom, M.M. Welsh-Maddux and R.W. Short. (2002). Principles and practices of lentil production. United States Department of Agriculture. P: 1-11.
190. Mueller G.M., Schmit J.P.(2007). Fungal biodiversity: what do we know ? What can we predict? Biodiversity and Conservation. 16: 1-5. - Mathiew R. (1995). Biologie Campbell, (edn) ISBN Canada.
191. Muehlbauer F.J. (1991). Use of introduced germplasm in cool season food legume cultivar development. In H.L. Shands and L.E. Wiesner (Eds), use of plant introductions in cultivar development (Part 2). *Corp Sci. Soc. Amer. Social publication*. **20**: 49-73.
192. Muhlabauer, F.D., R. J. Summerfield, W. J. Kaisser, S. L. Clement, C.M. Berboom, M.M. Welsh-Maddauxaud R.W. Short. (2002). principales and practices of lentil production. United states department of agriculture. P: 1-11.
193. Muhlabbauer F.J., Kaiser W.J., Clement S.L. and Summer field R.J. (1995). Production and breeding of lentil. *Advances in Agronomy*, **54**: 283-332.
194. Murashige, T. & F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant*. 15, 473.
195. Nag Raj T.R. and Kendrick Bryse. (1971). On the identity of three species of *Cylindropodium* described by Preuss. *Can. J. Bot.* **49**: 2119-2122.
196. Naseraoui Bouzide. (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées. Chapitre 3 et 4. p :320-447.
197. Nelson D.W., Sommers L.E.(1982). Total carbon, organic and organic matter. In dinauer R.C. ED, methods of soil analysis. Part 2. Madison, WI: American Society of Agronomy, Inc. and soil science society of America, Inc. P.539-580.
198. Nicklin J., Greame-Cook K., Paget T and Killington R.(1999). *Essentiel en microbiologie*, (edn) BERTI. Paris.

199. Niranjana S.R., Lalitha S., Hariprasad P. (2009). Mass multiplication and formulations of biocontrol agents for use against *Fusarium* wilt of pigeon pea through seed treatment. *Intern. J. Pest Manag.* **55**(4): 317–324.
200. Noronha E.F., Ulhoa C.J.(1996). Purification and characterization of an endo- β -glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Can J Microbiol* **42**: 1039-1044.
201. Omar Idrissi, Houasli Chafika et Nasserlhaq Nsarellah. (2013). Comparaison de lignées avancées de lentille sous stress hydrique durant la phase de floraison et formation des gousses. *Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, N° 08. P : 53- 61.
202. ONM. (2012). Station Constantine.
203. Oriol E.(1987). Croissance d'*Aspergillus niger* sur milieu solide : Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. Thèse de Doctorat, Institut national des sciences appliquées, Toulouse. P : 115.
204. Ozdemir, S. (2002). Grain legume crops. Hasad Publishing, Istanbul, Turkey.
205. Packer H.L. and Thomas C.R. (1990). Microbiological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol-Bioenerg.* **35**:870-881.
206. Pandey A., Soccol C.R. et Mitchell D. (2000). New developments in solid state fermentation: I. Bioprocesses and products. *Process Biochemistry.* **35**: 1153-1169.
207. Papavizas, G., C. and Lumsader R.D. (1982). improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. From soil. *Plant Dis.***66**:1019-1020.
208. Papavizas G., C., Dunn M. T., Lewis J. A., Beagle-Ristaino J.(1984), Liquid fermentation biotechnology for experimental production of biocontrol fungi, *Phytopathology*, 1171-1175.
209. Papavizas, G.C.(1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopath.* **23**:23-54.
210. Paul E. A. & Clark F. E. (1996). *Soil microbiology and biochemistry*. 2nd edition. Academic Press. San Diego, California (USA).P: 340.
211. Pedreschi F., Aguilera J. M. (1997). Viability of dry *trichoderma harzianum* spores under storage, *Bioprocess Engineering*, 177-183.
212. Peptaibol Database. (2007). www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home/shtml.
213. Perez-Torrado R., Carrasco P., Aranda A., Gimeno-Alcaniez J., Perez-Ortin J.E., Matallana E., and Del Olma M.L. (2002). Study of the first hours of microvinification by the use of osmotic stress response genes as probes. *Syst Appl Microbiol***25**. P: 153-161.

214. Persoon C.H. (1794). Desposita methodica fungorum. Romer's. *Neues Mag Bot.* **1**: 81-128.
215. Peuk A.D.(2000). The chemical composition of xylen sapin *Vitis vinifera* L.cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer. *Am. Enol. Viticult.* **51**:329-339.
216. Pham T.A., Kim J.J., Kim K. (2010). Optimization of Solid State Fermentation for Improved Conidia Production of *Beauveria bassiana* as a Mycoinsecticide. *Mycobiol.* **38(2)**: 137-143.
217. Pitt, D., Poole, P. C. (1981). Calcium induced conidiation in *penicillium notatum* in submerge culture, *Transactions BritishMycological Society*, 219-230.
218. Prevot Vincent. (2013). Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne.
219. Prince L., Prabakaran P., Mehalingam R. et Samuel P.(2011). An investigation of the soil mycoflora in sugarcane field of Thanjavur district tamilnadu. *European Journal of Experimental Biology.* **1(2)**: 132-138.
220. Quénea K.(2004). Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chrono séquence forêt/maïs (CESTAS, Sud-ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).
221. Rahardjo, Yovita S.P., Tramper, Johannes, Rinzema, Arjen and Modeling. (2006). conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances.* Vol. 24, N°2. P: 161-179.
222. Rahoui M., Soudi B., Chiang C., Badraoui M., Marcoen J.M. et Benzakour M.(2001). Atlas de la qualité des sols et des eaux souterraines dans le périmètre irrigué des Doukkala. Réalisation : A.Bamouh. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. P : 1-29.
223. Raimbault M.(1980). Solid Fermentation in Bioconversion of Agro-Industrial Raw Materials, Documents ORSTOM, Paris. P: 147.
224. Raimbault Maurice. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology.* vol. 1, n°3, p.174-188.
225. Redecker D.(2002). New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil. *Research in Microbiology.* **153**: 125-130.
226. Rennie R. J.& Dubetz S.(1986). Nitrogen-15-determined nitrogen fixation in fieldgrown chickpea, lentil, fababean, and field pea. *Agronomy Journal*, **78**, 654-660.

227. Richardson M.J. (1979). An annotated list of seed-borne diseases inth. Seed test. Assoc. Zurich, Switzzeland. P : 320.
228. Rifai Ma. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol Pap 116: 1-116.
229. Rinaldi C., Sutton A. and Fothergill S.R. (1998). The morphology of fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*67:123-129.
230. Robert-Seilaniantz A., Navarro L., Bari R., Jones J.D.(2007).Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* 10: 372-379
231. Rochester I. J., Peoples M. B., Constable G. A. & Gault, R. R. (1998). Faba beans and other legumes add nitrogen to irrigated cotton cropping systems. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38, 253-260.
232. Rodrigez- zarazoga S., Maylish E. and Steinberger Y. (2005). Vertical distribution the free-living *Amoeba* population in soil under desertshrubs in the Ngev. *Applied and environmental Microbiology* .71(4): 2053-2069.
233. Ronald et Atlas M. (1997). Hand book of microbiology media. Edition 2. New York.
234. Roquebert M.F. (1998). Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification", in "Moisissures des aliments peu hydratés", Ed. Tec & Doc. P : 39-95.
235. Roquebert M.F. (1996). Interaction antagoniste des *Trichoderma sp* dans les systèmestelluriques : systématique, biologie et écologie des organismes. *Compte rendu des 4^{ème}s rencontrent en toxicologie*. Paris.
236. Roussos S.(1985). Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation, et production de cellulases. Thèse de Doctorat, Universitéde Provence, Aix-Marseille I, 193 pages.
237. Roy K.W., D.E. Hershman, J.C. Rupe, and T.S. Abney. (1997). Sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease* 81:1100-1111.
238. Ruark G.H., Zarnoch S.J.(1992). Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. *Soil Sc. Soc. Am.J.* 56:1945-1950.
239. Saadoune I. and Momani I.(1997). Streptoyces from Jordan soil active against *Agrobacterium tumefasciens*. *Actinomycets*. 8(12): 29-36.
240. Samson R.A., Hoekstra E.S. et Van Oorschot. (1981). Introduction to foodborne fungi. Edn C.B.S. Amsterdam.

241. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. Et Filtenborg O.(2000). Introduction of food and airborne fungi. 6th edition. Centraal bureau voor schimmelcultures.Utrecht.
242. Samuels G. J. ; Petrini O. & Manguin S.(1994). Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 1994, 86 : 421-435.
243. Sanabria N., Goring D., Nurnberger T., Dubery I. (2008). Self/nonsel perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytol* 178: 503-514.
244. Sanogo S., Pomella A., Hebbar P.K., Bailey B., Costa J.C.B., Samuels G.J., Lumsden R.D.(2002). Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis perniciosa* on cacao. *Phytopathology*, 92: 1032-1037.
245. Saran Sundar M., T.Vinodhkumar, G.Ramanathan. (2013). Evaluation of Antifungal Activity Of Metabolites From *Trichoderma* Species Against Fungal Phytopathogens. *International Journal of Science Innovations And Discoveries*.3 (5), 528-538.
246. Saskatchewan. (2002). Lentil in Saskatchewan. Saskatchewan Agriculture and Food, Regina.
247. Saucedo-Castañeda G.(1995). Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castelli* cultivé sur support solide. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 212 pages.
248. Saxena M. C. (2009). Plant morphology, anatomy and growth habit. pp. 34-46. In: W. Erskine, F. Maeuhlbauer, A. Sarker and B. Sharma (Eds.). *The Lentil: Botany, Production and Uses*. First ed. CABI Publishing, London, UK.
249. Schirmbock M., Lorito M., Wang Y-L., Hayes C.K., Arisan-Atac I., Scala F., Harman G.E. and Kubicek, C.P. (1994).Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4,364- 4,370.
250. Schwartz D. (2011). Sol : les bases. Formation professeurs SVT-Rouffach.
251. Schawartz D. and Langham. (2012). Grows stage of lentil. Disponible sur internet : <http://legume.ipmpipe.org>.
252. SearleP.L.(1984). The Berthelot or indophenols reaction and its use in the analysis chemistry of Nitrogen. *The analyst*, Vol 109. Page: 549-565.
253. Sehirali, S.(1988). Grain legume crops. Ankara University, Faculty of Agricultural Engineering, Ankara, Turkey 1089 (314). P: 435.

254. Sels J., Mathys J., De Coninck B.M., Cammue B.P. and De Bolle M.F. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins : a focus on PR peptides. *Plant physiol biochem.* **46** : 941-950.
255. Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevéken J., et Viseur J.(1993). *Traité de pathologie végétale*. Gembloux. Belgique.
256. Shah Z., Shah S. H., Peoples M. B., Schwenke G. D. & Herridge D. F.(2003). Crop residue and fertiliser N effects on nitrogen fixation and yields of legume-cereal rotations and soil organic fertility. *Field Crops Research*, 83, 1-11.
257. Shibuya N., Minami E. (2001). Oligossacharide signaling for defense responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59: 223-233.
258. Simon A., Sivasithamparam K. (1989). Pathogen Suppression: A Case Study In Biological Suppression Of *Gaeumannomyces Graminis* Var. *Tritici* In Soil. *Soil Biol Biochem* 21: 331-337.
259. Singhania R.R., Soccol C.R. et Pandey A.(2007). Application of tropical agro-industrial residues as substrates for solid-state fermentation processes. In: Pandey A., SoccolC.R. and Larroche C., Editors, *Current Developments in Solid-state Fermentation*, Springer Science/Asiatech Publishers, Inc., New York, USA/New Delhi, India, 412–442.
260. Sivasithmparam K. and Ghisalberti E.L. (1998). *Secondary metabolism in Trichoderma an Gliocladium*. Taylor and Francis. Lendon. UK.
261. Smith C.K., Coyea M.R., Munson A.D.(2000). Soil carbon, nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. *Ecol. App.* **10**:75-78.
262. Smith S. C., Bezdicek D. F., Turco R. F. & Cheng, H. H. (1987). Seasonal N₂ fixation by cool-season pulses based on several ¹⁵N methods. *Plant and Soil*, 97, 3-13.
263. Sobal M. (2002). *Physiologie de la croissance mycélienne de Pleurotus ostreatus et dégradation des polyphénols de la pulpe et des coques de café*. Thèse de doctorat, Université de Provence, Aix-Marseille I. P : 127.
264. Song X. Y., Shen Q.T., Xie S.T., Chen X.L., Sun C.Y. et Zhang Y.Z.(2006). Boad spectrum antimicrobial actuvity and high stability of Trichodermins from *Trichoderma Koningii* SMF2 against plant pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 119-125.
265. Souci, Fachmann et Kraut, 2008 : *La composition des aliments. Tableaux des valeurs nutritives*, 7e édition, 2008, MedPharm Scientific Publishers / Taylor & Francis, ISBN 978-3-8047-5038-8.

266. Street K. (2008). Directives pour la régénération : lentille. In: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. P: 10.
267. Suárez B.(2001). Caracterización y detección molecular de cepas de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en fresa. Búsqueda de proteasas de *Trichoderma* implicadas en su biocontrol. PhD thesis, University of Salamanca, Spain.
268. Subler S. and Kirsh K.S.(1998).Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthwarm middens in no-tillcornfield. *Bio. Fert. Soils*. **26**:243-249.
269. Subramani R. et Vimala R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int; J. Sci. Nature*. **3(3)**:p: 480-486.
270. Sukumaran R.K., Singhania R.R. et Pandey A. (2005). Microbial cellulases production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **64**: 832-844.
271. Summiaya Rahim, Shahnaz Dawar and Marium Tariq. (2010). Mycoflora associated with lentil (*lens culinaris* L.) Seeds of pakistan. *Pak. J. Bot.*, **42(6)**: 4345-4352,
272. Sy A.A.(1976). Contribution à l'étude de *Pyricularia oryzae* Cav. Recherche In vitro d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique Thèse Doct. Ingénieur INP Toulouse, N°534. P : 236.
273. Tabuc Cristina. (2007). Flore fongique de différents substrats et condition optimales de production des mycotoxines. Thèse de Doctorat. Institut polytechnique de Toulouse.
274. Tarus, P.; Chhabra, S.; Lang'at-Thoruwa, C.C.; Wanyonyi, A. *Afr. J. Health Sci*. In press.
275. Tessier, D.(1999). La capacité d'échange cationique et son importance dans la gestion actuelle des sols. Extrait des comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France. Tome 85, N°2.
276. Tewari Lakshmi and Bhanu Chandra. (2004). Evaluation of agro-industrial wastes for conidia based inoculum production of bio-control agent: *Trichoderma harzianum*. *Journal of Scientific and Industrial Research*. Vol **63**. P: 807-8012.
277. Tewari, L., & Bhanu, C.(2004). Evaluation of agro-industrial wastes for conidia bases inoculum production of bio-control agent: *Trichoderma harzianum*. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **6**:807–812.

278. Thakore Y. (2006). The biopesticide market for global agriculture use. *Industrial Biotechnology*. **2**(3): 294-308.
279. Tivoli B, Beasse C., Lemarchand E. et Masson E.(1996). Effect of Ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) on yield components of single pea (*Pisum sativum*) plants Under field conditions. *Ann Appl Biol*, **129**:207-216.
280. Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.I.(2003). *Introduction à la microbiologie*, (edn) ISBN.Canada.
281. Tradieu, F., and Simoneau, T. (1998). Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviours. *J. exp. Bot.* **49**: 419-432.
282. Van Emden, H. F., Ball, S. L.& Rao, M. R.(1988). Pest disease and weed problems in pea lentil and faba bean and chickpea. In R. J. Summerfield (Ed.), *World Crops: Cool Season Food Legumes*. ISBN 90-247-3641-2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.P: 519-534.
283. Vial L. (1989). Critères de qualité de la production d'un biopesticide à base de *Trichoderma harzianum* RIFAI. Mémoire, École Nationale d'Ingénieurs des travaux agricoles, Bordeaux, France.
284. Vincent J.M. and Budge S.P. (1990). Screening for sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research* **94**: 607- 612.
285. Vzcaiini J.A., Sanz L., Basilio A., Vincent F, Gutierrez S., Hermosa M.R. and Monte E.. (2005). Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolate representing three *Trichoderma* sections. *Mycol. Res.* **109**:1397-1406.
286. Walkley A., Black I.A.(1934). An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter and a proposal modification of the chromic acid titration method-soil sci., **37**(1), 29-38.
287. Warcup J.H. (1955). On the origin of colonies of fungi developing on soil dilution plates. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **38**:298-301.
288. Wardle D.A., Parkinson D., Waller J.E. (1993). Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. *Oecologia* **94**: 165-172.
289. Wenger, G.(2004). La vogue des légumineuses et autre légumes à cosse. Séminaire professionnelle de la fédération de producteur suisse de lait PSL pour les enseignants en économie familiale.

290. Widden P. & Abitbol J.J. (1980). Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia*, **72** : 775-784
291. Wilson, V. E. and Law, A. G. (1972). Natural crossing in *Lens esculenta* Moench. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **97**:142-143.
292. Wu K.J., Chang C.F. et Chang J.S. (2007). Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochemistry*. **42**: 1165-1171. ed
293. Zeitoun F.M. et Long R.L. (1976). *Cylindrosporium* leaf spot or yellow leaf on cherry cause: *Cylindrosporium padi*, a fungus. *Ornamentals northwest archives*. Vol 1, Issue 10.
294. Zhao J., Davis L.C. and Verpoorte R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* **23**: 283-333.

ANNEXES 1

(Milieux de culture)

- ❖ Milieu Czapek-Dox (Attrassi et al. ; 2005): pH $6.5 \pm 0,3$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|--------------------------------------|-----------------|
| Sucrose | 30 |
| Extrait de levure | 5 |
| NaNO ₃ | 3 |
| K ₂ HPO ₄ | 1 |
| KCL | 0.5 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.5 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.01 |

- ❖ Milieu PDA (Ronald et Atlas, 1997): pH $5.6 \pm 0,2$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|----------------|-----------------|
| Pomme de terre | 200 |
| D-Glucose | 20 |
| Agar | 20 |

- ❖ Milieu KM (Landreau et al., 2002): pH $6,3 \pm 0,2$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|--------------------------------------|-----------------|
| Glucose | 10 |
| MgSO ₄ 7 H ₂ O | 2.4 |
| NH ₄ NO ₃ | 2.4 |
| Tampon Tris | 1.21 |
| Agar | 20 |

- ❖ Milieu MEA (Botton et al., 1990): pH $5.3 \pm 0,2$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|-----------------|-----------------|
| Glucose | 5 |
| Extrait de Malt | 20 |
| Agar | 15 |

- ❖ Milieu M0 : pH $5.4 \pm 0,2$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|-----------------|-----------------|
| Extrait de Malt | 30 |
| Agar | 15 |

- ❖ Milieu M5 : pH $5.4 \pm 0,2$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|-----------------|-----------------|
| Glucose | 5 |
| Extrait de Malt | 30 |
| Agar | 15 |

- ❖ Milieu M10 : pH $5.4 \pm 0,2$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|-----------------|-----------------|
| Glucose | 10 |
| Extrait de Malt | 30 |
| Agar | 15 |

- ❖ Milieu M15 : pH $5.4 \pm 0,2$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|-----------------|-----------------|
| Glucose | 15 |
| Extrait de Malt | 30 |
| Agar | 15 |

- ❖ Milieu M20 : pH $5.4 \pm 0,2$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|-----------------|-----------------|
| Glucose | 20 |
| Extrait de Malt | 30 |
| Agar | 15 |

- ❖ Milieu M2 : pH $5.4 \pm 0,2$.

| Composants | Quantités (g/L) |
|-------------------|-----------------|
| Extrait de levure | 2 |
| Extrait de Malt | 30 |
| Agar | 15 |

❖ Milieu MS (El Fiki et *al.*, 1998) : pH $6.0 \pm 0,5$.

| Composants | Quantités (mg/L) |
|---|------------------|
| NaCl ₂ .NH ₄ NO ₃ | 825.000 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.250 |
| KNO ₃ | 685.000 |
| H ₃ BO ₃ | 6.200 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.000 |
| KI | 0.830 |
| CaCl ₂ .6H ₂ O | 0.025 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440.000 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370.000 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 22.300 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8.600 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.025 |
| Na.EDTA | 37.250 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27.850 |
| Thiamine/HCl | 0.100 |
| Acide nicotinique | 0.500 |
| Pyroxydine-HCl | 0.500 |
| Glycine | 2.000 |
| NAA | 1.000 |
| Sucrose | 30 g/L |
| Agar | 20 g/L |

ANNEXES 2

(Solutions)

- ❖ Solution de Hoangland et Arno (Hoangland et Arnon, 1938):

| Composants | Quantités (mg/L) |
|--|------------------|
| Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | 1800 |
| KH ₂ PO ₄ | 136 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 246 |
| KNO ₃ | 505 |
| H ₃ BO ₃ | 2.860 |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 1.810 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0.220 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.080 |
| H ₂ MoO ₄ .H ₂ O | 0.020 |
| Fe-EDTA | 58.100 |

- ❖ Solution SRS (Adam, 2008):

| Composants | Quantités (g/L) |
|------------|-----------------|
| Peptone | 1 |
| NaCl | 5 |
| Tween 80 | 5 gouttes |

- ❖ Solution de Bleu de Coton de Lactophénol (Chabasse et *al.*, 2002):

| Composants | Quantités (g/L) |
|-------------------------------------|-----------------|
| Phénol cristallisé pur | 10 |
| Acide lactique | 10 |
| Glycérine | 20 |
| Bleu coton C4B (ou bleu de Méthyle) | 0.25 |

ANNEXES 3

(Séquences)

❖ **Séquence T-127a :**

CTTCTTCCGTCGACATCAGTCGCCGCTCTGATTCTCAAACACTTGTGCTAAC
 CACCATCTTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAATCATCTTGAGTGAGATCGAT
 CGAACACAGTACTGACTTGTTACATCAGCCACGTCGACTCCGGAAAGTCG
 ACCACCGTGAGTTGCACCCTTTATCCTGCTTCGATATCAAACGTCGTTTG
 ATACGGGACATCTACTCTTTGAACACAGGGCTAACAAATTTATCATACAGAC
 CGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAA
 GTTCGAGAAGGTAAGCTTCAACTCATTTTCGCCTCGATTCTCCCTCCACATT
 CAATTGTGTCCGACAATTCTGCAGAGAATTTTCGTGTCAACAATTTTTCAT
 CACCCCGCTTTGCATTACCCTCCTTTGCAGCGACGCAAAAATTTTTTGCTG
 TCGTTTGGTTTTAAGTGGGGTTTCTTGTGCACCCCACTAGCTCGTTTTTCT
 GCTTCGCTCTCACTCCCAGCCATCATTCAACGTATTCTGTGTCTCGTCACT
 TTCAGCGATGCTAACCCTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCA
 AGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTG
 AGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGT
 ACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTCTTTCCATCAATTTACACAGCGATTA
 CAAGCCAGTGCTAACAAAGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTT
 CATCAAG

❖ **Séquence T-127b :**

CATCAGTCGCCGCTCTGATTCTCAAACACTTGTGCTAACACCACATCTTCTA
 GGGGTGCGTATTCCATCAATCATCTTGAGTGAGATCGATCGAACACAGTAC
 TGACTIONGTTACATCAGCCACGTCGACTCCGGAAAGTCGACCACCGTGAGTT
 GCACCCTTTATCCTGCTTCGATATCAAACGTCGTTTGATACGGGACATCT
 ACTCTTTGAACACAGGGCTAACAAATTTATCATACAGACCGGTCACTTGATC
 TACCAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGT
 AAGCTTCAACTCATTTTCGCCTCGATTCTCCCTCCACATTCAATTGTGTCCG
 ACAATTCTGCAGAGAATTTTCGTGTCAACAATTTTTCATCACCCCGCTTTGC
 ATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAAAATTTTTTGCTGTCTGTTTGGTTTTA
 AGTGGGGTTTCTTGTGCACCCCACTAGCTCGTTTTTCTGCTTCGCTCTCAC
 TTCCCAGCCATCATTCAACGTATTCTGTGTCTCGTCACTTTCAGCGATGCTA
 ACCACTTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTCAA
 GTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCA
 CCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCG
 TCATTGGTATGTTCTTTCCATCAATTTACACAGCGATTACAAGCCAGTGC
 TAACAAGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTTCATC

ANNEXES 4

(Test de compétition)

| Traitement Antagonisme et % | | Echelle de germination (a) | | | Germination des conidies (b) | Taux de réduction de la germination % (c) |
|--------------------------------|-----|----------------------------|--------|--------|---------------------------------|---|
| | | Class1 | Class2 | Class3 | | |
| Témoin (Cyl) | M2 | 10 | 01 | 89 | 90 | - |
| | M0 | 44 | 40 | 16 | 56 | - |
| | M5 | 04 | 19 | 77 | 96 | - |
| | M10 | 10 | 36 | 54 | 90 | - |
| | M15 | 05 | 63 | 32 | 95 | - |
| | M20 | 04 | 33 | 63 | 96 | - |
| Cyl /Tr127a | M2 | 83 | 10 | 07 | 17 | 73 |
| | M0 | 78 | 13 | 09 | 22 | 34 |
| | M5 | 85 | 09 | 06 | 15 | 81 |
| | M10 | 70 | 08 | 22 | 30 | 60 |
| | M15 | 76 | 14 | 10 | 24 | 71 |
| | M20 | 80 | 18 | 02 | 20 | 76 |
| Cyl /Tr127b | M2 | 79 | 17 | 04 | 21 | 69 |
| | M0 | 80 | 11 | 09 | 20 | 36 |
| | M5 | 81 | 12 | 07 | 19 | 77 |
| | M10 | 75 | 14 | 11 | 25 | 67 |
| | M15 | 72 | 19 | 08 | 28 | 67 |
| | M20 | 79 | 13 | 08 | 21 | 75 |
| Témoin (Fus) | M2 | 02 | 20 | 78 | 98 | - |
| | M0 | 90 | 11 | 19 | 30 | - |
| | M5 | 05 | 12 | 83 | 95 | - |
| | M10 | 10 | 63 | 27 | 90 | - |
| | M15 | 14 | 41 | 45 | 86 | - |
| | M20 | 11 | 39 | 58 | 97 | - |
| Fus /Tr127a | M2 | 79 | 12 | 09 | 21 | 77 |
| | M0 | 70 | 13 | 17 | 30 | 0 |
| | M5 | 81 | 13 | 06 | 19 | 76 |
| | M10 | 75 | 11 | 14 | 25 | 65 |
| | M15 | 80 | 13 | 08 | 20 | 66 |
| | M20 | 73 | 09 | 18 | 27 | 70 |
| Fus /Tr127b | M2 | 83 | 11 | 06 | 17 | 81 |
| | M0 | 72 | 14 | 15 | 28 | 02 |
| | M5 | 79 | 16 | 05 | 21 | 74 |
| | M10 | 77 | 16 | 07 | 23 | 67 |
| | M15 | 67 | 06 | 27 | 33 | 53 |
| | M20 | 82 | 13 | 05 | 18 | 71 |

(a): Echelle de germination: 1= pas de germination; 2= tube germinatif <4x taille de la conidie; 3= tube germinatif > 4x taille de la conidie ; 100 conidies sont comptées par traitement.

(b): Le taux de germination total (classe2+classe3).

(c): Le taux de réduction de la germination par rapport aux témoins.

Cyl : *Cylindrosporim* sp ; **Fus** : *Fusarium solani*.

ANNEXES 5 (Communications)

Communications orale :

- 1^{ère} séminaire National : état des lieux, conservation et possibilités de valorisation des ressources biologique dans l'EST Algérien (Centre universitaire de Mila –Algérie-) ; Mars 2014.

Intitulé de la communication : Lutte biologique par l'utilisation de *Trichoderma sp* à l'égard de *Perenospora sp* agent de mildiou des lentilles.

- 26^{ème} Forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB (Monastir –Tunisie-), Mars 2015.

Intitulé de la communication : Activité antifongique de *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium solani*, agent de la pourriture racinaire des lentilles.

Communications orale :

- 24^{ème} Forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB (Sousse –Tunisie-), Mars 2013.

Intitulé de la communication : Isolement, étude de l'interaction de quelques mycètes vis-à-vis de *Lens culinaris* et mise en évidence de l'effet des agents de lutte biologique.

- Séminaire international sur la protection des cultures stratégiques en Algérie : situation et perspectives d'avenir (Université Hassiba Benbouali de Chelef –Algérie-) ; Mai 2013.

Intitulé de la communication : Lutte biologique contre les maladies de *Lens culinaris*.

Article :**academicJournals**

Vol. 10(13), pp. 1536-1542, 26 March, 2015
DOI: 10.5897/AJAR2014.9310
Article Number: 77071CD51979
ISSN 1991-637X
Copyright ©2015
Author(s) retain the copyright of this article
<http://www.academicjournals.org/AJAR>

**African Journal of Agricultural
Research***Full Length Research Paper*

The pattern of pathogen diversity and abundance in Lentil (*Lens culinaris*) fields in Constantine region, Algeria

Hiba Almi*, Laid Dehimat and Noredine Kacem Chaouche

Laboratory of Mycology, Biotechnology and Microbial Activity, SNV, University of Constantine -1 Constantine, 25000 Algeria.

Received 4 November, 2014; Accepted 18 March, 2015

Lenses are a group of pulses having a socio-economic and nutritional significance. The study was conducted on two fields of *Lens culinaris* in Constantine region contaminated with molds, had the objective to put a relationship between pathogenic molds associated with these plants and their environment. This study revealed the presence of 20 genera in soils (*Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bysochlamyces*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Peronospora*, *Phytophthora*, *Pseudallesheria*, *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Trichoderma* and *Ulocladium*) and 20 genera also in plants (*Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Cylindrosporium*, *Curvularia*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Onychocola*, *Phytophthora*, *Pseudallescheria*, *Penicillium*, *Peronospora*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma* and *Ulocladium*). They contribute approximately 54% of the total micropopulation enumerated in studied samples. The development of these pathogenic strains is governed by environmental conditions namely the chemical elements in soil, pH, electrical conductivity, Nitrogen, Carbon and saturation. The results we have obtained shows that the chemical variations ground contribute to the right development fungi and their transfer to plants

Key words: *Lens culinaris*, soil, fungi.

| | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|--|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---|----------------------|---|---------------------------|--|-------------------------|-------------------------------------|
| Nom/ Prénom : ALMI Hiba. | Date de Soutenance : 12/10/2015. | | | | | | | | | | | | |
| Intitulé : Etude des myco-pathogènes de <i>Lens culinaris</i> et évaluation de l'effet de deux souches de <i>Trichoderma harzianum</i> : cas de la Fusariose et de la Cylindrosporiose. | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Résumé : Dans l'objectif d'évaluer l'effet bio protecteur de deux souches de <i>Trichoderma harzianum</i> sur deux phytopathogènes <i>Cylindrosporium sp</i> et <i>Fusarium solani</i>, un pathosystème utilisant la légumineuse modèle <i>Lens culinaris</i> a été choisi. L'isolement des mycètes a permis d'obtenir 197 isolats fongiques des différents échantillons prélevés des sites Ain Semara et El Baâraouia dans la région de Constantine. En effet, 87 isolats fongiques ont été obtenus de différentes profondeurs du sol, avec une dominance fongique dans les profondeurs 5 et 10. Le reste des isolats (110) ont été obtenus des différents étages de plantes avec une distribution homogène en nombre d'isolats entre la partie aérienne et souterraine. L'identification macroscopique et microscopique de l'ensemble des isolats a permis de les sérier en 25 genres fongiques dont 55.34% des souches prélevés du site El Baâraouia et 46.30% du site Ain Semara sont des phytopathogènes. Deux isolats fongiques à activité antagoniste ont été présélectionnés après avoir développé des importantes zones d'inhibition sur le milieu PDA. L'identification préliminaire et moléculaire de ces isolats a montré qu'elles appartiennent à <i>Trichoderma harzianum 127a</i> et <i>Trichoderma harzianum 127b</i>. Les tests d'antagonismes menés <i>In vitro</i> contre deux pathogènes de <i>Lens culinaris</i> à savoir <i>Cylindrosporium sp</i> et <i>Fusarium solani</i> ; ont révélés que le taux d'inhibition par les métabolites volatiles est de 62.70% en moyenne et celui des métabolites diffusibles est de 86.34% en moyenne. L'évaluation du taux de compétition exercé par « <i>T-127a</i> et <i>T-127b</i> » a révélé que nos souches de <i>Trichoderma</i> ont la capacité de réduire de 70 à 83% la croissance de <i>C.sp</i> et de 67 à 82% et la croissance de <i>F.solani</i>. De ces résultats, il paraît que l'efficacité des souches de <i>Trichoderma</i> est plus importante en réunissant tous ces modes d'action (utilisation des spores). L'optimisation de milieu fermentation (FL) a révélé que les conditions optimales de production de biomasse de « <i>T-127a</i> et <i>T-127b</i> » sont : pH5, température 30°C et un milieu de culture à base d'extrait de Malt (M2). La culture de biomasse de « <i>T-127a</i> et <i>T-127b</i> » sur son du Blé (FMS) a permis d'obtenir une poudre lisse verdâtre dont la concentration avant purification est 3.27.10⁹UFC/mL pour <i>T-127a</i> et 3.33.10⁹UFC/mL pour <i>T-127b</i>. Par ailleurs, l'application de ces spores sur des plantes de lentilles a révélé qu'en absence de traitement avec les souches antagonistes, les plantes inoculés avec l'un des pathogènes (<i>C.sp</i> et <i>F.solani</i>) subissent un déficit hydrique conduisant à une augmentation de la teneur en Proline, une diminution dans la teneur Chlorophylle, la concentration en sucre et la croissance. Par contre, les plantes stimulées par les souches de <i>Trichoderma</i> avaient une teneur stable en Proline, une teneur élevée en Chlorophylle et sucre et une croissance est rapide. Les autres traitements ont pu conserver des valeurs de sucre, Proline Chlorophylle et aussi une croissance similaire aux témoins. En conclusion, nos spores de <i>Trichoderma harzianum</i> produisent à échelle laboratoire, possèdent des activités antifongiques importantes leurs permettant d'être exploités à l'échelle industrielle.</p> | | | | | | | | | | | | | |
| Mots clés : <i>Lens culinaris</i> , <i>Cylindrosporium sp</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , fermentation liquide, fermentation solide, antagonisme. | | | | | | | | | | | | | |
| Laboratoire : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie, et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri, Constantine. | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Jury d'évaluation :</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">Président de jury : Mr. KACEM CHAOUCHE N.</td> <td style="width: 50%;">Prof. Univ. Frères Mentouri.</td> </tr> <tr> <td>Rapporteur : Mr. DEHIMAT L.</td> <td>Prof. Univ. Frères Mentouri.</td> </tr> <tr> <td>Examineur : Mr. YAHIA A.</td> <td>Prof. Centre Universitaire Mila.</td> </tr> <tr> <td>Mr. GUECHI A.</td> <td>Prof. Univ. Ferhat Abbas, Sétif.</td> </tr> <tr> <td>Mr. HAMIDCHI M. A.</td> <td>Prof. Univ. Frères Mentouri, Constantine.</td> </tr> <tr> <td>Mr. OUFEROUKH A.</td> <td>Directeur INRA, Constantine.</td> </tr> </table> | | Président de jury : Mr. KACEM CHAOUCHE N. | Prof. Univ. Frères Mentouri. | Rapporteur : Mr. DEHIMAT L. | Prof. Univ. Frères Mentouri. | Examineur : Mr. YAHIA A. | Prof. Centre Universitaire Mila. | Mr. GUECHI A. | Prof. Univ. Ferhat Abbas, Sétif. | Mr. HAMIDCHI M. A. | Prof. Univ. Frères Mentouri, Constantine. | Mr. OUFEROUKH A. | Directeur INRA, Constantine. |
| Président de jury : Mr. KACEM CHAOUCHE N. | Prof. Univ. Frères Mentouri. | | | | | | | | | | | | |
| Rapporteur : Mr. DEHIMAT L. | Prof. Univ. Frères Mentouri. | | | | | | | | | | | | |
| Examineur : Mr. YAHIA A. | Prof. Centre Universitaire Mila. | | | | | | | | | | | | |
| Mr. GUECHI A. | Prof. Univ. Ferhat Abbas, Sétif. | | | | | | | | | | | | |
| Mr. HAMIDCHI M. A. | Prof. Univ. Frères Mentouri, Constantine. | | | | | | | | | | | | |
| Mr. OUFEROUKH A. | Directeur INRA, Constantine. | | | | | | | | | | | | |

