

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة بالحراش  
Ecole Nationale Supérieure Agronomique, EL- Harrach

## Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques

### Thème

**Etude de la diversité génétique de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* agent du flétrissement de la tomate et recherche de l'effet antagoniste de *Trichoderma* spp. à l'égard de l'agent pathogène**

Réalisée par

**DEBBI Ali**

#### Jury:

**Président:** M. REGUIEG L. Professeur ENSA. EL- Harrach

**D. de thèse :** Mme. BOUREGHDA H. Professeur ENSA.EL- Harrach

**Co-D. de thèse:** Mme. HERMOSA Prieto M. R. Professeur CIALE, université de Salamanca, Espagne

#### Examineurs :

**Mme KRIMI Z.** Professeur université de Blida

**M. BENCHABANE M.** Professeur université de Blida

**M. BOUZNAD Z.** Professeur ENSA.EL- Harrach

2018/2019

## **DEDICACES**

*A toute ma famille et à tous mes amis je dédie ce  
modeste travail*

# AVANT PROPOS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été initiés au Laboratoire de mycologie au Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine. Cependant, la principale partie a été réalisées au laboratoire de Phytopathologie et de Bio-control du Spanish-Portuguese Institute for Agricultural Research (CIALE) de Salamanca en Espagne, dans le cadre d'une bourse « PNE » financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique (MESRS).

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mme. Houda BOUREGHDA, Professeur de Phytopathologie au département de Botanique de l'ENSA d'El-Harrash. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon travail de recherche.

Ce travail a été aussi, Co-encadré scientifiquement par Mme. Maria Rosa HERMOSA PRIETO, Professeur de Microbiologie au département de Microbiologie et de Génétique, université de Salamanca, Espagne. Ses apports scientifiques et logistiques ainsi que son suivi pour la finalisation de mes travaux de recherche ont été d'une qualité supérieure et très fructueuse. Je tiens également, à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude.

Mes remerciements les plus chaleureux vont au président du jury, le Professeur REGUIEG Lyes, d'avoir accepté aimablement de présider et de juger ce travail. Je suis très reconnaissant et honoré par sa participation au jury de cette thèse

Mes remerciements vont également à Mme KRIMI Zoulikha, Professeur à l'université Saad Dahleb de Blida 1, d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement de critiquer et d'examiner ce travail. Je suis particulièrement reconnaissant pour sa participation à ce jury.

Je tiens à remercier également M. BENCHABANE Messaoud, Professeur à l'université Saad Dahleb de Blida, d'avoir accepté aimablement, malgré ses occupations de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Que, M. BOUZNAD Zouaoui, Professeur de Phytopathologie et chef du département de Botanique à l'ENSA d'El-Harrach, accepte l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, d'avoir ménagé son temps pour évaluer et critiquer ce travail et pour ces conseils scientifiques prodigués.

J'adresse mes sincères sentiments de reconnaissance et de respect au Pr. Enrique MONTE, chef du laboratoire de Phytopathologie et de Bio-control au centre de recherche « CIALE » de Salamanca en Espagne, d'avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire, pour son hospitalité et pour ses qualités humaines exceptionnelles.

Je tiens à exprimer mes sentiments les plus profonds et mes remerciements infinis au personnel du Laboratoire de mycologie du «C.R.Bt», notamment Houda BOULAHBEL et Hamed HAKKOUM sans oublier Mohamed-Abdou AMINE KHODJA, Mounia KARA MOSTEFA, Mahdi HAMDJ et Abd EIKader MAHROUK, pour les relations professionnelles et fraternelles pleines de compréhensions, ainsi que pour leur soutien et leur contribution considérable dans la réalisation de ce travail. Un grand merci également, à tous mes collègues et amis, chercheurs et personnels de soutien du « C.R.Bt » ayant participé et facilité quel que soit peu, à la réalisation de ce travail notamment, Boualem HARFI, tous les membres de l'équipe du laboratoire de Biologie moléculaire du «C.R.Bt» et tous les membres de l'équipe de Bio-statistique, pour leur soutien plein d'encouragement.

Je tiens à adresser mes remerciements chaleureux à tout le personnel du laboratoire de Phytopathologie et de Bio-control de CIALE notamment, Moatez BAY et Isabel CHAMORRO, pour leurs aides précieuses. Sans oublier, Irene, Belén, Ana, Vergenia et Thomas pour leurs aides, pour les relations amicales et conviviales et leur hospitalité, qui ont rendu tous mon séjour en Espagne si agréable,

Ma profonde gratitude est adressée aussi, au personnel du département de Botanique de l'ENSA d'El-Harrash notamment Fatima et Nesrine, pour leur disponibilité et leurs esprits professionnels, et à Hayet MEAMICHE et Wahiba HARRAT, doctorantes de l'ENSA et chercheurs à l'INRAA, pour leurs apports scientifiques en bibliographie, réactifs et produits consommables et à mon cher ami Boubekour SAIFI, enseignant chercheur à l'ENSB de Constantine, pour son soutien, ses encouragements et son apport scientifique.

Enfin, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que cette thèse ait pu voir le jour, j'exprime ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance.

## Résumé

Des prospections ont été menées dans différentes zones de production de la tomate en Algérie entre 2012 et 2015. 50 isolats de *Fusarium* associés à la culture de la tomate ont été collectés à partir de plants malades. Une caractérisation moléculaire par PCR en utilisant l'amorce spécifique PF02-03, a permis d'identifier 29 isolats comme étant des *Fusarium oxysporum*. En outre, l'amplification par PCR avec les amorces spécifiques P12-F2B / P12-R1, SIX3-F1/SIX3-R2, SIX4-F1/SIX4-R1 et SIX3-G137C-F1/SIX3-R2 a fait la distinction entre les isolats de *Fol*, et ceux du *Forl*, permettant l'identification de 19 isolats sur 29, comme *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), à savoir, 17 isolats comme race 2 (race dominante), 2 isolats comme race 3 et aucun des isolats n'a été identifié comme race 1. En outre, le test de pathogénicité *in vivo* a montré une grande diversité en terme d'indice de maladie allant de 1,2 à 3,7 enregistrés par les isolats F9 (*Forl*) et F30 (*Fol*) respectivement. L'étude de la diversité des isolats par les marqueurs ISSR, montrent une grande variabilité génétique aussi bien au sein des isolats de la même race qu'entre des isolats appartenant à des races différentes. Les résultats ont montré que seulement 10 isolats tendent à se regrouper par paire d'isolats avec un indice de similarité supérieur à 0,55. Le reste des isolats montrent un indice de similarité inférieur à 0,5. Cependant, une corrélation pourrait être notée entre le test de virulence et de la caractérisation moléculaire en utilisant des amorces spécifiques. Afin d'améliorer les méthodes de lutte biologique contre la fusariose de la tomate, trois espèces différentes, à savoir *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* et *T. ghanense*, ont été identifiées parmi une collection de 17 isolats autochtones de *Trichoderma*. Il est à noter que *T. ghanense* n'a jamais été signalé en Algérie auparavant. Bien que T8 (*T. ghanense*) ait enregistré les valeurs d'inhibition de la croissance les plus élevées contre l'isolat F42, sur les deux membranes avec 56,87% sur membrane de cellulose et 51,22% sur membrane de cellophane, le potentiel antagoniste des isolats de *Trichoderma* testés *in vitro* montre que leur capacité antagoniste dépend des isolats phytopathogènes ciblés. De même, au cours du test de l'activité antifongique *in vivo*, l'isolat T8 a montré la plus importante réduction de l'incidence de la maladie avec 53,12% et 48,28% contre *Forlc* et l'isolat F42 (*Fol*) respectivement.

**Mots clés:** Flétrissement fusarien de la tomate, caractérisation moléculaire, lutte biologique, antagonisme,

**Abstract**

Surveys in various production areas of tomato crop in Algeria were conducted from 2012 to 2015. 50 isolates of tomato *Fusarium* wilt were obtained from diseased tomato plants. A molecular characterization study was performed using specific primer PF02-03 led to identify 29 isolates as *Fusarium oxysporum*. Additionally, PCR amplification with specific primers P12-F2B / P12-R1, SIX3-F1/SIX3-R2, SIX4-F1/SIX4-R1 and SIX3-G137C-F1/SIX3-R2 discriminated between *Fol* races, and *Forl* forma speciales, allowing the identification of 19 of 29 isolates, as *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) namely, 17 isolates as race 2 (dominant race), 2 isolates as race 3 and none of isolates were identified as race 1. Furthermore, the *in vivo* pathogenicity test showed a large diversity in term of disease index ranged from 1.2 to 3.7 recorded by F9 (*Forl*) and F30 (*Fol*) isolates respectively. This characterization was completed by a study of isolates diversity by the ISSR markers, showing a high genetic diversity detected within even, the same race isolates as well as between isolates belonging to different races. The results showed that only 10 isolates tended to cluster by pair of isolates with similarity index more than 0.55 and the rest of isolates showed similarity index less than 0.5. However, a correlation might be noted between the virulence and molecular discrimination assay using specific primers. In order to improve biocontrol method against tomato *Fusarium* wilt, three different species namely, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma ghanense* were identified within a collection of 17 local *Trichoderma* isolates. It is noteworthy that *Trichoderma ghanense* has never been reported in Algeria before. Although, T8 (*T. ghanense*) recorded the highest growth inhibition values against *Fol* isolate F42, on both membranes with 56.87% on cellulose membrane and 51.22% on cellophane membrane, the antagonistic potential of *Trichoderma* isolates tested *in vitro*, showed that their antagonist capacity depends on the targeting phytopathogenic isolates. Similarly, by *in vivo* antifungal activity test, *Trichoderma ghanense* isolate T8, showed the highest decrease in disease incidence with 53.12% and 48.28% against *Forlc* and the *Fol* isolate F42 respectively. Such isolates might be selected as biological agent to control these pathogens.

**Key words:** Tomato *Fusarium* wilt, molecular characterisation, biological control, antagonism,

## ملخص

أجريت عملية مسح في مختلف مناطق إنتاج الطماطم في الجزائر خلال الفترة الممتدة بين 2012 و 2015. و بالتالي تم الحصول على 50 عزلة فوزاريوم "Fusarium" من نباتات الطماطم المصابة بمرض الذبول و/أو الاصفرار. تم إجراء دراسة توصيف جزيئي أولية باستخدام البادئات الخاصة PF02-03، مما أدى إلى تعريف 29 عزلة على أنها فوزاريوم أوكسيسبوروم "Fusarium oxysporum". إضافة إلى ذلك تمت عملية التضخيم التسلسلي "PCR" باستخدام البادئات الخاصة SIX3-G137C-و، SIX3-F1/SIX3-R2 ، P12-F2B / P12-R1، SIX4-F1/SIX4-R1 و F1/SIX3-R2، والتي مكنت من التمييز بين السلالات الفيزيولوجية لـ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* و *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* و بالتحديد تم تعريف 17 عزلة على أنها من السلالة 2 (race 2) و عزلتين على أنهما سلالة 3 (race 3). و لم يتم تعريف أي عزلة على أنها سلالة 1 (race 1). زيادة على ذلك، دراسة الأمراض في البيت البلاستيكي، أظهرت وجود تنوع كبير من خلال المؤشر المرضي و الذي يتراوح بين 1.2 و 3.7 ، تم تسجيله من طرف F9 (Forl) و F30 (Fol) على التوالي. تم إتمام هذا التوصيف بدراسة تنوع العزلات بواسطة علامات ISSR ، و التي بينت تنوعا جينيا عاليا لوحظ حتى بين عزلات من نفس السلالة و كذلك بين عزلات من سلالات مختلفة . هذه النتائج أظهرت أن 10 عزلات فقط تميل إلى التجمع مثلي، بمؤشر تشابه 0.55. بقية العزلات أظهرت مؤشر تشابه أقل من 0.5. و مع ذلك يمكن ملاحظة وجود توافق طفيف بين القدرة الإمراضية و التوصيف الجزيئي باستخدام بادئات خاصة.

من أجل تحسين طرق مكافحة البيولوجية لمرض فوزاريوم الطماطم، تم تحديد ثلاثة أصناف من بين 17 عزلة تريكودارما "Trichoderma" و هي "Trichoderma asperellum" ، "Trichoderma harzianum" و *Trichoderma ghanense* ، و الجدير بالذكر أنه لم يتم الإعلان عن وجود هذا الصنف في الجزائر من قبل. و أثناء دراسة القدرة على التثبيط في المخبر، العزلة T8 (*T. ghanense*) سجلت أعلى قيم تثبيط النمو ضد F42 ، و ذلك باستخدام غشاء السليلوز و غشاء السيلوفان بنسبة % 56.87 و % 51.22 على التوالي. النتائج المخبرية أظهرت أن القدرة العدائية الكامنة لعزلات التريكودارما مرتبطة بالعزلات الإمراضية المستهدفة . في نفس الاتجاه، دراسة النشاط العدائي المضاد للفطريات في وجود النبات، أظهرت أن عزلة T8 سجلت أعلى تخفيض في مؤشر المرض بنسبة % 53.12 و % 48.28 ضد العزلتين Forlc و F42 على التوالي. و بالتالي يمكن اختيار العزلة T8 كعنصر بيولوجي لمكافحة هذا المرض.

**الكلمات المفتاح:** فوزاريوم الذبول، التوصيف الجزيئي، مكافحة البيولوجية، التضاد البيولوجي .

# Table des matières

Résumé.....	IV
Introduction.....	1
I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	4
1. La culture de la tomate en Algérie.....	5
2. Etat phytosanitaire de la tomate.....	5
3. Les fusarioses de la tomate.....	8
3.1. Le flétrissement fusarien de la tomate.....	8
3.2. La pourriture fusarienne du collet et des racines de la tomate.....	9
3.3. Caractérisation morphologique et taxonomie de l'agent phytopathogène.....	11
3.4. Diversité génétique de l'agent phytopathogène.....	12
4. Moyens de lutte.....	13
4.1. Moyens de lutte chimique.....	14
4.2. Moyens de lutte culturaux.....	15
4.3. Moyens de lutte physiques.....	16
4.4. La lutte biologique.....	16
5. Le genre <i>Trichoderma</i> .....	17
5.1. Identification morphologique des espèces de <i>Trichoderma</i> .....	17
5.2. Identification et caractérisation moléculaires des espèces de <i>Trichoderma</i> .....	18
5.3. Application de <i>Trichoderma</i> spp. en lutte biologique.....	19
5.4. Mécanismes d'action de <i>Trichoderma</i> spp. en lutte biologique.....	20
II. MATERIEL ET METHODES.....	21
1. Matériel biologique.....	22
1.1. Matériel végétal.....	22
1.2. Matériel fongique.....	22
2. Méthodes.....	25
2.1. Prospection et collecte des échantillons fongiques.....	25
2.1.1. Prospection et collecte des échantillons malades.....	25
2.1.2. Echantillonnage de l'agent antagoniste.....	25
2.2. Isolement et purification des isolats fongiques.....	26
2.2.1. Isolement et purification de l'agent phytopathogène.....	26



2.2.2.	Identification morphologique de l'espèce <i>F. oxysporum</i> .....	26
2.2.3.	Isolement et purification de l'agent antagoniste .....	27
2.2.4.	Identification morphologique des isolats du genre <i>Trichoderma</i> .....	28
2.3.	Test de pathogénicité des isolats de <i>Fo</i> .....	28
2.4.	Caractérisation moléculaire de l'agent phytopathogène.....	29
2.4.1.	Production du mycélium en milieu liquide .....	29
2.4.2.	Extraction de l'ADN génomique .....	30
2.4.3.	PCR spécifique à <i>F. oxysporum</i> .....	30
2.4.4.	Identification des races de <i>Fol</i> et de <i>Forl</i> par PCR en utilisant les amorces spécifiques sprl, sp13 et sp23.....	31
2.4.5.	Confirmation de la virulence des isolats et des races de <i>Fol</i> par amplification du gène <i>SIX</i> .....	32
2.4.6.	Identification des races de <i>Fol</i> par amplification du gène <i>SIX</i> .....	32
2.4.7.	Étude de la diversité génétique des isolats de <i>Fol</i> et de <i>Forl</i> par ISSR .....	33
2.5.	Identification moléculaire des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.....	34
2.5.1.	Amplification de la région ITS et du fragment Tef 1 alpha .....	34
2.5.2.	Séquençage de la région ITS et du fragment Tef 1alpha .....	35
2.6.	Activité antagoniste de <i>Trichoderma</i> spp vis à vis de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> et de <i>F. o. f.sp radidis-lycopersici</i> .....	38
2.6.1.	Activité antagoniste <i>in vitro</i> .....	38
a.	Confrontation directe.....	38
b.	Activité antifongique sur membranes de cellophane .....	38
c.	Activité antifongique sur membranes de cellulose.....	39
2.6.2.	Activité antagoniste <i>in vivo</i> .....	40
III.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	42
1.	Résultats .....	43
1.1.	Caractérisation des isolats de <i>F. oxysporum</i> .....	43
1.1.1.	Identification des isolats basée sur les critères morphologiques .....	43
1.1.2.	Identification de l'espèce <i>F. oxysporum</i> par PCR.....	43
1.1.3.	Identification des races de <i>Fol</i> et de <i>Forl</i> par PCR en utilisant les amorces spécifiques sprl, sp13 et sp23.....	44
1.1.4.	Test de pathogénicité : inoculation des deux cultivars «SM» et «RG» par les isolats de <i>Fusarium oxysporum</i> étudiés .....	48

1.1.5.	Identification des races de <i>Fol</i> par amplification du gène <i>SIX</i> .....	52
1.1.6.	Diversité génétique des isolats de <i>Fo</i> algériens par ISSR .....	52
1.2.	Etude de l'activité antifongique des isolats de <i>Trichoderma</i> .....	58
1.2.1.	Identification moléculaire des isolats de <i>Trichoderma</i> spp. utilisés dans l'étude	58
1.2.2.	Activité antagoniste <i>in vitro</i> .....	63
1.2.3.	Activité antifongique des isolats de <i>Trichoderma</i> contre les isolats <i>F. oxysporum</i> <i>in vivo</i> .....	68
2.	Discussion.....	71
	Conclusion générale.....	78
	Références bibliographiques .....	81
	Annexes.....	i
	Annexe I Protocol d'extraction d'ADN .....	i
	Annexe II Matrice binaire correspondante aux gels obtenus par les deux amorces (GA) 9C et (GA) 9T utilisées pour l'étude des ISSR .....	ii
	Annexe III Séquences des régions ITS et du fragment des facteurs d'élongation (EF) des isolats de <i>Trichoderma</i> sp. ....	iii
	Article publié .....	i

## Liste des abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ANOVA: Analyse Of Variance

cv: cultivar

ENSA: École National supérieure d'Agronomie

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

*Fo* : *Fusarium oxysporum*

*Fol* : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

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

IGS : Inter Genic Spacer

IM : Incidence de la Maladie

ISSR: Inter Simple Sequence Repeat

ITCMI : Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles

ITS : Intragenic Transcribed Spacer

pb : paire de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB: Potato Dextrose Brouth

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA

RG: Rio Grande

RIM : Réduction de l'Incidence de la Maladie

SIX : Secreted In xylem

SM: Super Marmande

TEF : Facteur d'élongation de la traduction des protéines

UPGMA : Unweighted pair group method with arithmetic mean

UV : Ultraviolet

VCG: Vegetative compatibility group

## **Unités de mesure**

°C : degré Celsius

cm : centimètre

KDa : Kilo dalton

min : minute

mm : millimètre

ng : nanogramme

µm : micromètre

V : volt

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principales maladies de la tomate .....	6
<b>Tableau 2.</b> Principaux ravageurs de la tomate .....	7
<b>Tableau 3.</b> Isolats de <i>Fusarium</i> obtenus à partir des tiges de plantes de tomate malades, lieu d'isolement, symptômes observés et année d'isolement.....	22
<b>Tableau 4.</b> Isolats de <i>Trichoderma</i> utilisés, lieu et année d'isolement .....	24
<b>Tableau 5.</b> Amorces utilisées dans cette étude.....	37
<b>Tableau 6.</b> Profil d'amplification par PCR des isolats de <i>Fo</i> en utilisant les amorces spécifiques POF, sp13, sp23 et sprl.....	45
<b>Tableau 7.</b> Origines géographiques des isolats de <i>F. oxysporum</i> analysés et leur assignation aux f. sp. <i>lycopersici</i> ( <i>Fol</i> ) et <i>radicis-lycopersici</i> ( <i>Forl</i> ), basé sur l'amplification du gène <i>SIX1</i> , et le test de pathogénéicité .....	49
<b>Tableau 8.</b> Identification moléculaire des isolats algériens de <i>Fusarium oxysporum</i> ( <i>Fo</i> ) sur la base des profils d'amplifications du gène <i>SIX3</i> et <i>SIX4</i> (+, le fragment est présent, -, le fragment est absent).....	55
<b>Tableau 9.</b> Analyse de la diversité génétique par ISSR, des isolats de <i>F. oxysporum</i> collectés en Algérie avec les 2 isolats de référence 4287 et <i>Folrc</i> .....	57
<b>Tableau 10.</b> Identification des isolats de <i>Trichoderma</i> étudiés par séquençage de la région ITS de l'ADNr et du gène <i>tef1alpha</i> .....	60
<b>Tableau 11.</b> Taux d'inhibition de la croissance des colonies des isolats de <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>radicis-lycopersici</i> et des isolats de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> induit par les isolats de <i>Trichoderma</i> étudiés, après confrontation directe et sur membranes de cellophane et de cellulose .....	65
<b>Tableau 12.</b> Incidence de la maladie (IM) causée par <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> <i>Forlc</i> et <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> F42 et 4287 sur des plants de tomate "Super Marmande", traités séparément avec <i>T. ghanense</i> (T8) et <i>T. asperellum</i> (T9 et T17).....	69

## Liste des figures

- Figure 1.** Symptômes sur plantes de tomate atteintes par la fusariose vasculaire a) Coloration brune sombre au niveau des vaisseaux b) feuilles basses jaunes et flétris (Blancard, 2009). ..... 10
- Figure 2.** Symptômes induits par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* a) racines brunes et pourries et un brunissement des vaisseaux b) Système racinaire réduit, brun et pourri, vaisseaux brun chocolat dans les parties basses de la tige c) pourriture du collet (Blancard, 2009)..... 10
- Figure 3.** A – B: Macroconidies; C – D: Microconidies; E – F: Microconidies *in situ* on CLA (Carnation leaf agar) (Leslie et Summerell, 2006)..... 12
- Figure 4.** Localisation des cultures dans lesquelles les isolats de *Fusarium* et de *Trichoderma* ont été collectés en Algérie: [www.google.earth.com](http://www.google.earth.com)..... 25
- Figure 5.** Récupération des fragments de la région ITS et du gène *tef1 alpha* amplifiés par PCR, à partir du gel d'agarose ..... 36
- Figure 6.** Profils des bandes par PCR de l'ADN de *F. oxysporum* généré par les amorces spécifiques PF02-03, Marqueur de 100 pb de taille. .... 47
- Figure 7.** Profils des bandes par PCR de l'ADN de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, généré par les amorces spécifiques (A) spr1, (B) sp13, (C) sp23, Marqueur de 100 pb de taille. .... 47
- Figure 8.** Symptômes de jaunissement de flétrissement fusarien et de rabougrissement induit chez les plants de tomates par les isolats de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* A: 4287, B: F42, E: F30 sur le cv. «SM» et les isolats de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* D et F: Forlc, H: F17 sur le cv. «RG», 4 semaines après inoculation, C: plant témoin Super Marmande et G: plant témoin Rio Grand. .... 51
- Figure 9.** Profils des bandes obtenus par PCR de l'ADN des races de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, générées par les couples d'amorces (A) P12-F2B/P12-R1, spécifique au *Fol*, (B) SIX3-F1/SIX3-R2 spécifique à la race 2 de *Fol* et (C) SIX3-G137C-F1/SIX3-R2 spécifique à la race 3 de *Fol*. M : Marqueur de 100 pb de taille. .... 54
- Figure 10.** Profils des bandes obtenus par PCR des isolats de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et des isolats de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* et l'isolat non pathogène F44, générés par les amorces (A) (GA) 9C et (B) (GA) 9T. M : Marqueur de 100 pb de taille. .... 56
- Figure 11.** Dendrogramme des isolats de *Fol* et de *Forl* ( ) étudiés, obtenus à partir de la matrice du coefficient de Jaccard, généré de l'analyse par ISSR avec les amorces (GA) 9C et (GA) 9T..... 57

- Figure 12.** Profils d'amplification par PCR de la région ITS par les amorces ITS1-ITS4 (A) et du gène *tef1 alpha* par les amorces EF1-728F- *tef1-rev* (B), des isolats de *Trichoderma*. étudiés. .... 59
- Figure 13.** Arbre phylogénétique généré de l'analyse des séquences ITS, montrant la position des 17 isolats de *Trichoderma* spp. par rapport aux isolats de références, obtenu par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 7. Les numéros au niveau des branches indiquent le pourcentage avec lequel la branche donnée est supportée pour 1000 réplifications bootstrap..... 61
- Figure 14.** Arbre phylogénétique généré de l'analyse des séquences du gène *tef1 $\alpha$* , montrant la position des 17 isolats de *Trichoderma* spp. par rapport aux isolats de références, obtenu par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 7. Les numéros au niveau des branches indiquent le pourcentage avec lequel la branche donnée est supportée pour 1000 réplifications bootstrap. .... 62
- Figure 15.** Action myco-parasitaire des isolats de *T. asperellum* T9 et T17 à l'égard de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (isolats 4287, F42) et de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (isolats F17, Forlc), montrant un envahissement et une forte sporulation, après 6 jours d'incubation à 28 ° C à l'obscurité..... 66
- Figure 16.** Activité antifongique de l'isolat T8 de *T. ghanense* à l'égard de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (isolats 4287, F42) et *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (isolat Forlc) (A) sur membrane de cellophane, (B) sur membrane de cellulose après, 48 h d'incubation à 28 ° C à l'obscurité..... 66
- Figure 17.** Inhibition *in vitro* de la croissance mycélienne des isolats de *F. oxysporum* par des isolats de *Trichoderma* en confrontation directe (A), sur membrane de cellophane (B) et sur membrane de cellulose (C). .... 67
- Figure 18.** Activité Antagoniste *in vivo* des isolats de *Trichoderma* à l'égard des isolats de *F. oxysporum* : T8 (*T. ghanense*) contre F42 (A), T8 contre Forlc (B), T9 (*T. asperellum*) contre 4287 (C)..... 70

## Introduction

Les fusarioses sont des maladies fongiques courantes qui affectent les végétaux. Une étude sur les maladies des plantes tenue par « The American Phytopathological Society » a révélé que plus de 81 des 101 plantes économiquement importantes avaient au moins une maladie à *Fusarium* qui leur sont associée. Les symptômes induits par les espèces de *Fusarium*, tout comme leur gravité, sont très variés. Ils peuvent inclure des pourritures des racines ou des tiges, des chancres, des flétrissements, des pourritures des fruits ou des graines ainsi que, des maladies foliaires (Leslie et Summerell, 2006).

Un exemple de cette association, sont les fusarioses associées à la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), qui sont principalement causées par deux formes spéciales à savoir, le *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis et Shomaker (*Fol*), responsable de la pourriture du collet et des racines et le *Fusarium oxysporum* Schlecht : Fr. F. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder et H.N. Hansen (*Fol*), responsable d'une maladie vasculaire (Edel-Hermann *et al.*, 2012). Le flétrissement fusarien causé par le champignon phytopathogène *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* est l'une des maladies les plus répandues et les plus importantes sur le plan économique sur tomate. Cet agent phytopathogène peut être à l'origine des pertes de rendement de 30 à 40% et pouvant atteindre même 80% de perte, dans des conditions météorologiques favorables (Nirmaladevi *et al.*, 2016).

Les trois races physiologiques connues dans cette forme spéciale, nommées par ordre de découverte (race 1, race 2, et race 3) se distinguent par leurs capacités à infecter un ensemble de cultivars, dit gamme d'hôtes différentielle, portant des locus de résistance distincts (Mes *et al.*, 1999). Les races 1 et 2 sont largement distribuées dans le monde alors que la race 3 a une répartition géographique plus restreinte (Reis *et al.*, 2005). En effet, la distinction entre les formes pathogènes appartenant à l'espèce *Fusarium oxysporum* n'est pas facile. Cependant, la détection et la



détermination de ces formes pathogènes (f.sp. et races) de *F. oxysporum* dans le champ, les graines et les plants de pépinières sont les étapes les plus importantes pour la lutte contre les maladies causées par ce champignon (Inami *et al.*, 2010).

Bien que traditionnellement, la caractérisation morphologique et physiologique, soit utilisée comme méthode d'identification de base, les formes spéciales et les races de *F. oxysporum* ne peuvent pas être discriminées par ces méthodes. Récemment, de nombreuses techniques moléculaires sont utilisées comme méthodes pratiques et fiables pour l'identification des champignons. Les marqueurs moléculaires sont devenus techniquement faciles à appliquer, donnant rapidement des résultats informatifs et concluants pour l'identification des espèces et des sous-espèces de champignons (Çolakm et Biçici, 2013). Ainsi, la distinction par PCR « Polymerase Chain Reaction » entre les différentes races du *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) et de *F.o.* f. sp. *radicis-lycopersici* (*Forl*) en utilisant un groupe d'amorces spécifiques est un exemple qui démontre que l'approche moléculaire peut être utilisée pour faciliter l'identification et par conséquent, le diagnostic de la maladie (Hirano et Arie, 2006).

En Algérie, la fusariose de la tomate a été signalée par plusieurs auteurs indiquant qu'ils ont utilisé des isolats de *Fol* algériens dans leurs études telles que Henni *et al.* (1994), Mezaache-Aichour *et al.* (2012), et Toua *et al.* (2013). Néanmoins, à ce jour, il n'existe pas de rapport notoire sur la diversité pathologique et génétique ou sur les races physiologiques de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* existantes en Algérie. En outre, Edel-Hermann *et al.* (2012) ont rapporté dans leur étude qu'aucun des 48 isolats de *Fusarium* spp. collectés à partir des cultures de tomate, présentant des symptômes de flétrissement et de jaunissement, en Algérie n'a été assignés au *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En effet, dans cette étude le séquençage d'un fragment du gène *tef1 alpha* a permis d'identifier 18 isolats comme *Fusarium commune*, trois isolats comme *Fusarium redolens* et 27 isolat comme *Fusarium oxysporum*. Ces derniers isolats ont fait ensuite, l'objet d'une amplification par PCR du gène *SIX1* « secreted in xylem 1 » spécifique au *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Cependant aucun des 27 isolats n'a été scoré SIX1+. Il

a été suggéré de ce fait que les 27 isolats identifiés comme *Fusarium oxysporum*, peuvent être assignés au f. sp. *radicis-lycopersici*.

En plus de la confirmation de la présence du *Fol* et du *Forl* en Algérie, Cette étude a été initiée dans le but de:

- Identifier les formes pathogènes (formes spéciales et races physiologiques) de *F. oxysporum* associées au flétrissement et au jaunissement de la tomate en Algérie, par une approche moléculaire (PCR) en utilisant un ensemble d'amorces spécifiques ;
- Confirmer la virulence et l'agressivité des isolats de *Fusarium* collectés, par un test de pathogénicité ;
- Évaluer la diversité génétique au sein de la collection d'isolats des deux formes spéciales et des différentes races, par les marqueurs ISSR.

L'objectif de cette étude est également, l'identification et la recherche de l'effet inhibiteur des isolats de *Trichoderma* autochtones à l'égard des isolats de *Fusarium* de la tomate étudiés, par :

- L'identification des isolats de *Trichoderma* spp. par des méthodes moléculaires (séquençage) ;
- Les tests biologiques de bio-control, *in vitro* et *in vivo*, comme contribution pour le développement des méthodes de lutte alternatives, respectueuses de l'environnement et la possibilité d'implantation de ces agents antagonistes dans la lutte intégrée, contre les fusarioses de la tomate.

## I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## Données bibliographiques

---

### 1. La culture de la tomate en Algérie

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) est une solanacée des régions chaudes qui peut être cultivée dans toutes les régions de l'Algérie. Ainsi, la tomate de l'arrière-saison est cultivée dans les régions du littoral Centre et du littoral Ouest. La culture de tomate sous serres est basée dans les toutes régions du littoral et du sud. Cependant, la culture de tomate de saison se trouve pratiquement, dans toutes les régions du pays. La culture de la tomate occupe une place privilégiée dans le secteur maraîcher en Algérie. Elle est de ce fait, considérée comme une espèce prioritaire. Toutefois, les superficies cultivées en tomate n'ont pas connu une évolution importante au cours des dernières années, en passant simplement, de 21 358 ha en 2010 à 23 977 ha en 2017. Par contre, la production de la tomate fraîche en Algérie a presque doublé durant cette même période (2010-2017), dépassant les 1 280 000 tonnes en 2017 contre 718 235 tonnes en 2010 (FAOSTAT, 2018). Les chiffres témoignant donc, d'une reprise de la filière après des années de stagnation. Au-delà des performances réalisées dans la production qui a atteint 975 075 tonnes en 2013 contre 771 606 tonnes en 2011, les rendements obtenus à l'hectare ne cessent de connaître des améliorations significatives, selon les statistiques de l'AFO. Alors qu'ils n'étaient que de 375 quintaux à l'hectare en 2011, les rendements ont dépassé 536 quintaux/ha, en 2017 (FAOSTAT, 2018).

### 2. Etat phytosanitaire de la tomate

La tomate est l'un des légumes les plus cultivés dans le monde entier. Cependant, La culture de tomate est sujette à de nombreuses maladies et ravageurs (Tableau 1 et 2) telles que : Le mildiou, la pourriture grise et l'alternariose. Le flétrissement de la tomate causé par *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* et *Verticillium albo-atrum*, est l'une des maladies les plus destructrices des légumes dans les régions

chaudes et humides et des régions subtropicales et tempérées du monde (Takahashi *et al.*, 2005 ; Arie *et al.*, 2007).

**Tableau 1.** Principales maladies de la tomate

<b>Maladies cryptogamiques</b>	
<b>Maladie</b>	<b>Agent phytopathogène</b>
Alternariose de la tomate ou maladie des taches brunes de la tomate	<i>Alternaria solani</i>
Mildiou de la tomate	<i>Phytophthora infestans</i>
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>
Pourritures noires des fruits	<i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria tomato</i>
Chancre à <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Cercosporiose	<i>Pseudocercospora fuligena</i>
Verticilliose	<i>Verticillium albo-atrum</i> <i>Verticillium dahliae</i>
Pourriture charbonneuse	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Chancre à <i>Didymella</i>	<i>Didymella lycopersici</i>
Pourriture de la racine et du collet de la tomate	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> Jarvis et Shoem.
Flétrissure fusarienne de la tomate	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
Stemphyliose de la tomate	<i>Stemphylium lycopersici</i>
Phoma rot	<i>Phoma destructiva</i>
Oïdium	<i>Oidiopsis sicula</i>
Fonte des semis, pourritures	Oomycètes divers
Moisissure chevelue	<i>Rhizopus stolonifer</i>
Septoriose de la tomate	<i>Septoria lycopersici</i>
Pourriture de la tige (Brûlure de midi)	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Moisissure blanche	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<b>Maladies bactériennes</b>	
<b>Maladie</b>	<b>Agent phytopathogène</b>
Chancre bactérien de la tomate	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Moucheture bactérienne	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Gale bactérienne	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Pourriture molle bactérienne	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>
Flétrissement bactérien	<i>Ralstonia solanacearum</i>
Moëlle noire	<i>Pseudomonas corrugata</i>
Dépérissement bactérien à <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>

<b>Maladies virales</b>	
<b>Maladie</b>	<b>Agent phytopathogène</b>
Virus Y de la pomme de terre	<i>Potato virus Y (PVY)</i>
Mosaïque du concombre sur tomate	<i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>
Mosaïque de la tomate	<i>Tomato mosaic virus (ToMV)</i>
rabougrissement marbré de l'aubergine sur tomate	<i>Eggplant mottled dwarf virus (EMDV)</i>
Mosaïque de la luzerne sur tomate	<i>Alfalfa mosaic virus (AMV)</i>
Maladie bronzée de la tomate	<i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i>
Maladie des feuilles jaunes en cuillère de la tomate	<i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i>
<b>Nématodes</b>	
<b>Maladie</b>	<b>Agent phytopathogène</b>
Nématodes à galles	<i>Meloidogyne spp.</i>
Nématodes à lésions racinaires	<i>Pratylenchus spp</i>

(Blancard, 2019).

**Tableau 2.** Principaux ravageurs de la tomate

<b>Insectes</b>	
	Aleurodes
	Cochenilles
	Mouches mineuses
	Papillons de nuit (noctuelles)
	Pucerons
	Thrips
	<i>Tuta absoluta</i>
<b>Acariens</b>	
Acariose bronzée	<i>Aculops lycopersici</i>
Tarsonème	<i>Polyphagotarsonemus latus</i>

(Blancard, 2019).

### 3. Les fusarioses de la tomate

Les *Fusaria* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées. La tomate peut être sujette à deux maladies fusariennes différentes soit le flétrissement fusarien (fusarium wilt) causé par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* abrégée *Fol* et la pourriture des racines et du collet (fusarium crown and root rot) causée par *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* abrégée *Forl* (Arie *et al.*, 2007).

#### 3.1. Le flétrissement fusarien de la tomate

La fusariose vasculaire de la tomate causée par *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, est une maladie dévastatrice et très répandue dans les différentes zones de production de la tomate dans le monde (Cai *et al.*, 2003 ; Lievens *et al.*, 2009 ; do Amaral *et al.*, 2013).

La maladie se caractérise par un jaunissement des feuilles, une croissance rabougrie des plantes, un brunissement des racines et une réduction du système racinaire. Dans la partie inférieure de la tige, les tissus vasculaires sont de couleur brun chocolat. À un stade ultérieur de la croissance, un flétrissement suivi par la mort de toute la plante, peut survenir. La perte de rendement varie entre 30% et 80% selon le stade de croissance de la plante et les conditions de l'environnement (Kumar et Sood, 2002).

Cette maladie a été rapportée dans plus de 32 pays (Cai *et al.*, 2003), y compris en Algérie (Henni *et al.*, 1994 ; Mezaache-Aichour *et al.*, 2012 et Toua *et al.*, 2013).

Jusqu'à présent, trois races physiologiques 1, 2 et 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ont été identifiées à travers le monde. Elles se distinguent par leur pathogénicité sur des cultivars de tomate possédants des gènes de résistance dominant dits « race-specific, dominant resistance genes » (Mes *et al.*, 1999).

L'agent pathogène responsable se conserve et persiste dans le sol à grande profondeur (80 cm) (Duval, 1991).

### 3.2. La pourriture fusarienne du collet et des racines de la tomate

Causée par *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* est présente dans de nombreux pays et capable d'attaquer les racines et le collet (*fusarium* crown and root rot) de la tomate aussi bien des cultures en plein champ que sous abris.

Ce champignon dévastateur est inféodé avant tout au système racinaire de la tomate sur lequel il provoque dans un premier temps, des lésions localisées sur le cortex, de couleur marron à brune. Par la suite, celles-ci s'étendent tandis que d'autres apparaissent. À terme, les racines brunissent presque entièrement, pourrissent plus ou moins et se décomposent. En plus du cortex qui est particulièrement affecté, le xylème peut brunir ; une coupe longitudinale du pivot et de quelques grosses racines permet de le constater. Ce brunissement vasculaire gagne ensuite les vaisseaux de la tige qui ne sont pas touchés. Bien souvent, une strie brune de quelques millimètres de largeur s'étend dans la tige sur plusieurs centimètres (Sanchez *et al.*, 1975). Par la suite, le brunissement affecte une portion plus importante de vaisseaux de la tige et peut être observé jusqu'à plus de 30 cm au-dessus du sol ou du substrat.

Lorsque la maladie est assez évoluée, une lésion humide, brune et bien délimitée, apparaît sur le collet. Cette lésion a une configuration particulière lorsqu'elle ceinture le collet où son développement plus important sur un côté de la tige lui confère la forme d'une flamme. Elle peut être couverte par un mucus rose pâle à saumon constitué par les nombreuses sporodochies formées par *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, sur les tissus. Bien sûr, ces différentes altérations entraînent plus ou moins rapidement le flétrissement (réversible dans un premier temps) des folioles et des feuilles de l'apex et/ou un jaunissement des feuilles de la base des plantes (Blancard, 2009).





**Figure 1.** Symptômes sur plantes de tomate atteintes par la fusariose vasculaire a) Coloration brune sombre au niveau des vaisseaux b) feuilles basses jaunes et flétris (Blancard, 2009).

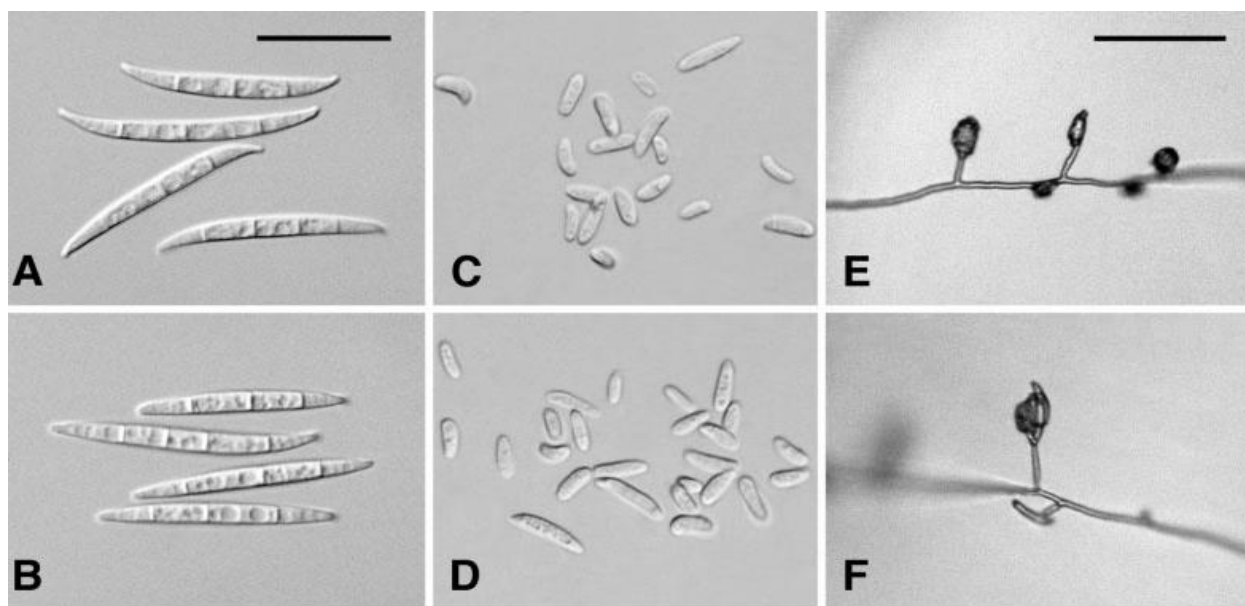


**Figure 2.** Symptômes induits par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopesci* a) racines brunes et pourries et un brunissement des vaisseaux b) Système racinaire réduit, brun et pourri, vaisseaux brun chocolat dans les parties basses de la tige c) pourriture du collet (Blancard, 2009).

### 3.3. Caractérisation morphologique et taxonomie de l'agent phytopathogène

Le genre *Fusarium* (Sordariomycetes, Hypocreales, Nectriaceae) renferme des champignons filamenteux (Rana *et al.*, 2017). *Fusarium oxysporum*, est une espèce anamorphe dont la forme parfaite n'a jamais été observée (Booth, 1971), très répandue dans le monde entier et la plus fréquente de toutes les *Fusaria* du sol. Comme saprophyte actif, le *Fusarium oxysporum* joue également, un rôle de premier plan en pathologie végétale ; sa virulence peut être très finement spécialisée. Cette espèce dévoile une variabilité morphologique importante. Voire, à l'intérieur d'une forme spéciale ou d'une race, on peut observer des variations morphologiques (Messiaen et Cassini, 1968).

Le *F. oxysporum* est caractérisé par des hyphes septées et abondamment ramifiées. Les microconidies sont généralement non septées de forme ovale, elliptique ou réniforme et naissent en fausses têtes sur des phialides courtes. Les macroconidies sont moins nombreuses que les microconidies, elles comportent entre 3 et 5 cloisons, de forme courte à moyenne, droite à légèrement incurvée avec une paroi mince (Fig. 3). Les chlamydospores sont produites de manière individuelle ou en pair, mais aussi peuvent être formées en grappes ou en chaînes courtes, en position soit terminale ou intercalaire avec une paroi lisse ou rugueuse (Leslie et Summerell, 2006).



**Figure 3.** A – B: Macroconidies; C – D: Microconidies; E – F: Microconidies in situ on CLA (Carnation leaf agar) (Leslie et Summerell, 2006).

### 3.4. Diversité génétique de l'agent phytopathogène

Dans le complexe des espèces de *F. oxysporum*, les formes spéciales (f.sp.) ont été définies comme des groupes de souches ayant une spécificité d'hôte (Armstrong et Armstrong, 1981). Il a été rapporté que les « Formae Specialis » sont polyphylétiques (O'Donnell *et al.*, 1998) et que la plupart des formes spéciales sont constituées de plus d'un VCG (Vegetative compatibility group), chaque VCG correspondant à une lignée clonale particulière (Kistler, 2001 ; Attitalla *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les souches de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* semblent avoir des chromosomes accessoires transférés horizontalement (Ma, 2014 ; Ma *et al.*, 2010) qui codent pour une série d'effecteurs, y compris une série d'effecteurs appelés SIX protéines « Secreted in xylem » qui sont sécrétés dans le xylème de la plante hôte (Houterman *et al.*, 2008).

En effet, Van der Does *et al.* (2008) ont rapporté que tous les isolats appartenant à la forme spéciale *lycopersici* contiennent une région identique dans leur génome, d'au

moins 8 kb. Cette région est absente chez les autres formes spéciales de *Fusarium oxysporum* et les isolats non pathogènes et comprend les gènes *SIX1*, *SIX2* et *SHH1*. Le gène *SIX1* chez le *Fol* code pour un facteur de virulence envers la tomate. Ainsi, les protéines Six1, Six2 et Six3 sont sécrétées dans le xylème au cours de la colonisation des plants de tomate.

Actuellement, les marqueurs génétiques de 12 gènes *SIX* ont été explorés dans la bibliographie: *SIX1* à *SIX11* et *SIX14* (Chakrabarti *et al.*, 2010 ; Laurence *et al.*, 2015). Une étude globale de plusieurs gènes *SIX* (*SIX1* à *SIX7*) a confirmé que ces gènes effecteurs transférés horizontalement (Ma *et al.*, 2010 ; Shahi *et al.*, 2016) sont des marqueurs robustes pour l'identification des souches de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lievens *et al.*, 2009).

D'autre part, certaines séquences géniques des marqueurs ISSR (inter-séquences simples répétées) qui génèrent un polymorphisme élevé ont révélé des corrélations avec des séquences de gènes codant pour des protéines spécifiques liées à la pathogénicité des espèces de *F. oxysporum*. Ces résultats soutiennent l'idée que certains marqueurs ISSR sélectionnés peuvent être utilisés pour le suivi de la divergence des espèces de *F. oxysporum* infectant la tomate et l'aubergine (Baysal *et al.*, 2013).

#### **4. Moyens de lutte**

Pour réussir, un programme de lutte contre les maladies des plantes, on doit examiner l'ensemble des interactions entre la plante et l'agent pathogène. Donc, on doit, soit empêcher ces interactions, soit faire pencher la balance en faveur de la plante. La réduction de la viabilité de l'inoculum de l'agent pathogène (densités de population) et / ou de sa fonctionnalité (capacité d'infecter l'hôte avec succès) est la clé de ce programme de lutte (McGovern, 2015).

Les mesures de lutte chimique (Fumigation des sols) restent les principales stratégies utilisées pour lutter contre les maladies, malgré le risque de pollution des eaux souterraines, les conséquences sur la santé humaine, la destruction de la microflore bénéfique non ciblée et l'évolution des pathotypes résistants aux fongicides (Sant *et al.*, 2010).

L'utilisation des variétés résistantes aux agents pathogènes est considérée comme la méthode la plus économique, saine et écologiquement inoffensive pour lutter contre les maladies. Cependant, les interactions hôte-pathogène impliquant la résistance sont loin d'être simple. Le flétrissement fusarien et la pourriture du collet et des racines de la tomate causés par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* respectivement, continuent de présenter des défis majeurs pour la production de cette culture importante, dans le monde entier. Des études intensives ont permis de mieux comprendre ces maladies et leur traitement. Des recherches récentes sur la lutte contre ces maladies, ont porté sur diverses stratégies individuelles et leur intégration, notamment la résistance de l'hôte, la lutte chimique, la lutte biologique et la lutte physique (McGovern, 2015).

#### **4.1. Moyens de lutte chimique**

La lutte chimique reste la méthode la plus utilisée pour lutter contre les maladies fongiques. Cependant, la mauvaise utilisation des pesticides en agriculture représente un danger non négligeable pour la santé humaine ; par la présence de résidus sur la nourriture et le risque d'intoxication des agriculteurs et d'autres personnes en contact avec ces pesticides ; ajouté à cela, l'apparition de souches résistantes.

En effet, le flétrissement fusarien constitue une contrainte biotique sérieuse sur la production de la tomate car la complexité de l'environnement (le sol) rend l'agent pathogène difficile à combattre. Des fumigants à large spectre, tel que le bromure de

méthyle (bromo-éthane) ont été utilisés pour lutter contre le pathogène. Cependant, suite au Protocole de Montréal (1998) (<http://www.unep.org/ozone>), la production de bromure de méthyle devrait être interdite depuis 2005, pour des mesures de protection de la couche d'ozone. De ce fait, le développement de méthodes alternatives de lutte contre la maladie est à considérer (Takahashi *et al.*, 2005).

Toutefois, selon Ajay *et al.* (2012), un contrôle efficace du flétrissement de la tomate peut être effectué par traitement des semences avec Thiram 75 WDP avant le semis suivi d'un trempage des racines des plantules pendant 10 minutes dans une solution de Carbendazim 50 WP à 0,3% avant la transplantation et un arrosage des racines avec l'oxychlorure de cuivre 50 WP à 0,3% + une solution de streptomycine à 0,01%, un mois après la transplantation. En Algérie, cette maladie est mal connue et elle est souvent confondue avec d'autres maladies. Par conséquent, le choix des traitements est aléatoire.

#### **4.2. Moyens de lutte cultureux**

Les mesures de lutte préventive contre le flétrissement fusarien consistent à éviter les conditions qui favorisent la maladie soit : un sol léger et acide, un manque d'azote et de calcium, des températures élevées et un manque de lumière en intensité et en temps. Barna *et al.* (1985) soulignent l'importance de maintenir une fertilisation azotée élevée surtout sous forme de nitrates (fumier) afin de produire beaucoup de jeunes pousses. Sun et Huang (1985) ont mis au point un amendement organique et minéral qui, à raison de 1% par poids de sol permet de lutter contre diverses espèces de *Fusarium* d'une manière efficace. Leur mélange (le mélange S-H) contient : 4,4% de bagasse (résidus de canne à sucre) ; 8,4% de son de riz; 4,25% de coquilles d'huitres; 8,25% d'urée; 1,04% de nitrate de potassium; 13,16% de superphosphate de calcium; 60,5% de cendres minérales constituées de 31% de dioxyde de silice, 4,4% d'oxyde de calcium, 1,7% d'oxyde de magnésium, 18% d'oxyde d'aluminium et 1% d'oxyde ferreux.

### 4.3. Moyens de lutte physiques

Anchisi *et al.* (1985) ont développé un traitement à l'eau chaude pour protéger les plants dans un sol contaminé. La méthode consiste à traiter les racines avec de l'eau chaude 48-49 C° pendant 30 secondes avant de transplanter ou, dans les premières 48 heures juste après transplantation. Cela stimule la croissance des racines. Cependant, la stérilisation ou la solarisation ne sont pas des solutions à long terme.

### 4.4. La lutte biologique

La lutte biologique contre le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* et le (Forl) englobe un large éventail de micro-organismes. En effet, de nombreuses bactéries et champignons, y compris des isolats de *Trichoderma*, ou des combinaisons de micro-organismes, prélevés sur des cultures de tomate en plein champ se sont révélés efficaces pour lutter contre la fusariose de la tomate (Taghdi *et al.*, 2015). Les combinaisons d'agents de bio-contrôles testés contre cette maladie incluent différents isolats de la même espèce bactérienne, de genres bactériens différents, de genres fongiques différents et de mélanges de bactéries et de champignons. Dans la majorité des cas, les combinaisons d'agents de bio-contrôle sont plus efficaces que leurs composantes individuelles. Un certain nombre de micro-organismes expérimentés avec succès en lutte biologique contre le Fol et le Forl tels que : *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Fusarium oxysporum* (isolats non pathogènes), *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium funiculosum*, ont réduit de manière significative les symptômes. Ces microorganismes ont également induit une réduction de l'incidence de la maladie qui varie entre 53% et 78% ; parfois supérieurs aux fongicides conventionnels et ont contribué de ce fait, à augmenter les rendements (McGovern, 2015).

## 5. Le genre *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales) avait été introduit à l'origine par Persoon en 1794. Cependant, la taxonomie et l'identification de ses espèces ont demeuré incertains jusqu'à ces dernières années. Le genre *Trichoderma* est caractérisé par une vitesse de croissance rapide et une sporulation abondante sur milieu de culture (Gams et Bissett, 1998). Ce genre renferme des espèces telluriques mais, qui peuvent également être présentes sur le bois en décomposition (Samuels, 1996). Toutefois, le compost destiné à la culture industrielle des champignons comestibles se trouve fréquemment contaminé par des espèces de *Trichoderma*. Cependant, ces dernières sont rarement parasites de plantes vivantes (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998). En effet, certaines espèces de *Trichoderma* sont d'un intérêt économique car elles sont productrices d'enzymes industrielles (cellulolytiques), d'antibiotiques ou utilisés comme agent de lutte biologique (Druzhinina et Kubicek, 2005).

### 5.1. Identification morphologique des espèces de *Trichoderma*

Les espèces de *Trichoderma* se caractérisent par des conidiophores hyalins, très ramifiés, non verticillées; des phialides solitaires ou en groupes; des conidies (phialospores) hyalines, unicellulaires, ovoïdes et portées en petites grappes terminales. Les *Trichoderma* sont habituellement, facilement reconnu par leur croissance rapide et leur conidies verdâtres (Barnett *et al.*, 1998).

En se basant essentiellement sur les caractères morphologiques, Rifai (1969) a subdivisé le genre *Trichoderma* en 9 espèces agrégats, tout en reconnaissant que les espèces qu'il a décrites ne sont pas vraiment des espèces biologiques. Bissett (1991) a principalement érigé les espèces de Rifai (1969) au rang de section, et a défini 5 sections à savoir : la Section *Trichoderma*, la Section *Longibrachiatum* Bissett, la Section *Saturnisporum* Doi *et al.*, la Section *Pachybasium* Sacc. et la section *Hypocreanum* sect. nov. Dans chaque section, il a identifié de deux à plusieurs espèces (Bissett, 1991).



## 5.2. Identification et caractérisation moléculaires des espèces de *Trichoderma*

Les espèces de *Trichoderma* sont difficiles à distinguer morphologiquement et leur identification reste toujours contestable. La taxonomie du *Trichoderma* est donc, continuellement ajustée et mise à jour (Oskiera *et al.*, 2015). En conséquence, les méthodes moléculaires sont devenues nécessaires pour fournir une identification plus précise au niveau des espèces.

En effet, pour l'identification moléculaire des espèces de *Trichoderma*, plusieurs régions de l'ADN sont analysées à savoir, l'actine (ACT), la calmoduline (CAL), les espaceurs internes transcrits 1 et 2 (ITS 1 et 2), l'ARN polymérase II (RPB2) et les séquences des facteurs d'élongation de la traduction 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Parmi celles-ci, le fragment EF-1 $\alpha$  est la région la plus recommandée pour une analyse moléculaire d'une région unique, et le séquençage de ces fragments a montré une résolution élevée entre les espèces pour la phylogénie de *Trichoderma* (Chaverri *et al.*, 2015 ; Jang *et al.*, 2018).

Selon Bissett *et al.* (2015), le genre *Trichoderma* compte plus de 250 espèces. Au cours de la même période, Chaverri *et al.* (2015) ont révisé la taxonomie de *T. harzianum*. Cette révision a abouti à distinguer 14 nouvelles espèces au sein du complexe *T. harzianum* et ont signalé qu'aucun des isolats connus comme agents de bio-contrôles (BCA) de *Trichoderma harzianum* n'appartient à *Trichoderma harzianum* sensu stricto. De ce fait, l'agent de lutte biologique bien connu sous le nom *T. harzianum* T22, a été identifié comme *Trichoderma afroharzianum*.

Une étude récente a porté sur l'analyse génomique d'une souche de bio-contrôle anciennement connue sous le nom de *Trichoderma harzianum* ITEM 908 et qui a été renommé comme *T. atrobrunneum* du complexe des espèces de *T. harzianum*. Cette étude a révélé la présence d'un large éventail de gènes codant pour les enzymes glucidiques-actives (CAZYmes), les protéines impliquées dans la production de métabolites secondaires, les peptaibols, les épidthiodioxopipérazines et les

sidérophores. Ces différentes molécules sont potentiellement impliquées dans le parasitisme, le bio-contrôle ainsi que dans les activités antagonistes. Ces travaux fournissent une contribution à une meilleure compréhension du mode d'action et à l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques à une activité, ce qui est utile pour la sélection des souches de bio-contrôle (Fanelli *et al.*, 2018).

### 5.3. Application de *Trichoderma* spp. en lutte biologique

Le degré élevé d'adaptation écologique révélé par les souches du genre *Trichoderma* se reflète par le fait que ses espèces sont répandues dans le sol partout dans le monde, dans des conditions environnementales différentes et vivant sur divers substrats. Cette adaptation importante, associée à leur capacité de se développer sur des substrats peu coûteux, font des isolats de *Trichoderma* des candidats intéressants pour différentes applications en lutte biologique (Hjeljord et Tronsmo, 1998).

Les espèces de *Trichoderma* ont été testées avec succès à l'égard de plusieurs maladies d'origine tellurique. Leur capacité à protéger les plantes contre des agents phytopathogènes est habituellement attribuée à leur effets antagonistes directs sur le pathogène fongique et en particulier leur capacité à produire des enzymes lytiques par exemple, les chitinases et les  $\beta$ -1,3-glucanases (Benítez *et al.*, 2004). Ces enzymes hydrolysent la paroi cellulaire, limitant ainsi la croissance des pathogènes fongiques. Le *Trichoderma asperellum* Samuels *et al.*, une espèce qui a été peu étudiée, mais qui peut contrôler plusieurs agents phytopathogènes, y compris l'agent responsable du flétrissement fusarien de la tomate (Cotxarrera *et al.*, 2002)

Des produits commerciaux à base de *Trichoderma* disponible sur le marché (biopesticides, biofertilisants et amendement du sol) ont été utilisés, dans le cadre d'une approche respectueuse de l'environnement, pour protéger les cultures contre les agents phytopathogènes et par conséquent, augmenter les rendements (Harman *et al.*, 2004 ; Mukherjee *et al.*, 2012). Malgré les succès commerciaux des fongicides à base microbienne (bio fongicides), des limitations majeures subsistent par rapport à leur efficacité étroite et leur incohérence avec les conditions naturelles sur le terrain.

De ce fait, des souches de *Trichoderma* très efficaces avec des capacités antagonistes potentielles élevées sont nécessaires pour des programmes de lutte biologique plus efficaces (Mahmoud *et al.*, 2015).

#### 5.4. Mécanismes d'action de *Trichoderma* spp. en lutte biologique

Les isolats de *Trichoderma* peuvent exercer une activité antagoniste selon différents mécanismes incluant: la compétition, les interactions directes cellule à cellule ou mycoparasitisme, l'antibiose et les actions sur la résistance de l'hôte.

**La compétition :** La compétition entre microorganismes se produit lorsqu'un élément vital comme les nutriments ou l'espace est disponible en quantité limitée. Dans ces conditions limites, la production de composés inhibiteurs capable d'arrêter ou de ralentir la croissance d'autres micro-organismes confère au microbe producteur un avantage écologique concurrents. Cette forme particulière de concurrence agressive est une «concurrence par ingérence» (Marzano *et al.*, 2013).

**Le Mycoparasitisme :** est un processus complexe qui aboutit à la destruction des parois cellulaires de la cible par les enzymes lytiques libérées par les isolats de *Trichoderma*, et considéré comme un mécanisme majeur de lutte biologique. Certains isolats de *Trichoderma* utilisent efficacement ces mécanismes, ont de forts effets antagonistes et mycoparasitaires contre les agents phytopathogènes et sont donc en mesure de réduire la gravité de la maladie chez les plantes (Jogaiah *et al.*, 2018).

**L'antibiose :** est définie comme l'inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme. Les produits métaboliques sont de différentes natures comme des enzymes lytiques, des peptides ou protéines antimicrobiens, des polyketides, des composés phénoliques, des biosurfactants etc (Fernando *et al.*, 2006).

**L'induction de la résistance de l'hôte :** le traitement des semences avec les spores ou les métabolites secondaires de *Trichoderma* a également, été démontré. Cette action se manifeste par la production des réponses rapides et efficaces de la défense contre les agents phytopathogène en agissant comme stimulateur de l'immunité (Jogaiah *et al.*, 2018).

## **II. MATERIEL ET METHODES**

## 1. Matériel biologique

### 1.1. Matériel végétal

Deux cultivars de tomates à savoir, Super Marmande (SM) et Rio Grande (RG) ont été utilisés dans les tests pathologiques. Le cv. Super Marmande sans résistance et le cv. Rio Grande résistant à *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) mais, sensible à la forme spéciale *radisis-lycopersici* (Forl) (Tello et Lacasa, 1988 ; Hibar *et al.*, 2005).

### 1.2. Matériel fongique

Le matériel fongique est constitué de l'ensemble des isolats fongiques utilisés dans cette étude, les isolats de l'agent phytopathogène (Tableau 3) et les isolats de l'agent antagoniste (Tableau 4).

**Tableau 3.** Isolats de *Fusarium* obtenus à partir des tiges de plantes de tomate malades, lieu d'isolement, symptômes observés et année d'isolement

codes	Origine géographique	Symptômes observés	Année d'isolement
F1	Zemmouri, Boumerdes	Jaunissement	2014
F2	M'ziraa, Biskra	Dessèchement	2014
F4	Khmis El khechna, Alger/ p. champ <sup>a</sup>	Jaunissement avec rabougrissement	2013
F3	Staoueli, Alger	Flétrissement	2014
F5	Melili, Biskra	Flétrissement	2014
F6	Zemmouri, Boumerdes	Jaunissement avec rabougrissement	2013
F7	Staoueli, Alger	Dessèchement avec rabougrissement	2014
F8	Melili, Biskra	Jaunissement	2014
F9	Ain Bennoui, Biskra	Jaunissement	2014
F10	ENSA <sup>b</sup> , Alger	Jaunissement	2013
F11	M'ziraa, Biskra	Dessèchement	2014
F12	Melili, Biskra	Dessèchement	2014
F13	ITCMI <sup>c</sup> Staoueli, Alger	Jaunissement	2014
F14	Djimar, Jiel	Flétrissement	2015
F15	Djimar, Jijel	Jaunissement avec rabougrissement	2015
F16	Boudouaou, Alger	Jaunissement	2014
F17	M'ziraa, Biskra	Flétrissement	2012
F18	Selga, Biskra	Dessèchement	2014

F19	El Kennar, Jijel	Dessèchement	2012
F20	El Kennar, Jijel	Jaunissement avec rabougrissement	2013
F21	M'ziraa, Biskra	Jaunissement	2013
F22	Corso, Boumerdes	Jaunissement	2013
F23	ITCMI <sup>c</sup> Staoueli, Alger	Flétrissement avec rabougrissement	2014
F24	Selga, Biskra	Flétrissement	2014
F25	Gouraya, Tipaza	Jaunissement	2013
F26	Mostaganem	Dessèchement	2013
F27	Corso, Boumerdes	Flétrissement avec rabougrissement	2014
F28	Boudouaou, Alger	Jaunissement	2013
F29	M'ziraa, Biskra	Jaunissement	2012
F30	Selga, Biskra	Dessèchement avec rabougrissement	2014
F31	Khmis El khechna, Alger/ p. champ <sup>a</sup>	Jaunissement	2013
F32	Thenia, Boumerdes	Rabougrissement	2013
F33	Staoueli, Alger	Flétrissement	2014
F34	M'ziraa, Biskra	Jaunissement	2012
F35	M'ziraa, Biskra	Jaunissement	2012
F36	M'ziraa, Biskra	Jaunissement	2012
F37	Djimar, Jijel	Flétrissement	2015
F38	Ain Bennoui, Biskra	Jaunissement	2014
F39	Djimar, Jijel	Flétrissement	2015
F40	Djimar, Jijel	Flétrissement avec rabougrissement	2015
F41	Selga, Biskra	Jaunissement	2014
F42	Selga, Biskra	Flétrissement avec rabougrissement	2014
F43	Djimar, Jijel	Dessèchement	2015
F44	Djimar, Jijel	Jaunissement avec rabougrissement	2015
F45	M'ziraa, Biskra	Flétrissement	2014
F46	Ain Bennoui, Biskra	Jaunissement	2014
F47	Staoueli, Alger	Jaunissement	2014
F48	ENSA <sup>b</sup> , Alger/ p. champ <sup>a</sup>	Flétrissement avec rabougrissement	2013
F49	Thenia, Boumerdes /p.champ <sup>a</sup>	Jaunissement avec rabougrissement	2013
F50	Damous, Tipaza	Dessèchement	2013

p. champ<sup>a</sup> : plein champ ; le reste c'est des cultures sous serre.

ENSA<sup>b</sup> : École National supérieure d'Agronomie, El Harrach, Alger.

ITCMI<sup>c</sup> : Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles, Staoueli Alger.

**Tableau 4.** Isolats de *Trichoderma* utilisés, lieu et année d'isolement

<b>Isolats de <i>Trichoderma</i></b>	<b>Origine géographique</b>	<b>Année d'isolement</b>
T1	Sol/ Damous, Tipaza	2013
T2	Sol/ Damous, Tipaza	2013
T3	Sol/ Gouraya, Tipaza	2013
T4	Sol/ Gouraya, Tipaza	2013
T5	Rhizosphère/ITCMI <sup>a</sup> pépinière/ Staoueli Alger	2014
T6	Sol/Corso, Boumerdes	2013
T7	Sol/Corso, Boumerdes	2014
T8	Rhizosphère/ITCMI <sup>a</sup> pépinière/ Staoueli Alger	2014
T9	Sol/Jijel	2012
T10	Sol/Jijel	2012
T11	Sol/El Kennar, Jijel	2012
T12	Sol/El Kennar, Jijel	2013
T13	Sol/El Kennar, Jijel	2013
T14	Sol/Jimar, Jijel	2015
T15	Sol/Djimar, Jijel	2015
T16	Sol/Djimar, Jijel	2015
T17	Sol/Skikda	2015

<sup>a</sup>ITCMI: Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles, Staoueli Alger.

## 2. Méthodes

### 2.1. Prospection et collecte des échantillons fongiques

#### 2.1.1. Prospection et collecte des échantillons malades

Pour l'obtention des isolats de *Fol* et de *Forl*, des prospections ont été menées entre 2012 et 2015 dans six zones de culture de la tomate en Algérie: Mostaganem, Tipaza, Alger, Boumerdes et Jijel, situées sur la côte et Biskra à l'intérieur du pays (Fig. 4). Des plantes présentant des symptômes de jaunissement, de flétrissement, un dessèchement des feuilles et/ ou un rabougrissement des plants ont été recueillies.

#### 2.1.2. Echantillonnage de l'agent antagoniste

Des échantillons du sol provenant de quatre zones littorales algériennes (Tipaza, Boumerdes, Jijel et Skikda) ont été prélevés dans des cultures de tomate à faible incidence de la fusariose. Le prélèvement du sol a été effectué à 10 cm de profondeur dans chaque site. D'autres échantillons contenant du sol de la rhizosphère des plants de tomate ont été prélevés à partir d'une pépinière sous serre à l'Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles (ITCMI, Staoueli, Alger). Les différents échantillons ont été placés dans des sacs en polyéthylène stérile, et transportés au laboratoire pour l'isolement de *Trichoderma*.



**Figure 4.** Localisation des cultures dans lesquelles les isolats de *Fusarium* et de *Trichoderma* ont été collectés en Algérie: [www.google.earth.com](http://www.google.earth.com)



## **2.2. Isolement et purification des isolats fongiques**

### **2.2.1. Isolement et purification de l'agent phytopathogène**

Les fragments des tiges de tomate provenant de plants malades ont été désinfectés en surface dans de l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 10 minutes et rincés soigneusement avec de l'eau distillée stérilisée. Les fragments désinfectés sont déposés sur milieu PDA (Difco Laboratories, Detroit, USA) et incubés à 25 ° C à l'obscurité.

Les isolats dont la morphologie correspond à l'espèce *F. oxysporum* selon les critères établis par Leslie et Summerell (2006) sont ensuite purifiés par des repiquages successifs jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

Les cultures ont ensuite fait l'objet d'une culture monospore et ont été conservées en tubes inclinés contenant le milieu PDA.

### **2.2.2. Identification morphologique de l'espèce *F. oxysporum***

Selon Leslie et Summerell (2006), l'espèce *F. oxysporum* présente une grande variabilité dans la morphologie sur milieu PDA où le mycélium peut être floconneux, clairsemé, abondant avec une couleur qui varie du blanc au violet pâle. Certains isolats peuvent produire un pigment de couleur violet ou rouge violacé foncé dans le milieu. Comme, certains isolats de *F. oxysporum* ne produisent pas de pigments.

Cette espèce produit des macroconidies de longueur courte à moyenne, de forme droite à légèrement incurvée, relativement mince généralement avec 3 cloisons et une paroi mince.

Les microconidies chez l'espèce *F. oxysporum* sont monocellulaires de forme ovale, elliptique ou réniforme généralement abondantes et produites sur des monophialides courtes.

Les isolats de l'espèce *F. oxysporum* produisent des chlamydospores solitaires ou en paire, mais peuvent être également groupées en grappes ou en chaîne courte, terminales ou intercalaires.

En outre, deux isolats de *Fusarium oxysporum* nous ont été fournis gracieusement par le professeur Díaz-Mínguez (Centre de CIALE, université de Salamanca, Espagne) ; Ces deux isolats ont servi de souches de référence dans cette étude: Forlc de *F. oxysporum* f.sp. *radisis-lycopersici* (Forl) et 4287 de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) race 2 (Di Pietro et Roncero, 1998). Tous les isolats de *F. oxysporum* ont été cultivés sur milieu PDA et conservés à 4 ° C pour les études ultérieures.

### **2.2.3. Isolement et purification de l'agent antagoniste**

Pour chaque échantillon, 90 ml d'eau distillée stérilisée ont été rajoutés 10 g de sol et mélangés par agitation magnétique pendant 1 h. La suspension concentrée a été ensemencée dans des boîtes de Petri contenant le milieu PDA, puis incubées à 25 ° C pendant 5 jours à l'obscurité.

Dans le cas des plants de tomate en pépinière, des fragments de 1 cm ont été découpés à partir des racines et ont été désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 5 min. Puis lavés 3 fois avec de l'eau distillée stérilisée. Les fragments ont ensuite été séchés sur un papier buvard stérilisé, puis déposés dans des boîtes de Petri contenant le milieu PDA additionné de 50 mg / L de streptomycine.

Après incubation pendant 5 jours à 25 ° C à l'obscurité, les extrémités hyphales des colonies en développement (dont les critères morphologiques correspondent au genre *Trichoderma*) ont été repiquées dans de nouvelles boîtes contenant le milieu PDA et ont été ensuite mises à incuber pendant 5 jours dans les mêmes conditions (Mulaw *et al.*, 2013).

#### **2.2.4. Identification morphologique des isolats du genre *Trichoderma***

L'identification des isolats appartenant au genre *Trichoderma* est basée sur les critères morphologiques décrits par Rifai (1969). Les isolats de ce genre montrent en milieu de culture une vitesse de croissance rapide, une sporulation abondante avec une coloration verdâtre des conidies. Les conidiophores de ces isolats sont fortement ramifiés selon une structure pyramidale et se terminent par une ou plusieurs phialides. Ces dernières peuvent être cylindriques ou subglobuleuses, regroupées en masse ou solitaires.

Des cultures monospores des isolats de *Trichoderma* spp. obtenus des échantillons du sol et des échantillons de plantes ont été retenues. Ainsi, les isolats de *Trichoderma* obtenus, ont été conservés à 4 ° C pour des études ultérieures.

#### **2.3. Test de pathogénicité des isolats de *Fo***

Les graines de tomate des 2 cultivars Super Marmande (SM) et Rio Grande (RG) ont été désinfectées superficiellement avec de l'éthanol à 70% pendant 10 minutes et avec l'hypochlorite de sodium à 2% également pendant 10 minutes. Ensuite, les graines sont soigneusement rincées avec de l'eau distillée stérilisée.

Le semis est réalisé dans des bacs multicellulaires contenant un substrat de culture préalablement autoclavé 2 fois pendant 1 h à 120 ° C, sur deux jours consécutifs. Les semis ont été maintenus sous serre avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité et une température comprise entre 18 et 30° C.

Quatorze jours après le semis, lorsque les deux premières vraies feuilles sont complètement déployées, les plantules ont été déracinées, l'excès de tourbe a été enlevé et les racines ont été aseptiquement coupées à environ 2,5 cm au-dessous du collet et sont ensuite trempées dans une suspension de conidies de *Fo* ajustée à  $2 \times 10^7$  conidies par ml. Une fois inoculées, les plantules sont transplantées

immédiatement, dans des pots de 3 L contenant un mélange stérilisé de sol: sable: tourbe (1: 1: 1).

Les conidies de *Fo* ont été obtenues à partir d'une culture liquide dans le milieu PDB âgée de 7 jours. Ainsi, dix répétitions sont réalisées pour chaque combinaison cultivar de tomate/isolat pathogène. Comme témoins, nous avons utilisé des plantules de tomate dont les racines ont été trempées dans de l'eau distillée stérilisée.

Après inoculation, les plantules ont été maintenues sous serre dans les conditions décrites ci-dessus pendant quatre semaines et irriguées selon le besoin.

### **Notation des symptômes**

Les résultats ont été exprimés par l'indice de sévérité des symptômes sur les deux cultivars «SM» et «RG», selon une échelle de notation de 0 à 4: tel que 0 signifie un plant sain; les indices 1, 2 et 3 correspondent aux degrés d'attaque légers, modérés et sévères respectivement, des symptômes de chlorose, flétrissement ou rabougrissement des plants du cultivar «SM», causés par les isolats de *Fol* (Cai et al., 2003). Cependant, sur le cultivar «RG», les indices d'attaque 1, 2 et 3, correspondent aux symptômes de jaunissement, flétrissement, pourriture racinaire ou rabougrissement des plants, causés par les isolats de *Forl*; et l'indice d'attaque 4, correspond aux plants morts dans les deux cas (Hibar et al., 2007).

## **2.4. Caractérisation moléculaire de l'agent phytopathogène**

### **2.4.1. Production du mycélium en milieu liquide**

Des flacons de 250 ml, contenant 50 ml de milieu liquide à base de jus de pomme de terre et de glucose (PDB, Difco), sontensemencés par 5 explants de 5 mm de diamètre, prélevés à partir d'une culture jeune de *Fusarium* et de *Trichoderma*, développées sur milieu PDA. Après 5 jours d'incubation en agitation continue, pour les isolats de *Fusarium* et 2 jours pour les isolats de *Trichoderma* à 25°C, le mycélium

est récupéré par filtration à travers un tissu (tulle) stérilisé, rincé avec de l'eau distillée stérilisée, séché avec du papier buvard stérilisé, lyophilisé et stocké à -20° C jusqu'à utilisation pour l'extraction de l'ADN.

#### 2.4.2. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique des isolats de *Fusarium* et de *Trichoderma* a été extrait par la méthode SDS tel que décrite par Lee *et al.*, (1992). Les principales étapes de cette méthode sont :

Consiste à Broyer 25 mg du mycélium lyophilisé dans l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre fine. Suivie d'une étape d'extraction de l'ADN en utilisant un tampon de lyse (Tris 200 mM, Na Cl 250 mM, EDTA 25 mM) pH 8, autoclavé à 120 °C pendant 20 min + SDS 0,5%), puis une purification de l'ADN en utilisant le chloroforme : alcool iso-amylique ; 24 : 1 suivie d'une précipitation avec l'acétate de sodium (NaOAc) et l'isopropanol froid (-20 ° C), la méthode d'extraction est détaillée en Annexe I.

#### 2.4.3. PCR spécifique à *F. oxysporum*

D'après les caractéristiques morphologiques, il est souvent difficile de distinguer *F. oxysporum* des autres espèces appartenant aux sections Elegans et Liseola (Fravel *et al.*, 2003). Ainsi, une PCR est réalisée en utilisant les deux amorces PFO2 et PFO 03 (Tableau 5) développées par Edel *et al.* (2000), comme amorces spécifiques au *F. oxysporum*. L'ADN est amplifié dans un volume final de 25 µl, chaque réaction contient 20 ng d'ADN génomique, 0,4 µM de chaque amorce, 100 µM de dNTP, une unité de Taq polymérase et 2,5 µl de tampon de réaction PCR 10X.

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur « Applied Biosystems PCR GeneAmp 9700 », avec une dénaturation initiale de 3 min à 95 ° C, suivie de 30 cycles de 30 s à 95 ° C, 30 s à 62 ° C et 30 s à 72 ° C avec une extension finale de 3 minutes à 72 ° C. Les fragments d'ADN amplifiés, d'environ 70 pb ont été visualisés dans un

gel d'agarose à 2% (Edel *et al.*, 2000). Les deux isolats de référence 4287 de *Fol* et Forlc de *Forl* ont été utilisés comme contrôle positif dans les réactions PCR tout au long des analyses moléculaires.

#### **2.4.4. Identification des races de *Fol* et de *Forl* par PCR en utilisant les amorces spécifiques sprl, sp13 et sp23**

Trois amorces spécifiques à savoir sprl; sp13 et sp23 (Tableau 5) ont été développés par Hirano et Arie (2006), permettant de différencier d'une part les races (1, 2 et 3) de *Fol* et d'autre part entre la forme spéciale *Fol* et la forme spéciale *Forl*.

Une réaction PCR réalisée en utilisant le couple d'amorces sprl, spécifiques au *Forl*, amplifie spécifiquement un fragment de 947 pb chez les isolats de *Forl*, sans aucune amplification chez les isolats de *Fol*. Cependant, selon Hirano et Arie (2006), une amplification PCR en utilisant les deux amorces spécifiques à savoir, sp13 et sp23 permet l'identification des races physiologiques de *Fol* (race 1, 2 ou 3). Ainsi, le couple d'amorces sp13 amplifie un fragment de 445 pb pour les races *Fol* 1 et 3. Alors que le couple d'amorces sp23 amplifie un fragment de 518 pb pour les races 2 et 3 de *Fol*.

Chaque amplification est effectuée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 20 ng d'ADN génomique, 0,25 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP, une unité de l'enzyme Taq polymérase et 2,5 µl de tampon de réaction PCR 10X. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur « Applied Biosystems PCR GeneAmp 9700 », avec une dénaturation initiale de 1 min à 94 ° C, suivie de 50 cycles de 1 min à 94 ° C, 1 min à 62 ° C et 1 min à 72 ° C, et une extension finale de 2 min à 72 ° C. Les fragments d'ADN amplifiés ont été visualisés dans des gels d'agarose à 1% (Baysal *et al.*, 2009)

#### 2.4.5. Confirmation de la virulence des isolats et des races de *Fol* par amplification du gène *SIX*

Tous les isolats ont été testés pour la présence du gène *SIX1* spécifique à la forme spéciale *lycopersici*, par PCR en utilisant les amorces P12-F2B et P12-R1 (van der Does *et al.*, 2008) (Tableau 5).

L'ADN génomique a été amplifié dans un volume réactionnel final de 25 µl contenant 20 ng d'ADN génomique, 0,2 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP, 3 U de Taq polymérase et 2,5 µl de tampon de réaction PCR 10X (Edel-Hermann *et al.*, 2012). Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur « Applied Biosystems GeneAmp 9700 », avec une dénaturation initiale de 2 min à 94 ° C suivie de 35 cycles contenant chacun une étape de dénaturation de 45 s à 94 ° C, une étape d'hybridation de 45 s à 59 ° C et une étape d'élongation de 45 s à 72 ° C et une extension finale de 10 minutes à 72 ° C.

Les produits de PCR sont visualisés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1%. Les isolats sont ensuite, notés SIX1 + si l'amplification de leur ADN a donné un fragment de 990 pb ou SIX1-, si aucun produit d'amplification n'est obtenu (Lievens *et al.*, 2009). Les deux isolats 4287 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et Forlc de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ont été utilisés respectivement, comme contrôle positif et contrôle négatif dans chaque expérience de PCR.

#### 2.4.6. Identification des races de *Fol* par amplification du gène *SIX*

Pour l'identification des races physiologiques de *Fol* basée sur l'amplification du gène *SIX*, tous les isolats *Fo* ont fait l'objet d'une analyse PCR en utilisant d'abord, le couple d'amorce P12-F2B / P12-R1 spécifique à la forme spéciale *Fol*. Une fois les isolats *Fol* sont identifiés, une PCR est réalisée en utilisant le couple d'amorce SIX3-F1 / SIX3-R2 qui amplifie une séquence commune aux races 1 et 2, suivie d'une autre PCR en utilisant le couple d'amorce SIX4-F1 / SIX4-R1 qui amplifie un fragment de 967 pb spécifique à la race 1. Pour l'identification de la race 3, une PCR est également

réalisée en utilisant les 3 couples d'amorce SIX3-G121A-F2 / SIX3-R2, SIX3-G134A-F2 / SIX3-R2 et SIX3-G137C-F1 / SIX3-R2 (Tableau 5), spécifiques à 3 fragments correspondant à trois variantes moléculaires de la race 3.

Les milieux réactionnels et les conditions thermiques sont tels que décrits précédemment (van der Does *et al.*, 2008 ; Lievens *et al.*, 2009). Les produits de la PCR sont visualisés par électrophorèse tels que décrit ci-dessus, et les résultats de cette analyse sont notés tels que décrit précédemment.

#### **2.4.7. Étude de la diversité génétique des isolats de *Fol* et de *Forl* par ISSR**

La diversité génétique de 31 isolats de *Fo* (29 isolés en Algérie et les deux isolats de référence 4287 (*Fol*) et *Forlc* (*Forl*) est étudiée par PCR l'utilisation des deux amorces (GA) 9C et (GA) 9T. L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM de l'amorce, 1,25 unités de Taq polymérase, 50 ng d'ADN génomique et 2,5 µL de tampon de réaction PCR 10X. Pour chaque combinaison amorce-isolat, les amplifications ont été répétées trois fois pour confirmer la reproductibilité.

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur « Applied Biosystems PCR GeneAmp 9700 », avec une dénaturation initiale à 94 ° C pendant 3 minutes, suivie de 35 cycles de : 94°C pendant 1 minute, 45°C pendant 1 minute et 72°C pendant 2 minutes avec une extension finale à 72°C pendant 10 min. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (Nirmaladevi *et al.*, 2016).

#### **Analyse des données**

Les fragments d'ADN amplifiés et visualisés sur gel d'agarose sont notés comme présents (1) ou absents (0). Les données générées par les deux amorces ISSR ont fourni une matrice binaire (Annexe II) qui est utilisée pour la classification



hiérarchique. La distance par paires entre les isolats a été calculée à partir de la matrice binaire en utilisant l'indice de Jaccard. Les coefficients de similarité sont utilisés pour construire un dendrogramme par la méthode UPGMA (méthode des groupes de paires non pondérées en utilisant des moyennes arithmétiques) généré par le logiciel NTSYS pc 2.21q. La diversité génétique pour chaque amorce a été calculée comme décrit par Owen *et al.*, (1998), par la formule suivante ( $H = 1 - \sum x_i^2$ ), où H est l'hétérozygotie attendue et  $x_i$  est la fréquence de l'allèle i. Toutes les analyses sont réalisées en utilisant le logiciel d'analyse statistique XLSTAT 2014.lnk.

## **2.5. Identification moléculaire des isolats de *Trichoderma* spp.**

La majorité des espèces de *Trichoderma* sont morphologiquement très semblables, difficiles à distinguer et elles ont été confondues pendant de nombreuses années. Cependant, Les méthodes moléculaires se sont montrées très utiles pour la caractérisation et l'identification des isolats de ce genre.

### **2.5.1. Amplification de la région ITS et du fragment Tef 1 alpha**

Pour les 17 isolats de *Trichoderma*, un fragment d'environ 0,56 Kb du gène *tef1alpha* est amplifié en utilisant le couple d'amorce EF1-728F développé par Chaverri, *et al.*, (2003) comme forward, et *tef1-rev* développé par Kullnig-Gradinger *et al.*, (2002) comme reverse. La réaction PCR est réalisée dans un volume de 50  $\mu$ l contenant 25 ng d'ADN génomique, 0,3  $\mu$ M d'amorces EF1-728F/*tef1-rev*, 100  $\mu$ M de dNTP, 2,5 unités de Taq polymérase avec 5  $\mu$ L du tampon réactionnel 10X. L'amplification est réalisée selon le programme suivant :

1. Une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 3 min.
2. 35 cycles constitués de 3 étapes chacun : 1 min de dénaturation à 95°C suivie de 1 min d'hybridation à 59°C et 1 min d'élongation à 72°C.
3. un cycle final de 7 min à 72°C pour finir l'élongation des séquences en voie de synthèse.

Pour les mêmes isolats, la région ITS du rDNA nucléaire est amplifiée en utilisant le couple d'amorces ITS1-ITS4 (White *et al.* 1990). La réaction PCR est réalisée dans un volume de 50  $\mu$ l contenant 25 ng d'ADN génomique 0,3  $\mu$ M d'amorce, 100  $\mu$ M de dNTP, 2,5 unités de Taq polymérase avec 5  $\mu$ L de tampon réactionnel 10X. L'amplification est réalisée selon le programme suivant :

1. Une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min.
2. 39 cycles constitués de 3 étapes chacun : 1 min. de dénaturation à 94°C suivie de 2 min. d'hybridation à 55°C et 3 min d'élongation à 72°C.
3. un cycle final de 7 min à 72°C pour finir l'élongation des séquences en voie de synthèse.

### **2.5.2. Séquençage de la région ITS et du fragment Tef 1alpha**

Les produits de la PCR obtenus par les amorces EF1-728F/tef1-rev et ITS1/ITS4 sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,75%. Les fragments d'ADN sous forme de bande sont prélevés du gel d'agarose à l'aide d'un scalpel (Fig. 5) et sont ensuite purifiés en utilisant le kit Gene-clean II system (Q-Biogene, Calsbad ; California) suivant les instructions du fabricant.

Les produits ainsi purifiés sont quantifiés dans un gel d'agarose à 1% en utilisant un marqueur de taille et de concentration (Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2009). Les échantillons à séquencer sont ensuite préparés dans des tubes Eppendorf. Pour chaque amorce (forward et reverse mise chacune dans un tube séparé), un volume final de 8  $\mu$ l est déposé dans chaque tube, contenant 3  $\mu$ l d'amorce (10  $\mu$ M) et de 70 à 100 ng d'ADN du fragment tef1 ou de la région ITS, déjà purifiés.

Les séquences d'ADN sont obtenues par un séquençage automatique avec un fluorescent terminators en utilisant l'ABI 377 Prism Sequencer (Applied Biosystems, Foster city California) au niveau du département de microbiologie et de génétique, université de Salamanca, Espagne. Toutes les séquences ainsi obtenues ont été

comparées aux séquences de la base de données « NCBI GenBank » pour l'identification des espèces de *Trichoderma*.



**Figure 5.** Récupération des fragments de la région ITS et du gène *tef1 alpha* amplifiés par PCR, à partir du gel d'agarose

**Tableau 5.** Amorces utilisées dans cette étude

Amorce	Séquence (5'-3')	Fragment (en bp)	Cible	Référence
PFO2	CCCAGGGTATTACACGGT	70	rDNA- <i>Fo</i>	Edel <i>et al.</i> , (2000)
PFO3	CGGGGGATAAAGGCGG			Edel <i>et al.</i> , (2000)
Sprlf	GATGGTGGAAACGGTATGACC	947	<i>pgx4</i>	Hirano et Arie, (2006)
Sprlr	CCATCACACAAGAACACAGGA			Hirano et Arie, (2006)
Sp 13f	GTCAGTCCATTGGCTCTCTC	445	<i>pgx4</i>	Hirano et Arie, (2006)
Sp 13r	TCCTTGACACCATCACAGAG			Hirano et Arie, (2006)
Sp 23f	CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA	518	<i>pgx4</i>	Hirano et Arie, (2006)
Sp 23r	GCAACAGGTCGTGGGGAAAA			Hirano et Arie, (2006)
P12-F2B	TATCCCTCCGGATTTTGGAGC	992	<i>SIX1</i>	van der Does <i>et al.</i> , (2008)
P12-R1	AATAGAGCCTGCAAAGCATG			Rep <i>et al.</i> , (2004)
SIX3-F1	CCAGCCAGAAGGCCAGTTT	608	<i>SIX3</i>	van der Does <i>et al.</i> , (2008)
SIX3-R2	GGCAATTAACCACTCTGCC			van der Does <i>et al.</i> , (2008)
SIX4-F1	TCAGGCTTCACTTAGCATAC	967	<i>SIX4</i>	van der Does <i>et al.</i> , (2008)
SIX4-R1	GCCGACCGAAAAACCCTAA			van der Does <i>et al.</i> , (2008)
SIX3-G121A-F2 <sup>a</sup>	ACGGGGTAACCCATATTGCA	429	<i>SIX3</i>	Lievens <i>et al.</i> , (2009)
SIX3-G134A-F2 <sup>a</sup>	TTGCGTGTTTCCCGGCCA	414	<i>SIX3</i>	Lievens <i>et al.</i> , (2009)
SIX3-G137C-F1 <sup>a</sup>	GCGTGTTTCCCGGCCGCC	412	<i>SIX3</i>	Lievens <i>et al.</i> , (2009)
ITS1 <sup>b</sup>	AATAGAGCCTGCAAAGCATG	580-600	ITS	White <i>et al.</i> , (1990)
ITS4 <sup>b</sup>	GCCATCCTTGGAGACCAGC			White <i>et al.</i> , (1990)
EF1-728F <sup>b</sup>	GCCATCCTTGGAGACCAGC	520-565	<i>tef1alpha</i>	Chaverri <i>et al.</i> , (2003)
<i>tef1</i> -rev <sup>b</sup>	GCCATCCTTGGAGACCAGC			Kullnig-Gradinger <i>et al.</i> , (2002)

<sup>a</sup> Lorsque est utilisé avec SIX3-R2, un fragment de 429, 414 ou 412 pb est généré pour les isolats *Fol* race 3 par PCR.

<sup>b</sup> Les couples d'amorces utilisés pour amplifier et séquencer les fragments des isolats de *Trichoderma*.

## **2.6. Activité antagoniste de *Trichoderma* spp vis à vis de *F. o. f. sp. lycopersici* et de *F. o. f.sp radicis-lycopersici***

### **2.6.1. Activité antagoniste *in vitro***

Pour l'étude de l'activité antagoniste *in vitro* des souches de *Trichoderma* à l'égard de l'agent phytopathogène, des tests de confrontation sur milieu PDA (Difco), ont été réalisés. Nous avons utilisé dans ce test 4 isolats de *Trichoderma* appartenant à 3 espèces différentes à savoir, T5 (*Trichoderma harzianum*), T8 (*Trichoderma ghanens*), T9 et T17 (*Trichoderma asperelum*) et 4 isolats de l'agent phytopathogène, 2 isolats de *Forl* à savoir, l'isolat Forlc et l'isolat F17 et 2 isolats de *Fol* à savoir, l'isolat 4287 et l'isolat F42. Ainsi, deux méthodes de confrontation ont été réalisées.

#### **a. Confrontation directe**

Cette méthode consiste à repiquer l'agent pathogène et l'agent antagoniste sur une même boîte de Petri contenant le milieu PDA. Deux explants mycéliens de 6 mm de diamètre sont repiqués à 2 cm de distance, l'un de l'agent pathogène et l'autre de l'agent antagoniste. Le témoin consiste au repiquage de l'agent phytopathogène seul dans une boîte contenant le milieu PDA. Le test est réalisé en trois répétitions. Après 6 jours d'incubation à l'obscurité à 28 ° C, la croissance en diamètre des colonies de l'agent phytopathogène est mesurée et exprimée en mm (Dennis et Webstert, 1971a).

#### **b. Activité antifongique sur membranes de cellophane**

Le principe de cette technique est de cultiver l'agent antagoniste sur la surface d'une membrane de cellophane déposée dans une boîte de Petri contenant le milieu PDA. Ce dispositif permet aux métabolites produits de diffusés à travers la membrane de cellophane dans le milieu PDA.

L'activité antifongique est ensuite évaluée par le repiquage de l'agent pathogène sur ce milieu de culture, après l'enlèvement de la membrane de cellophane et automatiquement de l'agent antagoniste. De ce fait, des boîtes de Petri contenant le

milieu PDA, sont préparées. Une feuille de cellophane de 50 µm d'épaisseur stérilisée est ensuite placée de manière aseptique sur le milieu de culture. À l'aide d'un emporte-pièce, un explant mycélien de 6 mm de diamètre est prélevé de la marge d'une culture de *Trichoderma* âgée de 3 à 4 jours et déposé au centre de la boîte. Après 48 h d'incubation à 28°C à l'obscurité, la membrane de cellophane et l'explant de l'isolat de *Trichoderma* y adhérant sont retirés. Aussitôt, un explant mycélien de 6 mm de diamètre de l'agent pathogène à tester est placé sur le milieu de culture dans la position précédemment occupée par l'agent antagoniste.

Le test est effectué en trois répétitions pour chaque combinaison isolat antagoniste/isolat phytopathogène. Pour les boîtes réservées au témoin, l'explant mycélien de *Trichoderma* a été remplacé par un explant de milieu PDA, avec trois répétitions également.

Après 2 jours d'incubation à 28°C ; les diamètres des colonies de l'agent phytopathogène sont mesurés (Dennis et Webster, 1971b).

### c. **Activité antifongique sur membranes de cellulose**

A des fins comparatives, des tests similaires ont été effectués en utilisant une membrane de cellulose (membrane de dialyse) de 14 kDa sur un milieu PDA tel que décrit par (Rubio *et al.*, 2009).

### **Analyse des résultats**

Le taux d'inhibition de l'agent pathogène est calculé selon la formule :  $I = (C - T / C) \times 100$ . Où I = taux d'inhibition en % ; C = croissance radiale de l'agent phytopathogène seul en mm (témoin) ; T = la croissance radiale en mm, de l'agent phytopathogène en présence de *Trichoderma*.

### 2.6.2. Activité antagoniste *in vivo*

L'aptitude des trois isolats de *Trichoderma* (T8, T9 et T17) à contrôler la maladie causée par les trois isolats de *F. oxysporum* (Forlc, 4287 et F42) sur la tomate cv. "SM" est évaluée par des tests *in vivo*.

Les graines de tomate ont été désinfectées en surface comme décrit précédemment et ensuite traitées par 1 ml d'une suspension sporale contenant  $2 \times 10^7$  conidies de l'un des isolats de *Trichoderma* étudiés, comme décrit par Pérez *et al.* (2015). 1 ml d'une suspension sporale a été utilisé pour enrober 30 graines déposées dans une boîte de Petri de 90 mm de diamètre, inclinée sous hotte à flux laminaire durant toute la nuit, pour permettre l'évaporation de l'eau.

Les graines de tomate traitées par les spores des isolats de *Trichoderma* sont semées dans des plateaux de culture à alvéoles contenant un substrat de culture commercialisé (Projar Proffesional-Comercial Projar SA) et maintenus sous serre dans des conditions contrôlées de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité et une température comprise entre 18 et 30 °C. Des graines de tomate non traitées avec les spores de *Trichoderma* ont été utilisées comme témoin.

L'inoculation des plants de tomate par les isolats *Fo* intervient 14 jours après le semis, comme décrit précédemment. Les plants inoculés sont ensuite transplantés dans des pots de 0,7 L contenant le substrat indiqué ci-dessus. Ainsi, dix répétitions sont réalisées pour chaque combinaison isolat *Trichoderma*/isolat *Fo* à raison d'un plant par pot.

#### Notation des symptômes

La sévérité des symptômes a été évaluée trois semaines après l'inoculation de *Fo*, selon une échelle de notation à 5 degrés (0-4) tel que : 0 signifie une plant sain; les indices 1, 2 et 3 correspondent aux degrés d'attaque légers, modérés et sévères respectivement, des symptômes de chlorose, flétrissement ou rabougrissement

des plants du cultivar «SM», causés par les isolats de *Fol* : 4287 et F42 (Cai et al., 2003). Quant à l'isolat Forlc, les indices d'attaque 1, 2 et 3, correspondent aux symptômes de jaunissement, flétrissement, pourriture racinaire ou raboutissement des plants causés par les isolats de *Forl* et le degré 4 correspond aux plants morts dans les deux cas (Hibar et al., 2007).

L'incidence de la maladie (IM) en pourcentage et la réduction de l'IM (RIM) due au traitement par *Trichoderma* sont déterminées selon les 2 formules :

$$\text{Incidence de la maladie (IM) (\%)} = \left[ \frac{(\sum \text{degré d'attaque} \times \text{nombre de plants infectés})}{(\text{degré d'attaque maximal} \times \text{nombre total de plants})} \right] \times 100.$$

$$\text{Pourcentage de réduction de l'incidence de la maladie due au traitement (RIM) (\%)} = \frac{(\text{incidence de la maladie du témoin} - \text{incidence de la maladie due traitement})}{(\text{incidence de la maladie du témoin})} \times 100 \text{ (Song et al., 2004).}$$

La protection contre la maladie s'est faite donc, en utilisant une plante hôte sensible (variété sensible) sous serre, en présence des deux agents biologique à savoir, l'agent phytopathogène et l'agent antagoniste. L'essai a été réalisé avec un témoin positif, inoculé avec l'agent phytopathogène et non traité avec le *Trichoderma* et un témoin négatif, non inoculé avec l'agent phytopathogène et non traité avec le *Trichoderma*.



### **III. RESULTATS ET DISCUSSION**

## 1. Résultats

### 1.1. Caractérisation des isolats de *F. oxysporum*

#### 1.1.1. Identification des isolats basée sur les critères morphologiques

La caractérisation morphologique des isolats de *Fusarium* spp. étudiés nous a permis d'identifier cinquante isolats fongiques comme étant *F. oxysporum*. Ces isolats proviennent de plants de tomate présentant des symptômes de jaunissement et/ ou de flétrissement, collectés à partir de six grandes zones de production de la tomate en Algérie. En effet, ces isolats ont présenté des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques qui correspondent bien aux caractères morphologiques de l'espèce *F. oxysporum* tels que décrits par Leslie et Summerell (2006). Ainsi, les cinquante isolats ont présenté un mycélium de couleur blanche avec un pigment de couleur rouge pour la majorité des isolats et avec un pigment violet pour certains isolats.

Les microconidies sont monocellulaires de forme ovale, elliptique ou réniforme naissant en fausses têtes sur des phialides courtes. Ces isolats produisent des macroconidies de longueur courte à moyenne, de forme droite à légèrement incurvée, relativement mince généralement avec 3 cloisons et une paroi mince. Les chlamydospores sont produites de manière individuelle ou en paire, mais aussi peuvent être formées en grappes ou en chaînes courtes, en position soit terminal ou intercalaire avec une paroi lisse ou rugueuse.

#### 1.1.2. Identification de l'espèce *F. oxysporum* par PCR

L'amplification par PCR en utilisant l'amorce PF02-03 a révélé que 29 des 50 isolats collectés appartiennent au *F. oxysporum* en raison, d'une bande commune amplifiée chez les isolats algériens et chez les isolats de référence. Ainsi, le fragment spécifique amplifié est de 70 pb (Fig. 6).

### 1.1.3. Identification des races de *Fol* et de *Forl* par PCR en utilisant les amorces spécifiques *sp1*, *sp13* et *sp23*

Pour une identification plus précise des isolats étudiés, une amplification par PCR en utilisant les amorces développées par Hirano et Arie (2006) à savoir : *sp1*, *sp13* et *sp23* a été réalisée pour discriminer les races de *Fol* et la forme spéciale *radicis-lycopersici*.

Les résultats obtenus ont montré la présence de deux races différentes (*r1* et *r3*) de *Fol* ainsi que la forme spéciale *radicis-lycopersici* dans les différentes zones de la culture de tomate en Algérie (Fig. 7, Tableau 6). Cependant, la plupart des isolats ont montré des profils d'amplification avec une bande supplémentaire non spécifique qui peut être un indicateur d'un autre profil que celui des races *Fol* et de la forme spéciale *radicis-lycopersici*.

Pour pouvoir distinguer clairement les isolats de *Fol* de ceux de *Forl* des amplifications PCR du gène *SIX1* codant pour un facteur de virulence de *Fol* envers la tomate ont été réalisées avec le couple d'amorces spécifique P12-F2B/P12-R1 en incluant des ADN provenant de deux isolats de référence. Ainsi, 20 isolats de la collection, y compris l'isolat espagnol 4287 utilisé comme référence de *Fol* race 2 ont présenté dans leur profil un fragment de 992 pb spécifique de la forme spéciale f. sp. *lycopersici*. Cependant, 11 isolats incluant l'isolat de référence *Forlc* n'ont pas montré de bandes amplifiées avec les amorces P12-F2B/P12-R1. En conséquence, ils ne peuvent pas être affiliés au *Fol* même si certains d'entre eux présentent une amplification positive avec les amorces *sp13* et ou *sp23* (Fig. 7, tableau 6).

En tenant compte des profils obtenus par les amorces développées par Hirano et Arie (2006) et les résultats de l'amplification du gène *SIX1*, l'ensemble des isolats a été identifié comme suit : parmi les 20 isolats notés *SIX1+*, 10 isolats ont été identifiés comme *Fol* race 1, sans aucune amplification avec l'amorce *sp1* et 2 isolats (F20 et F39) ont été identifiés comme *Fol* race 3, sans aucune amplification avec

l'amorce sprl également. En revanche, 7 isolats ont été identifiés comme *Fol* race 1 avec une amplification positive, avec l'amorce sprl et 1 isolat (F23) a été identifié comme *Fol* race 3 avec une amplification positive avec l'amorce sprl également. En outre, il convient de noter que l'isolat de référence 4287 connu comme étant *Fol* race 2 a été identifié comme *Fol* race 1.

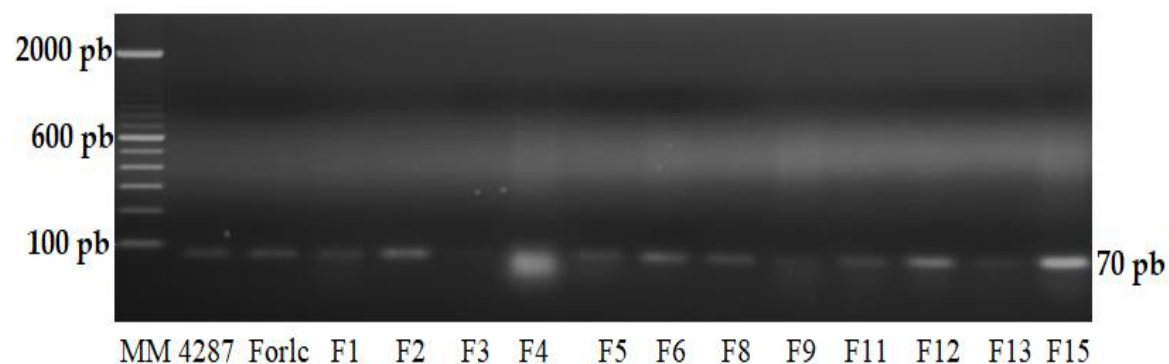
Concernant les 11 isolats Six1-, excepté l'isolat F44 qui a présenté une amplification positive avec l'amorce sp13. Ces isolats ont tous présenté une bande spécifique de 947 Pb avec l'amorce sprl, indiquant ainsi leur appartenance à la forme spéciale *radicis-lycopersici* d'après Hirano et Arie (2006). Par contre, la plupart de ces isolats ont présenté dans leur profil d'amplification une bande supplémentaire non spécifique avec les amorces sp13 (445 Pb) et sp23 (518 Pb). Parallèlement, l'isolat de référence *Forl* a présenté des bandes fines, supplémentaires avec chacune des deux amorces sp13 et sp23. Suite à ces résultats, à l'exception de l'isolat F44, 10 isolats Six1- ont été affiliés à la f. sp. *radicis-lycopersici*.

**Tableau 6.** Profil d'amplification par PCR des isolats de *Fo* en utilisant les amorces spécifiques POF, sp13, sp23 et sprl

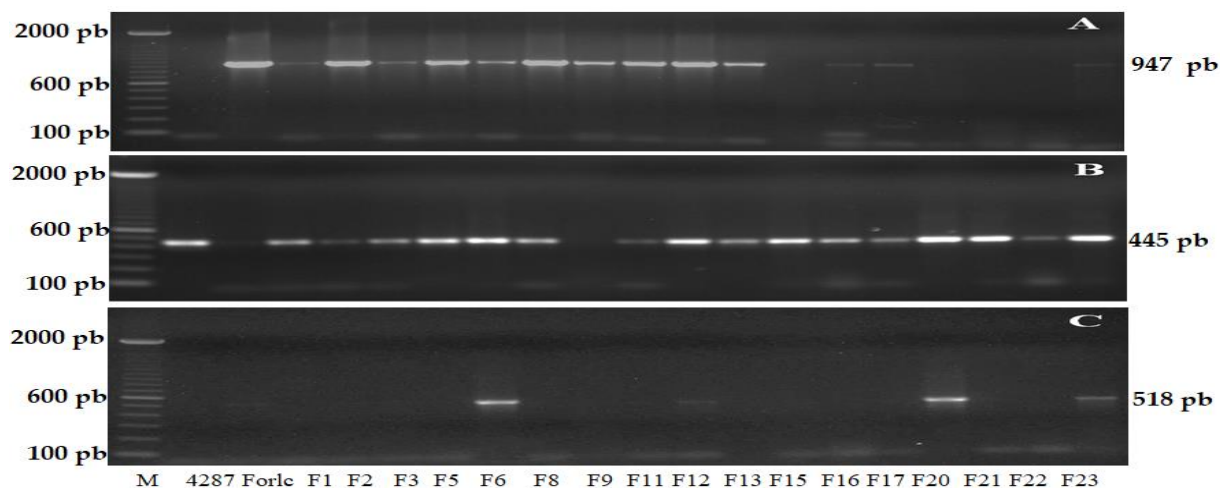
Code	Origine	POF	sp13	sp 23	sprl
F1	Zemmouri, Boumerdes	+	+	-	+
F2	Biskra	+	+	-	+
F3	Staoueli, Alger	+	+	-	+
F5	Melili, Biskra	+	+	-	+
F6	Zemmouri, Boumerdes	+	+	+	+
F8	Melili, Biskra	+	+	-	+
F9	Ain Benoui, Biskra	+	-	-	+
F11	Biskra	+	+	-	+
F12	Melili, Biskra	+	+	~	+
F13	Staoueli, Alger	+	+	-	+
F15	Djimar, Jijel	+	+	-	-

F16	Boudouaou, Alger	+	+	-	+
F17	M'ziraa, Biskra	+	+	-	+
F20	El Kennar, Jijel	+	+	+	-
F21	M'ziraa, Biskra	+	+	-	-
F22	Corso, Boumerdes	+	+	-	+
F23	Staoueli, Alger	+	+	+	+
F24	Selga, Biskra	+	+	-	+
F25	Gouraya, Tipaza	+	+	-	-
F26	Mostaganem	+	+	-	+
F27	Corso, Boumerdes	+	+	-	-
F30	Selga, Biskra	+	+	-	-
F33	Staoueli, Alger	+	+	-	-
F37	Djimar, Jijel	+	+	-	-
F38	Ain Bennoui, Biskra	+	+	-	-
F39	Djimar, Jijel	+	+	+	-
F42	Selga, Biskra	+	+	-	-
F43	Djimar, Jijel	+	+	+	+
F44	Djimar, Jijel	+	+	-	-
4287	Córdoba, Spain	+	+	-	-
Forlc	Gaza	+	~	~	+

+: bande présente ; -: bande absente; ~: bande fine



**Figure 6.** Profils des bandes par PCR de l'ADN de *F. oxysporum* généré par les amorces spécifiques PF02-03, Marqueur de 100 pb de taille.



**Figure 7.** Profils des bandes par PCR de l'ADN de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et *F. oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*, généré par les amorces spécifiques (A) sprl, (B) sp13, (C) sp23, Marqueur de 100 pb de taille.

#### 1.1.4. Test de pathogénicité : inoculation des deux cultivars «SM» et «RG» par les isolats de *Fusarium oxysporum* étudiés

L'ensemble des 31 isolats de *Fo* ont été inclus dans les tests de pathogénicité réalisés sur des plants de tomates, dans le but de confirmer l'identification de la forme spéciale *Fol* et *Forl* fournie par l'amplification par PCR du gène *SIX1* en utilisant l'amorce P12-F2B/P12-R1.

Les résultats des tests de pathogénicité sont présentés dans le tableau 7. Dix (9 collectés en Algérie et l'isolat de référence *Forlc*) sur les 31 isolats *Fo* ont induit des symptômes de jaunissement, de flétrissement et/ou un rabougrissement des plants de tomate du cv. «RG». Il est à signaler que ces dix isolats ont été amplifiés avec l'amorce spécifique *sp1l*, indiquant leur appartenance à la forme spéciale *Forl*.

En outre, ces mêmes isolats ont été notés *SIX1-*. En effet, les isolats F2 et F6 ont enregistré les indices de sévérité des symptômes les plus élevées. Ces valeurs étant significativement différentes de celles enregistrées par les sept autres isolats de *Forl* algériens. Par contre, aucune différence significative de sévérité des symptômes causés par ces 2 isolats, n'a été observée par rapport à ceux de l'isolat de référence *Forlc*.

Parallèlement, un test de pathogénicité par l'inoculation des plants de tomate cv. «SM» a été réalisé également, en incluant les 20 isolats notés *SIX1+* (*Fol*) en plus de l'isolat F44, non agressif sur «RG». Tous les isolats de *Fol* (19 isolats algériens et l'isolat de référence 4287 espagnol) ont provoqué des symptômes typiques de la maladie du flétrissement fusarien, observés quatre semaines après l'inoculation des plants de tomate (Fig. 8).

Les indices de sévérité des symptômes observés chez les plantes inoculés avec les isolats de *Fol* ont montré une grande variabilité de l'agressivité. Ainsi, l'indice de sévérité des symptômes le plus faible soit, 1,3 a été enregistré par sept isolats et l'indice de sévérité des symptômes le plus élevé soit 3,7 a été enregistré par l'isolat

F30. En effet, les isolats F15 et F30 ont enregistré les valeurs les plus élevées qui ne diffèrent pas significativement de celles enregistrées chez les plants inoculés avec l'isolat de référence 4287.

Comme, l'isolat F44 (*SIX1*- et sprl-) n'a causé aucun symptôme ni sur les plants de tomate «RG», ni sur les plants de tomate «SM», il a été identifié comme isolat *Fo* non pathogène.

**Tableau 7.** Origines géographiques des isolats de *F. oxysporum* analysés et leur assignation aux f. sp. *lycopersici* (*Fol*) et *radicis-lycopersici* (*Forl*), basé sur l'amplification du gène *SIX1*, et le test de pathogénéicité

Code	Origine	<i>SIX1</i> <sup>a</sup>	f. sp	indice de la maladie sur RG <sup>b</sup>	indice de la maladie sur SM <sup>b</sup>
F1	Zemmouri, Boumerdes	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,3 ± 0,5 e
F2	Biskra	-	<i>Forl</i>	3,6 ± 0.5 a	Nd <sup>c</sup>
F3	Staoueli, Alger	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,3 ± 0,5 e
F5	Melili, Biskra	+	<i>Fol</i>	0,0 e	2,0 ± 0,7 bcde
F6	Zemmouri, Boumerdes	-	<i>Forl</i>	3,5 ± 0.7 a	Nd
F8	Melili, Biskra	-	<i>Forl</i>	1,3 ± 0.5 d	Nd
F9	Ain Benoui, Biskra	-	<i>Forl</i>	1,3 ± 0.5 d	Nd
F11	Biskra	+	<i>Fol</i>	0,0 e	3,1± 0,6 ab
F12	Melili, Biskra	+	<i>Fol</i>	0,0 e	2,8 ± 0,9 abc
F13	Staoueli, Alger	-	<i>Forl</i>	1,2 ± 0.5 d	Nd
F15	Djimar, Jijel	+	<i>Fol</i>	0,0 e	3,6 ± 0,5 a
F16	Boudouaou, Alger	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,4 ± 0,5 e
F17	M'ziraa, Biskra	-	<i>Forl</i>	2,5 ± 0.5 bc	Nd
F20	El Kennar, Jijel	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,3 ± 0,5 e
F21	M'ziraa, Biskra	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,3 ± 0,5 e
F22	Corso, Boumerdes	-	<i>Forl</i>	1,6 ± 0.5 cd	Nd



F23	Staoueli, Alger	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,6 ± 0,5 cde
F24	Selga, Biskra	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,3 ± 0,5 e
F25	Gouraya, Tipaza	+	<i>Fol</i>	0,0 e	2,0 ± 0,5 bcde
F26	Mostaganem	-	<i>Forl</i>	1,9 ± 0,3 cd	Nd
F27	Corso, Boumerdes	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,3 ± 0,5 e
F30	Selga, Biskra	+	<i>Fol</i>	0,0 e	3,7 ± 0,5 a
F33	Staoueli, Alger	+	<i>Fol</i>	0,0 e	2,1 ± 0,6 bcde
F37	Djimar, Jijel	+	<i>Fol</i>	0,0 e	2,7 ± 0,7 abcd
F38	Ain Bennoui, Biskra	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,3 ± 0,5 e
F39	Djimar, Jijel	+	<i>Fol</i>	0,0 e	1,5 ± 0,5 e
F42	Selga, Biskra	+	<i>Fol</i>	0,0 e	2,5 ± 0,5 abcde
F43	Djimar, Jijel	-	<i>Forl</i>	1,9 ± 0,3 cd	Nd
F44	Djimar, Jijel	-	<i>Forl</i>	0,0 e	0,0 f
4287	Córdoba, Spain	+	<i>Fol</i>	0,0 e	2,8 ± 0,4 abc
Forlc	Gaza	-	<i>Forl</i>	3,4 ± 0,7 ab	Nd

<sup>a</sup>Présence (+) ou absence (-) d'un fragment de PCR de 992 pb en utilisant les amorces P12-F2R et P12-R1 pour une cible dans le gène *SIX1*.

<sup>b</sup> Pour chaque colonne, les valeurs avec différentes lettres alphabétiques indiquent les groupes homogènes suivant une signification statistique déterminée par ANOVA et le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>c</sup> Nd: non déterminé.



**Figure 8.** Symptômes de jaunissement de flétrissement fusarien et de rabougrissement induit chez les plants de tomates par les isolats de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* A: 4287, B: F42, E: F30 sur le cv. «SM» et les isolats de *F. oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici* D et F: Forlc, H: F17 sur le cv. «RG», 4 semaines après inoculation, C: plant témoin Super Marmande et G: plant témoin Rio Grand.

### 1.1.5. Identification des races de *Fol* par amplification du gène *SIX*

Afin d'identifier les races de *Fol* avec plus de précision, des amplifications par PCR supplémentaires ont été réalisées avec les paires d'amorces SIX3 et SIX4 (Tableau 5). Les différents profils d'amplification obtenus pour les 31 isolats *Fo* ont montré la présence des deux races : r2 et r3, de la forme spéciale *lycopersici* (Fig. 9, Tableau 8). Ainsi, un fragment de 608 pb a été amplifié avec les amorces SIX3-F1 et SIX3-R2 pour 20 isolats y compris l'isolat de référence 4287. Cependant, aucune amplification n'a été observée avec les amorces SIX4-F1 et SIX4-R1. Cela implique qu'il ne s'agit pas de la race 1 du *Fol*, mais plutôt, de la race 2 et/ou de la race 3.

En outre, un fragment de 412 pb a été détecté seulement chez les deux isolats F12 et F20 avec la paire d'amorces SIX3-G137C-F1/SIX3-R2 mais, aucune amplification n'a été observée lorsque les forwards SIX3-G121A-F2 ou SIX3-G134A-F2 ont été combinée avec la reverse SIX3-R2. De ce fait, les deux isolats F12 et F20 sont identifiés comme *Fol* race 3. En revanche, aucune bande n'a été observée chez les dix isolats notés *SIX1-*, y compris l'isolat de référence *Forl*, suite à l'amplification des gènes *SIX3* et *SIX4*.

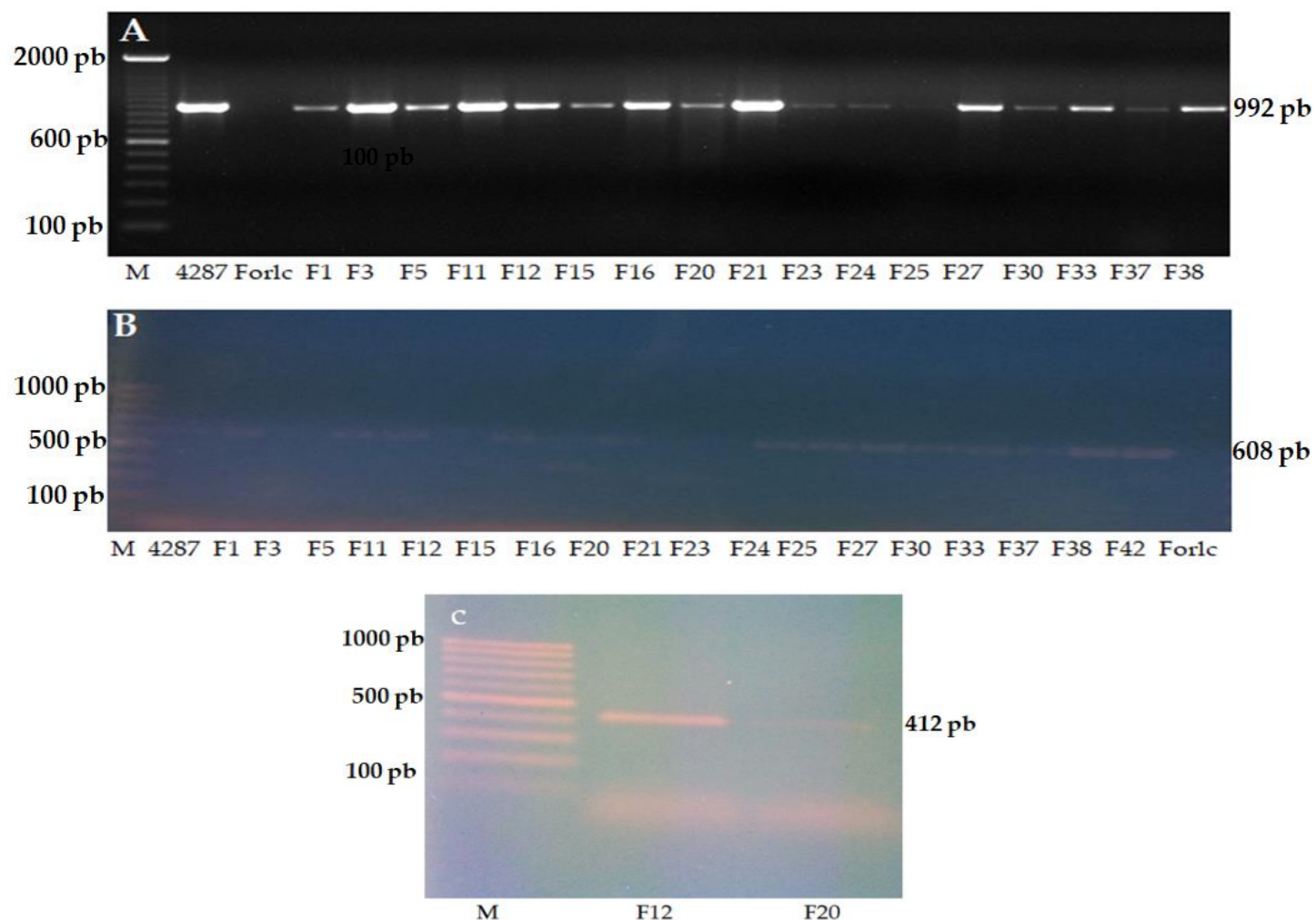
Ces résultats associés au test de pathogénicité sur les deux cultivars cv. «RG» et cv. «SM», confirment l'appartenance des 20 isolats *SIX1+*, à la forme spéciale *lycopersici* et l'appartenance des 10 isolats *SIX1-*, à la forme spéciale *radicis-lycopersici*. L'isolat F44 qui est *SIX1-* et *sprl-*, n'a causé aucun symptôme ni sur les plants de tomate «RG», ni sur les plants de tomate «SM». Il a été en conséquence, identifié comme un isolat de *F.oxysporum* non pathogène.

### 1.1.6. Diversité génétique des isolats de *Fo* algériens par ISSR

La diversité génétique des isolats de *Fusarium oxysporum*(*Fo*) a été évaluée par ISSR. Deux amorces ont été choisies selon leur capacité à produire des profils pour l'ensemble des 31 isolats de *Fo*, incluant les 29 isolats algériens et les deux isolats de référence *Forlc* de *Forl* et 4287 de *Fol*. Les deux amorces (GC) 9C et (GT) 9T ont

donné des bandes reproductibles pour 26 sur 31 isolats (Fig. 10, Tableau 9). Les deux amorces (GA) 9C et (GA) 9T ont produit respectivement 20 et 17 bandes chez 22 et 26 isolats de *Fo*, respectivement. L'amorce (GA) 9C a produit entre 1 et 8 bandes allant approximativement de 400 à 1900 pb et l'amorce (GA) 9T a généré entre 1 et 7 bandes allant de 300 à 2000 pb. La diversité génétique moyenne de Nei au sein de la collection est estimée à 0,22 et la valeur la plus élevée 0,26 est enregistrée par l'amorce (GA) 9T.

Le dendrogramme basé sur les profils de bandes obtenus avec les deux amorces et le coefficient de similarité de Jaccard a montré une grande diversité parmi les 26 isolats de *Fo* (Fig. 11). En effet, un indice de similarité de 1 n'a été enregistré que pour l'isolat de référence *Fol* 4287(r2) et l'isolat *Fol* (F33). La hiérarchie de ce dendrogramme a servi à regrouper ces 26 isolats de *Fo* dans différents groupes. En général, les isolats *Fol* et *Forl* ont été répartis à travers le dendrogramme, et leur regroupement n'a pas montré de corrélation avec la sévérité des symptômes observés au cours du test de pathogénicité, ou avec leur origine géographique.



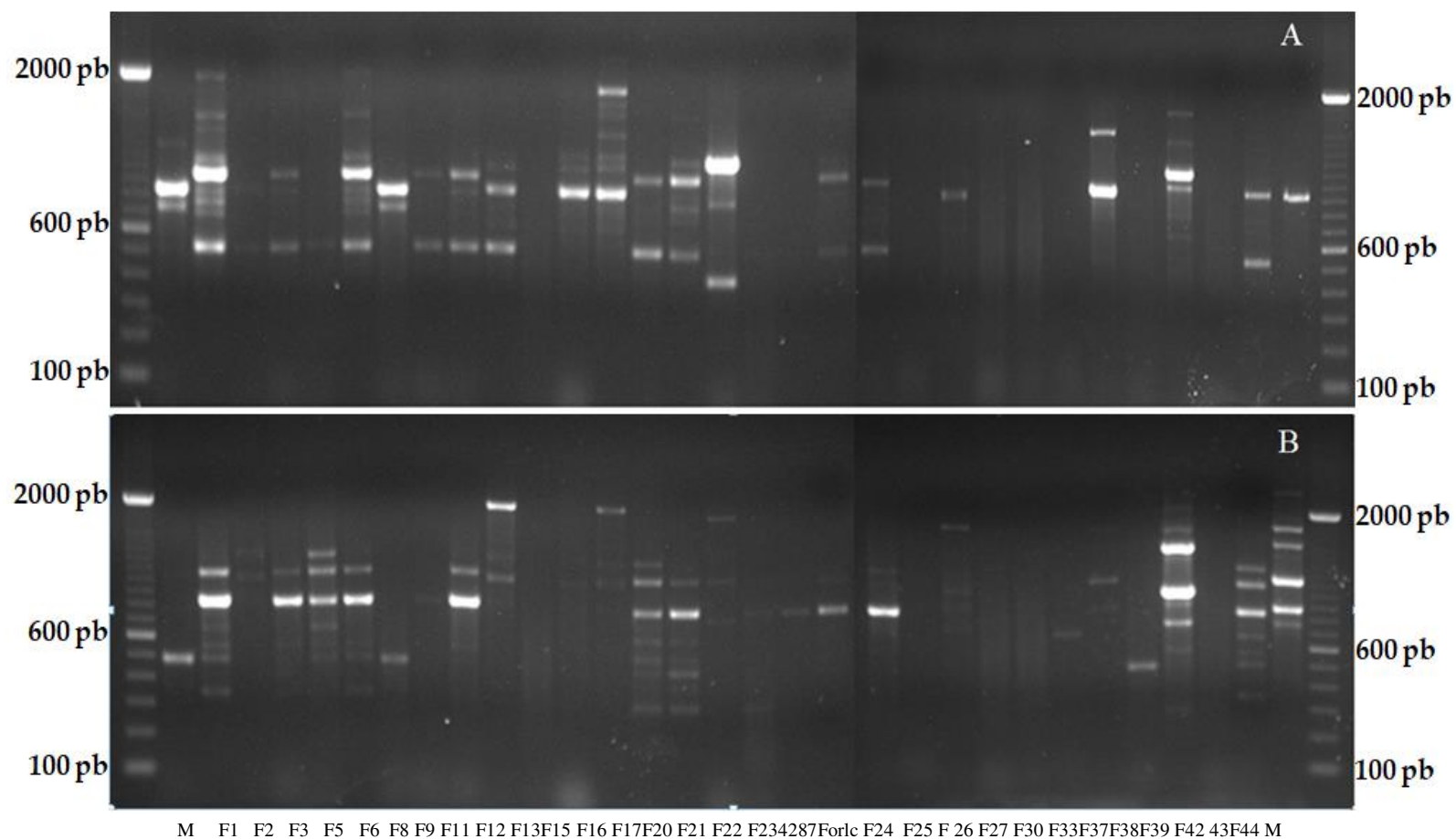
**Figure 9.** Profils des bandes obtenus par PCR de l'ADN des races de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, générées par les couples d'amorces (A) P12-F2B/P12-R1, spécifique au *Fol*, (B) SIX3-F1/SIX3-R2 spécifique à la race 2 de *Fol* et (C) SIX3-G137C-F1/SIX3-R2 spécifique à la race 3 de *Fol*. M : Marqueur de 100 pb de taille.

**Tableau 8.** Identification moléculaire des isolats algériens de *Fusarium oxysporum* (Fo) sur la base des profils d'amplifications du gène *SIX3* et *SIX4* (+, le fragment est présent, -, le fragment est absent).

Isolat	Couple d'amorce			Fo identité
	SIX3-F1/SIX3-R2 (608 bp)	SIX4-F1/SIX4-R1 (967 bp)	SIX3-G137C-F1/SIX3-R2 (412 bp)	
F1, F3, F5, F11, F15, F16, F21, F23, F24, F25, F27, F30, F33, F37, F38, F39, F42, 4287 <sup>a</sup>	+	-	-	Race 2 <i>Fol</i>
F12, F20	+	-	+	Race 3 <i>Fol</i>
F2, F6, F8, F9, F13, F17, F22, F26, F43, F44 Forlc <sup>b</sup>	-	-	-	<i>Forl</i>

<sup>a</sup> L'isolat 4287 est inclut comme référence pour f. sp. *lycopersici* (*Fol*) race 2.

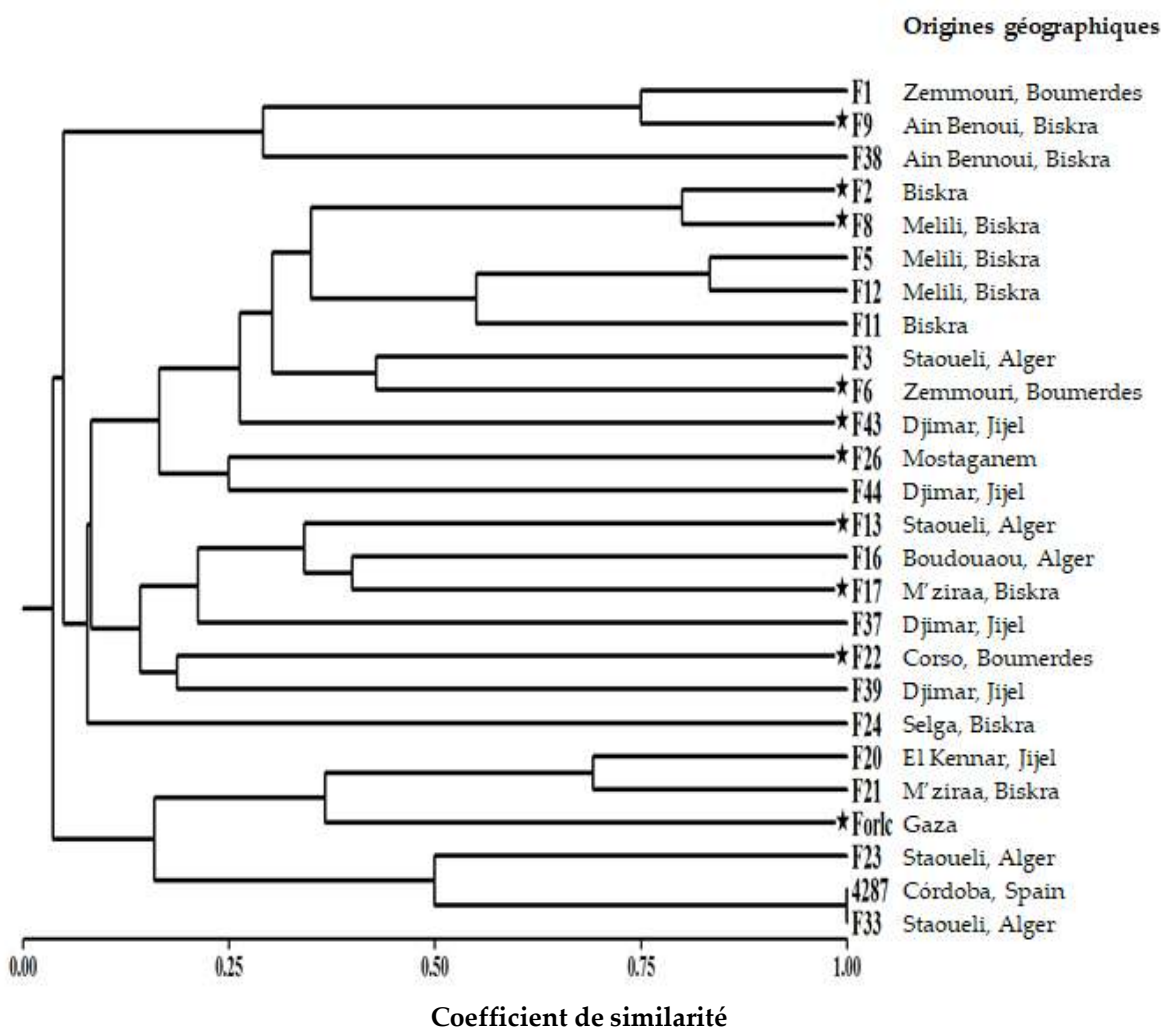
<sup>b</sup> L'isolat Forlc est inclut comme référence pour f. sp. *radicis-lycopersici* (*Forl*).



**Figure 10.** Profils des bandes obtenus par PCR des isolats de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* et des isolats de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* et l'isolat non pathogène F44, générés par les amorces (A) (GA) 9C et (B) (GA) 9T. M : Marqueur de 100 pb de taille.

**Tableau 9.** Analyse de la diversité génétique par ISSR, des isolats de *F. oxysporum* collectés en Algérie avec les 2 isolats de référence 4287 et Folrc.

ISSR amorce	Nombre de loci	Nombre d'isolat avec bande nulle	Diversité génétique de Nei (h)
(GA) <sub>9</sub> C	20	9	0,19
(GA) <sub>9</sub> T	17	5	0,26



**Figure 11.** Dendrogramme des isolats de *Fol* et de *Forl* (★) étudiés, obtenus à partir de la matrice du coefficient de Jaccard, généré de l'analyse par ISSR avec les amorces (GA) 9C et (GA) 9T.



## 1.2. Etude de l'activité antifongique des isolats de *Trichoderma*

### 1.2.1. Identification moléculaire des isolats de *Trichoderma* spp. utilisés dans l'étude

Dix-sept isolats de *Trichoderma* spp. ont été isolés à partir de 15 sol cultivés de tomate et de 2 pépinières de plants de tomate (Tableau 4). Leur appartenance au genre *Trichoderma* a été basée sur les caractères morphologiques telles que décrites par Rifai (1969). En effet, des isolats obtenus ont montré une vitesse de croissance rapide, une sporulation abondante sur milieu de culture avec une coloration verdâtre des conidies. Les conidiophores de ces isolats sont fortement ramifiés selon une structure pyramidale et se terminent par une ou plusieurs phialides. Ces dernières peuvent être cylindriques ou subglobuleuses, regroupées en masse ou en solitaire.

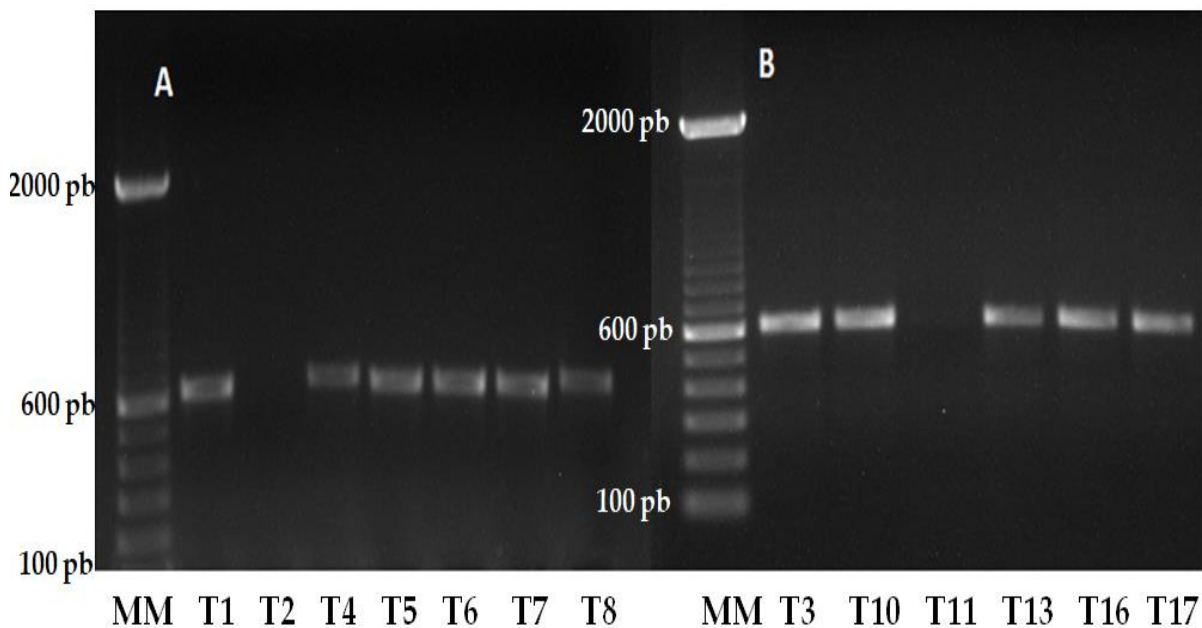
L'identification à l'échelle de l'espèce est confirmée par l'analyse des séquences de la région ITS et d'un fragment du gène *tef1alpha* (Fig. 12). La région de l'ADNr contenant les séquences ITS1, ITS2 et 5,8S, varient de 564 à 584 pb de longueur. Les séquences brutes obtenues ont été analysées et corrigées, puis comparées à celles de la banque de gènes « GenBank NCBI ». Ainsi, les isolats T1, T5, T6 et T7 ont présenté des séquences ITS identiques (100% de similarité) avec des séquences de l'isolat *T. harzianum* hu2 / MK377306.1. Alors que, les douze isolats: T2, T3, T4, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16 et T17 ont présenté des séquences identiques (100% de similarité) avec la séquence ITS de l'isolat *T. asperellum* (CBS 433.97 / MH021852). Enfin, un seul isolat (T8) avait présenté une séquence identique à 100% de similarité avec celle de l'isolat ATCC208858 /NR\_120299 (Tableau 10, Fig.13).

Pour l'ensemble des isolats étudiés le fragment du gène *tef1alpha* est d'environ 600pb de longueur. Le séquençage de ce fragment a généré des séquences identiques (100% de similarité) avec des séquences de la base des données « GenBank NCBI ». Ainsi, les isolats T1, T5, T6 et T7 ont montré des séquences identiques avec celle de *T. harzianum* CBS226.95 /AY605833. Les douze isolats T2, T3, T4, T9, T10, T11, T12, T13,

T14, T15, T16 et T17 ont présenté des séquences identiques (100% de similarité) avec celle de l'isolat *T. asperellum* CBS433.97/ AY376058. L'isolat (T8) a montré une séquence identique (100% de similarité) avec celle de l'isolat *T. ghanense* GJS95-137/AY937423 (Tableau 10, Fig. 14). Les séquences obtenues sont représentées en Annexe III.

Ainsi, il ressort de ces résultats que le séquençage de la région ITS et du fragment *tef1* a abouti aux mêmes résultats par rapport à la similarité des séquences des 17 isolats de la collection avec ceux de la base des données « GenBank NCBI ».

En se basant sur ces résultats, on peut conclure que T1, T5, T6 et T7 appartiennent à l'espèce *T. harzianum* ; les douze isolats T2, T3, T4, T9, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16 et T17 font partie de l'espèce *T. asperellum*. Alors qu'un seul isolat T8 est affilié à l'espèce *T. ghanense*.



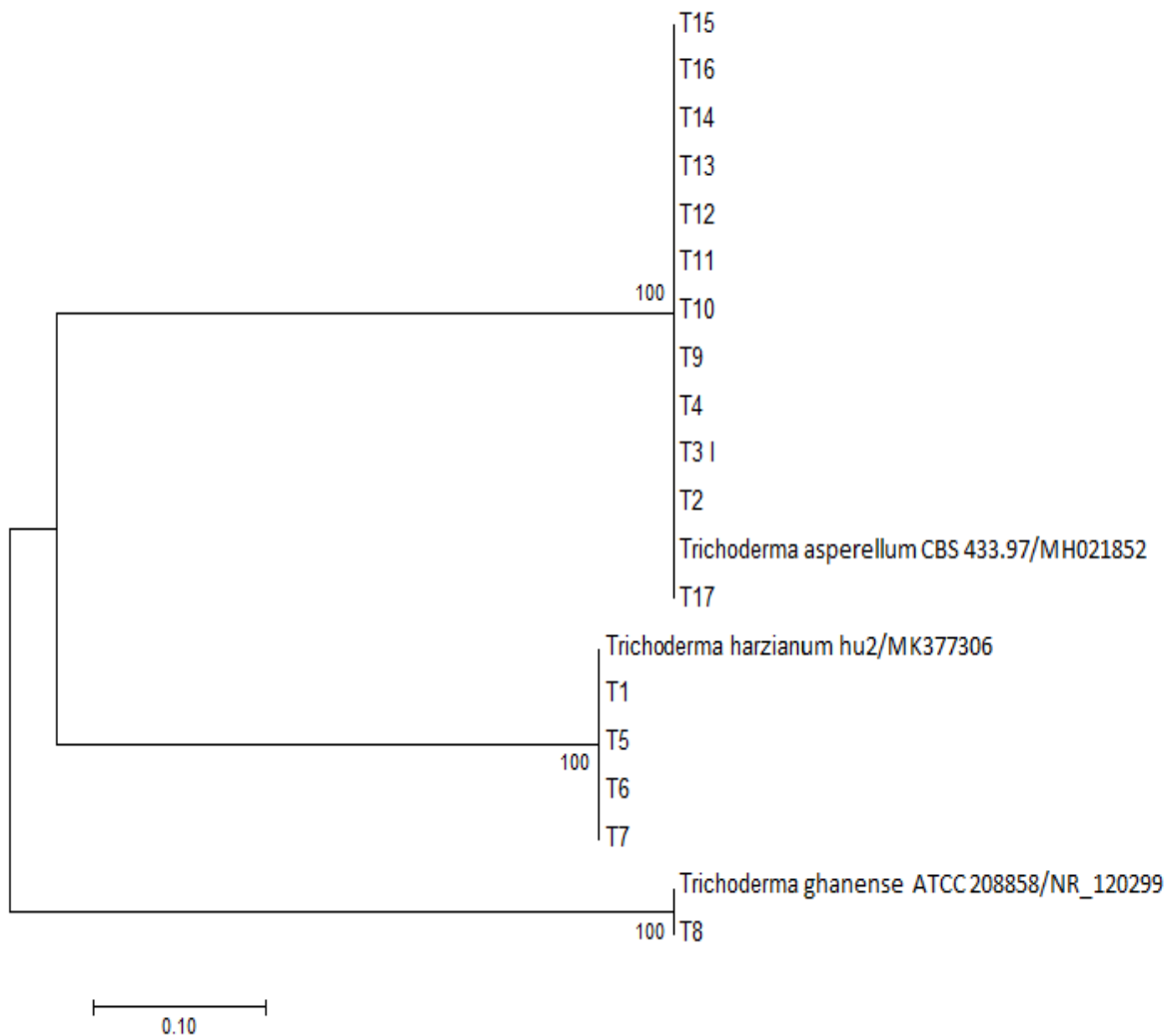
**Figure 12.** Profils d'amplification par PCR de la région ITS par les amorces ITS1-ITS4 (A) et du gène *tef1* alpha par les amorces EF1-728F- *tef1*-rev (B), des isolats de *Trichoderma*. étudiés.

**Tableau 10.** Identification des isolats de *Trichoderma* étudiés par séquençage de la région ITS de l'ADNr et du gène *tef1alpha*

Code Isolat	Origine géographique	100% de similarité souche/n d'accession <sup>a</sup> (la région ITS)	100% de similarité souche/n d'accession <sup>a</sup> (gène <i>tef1alpha</i> )	Identité
T1	Sol/Tipaza	hu2/MK377306	CBS226.95/AY605833	( <i>T. harzianum</i> )
T2	Sol/Tipaza	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T3	Sol/Tipaza	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T4	Sol/Tipaza	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T5	ITCMI <sup>b</sup> pépinière/ Staoueli Alger	hu2/MK377306	CBS226.95/AY605833	( <i>T. harzianum</i> )
T6	Sol/Corso, Boumerdes	hu2/MK377306	CBS226.95/AY605833	( <i>T. harzianum</i> )
T7	Sol/Corso, Boumerdes	hu2/MK377306	CBS226.95/AY605833	( <i>T. harzianum</i> )
T8	ITCMI <sup>b</sup> pépinière/ Staoueli Alger	ATCC208858 /NR_120299	GJS95-137/AY937423	( <i>T. ghanense</i> )
T9	Sol/Jijel	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T10	Sol/Jijel	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T11	Sol/El Kennar, Jijel	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T12	Sol/El Kennar, Jijel	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T13	Sol/El Kennar, Jijel	CBS433.97/ MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T14	Sol/Jimar, Jijel	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T15	Sol/Djimar, Jijel	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T16	Sol/Djimar, Jijel	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )
T17	Sol/Skikda	CBS433.97/MH021852	CBS433.97/AY376058	( <i>T. asperellum</i> )

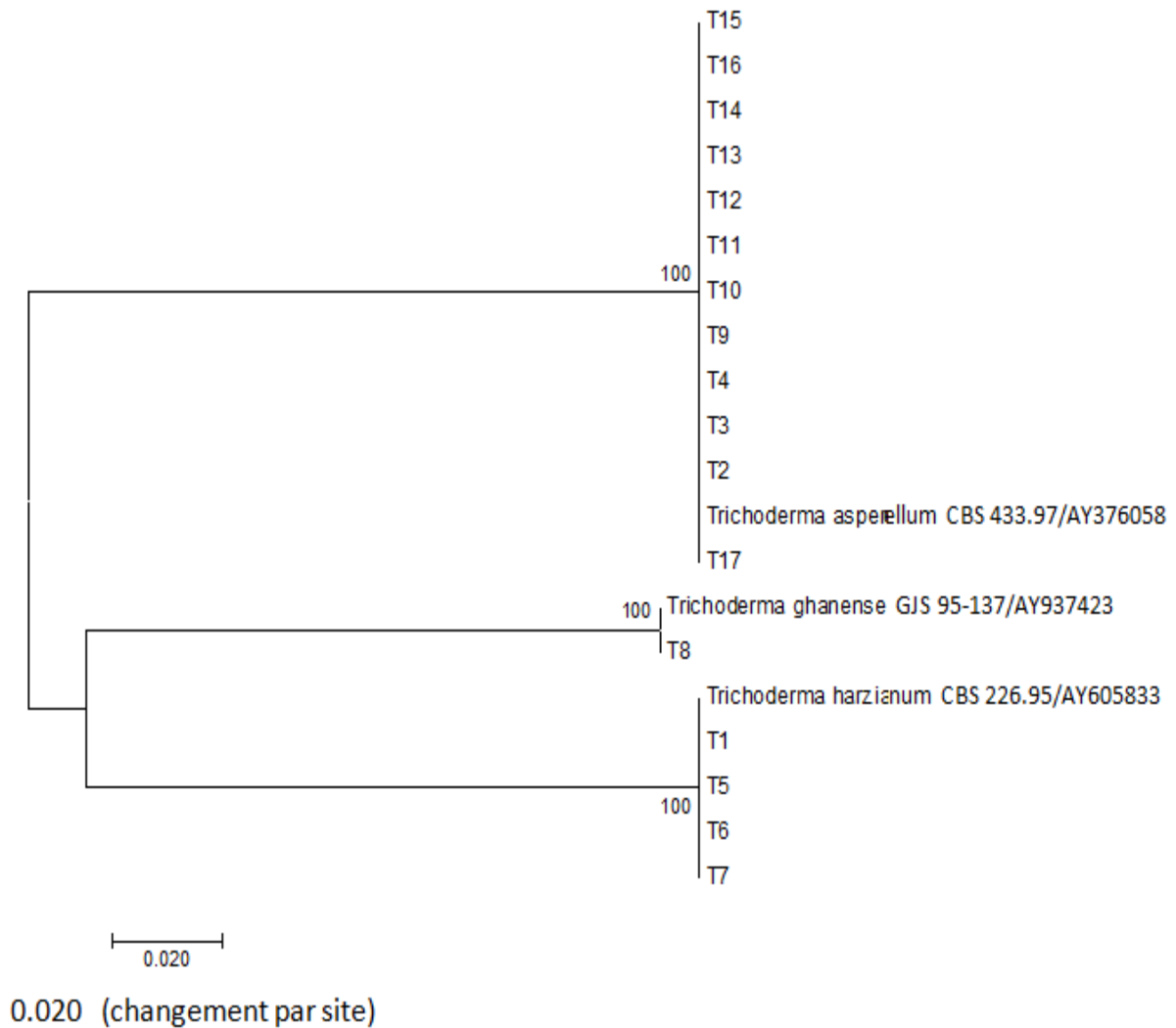
<sup>a</sup>100% de similarité entre les séquences, de la région ITS de l'ADNr et du gène *tef1alpha*, des isolats étudiés et des séquences de la bases de données provenant de souches de *Trichoderma* de référence.

<sup>b</sup>ITCMI: Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles, Staoueli Alger.



0.10 correspond au changement par site

**Figure 13.** Arbre phylogénétique généré de l'analyse des séquences ITS, montrant la position des 17 isolats de *Trichoderma* spp. par rapport aux isolats de références, obtenu par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 7. Les numéros au niveau des branches indiquent le pourcentage avec lequel la branche donnée est supportée pour 1000 répliquions bootstrap.



**Figure 14.** Arbre phylogénétique généré de l'analyse des séquences du gène *tef1α*, montrant la position des 17 isolats de *Trichoderma* spp. par rapport aux isolats de références, obtenu par la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 7. Les numéros au niveau des branches indiquent le pourcentage avec lequel la branche donnée est supportée pour 1000 répliquions bootstrap.

### 1.2.2. Activité antagoniste *in vitro*

#### Test de confrontation direct

Le test de confrontation directe est effectué sur milieu PDA entre les 4 isolats de *Trichoderma* : T5 (*T. harzianum*), T8 (*T. ghanens*), T9 et T17 (*T. asperellum*) et 4 isolats phytopathogènes de *Fusarium oxysporum* (*Fo*), à savoir : Forlc et F17 de la forme spéciale *Forl* et les 2 isolats de la forme spéciale *Fol* : 4287 et F42. Pour les 4 isolats de l'agent phytopathogène, les boîtes du témoin ont enregistré les taux de croissance les plus élevés. Ainsi, la capacité inhibitrice des isolats de *Trichoderma* à l'égard des isolats phytopathogènes cible est très visible (Fig. 15).

En général, les isolats antagonistes se développent beaucoup plus rapidement que les isolats de *Fo*. De ce fait, l'ensemble des isolats de *Trichoderma* ont induit un ralentissement significatif de la croissance du mycélium et ont entouré les colonies de *Fo*. L'activité antagoniste des 4 isolats de *Trichoderma* a été évaluée par le taux d'inhibition de la croissance des isolats de *Fo* durant la période de confrontation directe.

Les valeurs d'inhibition les plus élevées sont situées entre 68,75 et 70,62%, et sont conférés par les isolats T17 (*T. asperellum*) et T5 (*T. harzianum*). Ce dernier isolat a enregistré les taux d'inhibition de la croissance les plus élevés sur l'ensemble des isolats de *Fo* testés (64,6 - 70,62%). Toutefois, la plupart des isolats de *Trichoderma* testés ont conféré des valeurs d'inhibition modérées (62,4-64,64%). Cependant, les valeurs d'inhibition les plus basses 59,1 et 62,4% ont été induits par les deux isolats T8 (*T. ghanens*) et T9 (*T. asperellum*) respectivement, à l'égard de l'isolat F17 (Tableau 11). Dans l'ensemble, l'isolat F42 s'est montré le plus sensible vis-à-vis de la majorité des isolats de *Trichoderma*. Par contre, l'isolat F17 s'est montré le moins sensible. L'action myco-parasite des isolats de *T. asperellum* (T9 et T17), s'est exprimée par un envahissement et une sporulation très abondante sur les colonies du pathogène de tous les isolats de *Fol* et de *Forl* testés (Fig. 15).

### Activité antifongique sur membranes

Contrairement à la confrontation directe, le *T. harzianum* (T5) a induit les taux d'inhibition les plus bas aussi bien, sur les deux membranes. En revanche, l'isolat *T. ghanense* (T8) a dévoilé une activité antagoniste remarquable sur les deux membranes à la fois.

Il est à rappeler que cette action est due aux métabolites produits par les isolats de *Trichoderma* qui sont diffusés à travers la membrane de cellophane ou de cellulose dans le milieu PDA (Fig. 16). Ainsi, le taux d'inhibition le plus élevé à l'égard de l'isolat F42 sur membrane de cellophane a été enregistré avec l'isolat T8 avec 51,22% d'inhibition. L'isolat T8 a également conféré les valeurs d'inhibition les plus élevées sur membrane de cellulose, à l'égard des isolats F17 et F42 avec 57,67% et 56,87% respectivement.

Par ailleurs, les valeurs d'inhibition les plus élevées à l'égard des deux isolats de référence Forlc de *Forl* et 4287 de *Fol* ont été obtenues avec l'isolat T17 sur les deux membranes, avec 64,4%, 52,1% sur membrane de cellophane et 82,12 %, 68,9% sur membrane de cellulose, à l'égard des deux isolats respectivement (Tableau 11).

L'isolat T9 (*T. asperellum*) à son tour ; suit la même tendance que l'isolat T17, avec un taux d'inhibition légèrement plus faible (Fig. 17). Bien que la réaction des différents isolats de l'agent phytopathogène vis-à-vis des isolats antagonistes n'est pas constante et varie d'un isolat antagoniste à un autre. On peut distinguer l'isolat F17 de *Forl*, qui s'est montré le moins inhibé par la majorité des isolats de *Trichoderma* et l'isolat Forlc comme étant le plus inhibé sur membrane de cellophane. Par contre, sur membrane de cellulose l'isolat F42 a la tendance d'être le moins inhibé et l'isolat Forlc comme le plus inhibé. Cela indique un comportement inhibiteur dépendant de l'isolat antagoniste et de l'isolat phytopathogène.

Etant donné que les isolats de *T. asperellum* (T9 et T17) ont totalement envahit et sporulé sur les colonies des isolats phytopathogène et ont obtenu les valeurs

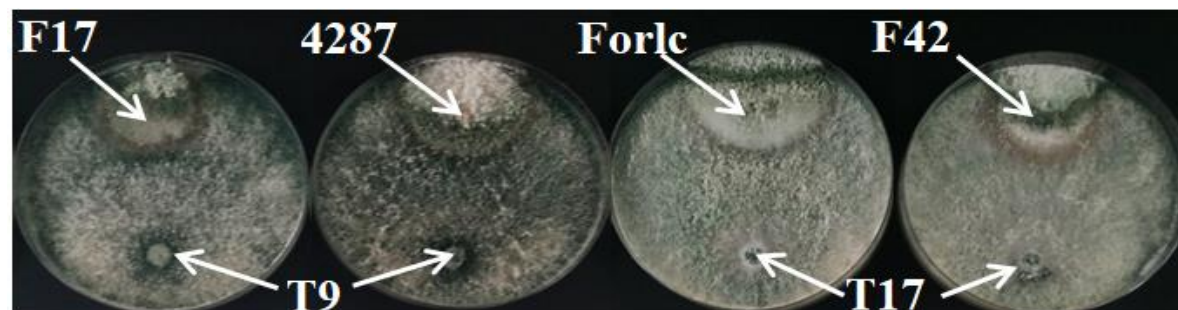
d'inhibition les plus élevées sur membranes à l'égard de la majorité des isolats phytopathogènes testés. Ces isolats peuvent être considérés comme étant les plus efficaces sur la base du test d'antagonisme *in vitro*.

**Tableau 11.** Taux d'inhibition de la croissance des colonies des isolats de *F. oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici* et des isolats de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* induit par les isolats de *Trichoderma* étudiés, après confrontation directe et sur membranes de cellophane et de cellulose

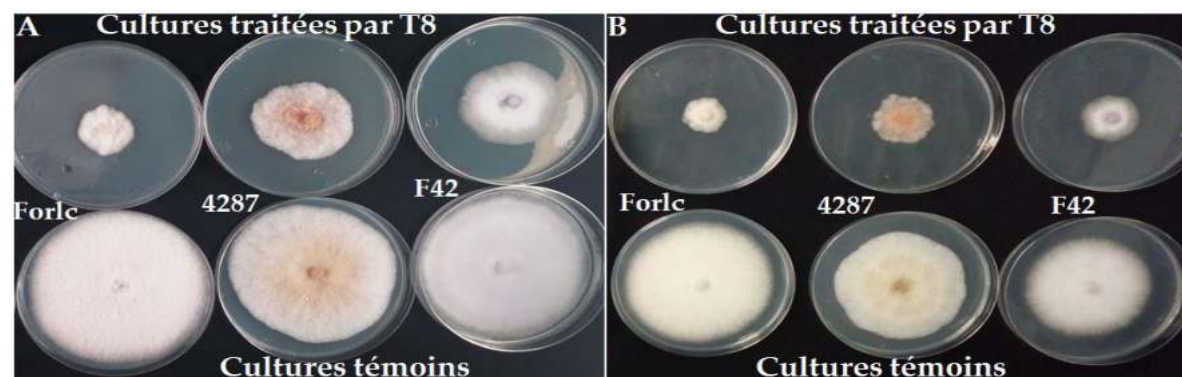
Combinaisons <i>Trichoderma-Fo</i>	Confrontation directe (%)	Membrane de Cellophane(%)	Membrane De Cellulose (%)
T5-F17	64,6 ± 1,1 ab	17,0 ± 1,0 de	47,6 ± 1,4 de
T5-Forlc	69,8 ± 0,0 a	12,5 ± 2,9 e	29,8 ± 2,2 fg
T5-4287	70,6 ± 1,1 a	35,3 ± 2,1 bcd	27,5 ± 1,0 fg
T5-F42	69,5 ± 0,0 ab	35,1 ± 2,4 bcd	22,6 ± 2,5 g
T8-F17	59,1 ± 1,1 b	35,8 ± 1,3 bcd	57,7 ± 1,5 bcd
T8-Forlc	62,8 ± 0,0 ab	63,5 ± 1,8 a	72,5 ± 1,5 ab
T8-4287	63,0 ± 1,0 ab	47,1 ± 1,5 abc	53,7 ± 1,0 cd
T8-F42	68,0 ± 1,1 ab	51,2 ± 1,4 ab	56,9 ± 1,3 bcd
T9-F17	62,4 ± 1,5 ab	37,0 ± 1,8 bc	41,8 ± 2,6 def
T9-Forlc	63,6 ± 1,1 ab	62,7 ± 0,6 a	78,5 ± 1,0 a
T9-4287	63,0 ± 0,0 ab	46,2 ± 1,0 abc	68,3 ± 2,9 abc
T9-F42	66,4 ± 1,1 ab	26,5 ± 1,5 cde	30,5 ± 1,91 efg
T17-F17	64,6 ± 1,1 ab	28,5 ± 1,7 cde	49,2 ± 1,4 d
T17-Forlc	63,6 ± 1,1 ab	64,4 ± 2,2 a	82,1 ± 2,6 a
T17-4287	63,0 ± 0,0 ab	52,1 ± 1,9 ab	68,9 ± 2,3 abc
T17-F42	68,7 ± 1,1 ab	29,9 ± 1,9 cde	31,3 ± 2,9 efg

Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions avec l'écart-type correspondant. Les valeurs avec différentes lettres alphabétiques indiquent les groupes homogènes suivant une signification statistique déterminée par ANOVA et le test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

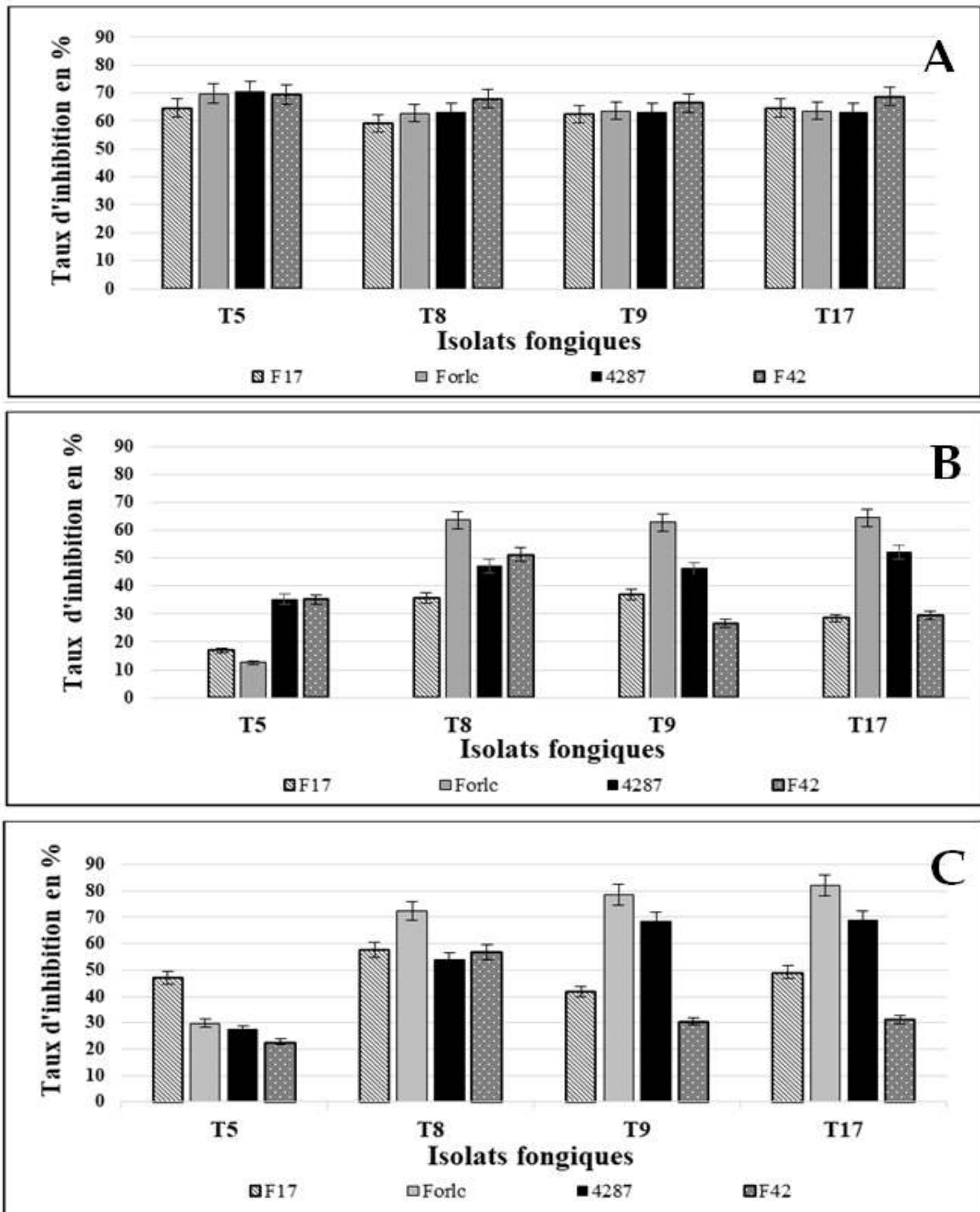




**Figure 15.** Action myco-parasitaire des isolats de *T. asperellum* T9 et T17 à l'égard de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (isolats 4287, F42) et de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (isolats F17, Forlc), montrant un envahissement et une forte sporulation, après 6 jours d'incubation à 28 ° C à l'obscurité.



**Figure 16.** Activité antifongique de l'isolat T8 de *T. ghanense* à l'égard de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (isolats 4287, F42) et *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (isolat Forlc) (A) sur membrane de cellophane, (B) sur membrane de cellulose après, 48 h d'incubation à 28 ° C à l'obscurité.



**Figure 17.** Inhibition *in vitro* de la croissance mycélienne des isolats de *F. oxysporum* par des isolats de *Trichoderma* en confrontation directe (A), sur membrane de cellophane (B) et sur membrane de cellulose (C).

### 1.2.3. Activité antifongique des isolats de *Trichoderma* contre les isolats *F. oxysporum in vivo*

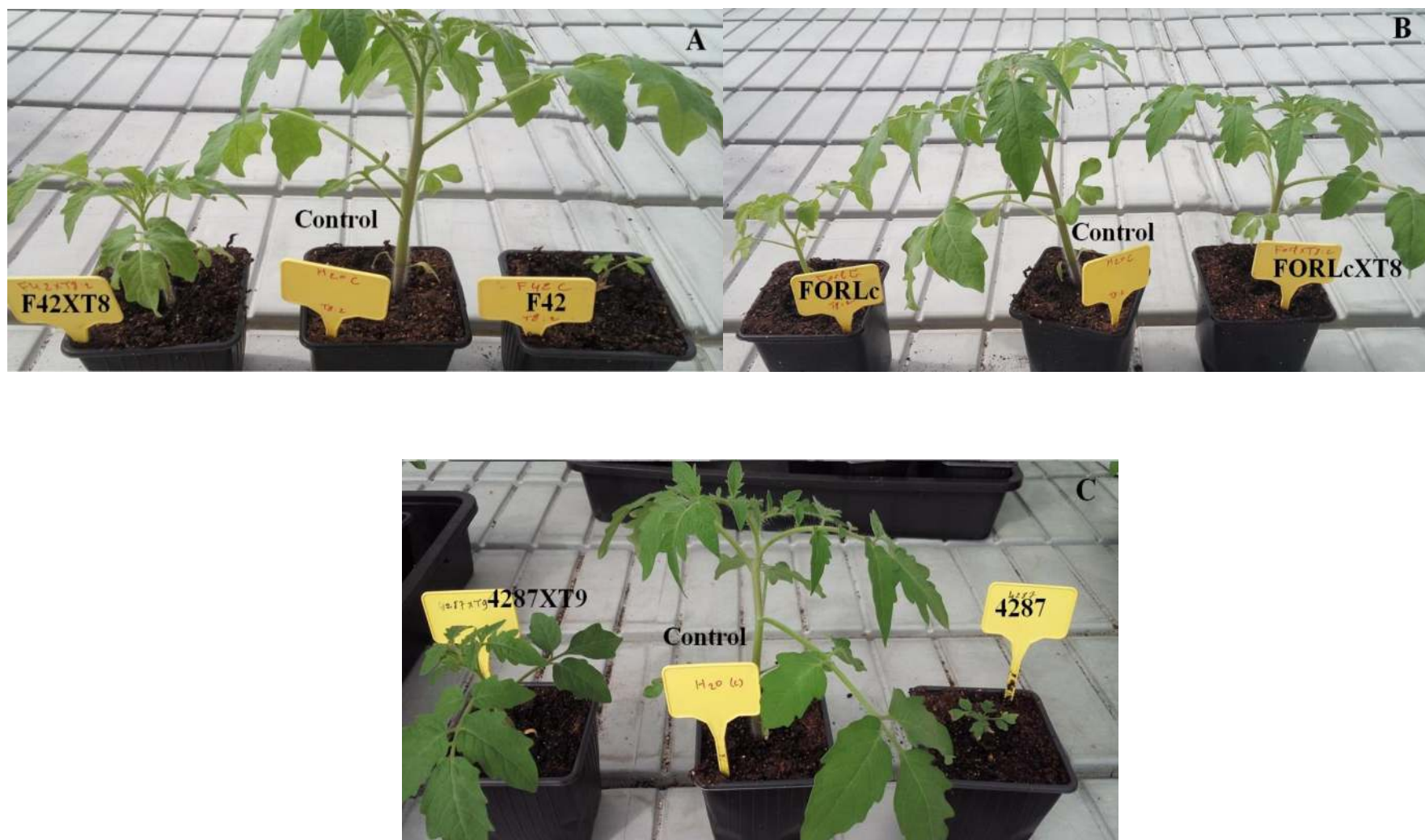
L'effet du traitement de la semence avec les spores de *T. ghanense* (T8) et *T. asperellum* (T9 et T17) sur le développement des maladies causées par l'isolat algérien *Fol* F42 et les isolats de référence *Fol* 4287 de *Fol* et Forlc de *Forl* sur les plants de tomate cv. «SM» (Fig. 18) est présenté dans le tableau 12. En revanche, aucun symptôme n'a été observé chez les plants témoins (non inoculés par les isolats de *Fo*), provenant des semences traitées par les spores de T8, T9 ou T17. A la fin des tests effectués, trois semaines après l'inoculation avec les isolats de *Fo* lorsque les plants étaient âgés de 14 jours, l'incidence de la maladie (IM) induit par l'isolat Forlc dans les trois tests effectués avec ce pathogène, varie de 80 à 97,5 %. Tandis que les incidences de la maladie induite sur les plantes suite à leur inoculation par les isolats F42 et 4287, sont plus faibles et varient dans des intervalles plus larges.

En effet, une réduction de l'incidence de la maladie (RIM) a été observée chez toutes les combinaisons *Trichoderma/Fo*. Ainsi, les pourcentages de RIM les plus élevés ont été enregistrés avec l'isolat T8, étant de 53,1 et 48,3% à l'égard de Forlc et de F42 respectivement. Cependant, l'isolat T9 a induit une RIM plus élevée (40,0%) que les deux isolats T8 et T17 qui ont conféré des taux de réduction de l'indice de la maladie de 25,8% et 18,2% contre l'isolat 4287 de *Fol* respectivement.

Sur la base de ces résultats, *T. ghanense* (T8) semble être le meilleur isolat pour lutter contre les deux agents de la fusariose de la tomate, *Fol* et *Forl*.

**Tableau 12.** Incidence de la maladie (IM) causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Forlc et *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* F42 et 4287 sur des plants de tomate "Super Marmande", traités séparément avec *T. ghanense* (T8) et *T. asperellum* (T9 et T17).

Traitements <i>Fusarium</i>	IM (%)	Traitements <i>Trichoderma-Fusarium</i>	IM (%)	Réduction de l'incidence de la maladie (RIM)
Forlc	80 ±10,54	Forlc-T8	37,5 ±13,18	53,1
Forlc	97,5 ±7,91	Forlc-T9	77,5 ±7,91	20,5
Forlc	90 ±12,91	Forlc-T17	80 ±10,4	11,1
4287	77,5 ±7,91	4287-T8	57,5±12,08	25,8
4287	62,5 ±13,18	4287-T9	37,5 ±13,18	40,0
4287	82,5 ±12,08	4287-T17	67,5 ±12,08	18,2
F42	72,5 ± 7,91	F42-T8	37,5± 13,18	48,3
F42	55 ±10,54	F42-T9	30 ±10,54	45,4
F42	42,5 ±12,08	F42-T17	30 ±10,54	29,4



**Figure 18.** Activité Antagoniste *in vivo* des isolats de *Trichoderma* à l'égard des isolats de *F. oxysporum* : T8 (*T. ghanense*) contre F42 (A), T8 contre Forlc (B), T9 (*T. asperellum*) contre 4287 (C).

## 2. Discussion

Dans notre étude, la majorité des 29 isolats algériens de *Fo* collectés entre 2012 et 2015 ont été attribués à la forme spéciale *lycopersici*, selon le test de pathogénicité et les amplifications des gènes *SIX*. Des études antérieures ont mis en évidence l'utilité et l'efficacité des amorces développées à partir du gène *SIX* pour discriminer rapidement et avec certitude les isolats de *Fol* de ceux de *Forl* par PCR (van der Does *et al.*, 2008, Lievens *et al.*, 2009). Par contre, les amorces développées par Hirano et Arie (2006), pour l'identification de la forme spéciale *Forl* et les races de *Fol*, manquent de spécificité et peuvent générer des bandes non spécifiques, au point où l'ADN d'un isolat de *F. oxysporum* non pathogène peut être amplifié par une ou plusieurs de ces amorces.

Nos résultats indiquent que les gènes *SIX* sont très utiles pour distinguer les isolats de *Fol* de ceux d'autres formes spéciales ou d'autres espèces du genre *Fusarium*, car un bon niveau de concordance entre les résultats des amplifications du gène *SIX* et du test de pathogénicité a été constaté chez les 31 isolats *Fo* analysés. L'isolat F44 n'a pas induit de symptômes lors de l'inoculation des deux cultivars de tomate «RG» et «SM», sachant que son amplification par PCR en utilisant les amorces *SIX* est négative.

En effet, il n'est pas rare de trouver des souches *Fo* non pathogènes parmi les isolats collectés et qui ont été considérés comme pathogènes à l'origine, malgré qu'ils étaient isolés à partir de plantes manifestant des symptômes (Cai *et al.*, 2003), ou à partir du sol (Jelinski *et al.*, 2017). Nos résultats montrent que la race 2 est la plus dominante parmi les isolats algériens testés et que la race 3 (isolats F12 et F20) est également, présente dans notre pays.

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par rapport aux isolats de *Fo* collectés sur la côte méditerranéenne de Turquie (Baysal *et al.*, 2009), où les races 2 et 3 de *Fol* et la forme spéciale *Forl* ont été détectées. Par contre, la race 3 était la plus dominante dans les échantillons turcs. L'existence de la race 3 dans un pays d'Afrique du Nord

comme l'Algérie confirme la distribution mondiale de cette race de *Fol*. Comme l'utilisation du matériel végétale greffé n'est pas une pratique courante en Afrique du Nord, on peut s'attendre à ce que le *Forl* soit très fréquent dans ses zones de culture de la tomate (Hibar *et al.*, 2007 ; Edel-Hermann *et al.*, 2012). Neuf isolats algériens sur 29 analysés dans notre étude, ont été affiliés au *Forl*, ce qui représente seulement 34,5% du total des isolats. Une étude antérieure réalisée avec des isolats de *Fo* de huit pays méditerranéens a montré que tous les isolats algériens de *Fusarium oxysporum* étaient pathogènes sur tomate. Mais, aucun des isolats n'a été scoré SIX1+. Il a été suggéré de ce fait, que ces isolats peuvent être assignés au f. sp. *radicis-lycopersici* (Edel-Hermann *et al.*, 2012). Cependant, nos résultats montrent la présence de *Forl* et de *Fol*, et même différentes races de *Fol* dans une même région, à savoir les isolats F5 (*Fol* race 2), F8 (*Forl*) et F12 (*Fol* race 3) collectés dans la région de Melili (Biskra). Ainsi, les 19 isolats algériens identifiés comme *Fol* dans la présente étude représentent le premier rapport formel de la présence de *Fol* race 2 et race 3 en Algérie.

Une corrélation entre l'identification des races physiologiques de *Fol* et la distribution géographique sur le territoire prospecté a été proposée pour les isolats échantillonnés en Turquie (Baysal *et al.*, 2009). A titre d'exemple, la race 3 de *Fol* et le *Forl* étaient associés aux zones côtières alors que la race 2 était plus fréquente dans les cultures des régions continentales. Notre étude portant sur les six principales zones de production de tomate en Algérie a inclus des isolats *Fo* de 13 sites géographiques, huit situés sur la côte et cinq correspondant à des régions de l'intérieure du pays (Fig. 4). Cependant, cette étude n'a pas révélé de corrélation entre les formes pathogènes et leur distribution géographique. Ainsi, dans les parcelles de l'intérieur du pays et dans une seule localité de culture de la tomate à Melili (Biskra), des isolats ont été identifiés comme *Forl* et d'autres isolats ont été identifiés soit comme race 2 ou comme race 3 de *Fol*. En effet, sept isolats de *Fol* race 2 sur 17 ont été échantillonnés dans la région de Biskra.

Les outils moléculaires basés sur la PCR tels que l'ISSR et la RAPD ont été largement utilisés pour évaluer la variabilité génétique au sein et entre les espèces fongiques. Plusieurs études ont utilisé des marqueurs ISSR pour estimer la variabilité génétique de *Fo* provenant de différentes cultures maraichères (Dubey et Shio, 2008 ; Baysal *et al.*, 2009 ; Edel-Hermann *et al.*, 2012 ; Nirmaladevi *et al.*, 2016). En raison de l'utilisation d'amorces plus longues, 18-24 bases, les marqueurs ISSR seraient plus reproductibles que ceux générés par la RAPD (Godwin *et al.*, 1997).

Dans ce travail, nous avons étudié la diversité génétique de 29 isolats de *Fo* algériens par une analyse des ISSR, en utilisant deux amorces et en incluant deux isolats de référence, à des fins comparatives. Malgré la non-amplification d'aucune bande chez cinq isolats, le polymorphisme global révélé avec ces deux amorces suggère que le niveau de variation génétique parmi les isolats de *Fol* et de *Forl* est important. Ceci est en concordance avec le haut degré de diversité génétique détectée parmi les isolats indiens, en utilisant les mêmes amorces que nous avons utilisé pour notre analyse (Nirmaladevi *et al.*, 2016). En revanche, une faible diversité génétique a été rapportée chez des isolats de la race 2 à Taiwan qui était la race prédominante dans l'étude réalisée par Sheu et Wang (2006). La diversité génétique basée sur la RAPD au sein et parmi les VCG de *Forl* a également été décrite (Balmas *et al.*, 2005). En outre, il a été rapporté que les isolats *Fo* des pays européens sont moins diversifiés que ceux des pays nord-africains. De même, les populations de *Fo* pathogènes sur tomate en Algérie qui comprennent 9 types d'espaceur intergénique (IGS) et 13 groupes de compatibilité végétative (VCG), sont génétiquement plus diversifiés que ceux des autres pays méditerranéens (Edel-Hermann *et al.*, 2012). Cette appréciation est soutenue par le dendrogramme généré dans notre étude, dans lequel la plupart des isolats algériens sont regroupés séparément des deux isolats de référence de *Fol* et de *Forl*.

Dans notre étude de diversité génétique par ISSR, 26 isolats *Fo* ont été distribués sur différents groupes UPGMA. Cependant, ce regroupement n'a pas montré de



corrélation avec l'origine géographique des échantillons, la forme spéciale ou le degré d'attaque induit sur les plants de tomate inoculés. A titre d'exemple, comme indiqué ci-dessus, les races 2 et 3 de *Fol* et les isolats de *Forl* ont été collectés du même endroit. Certaines études ont rapporté une corrélation entre le groupement des isolats *Fo* et les origines géographiques, tandis que d'autres études ont mentionné l'absence d'une telle corrélation. Néanmoins, Baysal *et al.* (2009) ont rapporté une corrélation entre le groupement UPGMA et les conditions climatiques pour les isolats de *Fol* race 3 en Turquie. Cependant, la présence de plus d'une race de *Fo* f. sp. *ciceris* dans les mêmes endroits en Inde a également été signalée (Dubey et Shio, 2008).

Les maladies fongiques deviennent de plus en plus une menace majeure pour la production de la tomate en Algérie. Etant donné que les cultivars résistants ne sont pas toujours disponibles ou utilisés, les traitements chimiques échouent généralement à contrôler le *Fol* et le *Forl* sur le terrain et les agriculteurs eux-mêmes, contribuent à la dissémination de ces agents phytopathogènes (Baysal *et al.*, 2009). En outre, il a été suggéré que de nouvelles formes pathogènes de *Forl* auraient pu évolué à partir de populations locales non pathogènes en Algérie (Edel-Hermann *et al.*, 2012).

En effet, des études antérieures ont attribué des aptitudes de biocontrol aux souches de *Trichoderma* contre le flétrissement fusarien sur différentes cultures, comme la tomate (Cotxarrera *et al.*, 2002 ; Taghdi *et al.*, 2015), le pois chiche (Bouregghda et Bouznad, 2009) et le melon (Martínez-Medina *et al.*, 2014). Récemment, il a été rapporté que deux isolats de *T. harzianum* collectés à l'ouest algérien ont révélé une activité de biocontrol contre la pourriture du collet et des racines de la tomate causée par des isolats de *Forl* algériens (Kerroum *et al.*, 2015). Il s'est bien avéré que les agents de biocontrol isolés d'un sol d'une culture donnée, peuvent être mieux adaptés à cette culture. Ces derniers pourraient assurer une meilleure protection contre les maladies que ceux isolés d'un sol d'autres espèces végétales (Cook, 1993).

Dans cette étude nous avons ciblé des plants de tomate en pépinière et des plants de tomate sous serre à faible incidence de maladie (flétrissement), pour collecter les isolats de *Trichoderma*, selon une approche similaire à celle adoptée par Taghdi *et al.* (2015) au Maroc.

L'espèce la plus fréquemment isolée dans notre étude est *T. asperellum*. Ce constat concorde avec des études antérieures qui décrivent la présence de cette espèce dans les parcelles de culture de la tomate dans d'autres pays d'Afrique du Nord comme l'Égypte (El-Komy *et al.*, 2015) et le Maroc (Taghdi *et al.*, 2015). *T. ghanense*, une espèce de la section *Longibrachiatum*, avec une distribution mondiale (Druzhinina *et al.*, 2012). Cette espèce avait été rarement citée comme agent de lutte biologique. Cependant, en plus de leurs capacités de promoteurs de la croissance des plantes, certains isolats de *T. ghanense* ont montré des potentialités de lutte biologique contre le flétrissement fusarien chez le melon (Martínez-Medina *et al.*, 2014) et la maladie racinaire causée par *Pythium arrhenomanes* chez le riz (Banaay *et al.*, 2012).

Dans notre étude un seul isolat, échantillonné d'une pépinière à Staoueli dans la région d'Alger a été identifié comme *T. ghanense*. Bien que, cette dernière espèce soit signalée pour la première fois en Algérie, l'espèce *T. harzianum* a déjà été identifiée avec *T. longibrachiatum* et *T. atroviride* par Bouregghda *et al.* (2008) et *T. asperellum* avait été signalée par Moumene et Oualha (2017).

Il est évident que les procédures de criblage pour la sélection des agents de lutte biologique doivent inclure des tests *in vitro* et des tests *in vivo*. Ceci est en raison de l'influence des facteurs environnementaux et édaphiques sur les mécanismes d'action mis en évidence chez l'agent antagoniste. Sur la base de la diversité et de l'abondance des espèces de *Trichoderma* identifiées dans notre étude, nous avons sélectionné les isolats T5, T8, T9 et T17 pour effectuer des tests au laboratoire contre deux isolats de *Forl* et deux isolats de *Fol*, afin d'explorer l'activité antagoniste *in vitro*.

Les résultats obtenus ont montré qu'une activité d'antagonisme a été exercée par les isolats de *Trichoderma* T5, T8, T9 et T17 contre les isolats de *Forl* et de *Fol*, par différents mécanismes. Ainsi, les 2 isolats T9 et T17 de *T. asperellum*, ont été capables d'envahir les isolats de *Forl* et de *Fol* et d'inhiber leur croissance. Il est à signaler que les isolats de *T. asperellum* collectés au Maroc n'étaient pas en mesure d'envahir les colonies de *Fol* (Taghdi *et al.*, 2015). Donc, cette aptitude observée chez T9 et T17 contre les isolats de *Fol* et de *Forl* ne doit pas être considérée comme un caractère commun des isolats de *T. asperellum* mais plutôt comme un caractère particulier de ces deux isolats.

D'autre part, l'antibiose est un mécanisme majeur de l'antagonisme chez les isolats de *Trichoderma* qui se sont avérés efficaces contre le *Forl* et le *Fol*. Les résultats des tests sur membranes l'indiquent par la production de composés antifongiques de *Trichoderma* en absence de l'agent pathogène. En effet, les valeurs d'inhibition les plus faibles, sur les 2 membranes, ont été enregistrées avec l'isolat T5. Cela montre que par ses métabolites, l'isolat *T. harzianum* T5 a une faible activité antifongique contre les isolats de *Forl* et de *Fol*. Cependant, nous avons observé des valeurs d'inhibition de la croissance mycélienne de *Fo* qui dépassent 50%, plus importantes dans le test sur membrane de cellulose qui laisse passer les composés de faible poids moléculaire comparativement à la membrane de cellophane. Cette constatation a été observée pour huit des seize combinaisons de *Trichoderma-Fo* testées. Ces résultats révèlent que les isolats de *Forl* et de *Fol* sont à la fois, plus sensibles aux composés de faible poids moléculaire sécrétés par les isolats de *Trichoderma*. Ceci est en accord avec les résultats des études antérieures qui ont montré que les métabolites sécrétés par *Trichoderma* spp. ont un effet majeur dans l'activité antagoniste contre les différents champignons phytopathogènes (Lorito *et al.*, 2010; Taghdi *et al.*, 2015).

En revanche, nous n'avons pas remarqué des différences du potentiel d'antagonisme entre T8, T9 et T17 lorsque des isolats de *Forl* et de *Fol* ont été utilisés comme cibles. Ainsi, ces trois isolats de *Trichoderma* ont été testés pour évaluer leur capacité dans la

lutte contre la pourriture du collet et des racines, et le flétrissement fusarien chez la tomate causés par des isolats de *Forl* et de *Fol*, respectivement.

Les tests *in vivo* réalisés sous serre sur des plants du cv. «SM» sensible aux trois isolats de *Fo*, représentant le *Forl* et le *Fol* ont montré des valeurs d'IM élevées chez les plants non traités avec les spores de *Trichoderma*. Alors que, les valeurs de réduction de l'indice de la maladie (RIM) les plus élevées correspondent à *T. ghanense* (T8) et *T. asperellum* (T9), ce qui dévoile une performance satisfaisante pour la protection de la tomate contre les isolats de *Forl* et de *Fol*. En revanche, les deux isolats T9 et T17 de l'espèce *T. asperellum* ont montré un potentiel antagoniste différent *in vivo*. Ceci montre comment ces mêmes isolats ayant exhibé une activité antagoniste semblable contre les différents isolats de *Fo* dans les tests *in vitro*, peuvent avoir un comportement différent dans les tests *in vivo*.

En effet, l'analyse des résultats des différents tests d'antagonisme *in vitro* obtenus par les trois isolats de *Trichoderma* et leurs comparaisons avec le test de bio-contrôle *in vivo*, n'ont montré aucune corrélation entre les deux tests. Cela, laisse supposer que l'effet du traitement par les agents biologiques sur la réduction de l'incidence de la maladie est influencé par d'autres facteurs. Ainsi, les facteurs de l'environnement et la réaction de la plante elle-même vis-à-vis du traitement peuvent intervenir dans les mécanismes d'action de l'agent antagoniste et le comportement de l'agent phytopathogène.

## Conclusion générale

Dans une première partie de cette étude, des prospections sur terrain ont été réalisées entre 2012 et 2015. Durant cette période nous avons visité les grandes zones de production de la tomate en Algérie, en plein champs et sous serre à savoir : Mostaganem, Tipaza, Alger, Boumerdes, Jijel, Skikda, et Biskra. Le choix des échantillons était basé sur l'observation de symptômes similaires à ceux causés par le *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ou par le *F. oxysporum* f.sp. *radisis-lycopersici* tels que les lésions au niveau du collet, le jaunissement des feuilles et ou le flétrissement des plants. Parallèlement, des échantillons du sol ont été collectés pour l'isolement des espèces de *Trichoderma*. Ainsi, les cultures de tomate saines ou à faible incidence de maladies ont été ciblées. Après isolement et purification, nous avons obtenu 50 isolats de *Fusarium* spp. présentant les caractères morphologiques et microscopiques de *F. oxysporum* et 17 isolats de *Trichoderma* spp.

Des techniques moléculaires ont été appliquées, pour une identification plus précise de l'espèce, des formes spéciales et des races physiologiques de l'agent pathogène. Ainsi, nous avons utilisé en PCR d'abord, le couple amorces POF2-3 spécifique au *F. oxysporum*. Cette analyse nous a permis d'identifier 29 isolats sur 50, comme *F. oxysporum*. Ensuite, nous avons réalisé une PCR en utilisant le couple d'amorce P12-F2B / P12-R1 spécifique au *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. En conséquence, une bande de 992 pb spécifique au *Fol* a été amplifiée chez 20 isolats y compris la souche de référence 4287. Pour l'identification des races physiologiques de *Fol* par PCR, l'utilisation des couples d'amorces SIX3-G121A-F2/SIX3-R2, SIX3-G134A-F2/SIX3-R2 et SIX3-G137C-F1/SIX3-R2, nous a permis de révéler la présence de 2 races de *Fol* en Algérie à savoir, la race 2 représentée par 17 isolats et la race 3 représentée par les 2 isolats F12 et F20.

En outre, l'identification moléculaire des isolats de *Fusarium* associés à la tomate a été appuyée par une étude de la pathogénicité. De ce fait, 2 cultivars de la tomate

ont été inoculés à savoir le cv. Super Marmande sans aucune résistance (sensible au *Fol* et au *Forl*) et le cv. Rio Grande sensible au *Forl* et résistant au *Fol*. Les symptômes induits par les différents isolats ont confirmé l'identification des isolats de *Fol* d'une part, et ont permis d'attribuer 10 isolats, y compris celui de références *Forlc*, au *F. oxysporum* f.sp. *radisis-lycopersici* (*Forl*) d'autre part.

Pour compléter notre étude des isolats de l'agent pathogène identifiés, nous avons examiné la diversité génétique des 29 isolats de *Fo* algériens par ISSR, en utilisant deux amorces et en incluant les deux isolats de référence à des fins comparatives. Ainsi, Une diversité importante entre les isolats a été observée (83,9%). De plus, le polymorphisme global révélé avec ces deux amorces suggère que le niveau de variation génétique parmi les isolats de *Fol* et de *Forl* est important et la plupart des isolats algériens ont été regroupés séparément des deux isolats de référence de *Fol* et de *Forl*. Dans cette étude de diversité par ISSR, 26 isolats *Fo* ont été distribués sur différents groupes UPGMA, mais ce regroupement n'a pas révélé de corrélation avec les origines géographiques des échantillons, la forme spéciale, la race physiologique ou le degré d'attaque induit sur les 2 cultivars de tomate inoculés.

De ce fait, cette étude pourrait s'avérer utile pour d'autres études qui peuvent être menées pour mieux comprendre la dynamique de la virulence et des pathotypes de la population des fusaria de la tomate et faciliter la mise au point de stratégies plus efficaces pour la lutte intégrée contre cette maladie.

La deuxième partie de notre étude consiste à la recherche de l'effet antagoniste de quelques isolats de *Trichoderma* spp. à l'égard des isolats de *Fusarium* associés à la fusariose de la tomate en Algérie. A cet effet, une collection de 17 isolats de *Trichoderma* spp. a fait l'objet d'une identification moléculaire. Le séquençage des régions ITS et du fragment du gène *tef 1alpha*, nous a permis d'identifier 3 espèces au sein de notre collection à savoir, *T. asperellum* représentée par 12 isolats, *T. harzianum* représentée par 4 isolats et *T. ghanense* représentée par un isolat unique. Les résultats

des différents tests de confrontation nous ont permis également, de sélectionner les isolats à effet inhibiteur, les plus performant *in vitro* à savoir, les 2 isolats T9 et T17 de *T. asperellum* et l'isolat T8 de *T. ghanense*. L'efficacité en « bicontrol », des isolats de *Trichoderma* sélectionnés, a été confirmée par le test *in vivo*. Ainsi, une réduction de l'incidence de la maladie de 48,3% et de 53,1%, a été enregistrée par l'isolat T8 contre les deux isolats F42 (*Fol*) et Forlc (*Forl*) respectivement.

En effet, les résultats de la présente étude ont montré la présence de *Forl* mais aussi l'existence des races 2 et 3 de *Fol* en Algérie, ainsi que leur grande diversité génétique. Les résultats soutiennent également, l'hypothèse que les espèces antagonistes autochtones offrent un atout potentiel de lutte biologique contre les agents phytopathogènes. Dans notre cas, les deux isolats de *T. ghanense* et *T. asperellum* ont été appliqués contre des agents de la pourriture des racines et du collet (*Forl*), et le flétrissement fusarien de la tomate (*Fol*).

Bien que, le potentiel d'antagonisme de diverse espèces et isolats de *Trichoderma* varie selon l'agent phytopathogène ; une combinaison d'agent antagonistes microbiens dans une seule préparation pourrait être, plus efficace pour lutter contre un ou plusieurs isolats de *Fol* dans des conditions environnementales et des sols variables. Tout cela fait des espèces de *Trichoderma* locales un moyen adéquat qui peut être programmé dans une stratégie de lutte intégrée contre ces deux maladies très redoutable, surtout lorsqu'elles sont appliquées en association avec du matériel végétal résistant.

En outre, pour mieux exploiter les souches de *Trichoderma* déjà sélectionnées, il est intéressant de mener des études plus approfondies visant à identifier les composés bioactifs impliqués dans l'effet antifongique.