

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH -ALGER

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD en Sciences
Agronomiques

Option : Agro-écosystèmes et stress biologiques

Thème

**Contribution à la recherche des antagonistes du nématode doré
de la pomme de terre : *Globodera rostochiensis* (Wollenweber)
et Evaluation de l'activité nématocide de quelques isolats de
champignons antagonistes à l'égard de ce bioagresseur**

Présentée par : BENTTOUMI Nawal

Soutenue le 29/03/2022 devant le Jury composé de :

Président :	M. BOUZNAD. Z,	Professeur à ENSA- El Harrach (Alger)
Directrice de thèse :	Mme. SELLAMI. S,	Professeure à ENSA- El Harrach (Alger)
Co-directeur de thèse :	M. CIANCIO. A,	Professeur au CNR-Bari (Italie)
Examineurs :	Mme. BENZINA. F,	MCA-Univ. M'hamed Bougara (Boumerdes)
	Mme. DJERROUDI-ZIDANE. O,	MCA-Univ. Kasdi Merbah (Ouargla)
Invitée :	Mme BOUREGHDA. H,	Professeure à ENSA- El Harrach (Alger)

Année universitaire : 2021/2022

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu Dieu, le tout puissant de m'avoir accordé la volonté, la patience, la force et le courage pour achever ce modeste travail et mes chers parents en deuxième lieu pour leur affection inépuisable et leurs précieux conseils et soutien tout au long de mon cursus, qu'ils acceptent l'expression de mon estime et ma profonde gratitude et que dieu les garde et les protège.

Je tiens vivement à exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude à **Monsieur BOUZNAD. Z**, Prof. et Chef de Département (Botanique) à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) pour sa disponibilité, son encouragement, son aide précieuse et pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de soutenance. Qu'il me permette d'exprimer mes remerciements les plus sincères.

Au terme de ce travail, Je tiens à exprimer mes remerciements les plus chaleureux à **Madame SELLAMI. S**, Prof. à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) et ma Directrice de thèse qui a suivi ce travail avec beaucoup d'intérêt, elle a su trouver les mots justes pour m'orienter vers les bons axes de recherche, m'a accompagné et guidé depuis le début.

Son soutien, son affection, sa disponibilité, ses judicieux conseils et sa clairvoyance m'ont été d'une aide inestimable. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect. Mes mots ne seraient jamais à la hauteur de la remercier assez pour son investissement dans ce long travail de thèse.

Mes vifs remerciements vont à **Madame DJERROUDI-ZIDANE. O**, MCA à l'Université Kasdi Merbah d'Ouargla de nous avoir honoré de sa présence et d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Un grand merci à **Madame BENZINA. F**, MCA à l'Université M'hamed Bougara de Boumerdes pour l'honneur qu'elle nous fait en participant à ce Jury et d'avoir accepté d'examiner notre travail de recherche.

Je remercie sincèrement **Madame BOUREGHDA. H**, Prof. à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) pour nous avoir fait l'honneur de participer au jury de soutenance, pour son initiation à l'isolement et à l'identification morphologique des champignons, son aide précieuse, son affection et sa disponibilité.

Mes remerciements les plus chaleureux et gratitude vont à **Monsieur CIANCIO. A**, Prof. et Dr. à l'Institut de Protection des Plantes (IPSP) au Centre National de Recherche (CNR) de Bari, Italie et mon Co-Directeur de thèse pour son accueil très chaleureux au sein de son laboratoire et pour son aide et sa gentillesse durant mon séjour chez lui et tout au long de la réalisation de ce travail.

Un remerciement particulier va à **Monsieur Kedad. A**, Enseignant à l'ENSA pour son initiation à l'isolement et à l'identification morphologique des champignons, sa disponibilité, ses conseils et son aide précieuse.

J'exprime toute ma gratitude et mon estime à **Monsieur Sellami. M**, Prof. au département de zoologie agricole (ENSA) pour son aide précieuse et encouragement, sa disponibilité, son affection et ses conseils judicieux et à **Monsieur Sellam. F**, Enseignant au département de génie rural (ENSA) pour m'avoir efficacement aidé et appris à faire les analyses statistiques ainsi que pour sa disponibilité, sa motivation et encouragement et son humour.

Je remercie tout particulièrement **Madame Benhouhou. S**, Prof. à l'ENSA pour son aide précieuse, sa gentillesse, ses conseils et orientations et son encouragement et **Madame Djebbari. B**, MCB à l'ENSA pour son initiation à la conservation des bactéries et pour sa disponibilité et aide.

J'exprime un vif remerciement aux enseignants de l'ENSA, en particulier **Messieurs Abdelkrim. H, chef de la formation doctorale, Traikia. A, Lehad. A, Benghanem. A.N, Baali-Cherif. D, Mansouri. D, Djili. K et Taoutaou. A et Mesdames Ghat. N, Benslimane. H, Lassouane. N, Laala. S, Boughrarou. F, Farsi. B, Alem. M et notre regrettée Louanchi. M**, pour leur aide et encouragement tout au long de mon cursus.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Madame Colagiero. M.A**, Dr. Au CNR de Bari, Italie pour son aide précieuse dans l'identification moléculaire, sa gentillesse, son assistance et sa disponibilité ainsi que le personnel du laboratoire, particulièrement **Monsieur Greco. N et Madame Finetti Sialer. M**.

Un très grand merci à **Monsieur Vinale. F**, Prof. à l'Université de Naples Federico II, Institut National de Protection des plantes (IPSP), Centre National de Recherche (CNR) de Naples, Italie pour son accueil, sa gentillesse et son aide judicieuse dans l'analyse et la caractérisation des métabolites secondaires ainsi que tout le personnel du laboratoire particulièrement **Lorito .M, Woo. S, Vasetti. A, Staropoli. A, Marra. R, Andolfi. A, Botiglieri. S, Comite. E, Lacomino. G, D'Errico. G, Gioia. L et Lombardi. N.**

Mes remerciements vont aussi à **Madame Cardoza. R.E**, Dr. à l'Université de León, Espagne pour nous avoir fourni la séquence du gène TRI et le programme PCR approprié pour le séquençage des trichotécènes et à **Carro-Huerga. G**, Dr. à l'Université de León, Espagne pour son aide précieuse, son encouragement, ses conseils et son soutien inestimable.

J'exprime également mes sincères remerciements à **tous les techniciens de l'ENSA, les travailleurs et les ingénieurs de laboratoire du département de Botanique** qui m'ont été d'une grande aide pour le bon déroulement des essais. Il m'est particulièrement agréable d'adresser mes remerciements à Karim, Mohamed, Redouane, Fatima, Nesrine, Soumia, Sabrina, Aarbiya, Meriem, Souhila, Hind, Fatiha, Fadila, Samia et Zakia de la DPGR et aux **étudiantes de Madame Sellami**. Je remercie vivement **Messieurs Toumi. M**, pour son aide avec le logiciel Graphprism et **Beninal. L**, du CNCC pour nous avoir fourni les semences de pomme de terre.

J'adresse un remerciement chaleureux à **Monsieur Boukhezzar. A**, pour son soutien, son écoute et sa bienveillance et à **Bouda. C**, pour son affection et encouragement.

A ma chère sœur Lynda et mon cher frère Bilal qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont soutenu jusqu'au bout, que dieu les protège.

A mes tantes, oncles et cousins(es), à la mémoire de mes chers grands parents.

A mes amis(es) et tous mes camarades de promotion.

Ce fut une expérience très enrichissante que je garderai longtemps en mémoire. Une page se tourne mais cette étape de mon parcours professionnel restera toujours comme une très belle période de ma vie, que toute personne m'ayant encouragé et aidé de près ou de loin trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

BENTTOUMI Nawal

Liste des abréviations

- **ACP** : Analyse en composantes principales
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **AFC** : Analyse factorielle des correspondances
- **BCA** : Biocontrol Agents/ Agents de biocontrôle
- **CTAB** : Cetyl trimethylammonium bromide
- **DSA** : Direction des services agricoles
- **ENSA** : Ecole Nationale Supérieure Agronomique
- **F** : *Fusarium*
- **FAO** : Food and Agriculture Organisation/ Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
- **G** : *Globodera*
- **ITS** : Internal Transcribed Spacer/ Espaceur interne transcrit
- **J2** : Juvéniles du 2^{ème} stade
- **Kb** : kilobase
- **MADR** : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
- **NCBI** : National Center of Biotechnology Information/ Centre américain pour les informations biotechnologiques
- **NKPT** : Nématode à kystes de la pomme de terre
- **NPP** : Nématodes phytoparasites
- **OEPP** : Organisation Européenne pour la Protection des Plantes
- **ONU** : Organisation des Nations Unies
- **pb** : Paires de bases
- **PCN** : Potato Cyst Nematodes/ Nématodes à kystes de la pomme de terre
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction/ Amplification en chaîne par polymérase ou réaction de polymérisation en chaîne
- **QTL** : Quantitative Trait Loci/ Locus de caractères quantitatifs
- **SMs** : Métabolites secondaires
- **T** : *Trichoderma*

Liste des figures

Figure 1 : Evolution de la production de pomme de terre et des superficies consacrées à sa culture dans le monde durant la période 2009-2019.....	6
Figure 2 : Evolution de la production de pomme de terre en Algérie durant la période 2009-2019.....	6
Figure 3 : Répartition spatiale de la culture de pomme de terre de saison en Algérie	8
Figure 4 : Répartition géographique de <i>Globodera rostochiensis</i> dans le monde.....	10
Figure 5 : Répartition géographique de <i>Globodera pallida</i> dans le monde	11
Figure 6 : Nématode à kystes <i>Globodera</i> spp. et dégâts occasionnés.....	12
Figure 7 : Aspect microscopique de <i>T. harzianum</i>	23
Figure 8 : Localisation des sites d'étude.....	36
Figure 9 : Fréquence d'occurrence des principaux genres fongiques identifiés.....	46
Figure 10 : Aspect cultural et microscopique de <i>Trichoderma</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Arthrotrichum</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. et <i>Stemphylium</i> sp.	48
Figure 11 : Aspect cultural des isolats bactériens obtenus sur milieu Nutrient Agar (NA).....	52
Figure 12 : Fréquence d'occurrence des espèces fongiques identifiées.....	54
Figure 13 : Projection de la distribution des espèces fongiques isolées avec les régions sur le plan de coordination 1 et 2 de l'AFC.....	55
Figure 14 : Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de <i>F. oxysporum</i> , <i>Gliocladium roseum</i> , <i>Fusarium</i> spp. <i>T. harzianum</i> et <i>T. afroharzianum</i> en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.....	56
Figure 15 : Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de <i>T. harzianum</i> et <i>T. afroharzianum</i> en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.....	56
Figure 16 : Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de <i>T. harzianum</i> , <i>T. afroharzianum</i> et <i>T. hirsutum</i> en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.....	57

Figure 17 : Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de <i>Penicillium</i> sp., <i>Gliocladium roseum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>T. afroharzianum</i> , <i>T. harzianum</i> et <i>T. atroviride</i> en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.....	57
Figure 18 : Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de <i>Fusarium</i> spp., <i>F. oxysporum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>Gliocladium roseum</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Arthrobotrys</i> sp. et <i>F. solani</i> en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.....	58
Figure 19 : Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de <i>T. harzianum</i> , <i>Gliocladium roseum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Fusarium</i> spp., <i>F. solani</i> , <i>Phoma</i> sp., <i>Stemphylium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. et <i>F. avenaceum</i> en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.....	59
Figure 20 : Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir des isolats bactériens <i>Brucella</i> spp., <i>Rhizobium</i> spp., Nadj (non identifié), <i>Bacillus</i> spp. et <i>Stenotrophomonas</i> spp. en utilisant les paires d'amorces 27F et 1492R correspondantes à l'ARNr 16S.....	60
Figure 21 : Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de <i>Trichoderma afroharzianum</i> , <i>T. atroviride</i> et <i>T. harzianum</i> en utilisant les paires d'amorces correspondantes aux gènes de trichothécènes Tri-3 (T3int3 et T3int5), Tri-11 (T11int3 et T11int5b), Tri-12 (T12int5 et T12int3) et Tri-14 (T14int5 et T14int).....	62
Figure 22 : Arbre phylogénétique de <i>Trichoderma</i> spp. construit en utilisant les séquences produites avec les entrées les plus proches extraites de la GenBank.....	64
Figure 23 : Schéma du dispositif expérimental.....	77
Figure 24 : Droites de régression des probits à différentes concentrations de A : <i>T. atroviride</i> Ta.13, B : <i>T. harzianum</i> Th.8, C : <i>T. afroharzianum</i> T22, D : <i>F. oxysporum</i> F.ox, E : <i>Fusarium</i> sp. KM8', F : <i>Fusarium</i> sp. MC18 et G : <i>F. oxysporum</i> K10-3 testées sur la mortalité des larves (J2) de <i>G. rostochiensis</i>	83
Figure 25 : Droites de régression des probits à différentes concentrations de A : <i>T. atroviride</i> Ta.13, B : <i>T. harzianum</i> Th.8, C : <i>T. afroharzianum</i> T22, D : <i>F. oxysporum</i> F.ox, E : <i>Fusarium</i> sp. KM8', F : <i>Fusarium</i> sp. MC18 et G : <i>F. oxysporum</i> K10-3 testées sur l'inhibition de l'éclosion des œufs de <i>G. rostochiensis</i>	86
Figure 26 : Cultures de <i>T. harzianum</i> (Th.8), <i>T. hirsutum</i> (T29) et <i>F. oxysporum</i> (F.ox).....	97
Figure 27 : Protocole d'extraction des métabolites secondaires fongiques	98
Figure 28 : Technique de séparation et de purification des métabolites secondaires fongiques.....	99
Figure 29 : Appareil d'analyse LC-MS qTOF Agilent (6400) - API 3000.....	101
Figure 30 : Extraits bruts des métabolites secondaires de <i>T. harzianum</i> (Th.8), <i>T. hirsutum</i> (T29) et <i>F. oxysporum</i> (F.ox) et révélation des chromatogrammes sous UV.....	103

Figure 31 : Révélation des chromatogrammes des fractions de <i>T. hirsutum</i> (T29) sous UV.....	103
Figure 32 : Révélation des chromatogrammes des fractions de : A. <i>T. harzianum</i> (Th.8) et B. <i>F. oxysporum</i> (F.ox) sous UV.....	104
Figure 33 : Arbre des conditions hiérarchiques sur le rapport entre les espèces : <i>F. oxysporum</i> (F.ox), <i>T. harzianum</i> (Th.8) et <i>T. hirsutum</i> (T29).....	105
Figure 34 : Rapport de l'analyse en composantes principales (ACP) de <i>F. oxysporum</i> (F.ox), <i>T. harzianum</i> (Th.8) et <i>T. hirsutum</i> (T29).....	107
Figure 35 : Structure chimique des métabolites secondaires majeurs purifiés.....	107
Figure 36 : Droites de régression des probits à différentes concentrations des trois extraits fongiques testés sur la mortalité des larves (J2) de <i>G. rostochiensis</i>	113
Figure 37 : Droites de régression des probits à différentes concentrations des trois extraits fongiques testés sur l'inhibition de l'éclosion des œufs de <i>G. rostochiensis</i>	114

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques géo-écologiques des sites d'étude.....	37
Tableau 2 : Origines, cultures et nombre d'échantillons de sol.....	38
Tableau 3 : Gènes TRI cibles des trichotécènes, amorces et séquences utilisées pour l'amplification par PCR.....	45
Tableau 4 : Principaux genres, ordres et familles fongiques isolés.....	47
Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des principaux genres fongiques identifiés.....	49
Tableau 6 : Caractéristiques morphologiques des isolats bactériens obtenus.....	52
Tableau 7 : Isolats bactériens identifiés obtenus à partir des kystes de <i>G. rostochiensis</i>	61
Tableau 8 : Les meilleures correspondances Blast des amplicons séquencés des gènes Tri des isolats de <i>Trichoderma</i> spp.	61
Tableau 9 : Les isolats séquencés et leurs accessions ITS sur la banque de gènes NCBI.....	65
Tableau 10 : Origines des souches fongiques testées contre <i>G. rostochiensis</i>	72
Tableau 11 : Les caractéristiques du nématicide Vydate.....	73
Tableau 12 : Effet des antagonistes testés sur la mortalité des larves (J2) de <i>G. rostochiensis</i>	80
Tableau 13 : Effet des antagonistes testés sur l'inhibition de l'éclosion des œufs de <i>G. rostochiensis</i>	84
Tableau 14 : Effet de <i>T. harzianum</i> (Th.8), <i>F. oxysporum</i> (F.ox) et leur combinaison sur la multiplication de <i>G. rostochiensis</i>	89
Tableau 15 : Inhibition de l'éclosion des œufs de <i>G. rostochiensis</i> par <i>F. oxysporum</i> (F.ox), <i>T. harzianum</i> (Th.8) et leur combinaison.....	90
Tableau 16 : Effet de <i>T. harzianum</i> (Th.8), <i>F. oxysporum</i> (F.ox) et leur combinaison sur la croissance des plants de pomme de terre.....	91
Tableau 17 : Métabolites secondaires caractérisés à partir des extraits bruts de <i>T. harzianum</i> (Th.8), <i>T. hirsutum</i> (T29) et <i>F. oxysporum</i> (F.ox) après analyse LC-MS.....	106
Tableau 18 : Métabolites secondaires de <i>T. harzianum</i> (Th.8), <i>T. hirsutum</i> (T29) et <i>F. oxysporum</i> (F.ox) caractérisés après analyse LC-MS.....	108
Tableau 19 : Effet des métabolites secondaires de <i>T. harzianum</i> (Th.8), <i>T. hirsutum</i> (T29) et <i>F. oxysporum</i> sur la mortalité des larves de <i>G. rostochiensis</i>	111

Tableau 20 : DL50 ($\mu\text{g /ml}$) de l'effet des métabolites secondaires des trois champignons testés sur la mortalité des juvéniles de *G. rostochiensis* après les trois périodes d'exposition.....**112**

Tableau 21 : Effet des métabolites secondaires de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* sur l'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis*.....**115**

Sommaire

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

Introduction	1
---------------------------	----------

Première partie : Analyse bibliographique

Chapitre 1 : Pathosystème Pomme de terre / Nématode à kystes *Globodera* spp..5

1. Généralités sur la culture de pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	5
1.1 Historique.....	5
1.2 Importance socio-économique de la pomme de terre dans le monde et en Algérie.....	5
1.3 Répartition géographique de la culture de pomme de terre en Algérie.....	7
1.4 Aspect phytosanitaire de la pomme de terre en Algérie.....	8
2. Le nématode à kystes <i>Globodera</i> spp.	8
2.1 Généralités.....	8
2.2 Distribution géographique.....	10
2.3 Symptômes occasionnés par <i>Globodera</i> spp. et impact économique.....	10
2.4 Cycle biologique et facteurs de développement.....	12
3. Interactions plantes nématodes	13
3.1 Pouvoir pathogène de <i>Globodera</i> spp.	14

Chapitre 2 : Gestion du Nématode à Kystes de la pomme de terre (*Globodera* spp.)

.....	15
1. Les mesures prophylactiques.....	15
2. Les méthodes culturales.....	16
3. Les méthodes physiques.....	17
4. La lutte génétique.....	18
5. Les méthodes chimiques.....	19
6. La lutte biologique.....	20
6.1 Les champignons antagonistes.....	20
6.1.1 Le genre <i>Trichoderma</i>	22
6.1.2 Le genre <i>Fusarium</i>	28
6.2 Les bactéries nématoparasites.....	30
6.3 Les substances naturelles ou extraits végétaux.....	31
7. La lutte intégrée.....	33

Deuxième partie : Partie expérimentale

Introduction.....	34
Chapitre 1 : Isolement et Identification des antagonistes de <i>G. rostochiensis</i>	35
1. Matériel et méthodes.....	35
1.1 Présentation des sites d'étude.....	35
1.2 Echantillonnage.....	35
1.3 Origine des échantillons.....	38
1.4 Extraction et isolement des nématodes.....	39
1.5 Isolement des champignons antagonistes à partir du sol.....	39
1.6 Isolement des champignons antagonistes à partir des kystes de <i>G. rostochiensis</i>	40
1.7 Repiquage des champignons antagonistes.....	40
1.8 Purification des champignons antagonistes.....	40
1.9 Isolement des bactéries nématoparasites à partir des kystes de <i>G. rostochiensis</i>	41
1.10 Identification des antagonistes obtenus.....	41
1.10.1 Identification morphologique.....	41
1.10.2 Identification moléculaire.....	41
2. Résultats.....	46
3. Discussion.....	65
Chapitre 2 : Evaluation de l'activité nématocide de quelques isolats de champignons antagonistes à l'égard de <i>Globodera rostochiensis</i>	72
1. Matériel et méthodes.....	72
1.1 Test <i>in vitro</i> : Activité nématocide de quelques isolats des champignons antagonistes <i>Trichoderma</i> spp. et <i>Fusarium</i> spp. vis-à-vis de <i>G. rostochiensis</i>	72
1.1.1 Matériel biologique.....	72
1.1.2 Nématocide utilisé.....	73
1.1.3 Préparation des souches fongiques.....	73
1.1.4 Préparation des suspensions de spores fongiques.....	74
1.1.5 Préparation des exsudats racinaires.....	74
1.1.6 Activité larvicide.....	74
1.1.7 Activité ovicide.....	75
1.2 Test <i>in vivo</i> : Effet de <i>T. harzianum</i> (Th.8) et <i>F. oxysporum</i> (F.ox) sur le développement de <i>G.rostochiensis</i>	75
1.2.1 Matériel biologique.....	75
1.2.2 Matériel végétal.....	75
1.2.3 Nématocide utilisé.....	76
1.2.4 Test de pathogénicité de la souche <i>F. oxysporum</i> (F.ox) <i>in vivo</i>	76

1.2.5 Dispositif expérimental.....	76
1.2.6 Analyses statistiques.....	78
2. Résultats.....	78
3. Discussion.....	92
Chapitre 3 : Caractérisation des métabolites secondaires (SMs) de <i>T. harzianum</i> (Th.8), <i>T. hirsutum</i> (T29) et de <i>F. oxysporum</i> (F.ox).....	97
1. Matériel et méthodes.....	97
1.1 Matériel biologique.....	97
1.2 Extraction des métabolites secondaires fongiques.....	98
1.3 Fractionnement et purification des SMs fongiques.....	99
1.4 Analyse et caractérisation des métabolites secondaires par LC-MS.....	100
1.5 Évaluation de l'activité nématocide des SMs fongiques à l'égard de <i>G. rostochiensis</i>	101
1.6 Analyses statistiques.....	102
2. Résultats.....	103
3. Discussion.....	115
Conclusion et Perspectives.....	121
Références bibliographiques.....	126
Annexes	
Publications	
Résumés	

Introduction

Introduction

L'agriculture de par sa dimension pluridisciplinaire est au centre des problématiques de développement rural et de sécurité alimentaire et constitue la base de l'économie. Elle est l'objet de préoccupations multiples d'une multitude de chercheurs de toutes les disciplines, notamment les phytopathologistes qui s'intéressent davantage à la protection de l'environnement et de la santé humaine.

Actuellement, la population mondiale est en constante augmentation et pourrait dépasser les 9 milliards d'habitants en 2050 d'après l'étude World Population Prospects de l'ONU (2019). Face à cet accroissement et en raison des modifications dans les habitudes alimentaires des êtres humains, on estime que la demande en produits agricoles va ainsi augmenter de 50 à 100 % d'ici 2050 (Tilman et *al.*, 2011; Guzman-Guzman et *al.*, 2019). De ce fait, les pressions sur les ressources et les impacts sur l'environnement s'accroissent. Dans ce contexte, de nouvelles formes d'agriculture sont nécessaires pour continuer à produire plus avec moins de produits chimiques. Face à cette demande, de nouveaux moyens pour l'agriculture peuvent représenter une réponse satisfaisante (Faessel et *al.*, 2014).

Les cultures maraîchères représentent une composante indispensable dans les systèmes de culture des pays du bassin méditerranéen. En effet, la pomme de terre est la culture vivrière non céréalière la plus importante et une ressource économique fondamentale pour les agriculteurs dans le monde, avec une production de 370 millions de tonnes pour l'année 2019 sur une superficie cultivée d'environ 17 millions d'hectares (Faostat, 2022). Elle est la troisième denrée alimentaire la plus cultivée au monde après le blé et le riz. Actuellement, l'Algérie occupe le premier rang en matière de rendement de pomme de terre en Afrique (Faostat, 2022).

En Algérie, la culture de pomme de terre occupe une place stratégique dans la nouvelle politique du renouveau agricole et rural et dans l'économie du pays, où elle reste parmi les espèces maraîchères primordiales tant par l'importance qu'elle occupe dans l'alimentation, les superficies qui lui sont consacrées, que par les volumes financiers qui sont mobilisés annuellement pour sa production locale. Cette culture est cultivée sur environ 157864 ha, avec une production de 5020249 tonnes et un rendement annuel de 311 Qx/ha en moyenne (Faostat, 2022).

Néanmoins, la pomme de terre est soumise à l'influence de nombreux bioagresseurs, parmi lesquels le nématode du genre *Globodera* avec les deux principales espèces *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 et *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975, qui constituent les ennemis les plus redoutables et sont responsables des baisses de rendement affectant la productivité agricole de pomme de terre dans le monde entier (Ciancio et Mukerji, 2009 ; Sasanelli et al., 2020).

Ainsi, l'infestation par *Globodera* spp. peut réduire jusqu'à 50 % de la production de cette culture en France (Chauvin et al., 2008) et jusqu'à 80 % dans le globe (Singh et al., 2013; Kooliyotill et al., 2017). Par ailleurs, les dommages peuvent être plus importants du fait que ces nématodes créent des portes d'entrée pour de nombreuses maladies des plantes et jouent un rôle prépondérant dans ce type de synergie et leur présence augmente l'incidence des attaques sur les végétaux (Ciancio et Mukerji, 2008 ; Bjorsell et al., 2017). En effet, les coûts engendrés par les infestations dues à ces nématodes sont imputables à des diminutions importantes des rendements de pomme de terre, soit des millions de tonnes chaque année, occasionnant ainsi plus de 100 milliards de dollars de perte de production annuellement (Singh et al., 2015) et à l'interdiction d'exporter la pomme de terre du fait de leur statut d'organisme de quarantaine (Mimee et al., 2014).

En Algérie, les travaux relatifs à ces bioagresseurs se sont limités à détecter leur présence, l'état d'infestation des parcelles de pomme de terre dans plusieurs zones, variant de 20-100 % et à leur identification (Belhadj- Benyahia, 2007 ; Galfout, 2014 ; Tirchi et al., 2016 ; Mezerket et al., 2018). De ce fait, des études complémentaires sont nécessaires afin de permettre de diminuer l'incidence de ces nématodes en s'étendant plus sur leur gestion.

Le recours aux nématicides à base de fumigants (D.D) et d'organophosphorés (Phénomiphos, Ethoprophos et Cadusaphos) est l'une des méthodes les plus efficaces dans la lutte contre ces nématodes (Abu Gharbieh et al., 2010). Ces derniers présentent des risques assez sérieux pour l'environnement par pollution de l'atmosphère et des nappes phréatiques, déséquilibre de la microflore et de la microfaune des sols et par leur coût élevé et efficacité limitée dans le temps, ainsi, l'application des pesticides a récemment été révisée et des restrictions ont été établies par les législations européennes (Norshie et al., 2016). De même, l'utilisation des variétés résistantes représente la méthode la plus facile à l'emploi or celle-ci est souvent confrontée à l'apparition de populations virulentes qui peuvent contourner la résistance, cette méthode ne peut pas contrôler toutes les espèces, c'est le cas des pathotypes de *G. rostochiensis* et *G. pallida* (Dandurand et al., 2019).

L'emploi de la rotation et des plantes pièges permet la diminution des populations de *Globodera* spp. et pour être efficace, la rotation doit être réalisée sur plusieurs années (minimum sept ans) (Mugnieri et Phillips, 2007). Enfin, les procédés physiques, principalement la solarisation du sol est très peu utilisée en raison du coût élevé et son efficacité est fortement liée aux conditions climatiques (Kerlan et al., 2012).

En effet, compte tenu de l'importance économique considérable des dégâts provoqués par les nématodes à kystes de la pomme de terre et des enjeux environnementaux auxquels l'agriculture mondiale doit faire face aujourd'hui remettant en question les modes de protection conventionnels, la recherche de méthodes alternatives respectueuses de l'environnement s'avère indispensable, permettant une stratégie plus efficace pour le contrôle de ces nématodes et visant la diminution des nématicides de synthèse dans le cadre d'une agriculture durable (Degenkolb et Vilcinskas, 2016).

Ces dernières années, l'accent a été mis sur la protection biologique favorisant la gestion par l'emploi d'amendements organiques (Renco et al., 2011; Mokrini et al., 2018) et des extraits végétaux ou leurs produits dérivés (Sellami et al., 2013; Dandurand et al., 2017), ainsi l'application des microorganismes antagonistes ou de leurs produits (enzymes, antibiotiques et toxines) peut constituer une voie de recherche très intéressante qui répond à ces exigences (Rasmann et al., 2012).

Actuellement, les champignons antagonistes et les bactéries nématoparasites représentent les micro-organismes les plus utilisés et possèdent un intérêt agronomique considérable (Abd-Elgawad et Askary, 2018). En effet, un certain nombre d'espèces fongiques ont été appliquées pour le contrôle biologique des NKPT, tels que *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson, *Arthrobotrys* spp. (Corda) et/ou *Trichoderma* spp. (Persoon) (Lopez-Llorca et al., 2008). L'efficacité de plusieurs champignons antagonistes notamment *Trichoderma* spp. a été rapportée contre les deux espèces du genre *Globodera* (Trifonova et Atanasov, 2011 ; Deravel et al., 2014 ; Contina et al., 2017 ; Benttoui et al., 2020b). Par ailleurs, l'activité nématicide des *Trichoderma* spp. est attribuée particulièrement aux métabolites secondaires comme les trichotécènes ou des métabolites polypeptidiques (Saravanakumar et al., 2017; Salwan et al., 2019), d'où le grand intérêt pour leur exploitation potentielle comme biopesticides et biofertilisants.

Ainsi, l'objectif de notre travail consiste en une contribution à la lutte biologique contre le nématode doré de la pomme de terre par la recherche et la caractérisation des agents antagonistes ainsi que l'évaluation de leur activité nématicide.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre présent travail qui comporte deux parties comprenant plusieurs chapitres. La première est consacrée aux généralités sur le genre *Globodera* et la gestion de ce bioagresseur et les données sur la filière pomme de terre dans le monde et en Algérie.

La deuxième partie où «partie expérimentale» comporte trois chapitres :

Dans le premier est présentée la méthodologie utilisée avec la présentation des sites d'étude, les méthodes de collecte des échantillons de sol, les méthodes d'isolement et de purification des antagonistes microbiens ainsi que leur caractérisation morphologique et moléculaire.

Le deuxième s'est concentré sur l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'activité nématicide de quelques champignons antagonistes à l'égard de *G. rostochiensis*. *In vitro*, sur la mortalité des larves et l'inhibition de l'éclosion des œufs de ce nématode et *in vivo* sur le développement des populations de ce bioagresseur et sur la croissance des plants de pomme de terre.

Cette étude est complétée par la purification et la caractérisation biochimique par LC-MS des molécules actives responsables de l'efficacité contre *G. rostochiensis* et leur test *in vitro* à l'égard des larves et des œufs de ce dernier, cette approche sera présentée dans le troisième et dernier chapitre.

Les résultats obtenus et leurs discussions sont présentés à la fin de chaque chapitre de cette partie expérimentale.

Enfin, ce document s'achève par une conclusion où seront exposés les apports de cette thèse dans la recherche scientifique et les perspectives afin d'établir un programme de lutte approprié contre *Globodera* spp. visant à concilier durablement les performances socioéconomiques, environnementales et sanitaires.

1 ère Partie : Analyse bibliographique

Chapitre 1 : Pathosystème Pomme de terre / Nématode à kystes *Globodera* spp.

1. Généralités sur la culture de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

1.1 Historique

L'espèce *Solanum tuberosum* L., appelée communément pomme de terre, a été décrite en 1753 par Linné. Elle appartient à la famille des Solanacées. C'est une plante vivace dicotylédone herbacée, cultivée pour ses qualités nutritives et pour ses tubercules riches en amidon. La pomme de terre est entrée dans l'histoire il y'a environ 8000 ans dans la cordillère des Andes, à la frontière entre la Bolivie et le Pérou (Spooner et *al.*, 2005).

Au XVI^{ème} siècle, les conquistadores espagnols pensaient amener en Europe de l'or trouvé au Pérou, mais ce qu'ils ramenaient en fait, était de la pomme de terre. Cependant, la date exacte de son introduction n'est pas connue, il est probable que sa première culture sur le vieux continent ait eu lieu vers 1570 en Espagne. Au début du XVIII^{ème} siècle, les émigrants Irlandais apportèrent le tubercule aux Etats-Unis, qui fut dénommé la pomme de terre Irlandaise, au même siècle, cette culture fut plantée en Europe. Ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle, qu'elle ait connu un réel succès, grâce à son rôle déterminant dans la révolution industrielle. En effet, Cet aliment bon marché et abondant convenait parfaitement aux ouvriers (Oswaldo, 2010).

1.2 Importance socio-économique de la pomme de terre dans le monde et en Algérie

La pomme de terre est l'une des principales cultures alimentaires non céréalières mondiales. Cette spéculiation est l'une des productions végétales les plus cultivées et consommées à travers le monde. Actuellement, elle est la troisième denrée agricole produite après le blé et le riz au niveau mondial (FAOSTAT, 2022). Elle est cultivée dans plus de 160 pays, représente une production mondiale de plus de 368 millions de tonnes et elle est cultivée sur une superficie d'environ 17 millions d'hectares (FAOSTAT, 2022, Figure 1).

La chine est le premier grand producteur devant la Russie et l'Inde, avec une production de 91 millions de tonnes sur 5 millions d'hectares pour l'année 2019 (FAOSTAT, 2022), représentant 24,5 % et 27,4 % de la production et de la superficie mondiale respectivement de la culture de pomme de terre.

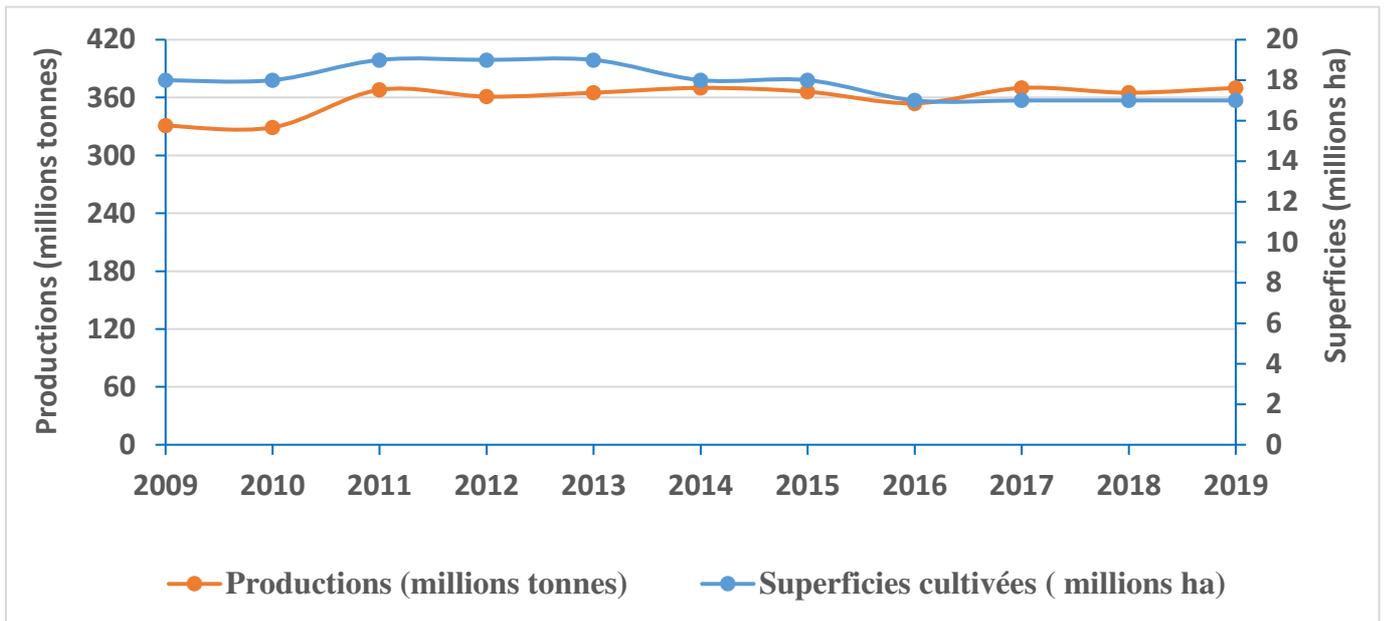


Figure 1. Evolution de la production de pomme de terre et des superficies consacrées à sa culture dans le monde durant la période 2009-2019 (FAOSTAT, 2022).

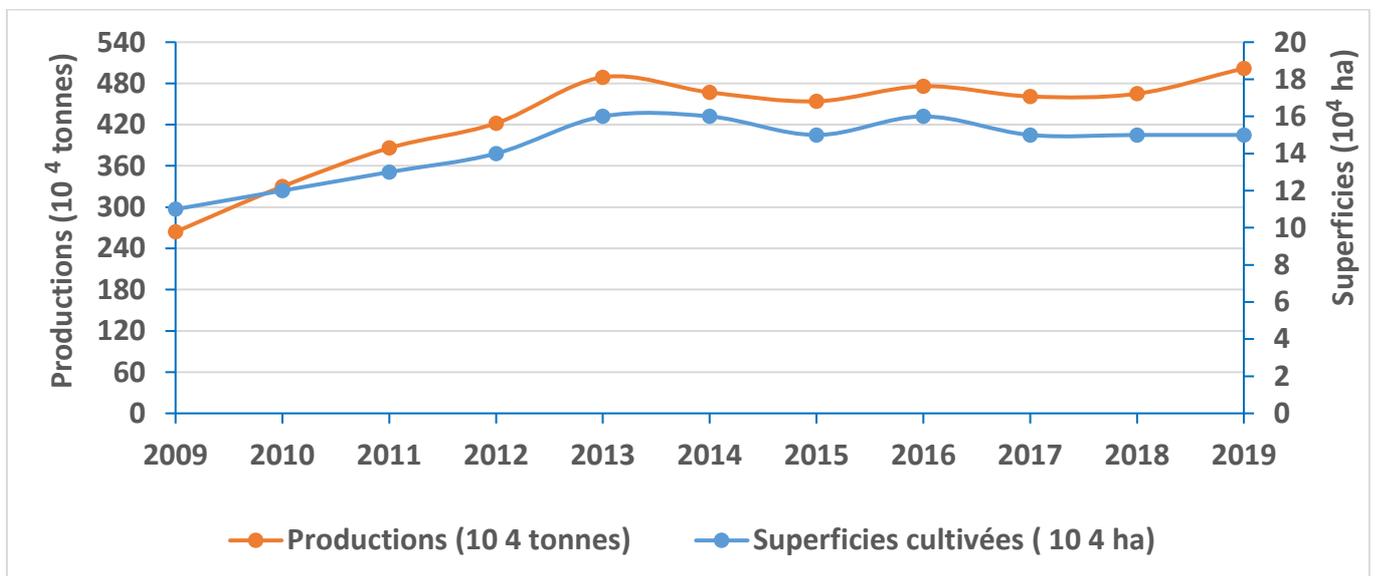


Figure 2. Evolution de la production de pomme de terre en Algérie durant la période 2009-2019 (FAOSTAT, 2022).

L'introduction de cette culture en Algérie remonte au milieu du 19^{ème} siècle, elle a été cultivée principalement pour l'exportation vers le marché français. Actuellement, elle est considérée parmi les principales grandes cultures en Algérie avec une superficie cultivée estimée à 150 milles hectares et une production annuelle de près de 5 millions de tonnes pour l'année 2019, soit 1,3 % de la production mondiale (Figure 2).

En outre, la Pomme de terre constitue l'un des aliments recommandés par les Nations Unies pour atteindre la sécurité alimentaire mondiale. Elle est cultivée pour sa valeur nutritionnelle très importante.

1.3 Répartition géographique de la culture de pomme de terre en Algérie

La Pomme de terre peut être cultivée dans quasiment toutes les régions du territoire national y compris dans les oasis du sud du pays et à n'importe quel mois de l'année pourvu qu'il n'y ait pas de gel et de sécheresse (Omari, 2011).

Ainsi, elle est cultivée selon trois types de cultures, placées en trois groupes de saisons : culture de primeur, de saison et d'arrière-saison (Regueig, 2008).

En effet, cent soixante-neuf (169) variétés sont inscrites au catalogue Algérien des espèces et variétés cultivées. Cette inscription est obligatoire pour leur commercialisation.

Aussi, les caractères d'utilisation, le rendement et le comportement vis-à-vis des parasites sont évalués par le service de Contrôle et de Certification des Semences et des Plants CNCC.

Selon les données de la Chambre Nationale d'Agriculture, les variétés les plus demandées en production sont :

-La catégorie peau rouge : Désirée, Kondor, Stemter, Cardinal.

-la catégorie peau blanche : Spunta, Timate, Diamant, Nicolas, Escort et Apollo.

La répartition géographique de la pomme de terre en Algérie est comme suit (MADR, 2020, Figure 3):

-Hauts plateaux : présentant une superficie de plus de 21000 ha avec une moyenne de 32 % de la superficie totale réservée à la pomme de terre de saison ;

-Plaines intérieures : avec une superficie de 19738 ha, soit 29 % de la superficie totale ;

-Littoral et Sublittoral : avec près de 17228 ha soit près de 25 % de la superficie totale réservée à la pomme de terre ;

-Sud : principalement au bassin d'El Oued, où la pomme de terre est devenue en quelques années une spéculation majeure avec près de 9463 ha soit près de 14 % des superficies totales.

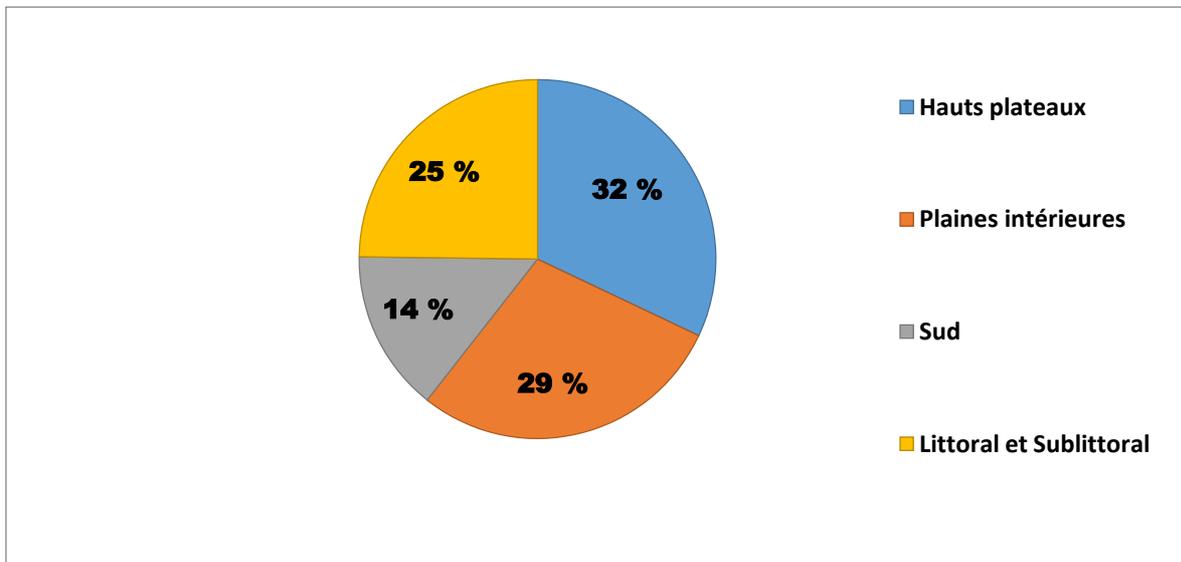


Figure 3. Répartition spatiale de la culture de pomme de terre de saison en Algérie (MADR, 2020).

1.4 Aspect phytosanitaire de la pomme de terre en Algérie

La culture de pomme de terre est attaquée par une multitude de maladies et ravageurs qui peuvent causer des pertes non négligeables sur cette culture dont les plus importants sont consignés dans l'annexe 1.

2. Le nématode à kystes *Globodera* spp.

2.1 Généralités

Les nématodes, du grec *nêmatos*, « fil » et *eidos*, « apparence », sont des organismes vermiformes ronds, fins et non segmentés, à symétrie bilatérale, recouverts d'une cuticule de collagène continue, souple et très résistante. Exceptée leur morphologie très homogène, ils présentent une très grande diversité ; avec un grand nombre d'espèces. Ils comptent 100 à 1000 individus/g de terre soit 1 à 30 millions/m² (biomasse de 1 à 30 g/m²). On peut compter plus de 100 000 individus appartenant à une centaine d'espèces par cm³ (Gobat et *al.*, 2003), les plaçant ainsi au deuxième rang dans le règne animal après les insectes. En effet, leur abondance et leur très grande diversité permet de les caractériser comme indispensables au bon fonctionnement du sol (Riou et Ceremonie, 2017).

Les nématodes suscitent un grand intérêt vus leurs régimes alimentaires très diversifiés. Plus de 4100 espèces de nématodes phytoparasites ont été décrites (Poveda et *al.*, 2020). Les Tylenchida constituent l'ordre le plus important des nématodes phytoparasites, tant en termes de nombre d'espèces qu'en termes de dégâts causés aux plantes qu'ils parasitent. Cet ordre comporte la famille des Heteroderidae responsables des dégâts les plus importants sur les

plantes. Cette famille contient une vingtaine de genres dont les nématodes à galles *Meloidogyne* spp. et les nématodes à kystes des genres *Globodera* et *Heterodera*.

Les nématodes à kystes de la pomme de terre sont des endoparasites sédentaires des racines appartenant au phylum Nematoda et à la famille des Heteroderidae. Ce sont des vers microscopiques caractérisés par un dimorphisme sexuel très prononcé. Ce genre est considéré comme parasite obligatoire de certains membres de la famille des Solanacées dont trois d'intérêt commercial, ce sont la tomate (*Lycopersicon esculentum* M.), l'aubergine (*Solanum melongena* L.) et la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) qui est l'hôte principal (Contina et al., 2017). Ils endommagent les racines de pomme de terre et provoquent ainsi des baisses de rendement considérables et déprécient la qualité des récoltes de cette culture. Ils ont une remarquable capacité à survivre à des mauvaises conditions. Ainsi, ils font l'objet d'une réglementation stricte de quarantaine dans de nombreux pays (OEPP/EPPO, 2009, 2010, 2013).

Le genre *Globodera* a été signalé pour la première fois en 1880 à Rostock, dans le nord de l'Allemagne. En Algérie, ce nématode a été signalé pour la première fois à Alger en 1953 suite à l'introduction de semences de pomme de terre d'origine britannique à la fin de la deuxième guerre mondiale. Une année après, il a été disséminé dans le littoral algérois (Frezal, 1954). Actuellement ce bioagresseur est répandu dans la quasi-totalité des régions à vocation pomme de terre (Tirchi et al., 2016; Mezerket et al., 2018 ; DSA, 2019).

Les nématodes à kystes inféodés à la culture de la pomme de terre ont été longtemps considérés comme une seule espèce : *Heterodera rostochiensis* depuis sa description par Wollenweber en 1923. Des études très précises ont conduit à distinguer deux différentes espèces, qui sont : *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 et *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975, classées dans un nouveau genre : *Globodera*.

La couleur des femelles immatures permet de différencier *G. pallida* et *G. rostochiensis* : à maturité, les deux espèces deviennent marron, mais *G. rostochiensis* passe par un stade doré alors que *G. pallida* passe par un stade blanc, d'où la nomenclature de « nématode doré de la pomme de terre » donné à la première espèce et « nématode blanc de la pomme de terre » pour la deuxième. D'autres différences reposent sur la taille du stylet et la position des boutons basaux. L'identification spécifique est possible par observation de la couleur de la femelle au stade approprié, mais une identification précise doit être faite au microscope.

L'espèce peut être déterminée sur la base de caractères morphologiques (Subbotin et al., 2010). Néanmoins, devant la complexité de la différenciation des espèces de *Globodera* par ces caractères, le recours aux méthodes moléculaires est devenu indispensable (Sirca et al., 2010).

2.2 Distribution géographique

La dissémination des nématodes du genre *Globodera* à travers le monde a suivi la diffusion de la culture de pomme de terre (Chauvin et *al.*, 2008), leur présence est signalée actuellement sur tous les continents sauf en Antarctique. Les deux espèces de *Globodera* diffèrent dans leurs exigences thermiques ce qui affecte leurs distributions géographiques dans le monde (Moxnes et Hausken, 2007).

Selon la base des données de l'OEPP (2022), 74 pays rapportent la présence de *G. rostochiensis* (Figure 4) et 50 présentent *G. pallida* (Figure 5).

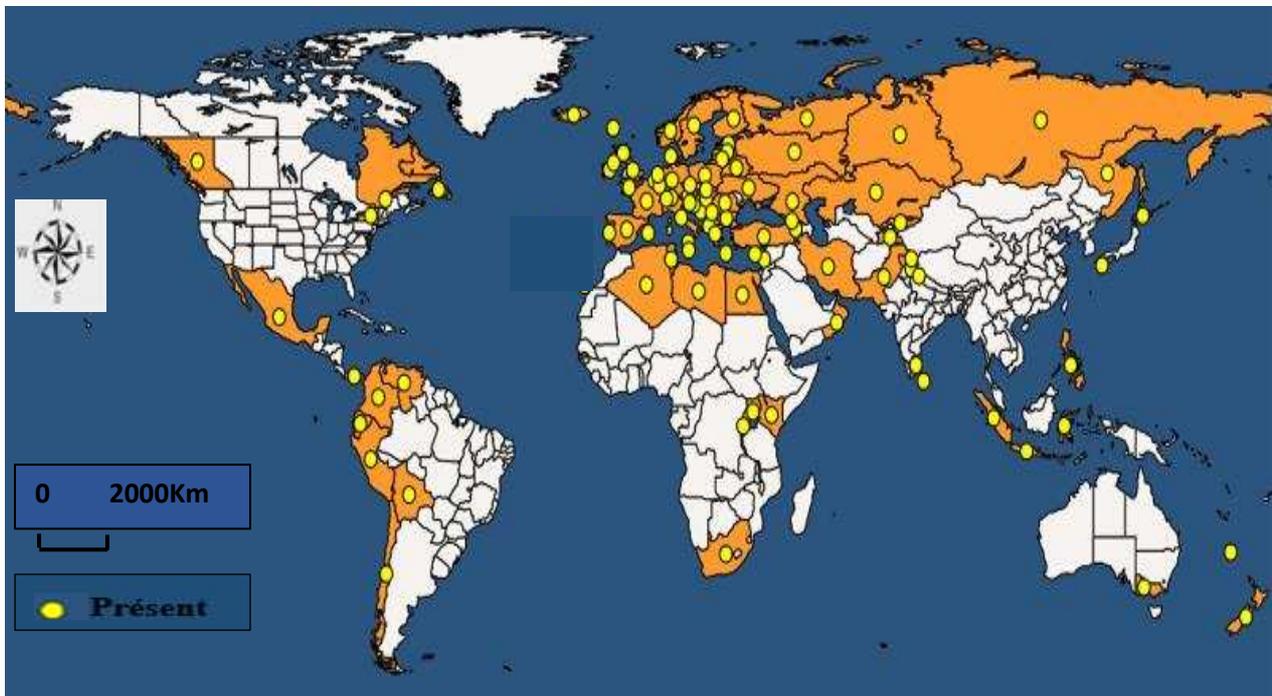


Figure 4. Répartition géographique de *Globodera rostochiensis* dans le monde (OEPP, 2022)

2.3 Symptômes occasionnés par *Globodera* spp. et impact économique

Les attaques du genre *Globodera* sont le plus souvent non spécifiques et facilement confondues avec des symptômes d'origine abiotique ou biotique et sont observables aussi bien sur parties aériennes que sur parties souterraines (Duvauchelle, 2013). En revanche, les lésions causées au système racinaire peuvent aussi ne laisser transparaître aucun symptôme particulier, il est ainsi difficile de deviner la présence de nématodes sans une analyse précise du sol. Toutefois, l'analyse nématologique pour la détection de *Globodera* spp. est indispensable (Coyne et *al.*, 2007).

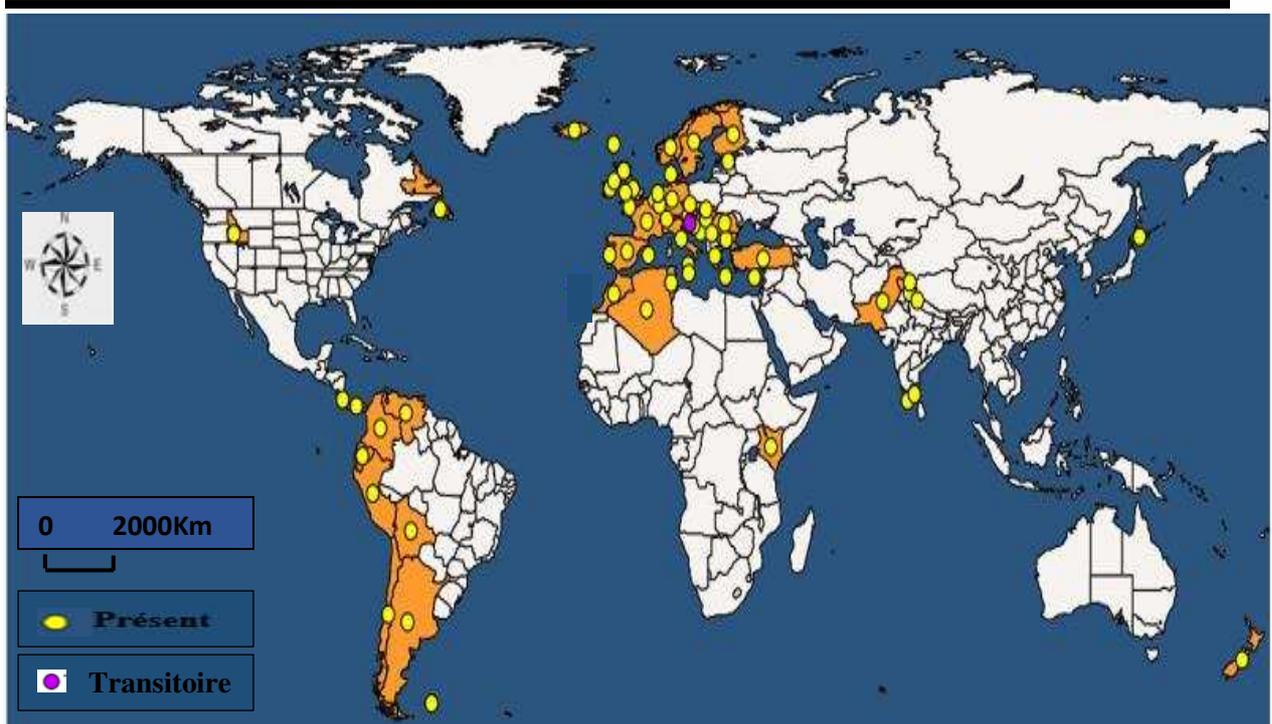


Figure 5. Répartition géographique de *Globodera pallida* dans le monde (OEPP, 2022).

❖ Au niveau des plants

Le NKPT cause des dégâts conséquents sur ses hôtes :

- Le sol et les racines des plants attaqués présentent des femelles de couleur blanchâtre ou jaunâtre et des kystes de couleur brunâtre (Figure 6- B, C).
- La croissance de la plante est entravée, entraînant une déficience hydrique et un dérèglement du métabolisme nutritionnel.
- Les racines brunissent, se ramifient et prennent un aspect buissonnant.
- La croissance de la pomme de terre se ralentie (nanisme). La plante reste chétive et peu productive (floraison et fructification réduites, diminution de la taille des tubercules et baisse du rendement).
- Les feuilles inférieures se fanent et meurent et les feuilles supérieures se décolorent et sont ainsi jaunâtres et flétris.

❖ Au niveau du champ

Les attaques se manifestent sous forme de zones circulaires ou elliptiques dites plages (Figure 6- A), ces zones s'agrandissent à chaque nouvelle plantation de pomme de terre. Par ailleurs, les pertes de rendement dus au NKPT sont importantes, pouvant aller jusqu'à 80 % dans certaines conditions (Singh *et al.*, 2013; kooliyottil *et al.*, 2017).

En effet, selon Turner et Evans (1998), l'incidence de ces nématodes sur les rendements dépend

des densités initiales des populations, elle varie en fonction des conditions climatiques et édaphiques. Ainsi, en Europe, le seuil de nuisibilité de *Globodera* spp. est en moyenne de 3 œufs/g de sol (Seinhorst, 1982). En Italie, il est de 1,7 œuf/g de sol pour *G. pallida*, cependant celui de *G. rostochiensis* est de 1,2-2,1 œufs/g de sol (Greco et al., 1982). En Hollande, Brodie et al., (1993) estiment la limite de tolérance de la pomme de terre à *G. rostochiensis* à 1,5 œuf/g de sol.

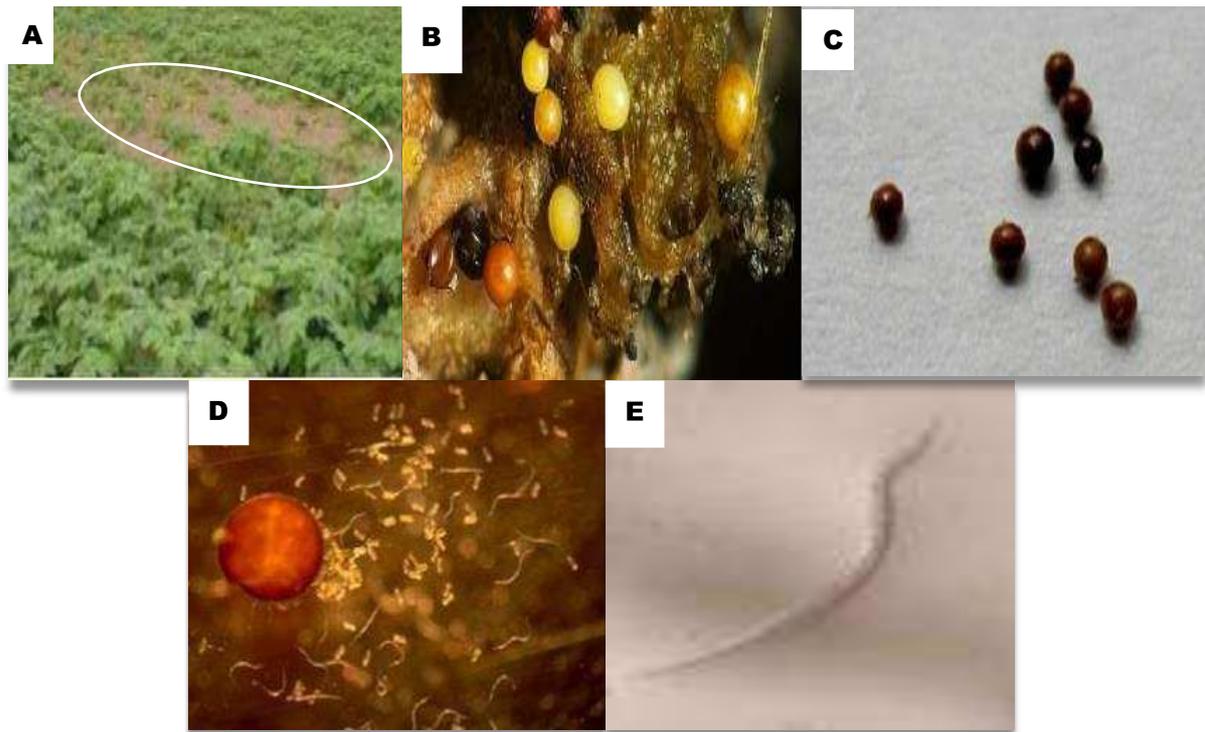


Figure 6. Nématode à kystes *Globodera* spp. et dégâts occasionnés ; **A.** Champ de pomme de terre infesté par les nématodes (*Globodera* spp.) ; **B.** Femelles et kystes de *G. rostochiensis* sur racines de pomme de terre ; **C.** Kystes de *G. rostochiensis* observés sous loupe binoculaire ; **D.** Kyste écrasé, œufs et larves ; **E.** Larve de 2^{ème} stade (J2) (Originales).

Enfin, en Norvège celui-ci est estimé à 1-3 œufs/g de sol pour *G. rostochiensis* (Moxnes et Hausken, 2007). Néanmoins, les NKPT sont régis par des réglementations afin de minimiser les risques de propagation en réponse aux pertes économiques qu'ils occasionnent (Dandurand et al., 2019).

2.4 Cycle biologique et facteurs de développement

Les nématodes du genre *Globodera* sont des endoparasites sédentaires, leur cycle de développement s'effectue dans le système racinaire de la plante hôte et sont caractérisés par un dimorphisme sexuel très prononcé (Annexe 2).

La première mue s'effectue dans l'œuf qui va éclore sous l'action des exsudats racinaires de nature volatile et/ou non volatile émis par la plante hôte pour donner les J2, constituant le stade infestant du nématode. Ils vont se déplacer rapidement dans le sol, pénètrent par la zone d'élongation racinaire et s'installent dans le cylindre central détruisant les cellules corticales, celles-ci se modifient et la lyse des parois situées entre ces cellules entraîne la formation d'un site nourricier, « **le syncytium** ». Les J2 deviennent sédentaires et y passent le troisième et quatrième stade juvénile et atteignent le stade adulte. À maturité, le mâle filiforme va migrer dans le sol, les femelles sédentaires vont faire saillie à la surface des racines, c'est à ce stade qu'elles sont fécondées par les mâles mobiles. Ces derniers sont attirés par les femelles grâce à des phéromones sexuelles sécrétées par la cuticule.

Les œufs se développent à l'intérieur de la femelle fécondée provoquant le gonflement de son corps. Sa cuticule se transforme en une enveloppe protectrice « **le kyste** » qui peut contenir plusieurs centaines d'œufs (200 à 500 œufs) (Evans et Stone, 1977). En effet, le kyste constitue un excellent moyen de dissémination et de conservation de *Globodera* spp. pouvant persister dans le sol pendant 15 à 20 ans (Stone et al., 1973).

Ce nématode n'accomplit qu'une génération par an, cependant, il peut accomplir une 2^{ème} génération dans certaines conditions (Greco et al., 1988). Le cycle complet dure de 38 à 55 jours (Bélaïr et LaPlante 2007). Le développement, la reproduction, la dynamique et la survie des populations de *Globodera* sont régulés par plusieurs facteurs biologiques comme la température, l'humidité et l'eau, nécessaires pour le déplacement des larves et les facteurs édaphiques (Mugniery et Phillips, 2007). Ainsi, les espèces de *Globodera* s'adaptent à une large gamme de textures de sols allant de sableux à argileux (Duvauchelle, 2013). Par ailleurs, les attaques dues à *Globodera* sont plus sévères en sols légers et poreux. Ce nématode peut s'adapter aussi à une gamme de températures assez larges, les larves ne peuvent éclore que lorsque la température du sol dépasse 7 °C, la température optimale pour l'éclosion du kyste est de 15 à 20 °C (Mugniery, 1984).

3. Interactions plantes-nématodes

Les plantes sont exposées en permanence à un large éventail d'agents pathogènes, y compris les nématodes phytoparasites, qui peuvent attaquer presque toutes les parties de la plante et causer des pertes de récoltes estimées à plus de 100 milliards de dollars par an dans le monde (Singh et al., 2015). Ainsi, les plantes ont développé des mécanismes de défense élaborés qui leur permettent de reconnaître les pathogènes. En outre, la coévolution des plantes et des nématodes à kystes

concernant la résistance et le parasitisme a entraîné des adaptations remarquables des cycles de vie de l'hôte et du parasite (Shukla et *al.*, 2016).

3.1 Pouvoir pathogène de *Globodera* spp.

Le pouvoir pathogène du nématode à kystes de pomme de terre se définit par sa capacité à se reproduire sur une plante. La stratégie mise en place par *Globodera* spp. pour parvenir à infecter leur hôte fait intervenir plusieurs processus :

- ✓ Pénétration, migration et dégradation des parois des cellules végétales.
- ✓ Protection du nématode et suppression des défenses de l'hôte.
- ✓ Induction et maintien du site nourricier par manipulation des voies de signalisation de son hôte.

Ces différentes étapes mobilisent les gènes du pouvoir pathogène permettant au nématode de parasiter la plante, de se développer jusqu'au stade adulte et de se multiplier. Une partie de ces gènes code pour des protéines produites au niveau de divers organes de sécrétion, tels que les glandes salivaires, les amphides ou la cuticule (Haegeman et *al.*, 2012) et qui seront déversées dans les tissus de l'hôte. Les protéines sécrétées sont appelées « Effecteurs » et possèdent toutes un peptide signal, c'est-à-dire un chaînon de 15 à 20 acides aminés situé à l'extrémité N-terminale de la forme traduite de la protéine destinée à être sécrétée. Un effecteur est plus précisément défini comme toute protéine ou petite molécule du pathogène qui modifie la structure et la fonction des cellules de l'hôte, entraînant ainsi le déclenchement des différents niveaux de réponse de défense de la plante (Hogenhout et *al.*, 2009).

En effet, le nématode à kystes de la pomme de terre *Globodera* spp. envahit les racines des plantes hôtes où il transforme les cellules près du cylindre vasculaire en un site nourricier permanent. Les modifications des cellules hôtes sont très probablement induites par un mélange complexe de protéines des sécrétions du stylet des nématodes. La résistance aux nématodes conférée par les protéines riches en leucine se liant aux nucléotides (NB-LRR) entraîne généralement une mort cellulaire programmée dans et autour du site nourricier, celle-ci est très probablement déclenchée par la reconnaissance des effecteurs dans les sécrétions des stylets (Postma et *al.*, 2012).

En outre, plusieurs études se sont intéressées en particulier aux sécrétions des nématodes produites au niveau des glandes salivaires et sécrétées via le stylet et ont permis de mieux comprendre leur rôle dans les différentes étapes du parasitisme (Eoche-Bosy et *al.*, 2017; Diaz-Granados et *al.*, 2020).

Chapitre 2 : Gestion du Nématode à Kystes de la pomme de terre (*Globodera* spp.)

De par son statut d'organisme de quarantaine et sa capacité à survivre pour de longues périodes dans le sol en font de *Globodera* spp. un parasite très difficile à éradiquer. En effet, des mesures de lutte obligatoire contre le NKPT existent à l'échelle internationale. L'objectif de la lutte contre ce bioagresseur consiste à réduire ou à maintenir la densité des populations à un niveau inférieur au seuil de nuisibilité pour que la culture ne subisse pas de dommages sérieux (Viaene et al., 2006 ; Djian-Caporalino et al., 2009).

Ainsi, les enjeux environnementaux auxquels l'agriculture mondiale doit aujourd'hui faire face remettent en question les méthodes de lutte conventionnelles. Il est donc urgent de proposer des méthodes de lutte alternatives visant la diminution des nématicides de synthèse en développant des stratégies de gestion efficaces et respectueuses de l'environnement (Zasada et Ferris, 2004). Enfin, la mise au point d'un programme de lutte contre ce parasite doit mettre en œuvre un ensemble de mesures préventives et curatives pour mieux protéger la culture de pomme de terre permettant une production agricole durable et une lutte intégrée contre ce bioagresseur (Pandit et al., 2017).

1. Les mesures prophylactiques

La prophylaxie comprend l'ensemble de mesures préventives à prendre reposant sur un contrôle rigoureux pour empêcher la propagation du parasite et éliminer les sources possibles d'infection. Il est important avant tout d'empêcher ou de limiter la multiplication du nématode et d'éviter la contamination des zones indemnes par :

- ✓ Utilisation de plants certifiés indemnes de ces pathogènes,
- ✓ Nettoyage et désinfection des machines agricoles afin d'éviter les contaminations inter parcelles,
- ✓ Elimination des débris végétaux et des adventices hôtes,
- ✓ Surveillance de la qualité des eaux d'irrigation,
- ✓ Installation des brise-vents afin de minimiser le risque de dissémination par le vent,
- ✓ Sensibilisation et vulgarisation des agriculteurs par la collaboration des différentes institutions et l'utilisation des différents moyens pour mieux gérer l'infestation des parcelles de pomme de terre dans le temps et dans l'espace .

- ✓ Contrôle aux frontières pour éviter l'introduction de nouvelles populations de nématodes.

2. Les méthodes culturales

Ce sont des procédés relativement simples et peu onéreux qui peuvent limiter les dégâts occasionnés par *Globodera* spp., parmi lesquels nous pouvons citer :

❖ Les amendements organiques

L'incorporation des amendements organiques au sol représente un moyen très prometteur dans la gestion des espèces du genre *Globodera*. D'après Jones et Milne (1982), la décomposition de la matière organique dans le sol libère certains produits toxiques tels que l'acide butyrique qui agit négativement sur le développement des nématodes.

De même, les apports de matière organique compostée (végétale ou animale) améliorent le sol, augmentent la tolérance des plantes aux nématodes en stimulant les populations de champignons, de bactéries et d'autres micro-organismes antagonistes (Renco et Kovacik, 2012; Mokrini et al., 2018) et permettent une diminution significative des effectifs de *Globodera* spp. dans le sol (Renco et al., 2011). En effet, l'application d'un mélange de 87,4 % de grignons d'olive, 4 % de paille, 8 % de fumier de poulet et 0,6 % d'urée cause une réduction significative de *G. rostochiensis* ; et l'utilisation d'un mélange de 30 % de boues d'épuration et 70 % de résidus verts donne un meilleur effet suppressif sur la reproduction des femelles de *Globodera* spp. Aussi, l'utilisation de l'engrais vert de blé réduit le nombre de kystes de *Globodera* spp de 50 % et les œufs finaux/g de sol de 81 % (Fatemy et Sepideh, 2016).

❖ La rotation

Elle a pour but d'introduire dans le système culturel des espèces qui ne permettent pas la multiplication du nématode. Il s'agit ainsi d'une alternance judicieuse de plantes non-hôtes à condition de contrôler les repousses de pomme de terre, des rotations de 5 à 8 ans sont préconisées (Trudgill et al., 2003), elles contribuent à la diminution naturelle des nématodes jusqu'à 30 % par an (Duvauchelle, 2013).

L'utilisation des plantes non hôtes (La carotte, le ray gras) réduit les populations de nématodes à kystes de 80 % au printemps, 30 à 33 % en automne et enfin de 50 % en été (Mugniery et Balandras, 1984). Cette pratique reste une méthode efficace contre le genre *Globodera* (Dababat et al., 2007). En revanche, elle doit être réalisée sur plusieurs années (Mugniery et Phillips, 2007).

❖ La jachère

Selon Szilvasis (2013), une jachère doit durer au moins deux ans pour réduire les populations des nématodes à kystes. En Algérie, la jachère estivale détruit 50 % des œufs de *Globodera* spp. Cette technique aboutit à 80 % de réduction annuelle (Mugniery et Balandras, 1984). La diminution des populations du NKPT en l'absence d'un hôte est de 10 % au cours d'une année. Cependant, cette méthode peut entraîner des dégradations de la qualité du sol, telles que la perte de l'azote en profondeur lors de fortes pluies, le tassement du sol voire même des problèmes d'érosion (Dandurand et al., 2017).

❖ Les plantes pièges

La technique des plantes pièges consiste à faire éclore les kystes tout en empêchant la multiplication des larves. Selon Chauvin et al. (2008), cette méthode permet des diminutions des populations de *Globodera* spp. de l'ordre de 70 à 80 %, elle est néanmoins très délicate à appliquer.

Aussi, il est possible de planter des Solanacées sauvages dites plantes « pièges mauvais-hôtes », c'est le cas de la morelle de Balbis : *Solanum sisymbriifolium* Lam. qui est une plante piège prometteuse contre *Globodera* spp. (Kooliyottil et al., 2017). Ainsi, son utilisation a permis des diminutions de 50 à 80 % des populations des kystes de *Globodera* spp. (Duvauchelle, 2013) ; la capacité de *S. sisymbriifolium* à réduire les (J2) de *Globodera* spp. en comparaison avec la jachère a été de l'ordre de 25 à 68 % (Dandurand et al., 2019).

3. Les méthodes physiques

Parmi les procédés physiques les plus utilisés nous citerons :

❖ **La solarisation du sol** : qui consiste à utiliser les radiations solaires capturées sous film plastique et à chauffer le sol en profondeur pour détruire les nématodes. L'efficacité de la solarisation à l'égard de *Globodera* spp. a été rapportée par plusieurs travaux, seule ou en combinaison avec d'autres méthodes de lutte.

En effet, d'après Greco et Brandonisio (2000), une solarisation de 4 à 8 semaines, à une température de 44 °C permet de réduire la reproduction et le nombre de kystes de *Globodera* spp. dans les racines de pomme de terre.

Enfin, El Hajji et Horrigue-Raouani (2012) rapportent que la solarisation permet une réduction de la multiplication de *G. pallida* ainsi qu'une amélioration de la production de pomme de terre. Néanmoins, l'utilisation de ces méthodes physiques est limitée par leur coût élevé et leur efficacité fortement liée aux conditions climatiques (Chauvin et al., 2008; Kerlan et al., 2012).

4. La lutte génétique

Actuellement, les méthodes de lutte les plus prometteuses reposent sur l'utilisation de variétés résistantes suffisamment efficaces et qui peuvent assurer un contrôle durable des populations de nématodes (Castagnone-Sereno et Djian-Caporalino, 2011 ; Castro-Quezada et *al.*, 2013).

La lutte génétique consiste à introduire des gènes de résistance aux nématodes présents dans certaines variétés de plantes afin de maintenir les populations de ceux-ci au-dessous du seuil de nuisibilité sans risque sur les autres constituants de la biocénose. Plusieurs espèces sauvages de la famille des Solanaceae : (*Solanum tuberosum* ssp *andigena* (Juzepczuk & Bukasov) Hawkes et *Solanum vernei* Bitter & Wittm) apparentées à la pomme de terre cultivée ont été identifiées comme sources possibles de résistance aux NKPT. Ces espèces possèdent des allèles qui permettent à la plante de développer deux modes de résistances : la masculinisation et la formation des nécroses au niveau de la racine infectée par le parasite ce qui empêche le développement du site nourricier ou syncytium (Fournet et *al.*, 2011).

Récemment, près d'une vingtaine de locus de résistance au NKPT ont été identifiés dans le génome de la pomme de terre dont certains confèrent une résistance monogénique presque totale contre certains pathotypes. Les gènes de résistance H1 issus de *S. tuberosum* ssp *andigena* (efficace contre Ro1 et 4), H2 (contre Pa1), Gpa2 (contre Pa2 et 3), Gro1-4 (contre Ro1) et GroVI (contre Ro1) provoquent une réaction d'hypersensibilité accompagnée d'une accumulation de lignine autour du syncytium, ce qui empêche le développement du nématode (Finkers-Tomczak et *al.*, 2009). Ce gène H1 pourrait conférer la résistance à *G. ellingtonae* et *G. pallida*, cependant, cette résistance est faible comparativement à celle observée à l'égard de *G. rostochiensis* (Whitworth et *al.*, 2018). D'autres locus présentent une résistance polygénique, tels que les locus H3 (contre Pa2 et 3) ou QTL (Chauvin et *al.*, 2008).

Les progrès récents dans l'étude des NPP rendent possible l'exploitation d'aspects spécifiques de leur relation avec leur hôte afin de mettre au point des stratégies de contrôle. Récemment, Dandurand et *al.* (2019) ont montré que de nouvelles variétés résistantes (des USA) au pathotype Ro2 de *G. rostochiensis* ont été obtenues après plusieurs générations de croisements et de sélections sous les noms de «Upstate Abundance» et « Brodie » respectivement. Cette dernière est aussi partiellement résistante à *G. pallida*, cette résistance est conférée par les gènes GpaIVsadg et Gpa5, elle est plus importante lorsque ces deux gènes sont combinés.

Cependant, l'utilisation des variétés résistantes présente des limites, les sources de résistance utilisées présentent souvent une grande spécificité et ne sont efficaces que contre une espèce, voire une population.

C'est le cas notamment du gène de résistance H1 de la pomme de terre qui ne permet de contrôler que les populations de *G. rostochiensis* du pathotype Ro1 et 4 et non les autres pathotypes de *G. rostochiensis* (Ro2, 3 et 5) ou *G. pallida*. Pour ces derniers, seules des résistances partielles ont été identifiées. En conséquence, il existe des variétés commerciales résistantes à *G. rostochiensis*, mais le cas de *G. pallida* est plus compliqué dans la mesure où il existe que peu de variétés résistantes (Chauvin et al., 2008). En effet, l'utilisation des sources de résistance nécessite de s'assurer de leur durabilité dans le temps, des cas de contournement de résistance ont été recensés, ils favorisent la sélection de populations de nématodes de plus en plus virulentes. De plus, des populations avirulentes peuvent parfois s'adapter aux gènes de résistance et peuvent ainsi devenir virulentes, c'est le cas des populations de *G. pallida* face au QTL de résistance GpaVvrn (Eoche-Bosy et al., 2017) ; une utilisation raisonnée de ces résistances est donc nécessaire afin d'en assurer la durabilité.

5. Les méthodes chimiques

La lutte chimique est l'une des méthodes de lutte classiquement utilisées contre les agents phytopathogènes reposant sur l'application répétée de produits chimiques. En effet, l'emploi des nématicides s'inscrit comme moyen de lutte le plus utilisé et le plus efficace, destinée à réduire les populations de nématodes pouvant aller jusqu'à 80 % pour les nématodes à kyste (Chauvin et al., 2008).

En Algérie, la lutte chimique contre les nématodes est basée sur l'utilisation des nématicides fumigants et des substances endotherapiques (systémiques) (Abu gharbieh et al., 2010) dont plusieurs sont homologués en Algérie (Annexe 3).

Les fumigants comptent parmi les nématicides les plus dangereux, ils agissent par asphyxie contre les nématodes en saturant l'atmosphère et en remplissant les pores du sol. L'efficacité des nématicides comme le 1,3-dichloropropène (1,3-D) et l'isothiocyanate de méthyle (MITC) a été rapportée contre *Globodera* spp., cependant, leur application reste difficile à réaliser et nécessite certaines conditions, ces produits ne sont utilisés qu'avant la mise en place des cultures (Whitehead, 1998).

Les nématicides systémiques sont représentés par les carbamates (Aldicarbe, Carbofuran) et les organophosphorés (Ethoprophos, Phenaniphos, Cadusaphos), agissant par ingestion et désorientation des nématodes, empêchant ainsi leur pénétration dans les plantes hôtes en inhibant la sécrétion de l'acétylcholinestérase (Been et Schomaker, 2000). Ces produits ne nécessitent pas de matériels spécialisés et sont faciles à l'emploi. Ainsi, l'efficacité du Vydate (10 % d'oxamyl) à une dose de 30 kg / ha ou 3L /ha sur une variété de pomme de terre sensible a permis une forte réduction de *G. rostochiensis* (Yamada, 2005).

De même, ce nématicide peut réduire la mortalité des larves de *Globodera* spp. de 80 à 90 % (Blanchard, 2005). L'application du Vydate (240 % d'oxamyl) et du Mocap (10 % d'Ethoprophos) à des doses de 3l/ha et 60 Kg/ha respectivement réduit le nombre des kystes de *G. pallida* et augmente le rendement de la pomme de terre (Galfout, 2014). Enfin, Hajji-Hedfi et al. (2017) montrent que le traitement à l'oxamyl à une dose de 20 kg/ha réduit les populations de *Globodera* spp. aussi bien dans le sol que dans les racines et améliore le rendement de pomme de terre.

Néanmoins, l'utilisation de ces produits chimiques est remise en question du fait des problèmes qu'ils présentent au niveau sanitaire et environnemental (Dandurand et Knudsen, 2016). De plus, si ces intrants chimiques ont longtemps été loués pour leur capacité à contrôler les bioagresseurs, des exemples de plus en plus nombreux d'apparition de résistances face à de diverses molécules chimiques ont été rapportés. Pour ces raisons, les pesticides font face à une défiance accrue de la part de l'opinion publique et leur utilisation est également soumise à une réglementation de plus en plus restrictive conduisant ainsi les industriels à privilégier des méthodes de lutte alternatives (Pandit et al., 2017).

6. La lutte biologique

La lutte biologique a été décrite par l'Organisation Internationale de Lutte Biologique (OILB) comme : « L'utilisation d'organismes vivants ou d'ennemis naturels tels que les parasitoïdes, les prédateurs, les pathogènes, les antagonistes ou les compétiteurs pour prévenir ou réduire les dégâts causés aux cultures par les ravageurs et pour contrôler des populations d'espèces nuisibles et les maintenir en dessous d'un seuil de nuisibilité » (Suty, 2010).

Sikora (1992) a suggéré le terme « potentiel antagoniste » pour tous les parasites, prédateurs, compétiteurs et autres organismes du sol pouvant parasiter, repousser, inhiber ou tuer les NPP, ces organismes sont appelés « antagonistes des nématodes ». Les champignons et les bactéries sont numériquement les organismes les plus abondants dans le sol (Abd-Elgawad et Askary, 2018).

6.1 Les champignons antagonistes

Les agents de lutte biologique les plus prometteurs et les plus régulateurs des densités de NPP dans le sol sont les champignons antagonistes (Moosavi et al., 2015). Plus de 700 espèces ont été décrites (Zhang et al., 2011). Ils désignent un groupe diversifié de champignons qui colonisent et parasitent les nématodes pour l'exploitation de substances nutritives, ce qui leur procure un grand potentiel pour leur développement comme agents de biocontrôle (Nordbring-Hertz et al., 2011).

Les champignons antagonistes des nématodes se retrouvent dans la plupart des taxons fongiques (Annexe 4), y compris les Ascomycètes (Orbiliaceae asexués et Clavicipitaceae), Basidiomycètes (Pleurotaceae), Zygomycètes (Zoopagales), Chytridiomycètes et Oomycètes (Fungi-like) (Moosavi et Zare, 2012). Traditionnellement, les champignons nématophages ont été assignés aux genres sur la base de la morphologie de leurs conidies et conidiophores : la forme, la taille et la septation des conidies, le degré de ramification des conidiophores et la présence de denticules, de branches et de modifications à la pointe du conidiophore, étant les caractères taxonomiques les plus importants (Stirling, 2014).

Actuellement, ils sont classés selon leur mécanisme d'infection en quatre principaux groupes (Nordbring-Hertz et al., 2006; Zhang et al., 2011) :

(1) **Les champignons prédateurs des nématodes** (environ 380 espèces) : Ils sont caractérisés par l'utilisation de dispositifs de piégeage et de capture spécialisés (anneaux constricteurs, boutons adhésifs), le nématode se retrouve immobilisé dans le réseau mycélien. C'est le cas des genres : *Arthrobotrys*, *Dactylella* ou *Dactylaria*. La formation du piège par les champignons prédateurs est un indicateur important de leur passage de l'état saprophyte à la phase prédatrice (Yang et al., 2011). Ce sont les *Arthrobotrys* spp. qui ont fait l'objet de nombreux travaux et même de commercialisation, leur efficacité est connue essentiellement vis-à-vis des *Meloidogyne* (Cayrol et al., 1992). Li et al. (2015) rapportent le piégeage des *Globodera* par *A. irregularis* et *A. ovoformis*.

(2) **Les champignons endoparasites** (environ 120 espèces) : Ce sont des pathogènes obligatoires qui passent leur cycle de vie à l'intérieur des hôtes infectés (Lopez-Llorca et al., 2008), ils ont généralement une large gamme de nématodes hôtes (Moosavi et Zare, 2012). Ils agissent en utilisant les appressoria pour pénétrer la cuticule de l'hôte ou les spores (conidies ou zoospores) qui sont injectés à travers cette dernière. Parmi ces champignons nous citons : *Drechmeria coniospora* (Drechsler) Gams & Jansson, qui forme un grand nombre de conidies pouvant arriver à 10 000 et *Hirsutella rhossiliensis* Minter & Brady qui sporule isolément, produisant de 100 à 1000 conidies par nématode infecté.

(3) **Les champignons parasites des œufs et des kystes** : Ces champignons pénètrent la cuticule des œufs et digèrent ensuite leur contenu (juvéniles) ; ils ont la propriété de tuer les nématodes. Parmi ces champignons, nous citons *Paecilomyces lilacinus* (syn. *Purpureocillium lilacinum*) (Thom) Samson et *Verticillium chlamydosporium* (syn. *Pochonia chlamydosporia*) (Goddard) Zare & Gams, ils s'attaquent aussi bien aux œufs du genre *Meloidogyne* qu'à ceux des genres *Heterodera* et *Globodera* (Cayrol et al., 1992).

Paecilomyces lilacinus est l'un des champignons les plus étudiés dans la lutte biologique contre ces nématodes, il est particulièrement connu pour avoir des activités ovicides. L'application de ce champignon avec *V. leptobactrum* réduit les populations de *Globodera* respectivement de 76 à 83 % dans les racines et de 61 à 66 % dans le sol (Hajji et al., 2016).

(4) **Les champignons producteurs de toxines** (environ 270 espèces) : Ce sont des champignons qui ont la capacité de produire des métabolites toxiques vis-à-vis des nématodes. Ils peuvent coloniser les structures de reproduction des nématodes et avoir la capacité d'affecter gravement leurs capacités reproductives (Siddiqui et Mahmood, 1996 ; Yang et Zhang, 2014). Plusieurs composés nématocides ont été identifiés à partir des champignons, parmi ces composés nous pouvons citer : les alcaloïdes, les composés peptidiques, les composés aliphatiques, les quinones, les composés aromatiques simples et les stérols (Zhang et al., 2011). *Fusarium* spp. et *Trichoderma* spp. provoquent un effet inhibiteur sur la multiplication de *G. rostochiensis*, ils produisent des substances toxiques qui affectent les capacités du nématode et des exsudats racinaires, qui contrôlent l'attraction des juvéniles et la pénétration dans la rhizosphère (Djian- Caporalino et al., 2009).

6.1.1 Le genre *Trichoderma*

Ce sont des champignons filamenteux connus par leur croissance rapide et leur sporulation abondante, ce qui fait qu'ils ont un pouvoir compétitif élevé. Ce dernier, en interaction avec leur grande production de métabolites secondaires actifs leur confère le pouvoir de survivre dans différents habitats tout en affectant les autres organismes vivants dans leur niche écologique (Suty, 2010).

Le genre *Trichoderma* (téléomorphe : *Hypocrea*) est rattaché au phylum des Ascomycota, classe des Sordariomycètes, ordre des *Hypocreales* et à la famille des *Hypocreaceae*. Ce genre regroupe un ensemble d'espèces saprophytes qui vivent couramment dans le sol, sur les bois morts et les débris végétaux (Prasun, 2013).

En outre, les *Trichoderma* spp. stimulent la croissance des plantes et sont employées commercialement comme biopesticides et biofertilisants dont le spectre d'activité optimal varie entre 18 et 25 °C (Dubey et al., 2007). Ce genre est le plus isolé et le plus présent dans la rhizosphère des plantes (Harman et al. 2004 ; Vinale et al., 2009). Les champignons du genre *Trichoderma* ont été utilisés comme agents de lutte biologique contre un large spectre d'agents phytopathogènes (Druzhinina et al., 2011; Vinale et al., 2016 ; Contina et al., 2017), ainsi, plusieurs espèces ont été testées pour leur activité nématocide à l'égard des œufs et des larves des NPP (Sharon et al., 2001; Trifonova, 2010; Khan et al., 2020).

Le genre *Trichoderma* est facilement reconnaissable en culture grâce à la couleur généralement verte de ses spores (Dubos, 1986 ; Schuster et Schmoll, 2010). Il est caractérisé par des conidiophores fortement ramifiés selon une structure pyramidale (Figure 7) se terminant par une ou plusieurs phialides. Ces dernières peuvent être cylindriques ou subglobuleuses, solitaires ou regroupées en masse. Les conidies sont hyalines, ellipsoïdes et lisses chez la plupart des espèces et rarement globuleuses (Figure 7). Certaines espèces peuvent produire des chlamydospores globuleuses intercalaires ou terminales (Samuels et *al.*, 2006). Le système de ramification des conidiophores est hautement variable et dans certains cas, il peut ressembler superficiellement aux genres *Verticillium* ou *Gliocladium* (Gams et Bissett, 1998).

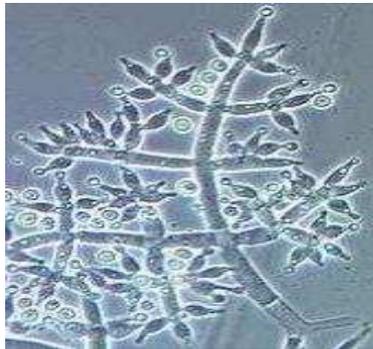


Figure 7. Aspect microscopique de *T. harzianum*, conidiophores, phialides et conidies.

Ce genre avait été proposé à l'origine par Persoon en 1794, mais l'identification de ses espèces est restée incertaine jusqu'à ces dernières années.

-En 1865, une relation vers le stade parfait des espèces du genre *Hypocrea* avait été suggérée par les frères Tulsane, ils ont suggéré que *Hypocrea rufa* est le stade parfait de *T. viride* (Hoyos-Carvajal et Bissett, 2011).

-Gilman et Abbott (1927), ont décrit 4 groupes bien définis parmi les isolats de *Trichoderma*, mais en reconnaissant uniquement 3 espèces dont deux sont considérées actuellement comme synonymes de *T. viride* (Druzhinina et *al.*, 2006).

-Bisby (1939), a réduit toutes les espèces décrites de *Trichoderma* en une seule espèce. Il a suggéré que les variations morphologiques sont attribuées à une seule espèce, *T. viride* (Harman et Kubicek, 2002).

Ce système avait été adopté jusqu'à 1969, où Rifai (1969), en révisant la taxonomie de *Trichoderma* a subdivisé ce genre en 9 groupes d'espèces agrégées : *Trichoderma piluliferum* (J. Webster) Rifai, *T. polysporum* (Link) Rifai, *T. hamatum* (Bonord) Bainier, *T. koningii* Oudem, *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, *T. viride* Persoon.

Ensuite, Bissett (1984, 1991a, b, c), a considéré chaque groupe d'espèces comme une section et a reconnu ainsi 5 sections, dans chacune, il a identifié deux à plusieurs espèces, pour un total de 27 espèces. Les sections proposées par Bissett sont : *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporum*, *Pachybasium* et *Hypocreanum*.

Bissett (1991c) a conclu que la détermination des espèces chez le genre *Trichoderma* ne peut être résolue sans une intégration des études morphologiques, moléculaires et biologiques. L'intégration de ces études avait été exploitée en premier par Samuels et al. (1998) ; qui ont résolu l'identité de 10 espèces de la section *Longibrachiatum* en se basant sur la morphologie du téléomorphe et de l'anamorphe et sur les séquences nucléotidiques des ITS. Depuis, les analyses moléculaires sont devenues essentielles pour la délimitation de nouvelles espèces et pour la détermination des téléomorphes (Bissett et al., 2003). Ainsi, l'introduction des méthodes d'évolution moléculaire a entraîné une expansion exponentielle de la taxonomie de *Trichoderma*, avec jusqu'à 50 nouvelles espèces reconnues par an. Selon Bissett et al. (2015), il existe plus de 260 espèces de *Trichoderma*.

Samuels et al. (2012) ont révisé le clade *Longibrachiatum*, huit nouvelles espèces ont été décrites, il s'agit de *T. aethiopicum* Mulaw, C.P. Kubicek & Samuels, *T. capillare* Samuels & C.P. Kubicek, *T. flagellatum* Mulaw, C.P. Kubicek & Samuels, *T. gillesii* Samuels, *T. gracile* Samuels & Szakács, *T. pinnatum* Samuels, *T. saturnisporopsis* Samuels & Jaklitsch et *T. solani* Samuels.

De même, 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 biocontrôle (BCA) de *T. harzianum* n'appartient à *T. harzianum sensu stricto*. De ce fait, l'agent de lutte biologique bien connu sous le nom *T. harzianum* T22 a été identifié comme *T. afroharzianum*. Vingt-trois nouvelles espèces ont été décrites par Chen et Zhuang (2017) dont *T. hirsutum* K. Chen & W.Y. Zhuang. Aussi, cinq autres nouvelles espèces ont été décrites par Du Plessis et al. (2018), *T. beinartii* Du Plessis, Druzhin., Atan., Yarden & K. Jacobs, *T. caeruleimontis* Du Plessis & K. Jacobs et *T. chetii* Du Plessis, Druzhin., Atan., Yarden & K. Jacobs ont été attribué au clade *Longibrachiatum*, *T. restrictum* Du Plessis & K. Jacobs a été signalée comme membre du clade *Hamatum*, tandis que *T. undulatum* Du Plessis & K. Jacobs occupe une lignée distincte des autres espèces de *Trichoderma*. Une étude récente a porté sur l'analyse génomique d'une souche de biocontrôle anciennement connue sous le nom de *T. harzianum* ITEM 908 et qui a été renommé comme *T. atrobrunneum* du complexe des espèces de *T. harzianum* (Fanelli et al., 2018).

Actuellement, une identification plus fiable de nouvelles espèces a été facilitée par le développement des programmes ("Oligonucléotide barcode program"): TrichoKEY et

TrichoBLAST (Cai and Druzhinina, 2021), permettant de comparer une séquence Rpb2, prétraitée dans TrichoMARK avec les séquences de référence de *Trichoderma*. Ces derniers auteurs ont revu la taxonomie de *Trichoderma* à l'échelle du genre et dressé un inventaire complet de toutes les espèces de ce genre, parmi les 375 espèces ayant un nom valide en juillet 2020, 361 (96 %) ont été cultivées *in vitro* et ont reçu un code-barres ADN.

***Modes d'action de *Trichoderma* spp.**

Les propriétés antagonistes du genre *Trichoderma* ont été mentionnées pour la première fois par Vuillemin en 1887 et ce n'est qu'en 1971 que Dennis et Webster ont pu élucider les différents mécanismes d'action de ce champignon. Depuis, les recherches portant sur *Trichoderma* se sont multipliées (Lamy Krafft et Roquebert, 1981).

L'activité de biocontrôle de *Trichoderma* spp. contre les nématodes phytoparasites est exploitée par différents mécanismes. Ces derniers incluent principalement le parasitisme, la sécrétion de métabolites secondaires volatils ou non volatils toxiques pour les nématodes, la compétition, la promotion de la croissance des plantes et l'induction de la résistance de ces dernières contre les nématodes. Concernant le parasitisme, *Trichoderma* attaque les œufs, les juvéniles de deuxième stade (L2) et les adultes de NPP en dégradant leurs parois cellulaires par mécanisme de lyse enzymatique (sécrétion des chitinases, glucanases, cellulases et protéases) permettant la pénétration des hyphes, la colonisation et le début de l'activité parasitaire. En outre, la matrice gélatineuse qui enveloppe les œufs joue un rôle essentiel pour la fixation du mycélium de *Trichoderma* à ces derniers (Sharon et al., 2007, 2011 ; Keswani et al., 2013).

Trichoderma peut rentrer en compétition avec le nématode pour les nutriments et l'espace (Hussey et Roncadori, 1978), coloniser les racines et favoriser la promotion de la croissance des plantes par production de phytohormones. Ce champignon peut également induire la résistance systémique contre les nématodes (Sharon et al., 2011 ; Hermosa et al., 2012). Ces mécanismes sont utilisés indépendamment ou en synergie (Samuels, 1996 ; Suty, 2010).

***Potentialités antagonistes de *Trichoderma* spp.**

❖ Activité fongicide

Les potentialités fongicides des *Trichoderma* ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche contre les champignons phytopathogènes tels que les genres : *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* et *Botrytis* (Harman, 2006 ; Mouria et al 2013 ; Vinale et al., 2014 ; Baiyee et al., 2019). En Algérie, l'efficacité de plusieurs espèces de *Trichoderma* ont été signalées à l'égard des champignons ayant une importance économique, c'est le cas des *Fusarioses* sur pois chiche, épi de blé et tomate (Bouregghda et Bouznad , 2009 ; Bouregghda et Renane, 2011 ; Debbi et al., 2018) , *Phytophthora infestans* sur pomme de terre (Kerroum et al., 2015),

Ascochyta rabiei sur pois chiche (Benzohra et al., 2016) et de *Botrytis cinera* sur fève, vigne et tomate (Bendehmane et al., 2012 ; Louanchi et al., 2017 ; Laib et al., 2020).

❖ **Activité insecticide**

La mise en évidence de l'effet insecticide du genre *Trichoderma* est très restreinte. Ainsi, l'application de *T. harzianum* à l'égard des larves d'*Helicoverpa armigera* H. (Lépidoptère : *Noctuidae*) ainsi que l'effet de *T. harzianum* et *T. gamsii* Samuels & Druzhinina sur les œufs et les larves de *Xylotrechus arvicola* O. (Coléoptère : *Cerambycidae*) ont été rapportés (Binod et al., 2007., Rodríguez-González et al., 2018). De même, Fernández-Daza et al. (2019) ont rapporté l'effet bioinsecticide des spores de *T. lignorum* (souche ATCC 8751) à l'égard d'*Atta cephalotes* L. (Hyménoptère : *Myrmicinae*). Enfin, l'extrait fongique de *Trichoderma* spp. à une concentration de 0,4 µg/ml s'est avéré efficace contre *Locusta migratoria* L. (Orthoptère : *Acrididae*) (Laib et al., 2020).

❖ **Activité nématocide**

L'évaluation de *Trichoderma* comme agent potentiel contre les nématodes a également fait l'objet de nombreux travaux. Les espèces de ce genre ont été testées sur les nématodes à galles et à kystes et ont montré une efficacité envers les différents stades de ces derniers (Sharon et al., 2001). Ainsi, Abd-Elgawad et Kabeil (2012) ont montré le rôle des isolats de *T. harzianum* dans le biocontrôle de *Meloidogyne incognita* (Kofold & White) Chitwood infectant la tomate et ont signalé leur activité enzymatique et leur rôle dans l'induction de la résistance. La capacité de *T. harzianum* à coloniser les masses d'œufs et les juvéniles du deuxième stade (J2) de *M. javanica* (Treub) Chitwood *in vitro*, à réduire l'indice de galles de *M. incognita* sur plants de tomate, à stimuler leur croissance et à augmenter leur rendements sous serre a été rapportée par Zaidi et Singh (2013). L'évaluation sous abri plastique de *T. harzianum* et *T. viride* à différentes densités a entraîné une réduction de la reproduction et de l'indice de galles de *M. javanica* et a permis l'augmentation de la croissance des plants de tomate (Javeed et Al Hazmi, 2015).

Récemment, en Algérie Sellami et al. (2017) ont signalé l'efficacité des filtrats de culture de *T. atroviride* et *T. harzianum* sur la mortalité des larves et l'inhibition de l'éclosion des œufs de *M. incognita*. Par ailleurs, d'autres études rapportent l'efficacité de ce champignon à l'égard du genre *Globodera*. Ainsi le traitement du sol par *Trichoderma* spp. a causé une réduction des populations de *G. rostochiensis* de l'ordre de 36 à 44 % (Trifonova, 2010). Ce même auteur rapporte l'amélioration de la croissance et du rendement des plants de pomme de terre de 6,6 %. Par ailleurs, l'application au sol de *T. harzianum* a réduit le taux de reproduction de *G. pallida* de 42 à 47 % et de 49 à 60 % respectivement (Dandurand et Knudsen, 2016 ; Contina et al., 2017).

❖ **Activité herbicide**

Selon Prasun (2013), les espèces du genre *Trichoderma* sont capables de produire des substances ayant un effet herbicide. Ainsi, le potentiel herbicide des filtrats de culture de *T. harzianum*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei* E.G. Simmons et *T. viride* à l'égard de *Phalaris minor* L. (Poaceae) et *Rumex dentatus* L. (Polygonaceae) a été signalé par Javaid et Ali (2011). De même les potentialités herbicides des métabolites produits par *T. longibrachiatum* (Tr673), *T. harzianum* (Tr319), *T. viride* (Tr347) *T. koningii* (Tr324) et *T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg (Tr85) à l'égard des semences de *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae), *Echinochloa crus-galli* L. (Poaceae) et *Amaranthus retroflexus* L. (Amaranthaceae) ont été rapporté par Kuang et al. (2016). Récemment l'efficacité de *T. harzianum*, *T. viride* et *T. vierns* contre *Orobanche crenata* F. (Orobanchaceae) sur fève a été rapportée par El Dabaa et Abd-El-Khair (2020).

***Les biopesticides à base de *Trichoderma* spp.**

Plusieurs isolats de *Trichoderma* ont été largement étudiés grâce à leur capacité à contrôler les maladies et ravageurs des plantes, divers produits à base de *Trichoderma* spp. sont maintenant commercialisés comme biopesticides et biofertilisants du sol (Vinale et al., 2016). Le rôle bénéfique des métabolites secondaires dans la commercialisation des agents de biocontrôle formulés avec des complexes d'espèces de *Trichoderma* spp. a récemment été démontré (Chaverri et al., 2015; Keswani et al., 2019).

Dans le monde, 60 % des compagnies phytopharmaceutiques utilisent *Trichoderma* spp. comme matière de base dans leurs produits contre 40 % à base de bactéries, virus et nématodes (Dinesh et Prateeksha, 2015). Parmi les isolats commercialisés, on peut citer : *T.harzianum* T-22 (Trianium-G[®], RootShield[®], Root-Pro[®]), *T. virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx GL-21 (SoilGard[®]), *T. asperellum* (T-34 Biocontrol) *T. gamsii* (Bioten[®]) (Harman et al., 2004 ; Tranier et al., 2014). L'activité nématocide du biopesticide Biozeid[®] à base de *T. album* Preuss a été signalée par Raddy et al. (2013). Woo et al. (2014) signalent les nématocides à base de *Trichoderma* spp. dont le Trifesoil[®] (*T. viride* 2684), Trichobiol WP[®] (*T.harzianum*), Mycobac WP[®] (*T. lignorum*), Tricone V[®] (*T. harzianum* avec le neem), Commander Fungicide[®] (*T. harzianum*) et Ecosom-TH[®] (*T. harzianum* IIHR-Th-2).

Enfin, des biopesticides à base de *T. viride* (Anoka[®]) et *T. harzianum* (Sardar EcoGreen[®], Tricho[™], Natibioli[™], BioFungo[™], ECO-77[™], Lycomax[®], Trichodermil[™], Trianium[™], ECO-T[™], Agroguard WG[™], Bioderma H[®], FoliGuard[™], RootShield[™]/PlantShield[™], Ecotrich ES[™], Vinevax[™]–Trichoprotection[™], Antagon WP[™] et Trichosoil[®]) ont été rapportés (Fraceto et al., 2018 ; Kumar et al., 2019).

6.1.2 Le genre *Fusarium*

Fusarium est un genre de champignons imparfaits (Deutéromycètes), rattaché à la classe des Sordariomycètes, ordre des *Hypocreales* et à la famille des *Nectriaceae*. Ce genre est très important sur le plan économique du fait qu'il regroupe de nombreuses espèces phytopathogènes susceptibles d'induire des maladies chez de nombreuses plantes. Les *Fusaria* sont des champignons qui contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. Ils sont généralement impliqués dans la pourriture des racines, tiges et fruits et dans la dégradation du système vasculaire (Fernandez et al., 2009).

***Modes d'action de *Fusarium* spp.**

Ce genre comprend des espèces capables de produire de nombreuses mycotoxines : les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines (Pitt, 2000). Ces mycotoxines synthétisées par les espèces du genre *Fusarium* leur confèrent un pouvoir pathogène important vis-à-vis des végétaux ou des mammifères dont l'Homme (Nucci et al., 2007). Les facteurs de pathogénicité des *Fusaria* comporte également les enzymes impliqués dans les pourritures.

Il existe de nombreuses espèces de *Fusarium* dont certaines sont pathogènes et/ou sont susceptibles d'émettre des mycotoxines et des enzymes.

Néanmoins, de nombreuses souches non pathogènes sont recensées, celles-ci protègent les plantes contre une infection par les souches pathogènes (Olivain, et al., 2006), favorisent leur croissance en induisant une résistance locale et systémique. En effet, la compétition pour l'espace et les nutriments, la production de métabolites secondaires et l'induction de la résistance sont leurs différents modes d'action contre les pathogènes. Ainsi, la souche de *F. oxysporum* Schlechtendal, appelée « Fo 47 » est connue comme agent potentiel de biocontrôle contre les agents pathogènes dont les nématodes (Edel-Hermann et al., 2009 ; Sajeena et al., 2020).

***Potentialités antagonistes de *Fusarium* spp.**

Le genre *Fusarium* possède des potentialités phytosanitaires contre de nombreux bioagresseurs:

❖ Activité fongicide

De nombreux travaux ont montré que certaines souches non pathogènes de *F. oxysporum* peuvent contrôler les maladies causées par des souches pathogènes de ce même genre et par d'autres genres fongiques. Ainsi, l'efficacité de l'association de *F. oxysporum* (Fo 47) et *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula dans le contrôle de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker, agent responsable de la pourriture du pied et des racines de la tomate et de l'agent du flétrissement, *V. dahliae* Klebahn sur poivre a été rapportée (Bolwerk et al., 2005; Veloso et al., 2021).

L'efficacité du contrôle biologique par l'association de la souche Fo47 avec des souches d'actinomycètes (*Streptomyces* spp.) à l'égard des agents de flétrissements *F. oxysporum* et *V. dahliae* a été signalée par Zhang et al. (2018). Cette même souche pourrait réduire l'apparition de maladies par un effet concurrentiel et les actinomycètes pourraient ajuster le micro-écosystème du sol de la rhizosphère végétale, formant ainsi une barrière biologique qui pourrait réduire l'incidence des maladies transmises par le sol et aussi promouvoir la croissance des plantes.

❖ **Activité insecticide**

L'effet insecticide de *Fusarium* spp. a été signalé depuis longtemps ainsi, Stornelli et al. (1998) rapportent l'activité insecticide de *F. larvarum* Fuckel, souche 2139 contre la cochenille noire de l'olivier *Saissetia oleae* O. (Hémiptère : Coccidae). Les mycotoxines comme les trichothécènes (T-2) produites par le genre *Fusarium* possèdent un effet insecticide contre les *Tribolium* spp. H. (Coléoptère : Tenebrionidae) et la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* H. (Lépidoptère : Crambidae) (Gertrud et Roberts, 1983). Les filtrats de culture de *F. oxysporum* provoquent une mortalité de 99 % des adultes de *Culex quinquefasciatus* S. (Diptère : Culicidae), vecteur de certaines maladies virales (Singh et Prakash., 2011).

En Algérie, Laib et al. (2015) rapportent que les filtrats de culture de *Fusarium* spp. possèdent une activité insecticide à l'égard de *Sitophilus zeamais* M. (Coléoptère : Curculionidae). Enfin, Vivekanandhan et al. (2018) rapportent l'effet toxique de l'extrait de *F. oxysporum* seul et en combinaison avec le Temephos (insecticide : organophosphoré) sur les larves et les pupes d'*Anopheles stephensi* L., *Aedes aegypti* L. et *Culex quinquefasciatus* S. (Diptera : Culicidae).

❖ **Activité nématocide**

Plusieurs études ont également évalué les performances antagonistes de *Fusarium* contre les NPP. Ainsi, Hallmann et Sikora (1994) ont démontré que les mycotoxines de *Fusarium* spp. peuvent interagir avec les nématodes par effets antagonistes en relation avec leurs concentrations dans la rhizosphère des plantes. En effet, Indarti et al. (2010) ont rapporté l'effet nématocide de trois isolats de *F. oxysporum* et un isolat de *F. lateritium* Nees sur le parasitisme des kystes de *Globodera* spp. *in vitro* dépassant les 50 %. En outre, les mycotoxines sécrétées par ce genre manifestent un effet nématocide contre *M. exigua* Goeldi sur café (Freire et al., 2012). Les densités des populations de *Pratylenchus goodeyi* Sher & Allen et *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb) Golden ont été réduites de plus de 45 % sur bananiers en présence de *F. oxysporum* et l'effet nématocide de *F. solani* (Martius) Saccardo sur les œufs et les larves de *M. incognita* a été démontré (Hussain et al., 2017).

❖ Activité herbicide

Quelques espèces appartenant au genre *Fusarium* possèdent un effet herbicide sur les plantes parasites, notamment sur les genres *Orobanche* et *Striga*. En effet, *F. oxysporum* f.sp. *strigae* Elzein & Thines a été évalué à l'égard de *Striga hermanthica* D. (*Orobanchaceae*) sur sorgho, empêchant toute émergence de cette plante parasite et augmentant le poids sec de cette culture (Ciotola et al., 1995 ; Kangethe et al., 2016). Amsellem et al. (2001) et Cohen et al. (2002) ont observé une réduction d'*Orobanche* spp. (*Orobanchaceae*) par *F. oxysporum* et *F. arthrosporioides* Sherbakov sur tomate sous serre. L'efficacité de *Fusarium* spp. a aussi été testée à l'égard d'*O. cumana* W. (*Orobanchaceae*) sur tournesol, avec une diminution de l'ordre de 80 % (Sauerborn et al., 2007). Enfin, Namasivayam (2010) rapporte l'effet herbicide de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* vis à vis de *Cyperus iria* L. (*Cyperaceae*) sur riz.

6.2 Les bactéries nématoparasites

La lutte biologique contre les nématodes est possible par l'emploi des bactéries. Ces dernières appartiennent surtout à trois grandes familles qui sont les *Bacillaceae*, les *Enterobacteriaceae* et les *Pseudomonadaceae*. Les bactéries nématoparasites ont été classées en 6 groupes selon leur mode d'action. Il s'agit des bactéries parasites (*Pasteuria* spp.), bactéries parasites opportunistes (*Bacillus nematocida*), les rhizobactéries ou PGPR (Plant growth Promoting Rhizobacteria) : *Pseudomonas* spp., bactéries formants des protéines (Cry-protéines): *B. thuringiensis* Berliner, bactéries endophytes (presque toutes les PGPR sont des endophytes) et enfin les bactéries symbiotiques (les genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*) (Tian et al., 2007; Eissa et Abd-Elgawad, 2015).

En tant qu'antagonistes importants des nématodes, les bactéries nématoparasites présentent divers modes d'action comprenant le parasitisme, la production de toxines ou d'enzymes, la compétition pour les nutriments ainsi que l'induction de la résistance systémique et la promotion de la croissance des plantes (Nordbrig-Hertz et al., 2006). Plusieurs espèces ont été isolées à partir du sol et des kystes de nématodes. Parmi ces bactéries, *Pasteuria* spp., peut infecter 323 espèces de nématodes appartenant à 116 genres (Tian et al., 2007; Öztürk et al., 2020). En d'autres termes, *Pasteuria* présente un grand potentiel dans la lutte contre *Globodera* et *Heterodera* (Sayre et Starr, 1985 ; Carneiro et al., 1999). Ce genre peut réduire les populations de *Globodera* sur pomme de terre de 22 % ainsi que celles de *Meloidogyne* spp. (Mohan et al., 2012 ; Vagelas et al., 2012).

Parmi les rhizobactéries PGPR, l'efficacité d'*Agrobacterium radiobacter* (Beijerinck & van Delden) Conn et de *Bacillus sphaericus* Meyer & Neide a été notée vis-à-vis de *G. pallida* (Beneduzi et al., 2012).

De même, l'effet inhibiteur de *Pseudomonas aurantiacea* et *P. putida* de la multiplication de *G. rostochiensis* avec une diminution de 40,7 % et 42,2 % respectivement ainsi qu'une augmentation de la croissance des plants de pomme de terre ont été enregistrés (Trifonova et al., 2014). La reconnaissance par la plante de certaines rhizobactéries peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque ultérieure par un organisme pathogène (Jourdan et al., 2008).

Par ailleurs, des biopesticides contenant des bactéries ou leurs métabolites sont commercialisés incluant les genres *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* et *Bacillus* (Vinale et al., 2009), c'est le cas de *B. firmus* Bredemann & Werner et *P. penetrans* (Eissa et Abd-Elgawad, 2015). Aussi, l'application des biopesticides à base de *B. thuringiensis* var. berline (Kustom larvo WT-1 ml/pot), var. kurstaki (Kostar 76 LW-1 ml/pot) et de *Saccharopolyspora spinosa* Mertz & Yao (Treisr 480 EC-1 ml/pot) entraîne un effet inhibiteur sur la multiplication de *G. rostochiensis* avec une diminution de 27,7 à 33,3 % et favorise l'augmentation de la croissance et des rendements des plants de pomme de terre (Trifonova, 2010). Récemment, Sasanelli et al. (2019) ont rapporté l'efficacité d'un biopesticide (Vertimec® EC) à base d'abamectin (lactone macrolytique issu de la fermentation des produits dérivés de la bactérie Gram (+), *Streptomyces avermitilis* Kim and Goodfellow) dans la réduction des populations de *G. pallida*, pathotype « Pa3 » *in vitro* et *in vivo*.

6.3 Les substances naturelles ou extraits végétaux

Ces dernières années, l'utilisation des substances naturelles ou des extraits végétaux comme moyen de lutte alternatif aux pesticides a fait l'objet de nombreux travaux. En effet, les plantes ont la capacité de synthétiser une multitude de substances chimiques qui sont des métabolites secondaires. Ces derniers sont considérés comme étant les moyens de défense de la plante qu'elle produit contre divers bioagresseurs.

Ces produits peuvent être exploités par les laboratoires de biopesticides. Plus de 200 espèces de plantes appartenant à plusieurs familles botaniques ont été décrites pour leurs propriétés nématocides (Djian-Caporalino et al., 2009).

De nombreux travaux ont montré l'efficacité des extraits de plantes vis-à-vis des nématodes phytoparasites comme les Asteraceae (*Tagetes* spp.), (*Artemisia* spp.), les Zygophyllaceae (*Peganum harmala* L.), les Fabaceae (*Crotalaria* spp.), les Meliaceae (*Melia azedarach* L. ; *Azadirachta indica* L.), les Lamiaceae (*Origanum* spp.) (Sellami et Zemmouri, 2001 ; Sellami et al., 2010, 2013 ; Zaidat et al., 2020). Elles sont utilisées comme engrais verts dans les assolements ou sous forme de broyats, d'amendements incorporés au sol ou bien comme huiles essentielles.

Ces plantes peuvent agir de différentes manières soit par effet nématostatique ou bien comme inhibiteurs de l'éclosion des œufs (effet ovicide) ou en empoisonnant les nématodes et provoquant leur mort, c'est le cas du coriandre : *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae). D'autres plantes possèdent des métabolites pouvant agir comme inhibiteurs des fonctions des nématodes en causant une interruption permanente ou temporaire de la nutrition de ces derniers. C'est le cas de « l'absinthin », produit par *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) (D'Addabbo et al., 2014).

Actuellement, les espèces de la famille des Brassicaceae suscitent un intérêt primordial comme méthode alternative en vue de réduire l'utilisation des pesticides, elles produisent des essences soufrées, des glucosinolates et leurs dérivés possèdent des potentialités nématocides importantes. Lors de la dégradation de ces plantes, les glucosinolates sont transformés en substances volatiles toxiques : les isothiocyanates (Dutta et al., 2019). Ainsi, Aires et al. (2009) rapportent que les extraits des feuilles de *Nasturtium officinale* Brown (Cresson), *Brassica oleracea* L. (Chou-fleur) et de *B. napus* L. (Navet) (Brassicaceae) manifestent un effet nématocide à l'égard de *G. rostochiensis*. Ces mêmes auteurs expliquent cette activité nématocide par la présence d'une forte teneur de 2-Propényle-Glucosinolate dans ces plantes. Par ailleurs, selon Trifonova et Atanason (2011), l'évaluation de l'effet des extraits de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) à 0,5 % et *Veratrum album* L. (Melanthiaceae) à 1 % sur les larves de *G. rostochiensis* a montré une diminution significative des effectifs de ce nématode et une augmentation des rendements des plants de pomme de terre. De même, les extraits d'*Eruca sativa* Miller., *Sinapis alba* L., *Nasturtium officinale* et *Brassica juncea* (Linnaeus) Czernohorsky (Brassicaceae) induisent une mortalité des œufs de *G. pallida* respectivement de 60 ; 70 ; 75 et 90 % (Lord et al., 2011).

Aussi, les extraits de neem (*Melia azadirachta* L.), aux concentrations 0,2 à 1 % réduisent significativement les effectifs de *G. rostochiensis* de 58 à 71 % (Trifonova, 2012). Ultérieurement, Ngala et al. (2015) notent l'effet nématocide des extraits de *B. juncea* sur les œufs de *G. pallida*. A la même année, Umamaheswari et al., montrent l'efficacité de l'incorporation des feuilles de radis (*Raphanus sativus* L.) à raison de 1 kg/m² dans la diminution des populations de *Globodera* spp. de 60,7 %, ainsi qu'une augmentation importante du rendement de la pomme de terre et des paramètres de croissance de cette plante comparée au traitement chimique (Carbofuran) qui était moins efficace. Ainsi, l'utilisation de *B. juncea* constitue une stratégie alternative d'éradication de *Globodera* spp. (Dandurand et al., 2017). Enfin, plusieurs espèces appartenant à la famille des Brassicaceae et d'autres familles botaniques sont utilisées en biofumigation contre les NPP, notamment contre *Globodera* spp., il s'agit de *B. rapa* L., *B. juncea*, *B. oleracea*, *R. sativus*, *E. sativa* et *S. alba* (Dutta et al., 2019).

7. La lutte intégrée

Il est très difficile de combattre les NPP, notamment les NKPT, qui sont des organismes de quarantaine. En effet, les possibilités de contrôle de ces bioagresseurs par les pesticides de synthèse se réduisent de plus en plus pour des raisons à la fois réglementaires et économiques et on assiste actuellement à une montée en puissance de l'utilisation des méthodes alternatives. Néanmoins, l'éradication totale de ces parasites est pratiquement impossible.

Actuellement, les recherches sur la lutte contre les NPP s'orientent davantage vers une lutte intégrée et durable des nématodes afin de maintenir les populations de ces derniers à un niveau assez bas pour que les dégâts occasionnés soient économiquement tolérables.

Selon Mateille et *al.* (2008), la mise au point de la lutte intégrée contre les NPP associés aux cultures légumières s'avère indispensable. Il s'agit d'une approche de planification, de décision et de gestion des cultures dans laquelle seront combinés différents moyens de lutte : culturaux, chimiques, physiques et biologiques, de manière raisonnable, efficace, durable et économique, avec la préservation de l'environnement.

Selon Eissa et Abd-Elgawad (2015), les approches de contrôle de nématodes les plus prometteuses combinent plusieurs outils et méthodes. En effet, l'utilisation de *Trichoderma* spp. associée avec la poudre de graines de neem réduit efficacement les larves de 2^{ème} stade (J2) de *Globodera* spp. (Affokpon et *al.*, 2017).

L'efficacité de l'association de *T. harzianum*, de *B. thuringiensis*, d'engrais inorganique et de l'oxamyl contre *Globodera* spp. a été rapportée par Osman et *al.* (2018). De même, Dandurand et *al.* (2019) rapportent l'importance que peut jouer la plante piège *S. sisymbriifolium* dans une stratégie de lutte intégrée dans la gestion de ce bioagresseur.

Enfin, la combinaison des différents moyens de lutte disponibles apparaît indispensable pour parvenir à l'amélioration sanitaire du sol et devrait aboutir à la mise en pratique d'une véritable gestion durable du nématode à kystes de la pomme de terre *Globodera* spp. (Desgarenes et *al.*, 2018 ; Kranti et Nishi, 2018 ; Lopez-Lima et *al.*, 2020).

2 ème Partie : Partie Expérimentale

Introduction

Les *Globodera* sont parmi les NPP les plus importants sur le plan économique compte tenu des pertes de récoltes annuelles considérables pouvant aller jusqu'à 80 % sur pomme de terre (kooliyottil et *al.*, 2017) affectant la productivité agricole dans le monde entier et de leur persistance dans le sol, d'où leur statut d'organismes de quarantaine.

En raison des préoccupations concernant la sécurité alimentaire et la santé humaine, la gestion de ce bioagresseur est obligatoire et elle est de plus en plus orientée vers des méthodes alternatives respectueuses de l'environnement (Pandit et *al.*, 2017). L'utilisation des agents de lutte biologique constitue une voie de recherche intéressante répondant à ces exigences représentées par les antagonistes naturels de ce nématode.

Ainsi, un certain nombre d'espèces fongiques sont utilisées pour le contrôle biologique du NKPT, tels que *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp., contribuant à la réduction significative des populations de ce nématode et à leur maintien en-dessous du seuil économique (Jatala et *al.*, 1979 ; Manzanilla-Lopez et *al.*, 2011 ; Abd-Elgawad et Askary, 2018).

Plusieurs bactéries comme les genres *Pasteuria*, *Bacillus* et *Pseudomonas* agissent comme régulateurs naturels de nématodes avec différents niveaux de spécificité et d'efficacité (Siddiqui et Shaukat, 2003 ; Ciancio, 2018 ; Sasanelli et *al.*, 2021).

Toutefois, une sélection d'isolats est considérée comme indispensable pour atteindre un niveau de contrôle biologique acceptable, souvent en raison de leur spécialisation biochimique (Kerry, 2000). Cela met en évidence l'importance pratique d'étudier la diversité des isolats des antagonistes.

Cette présente étude a pour objectif : *i*) de rechercher et d'isoler les antagonistes potentiels de *Globodera rostochiensis* à partir du sol et des kystes des parcelles infestées par ces nématodes, dans les régions à vocation pomme de terre du Centre (Alger, Boumerdes, Tipaza), de l'Est (Bouira) de l'Ouest (Mostaganem) et du Sud (El Oued) d'Algérie ; *ii*) d'identifier les antagonistes isolés, par l'outil de la biologie moléculaire ; *iii*) d'évaluer l'activité nématocide des champignons les plus fréquents ; *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp. ; à l'égard des œufs et des larves (J2) de *G. rostochiensis*. Enfin, cette étude est complétée par la caractérisation des métabolites secondaires (SMs) responsables de l'effet nématocide à l'égard du NKPT.

Chapitre 1 : Isolement et identification des antagonistes de *G. rostochiensis*

1. Matériel et méthodes

1.1 Présentation des sites d'étude

Des prospections ont été réalisées durant la période Octobre-Juillet des années 2015, 2016 et 2017 à partir des parcelles infestées par *Globodera*, dans les régions à vocation pomme de terre du Centre (Alger : Sataoueli, Zéralda ; Boumerdes : Hammadi, Chebacheb ; Tipaza : Bou Ismail, Chenoua), de l'Est (Bouira : El Asnam , Ain Bessam), de l'Ouest (Mostaganem : Sirat, Mesra, Hassi mamache, Ain sidi cherif, Debdaba et Sayada) et du Sud (El Oued : Ourmes et Nakhla) d'Algérie. La localisation géographique ainsi que les caractéristiques des sites d'étude sont représentés dans la figure 8 et le tableau 1 respectivement.

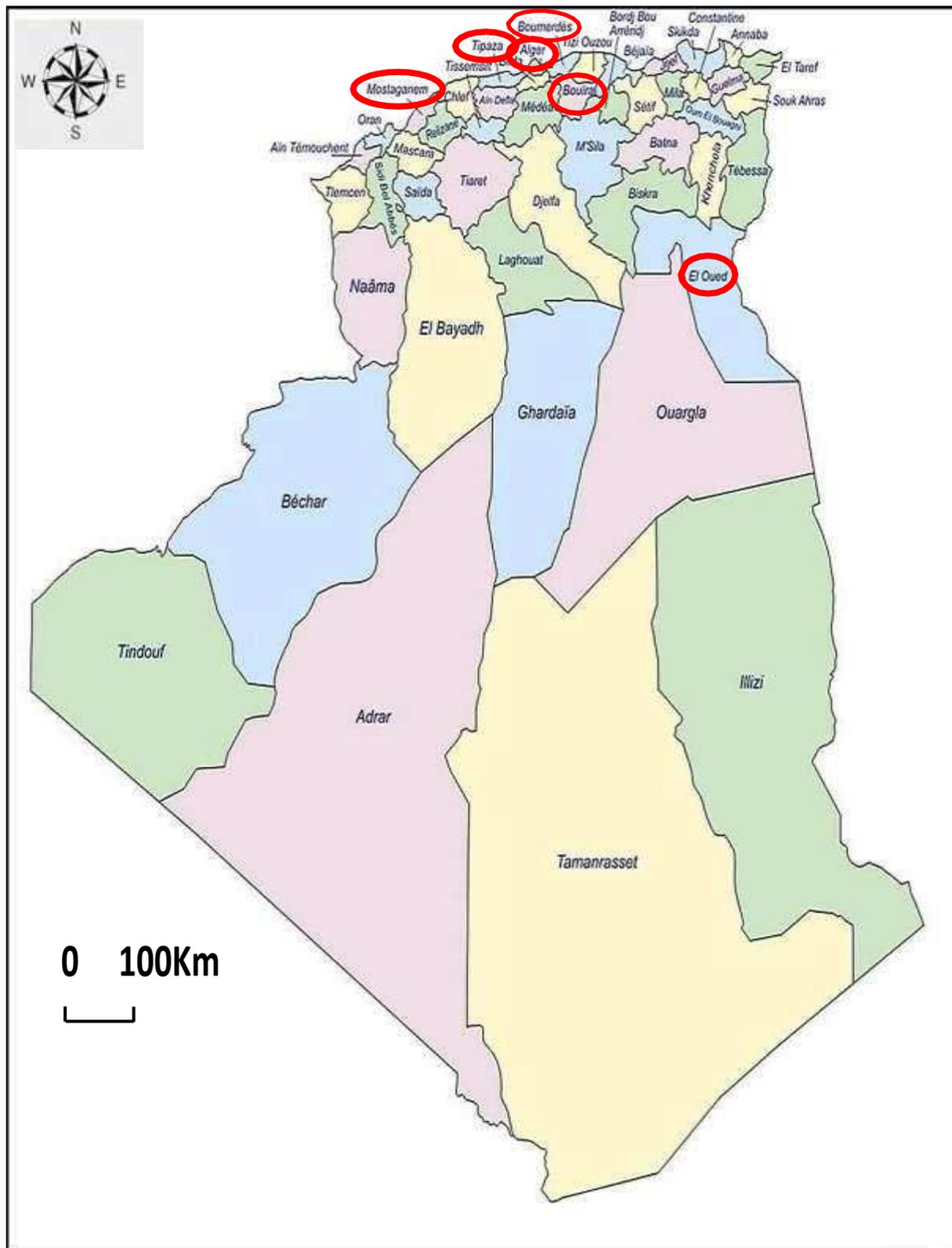
1.2 Echantillonnage

Après avoir observé les symptômes d'une infestation possible par les nématodes, l'étape suivante consiste à collecter des échantillons de sol et de racines des plants infestés et non infestés pour l'analyse nématologique et l'isolement des antagonistes.

L'échantillonnage est une étape très importante dans l'analyse de la nématofaune, les conditions climatiques, le type de sol et le type de cultures installées influencent la variation de l'effectif de ces populations (Merny et Luc, 1969 ; Nakachian, 1971). En conséquence, l'échantillonnage doit être réalisé d'une manière aléatoire afin d'obtenir des résultats significatifs.

La méthode préconisée pour les prélèvements d'échantillons est celle des diagonales (Merny et Luc, 1969), elle consiste à collecter des échantillons de sol à partir de la rhizosphère à 10-30 cm de profondeur sur une surface de 0,5 à 1 hectare en utilisant une tarière. Il est préconisé d'augmenter le nombre d'échantillons collectés afin d'assurer un échantillonnage représentatif, plus grand sera le nombre d'échantillons élémentaires prélevés, plus précise sera l'estimation.

Chaque échantillon est composé de 40 échantillons élémentaires pour un total de 1.5 Kg. Les échantillons prélevés sont mis dans des sacs n'ayant contenu aucun produit chimique, sont conservés au réfrigérateur (entre 5 et 10 °C) et sont utilisés ultérieurement pour les analyses nématologiques et les isollements des antagonistes à partir du sol et/ou des nématodes. Notre étude a été réalisée sur un total de 404 échantillons (Tableau 2).



 Zones d'étude

Figure 8. Localisation des sites d'étude.

Tableau 1. Caractéristiques géo-écologiques des sites d'étude (source : <https://www.wikipedia.org>).

Critères	Etages	Texture du sol	pH	MO	Pluviométrie	Températures	Longitude	Latitude
Localités	climatiques			sol (%)	Annuelle (mm)	Moyennes (°C)		
Centre du pays								
Alger (Zéralda)	Humide	Limoneux-sableuse	7,85	4,01	707	17,7	3°02'31" Est	36°45'08"N
Boumerdes (Hammadi)	Humide-Sub-humide	Limoneux-Argileuse	8,30	1,67	739	18	3° 28' 38" Est	36°45'00 "N
Tipaza (Chenoua)	Sub-humide	Argileux-Limoneuse	7,21	1,20	631	18,5	2° 26'26,76" Est	36° 35' 42,23"N
Est du pays								
Bouira (El Asnam)	Semi-aride	Limoneuse	8,25	2,96	659	16,5	3°54'07" Est	36°22'29" N
Ouest du pays								
Mostaganem	Semi-aride				347	17,9	0°33'21" Est	35°44'14" N
Sirat		Argileux-Limoneuse	8,15	3,31				
Mesra		Limoneux -sableuse	7,35	5,11				
Hassi mamache		Limoneux -sableuse						
Ain sidi cherif		Argileux-Limoneuse	7,77	4,30				
Debdaba		Sableuse	7,63	2,96				
Sayada		Argileux-Limoneuse	6,86	1,03				
Sayada		Argileux-Limoneuse	8,16	2,53				
Sud du pays								
El Oued (Ourmes)	Aride (Desert)	Sableuse	7,7	4,1	74	25	6°52'03" Est	33°22'06"N

1.3 Origine des échantillons

Les échantillons de sol utilisés dans cette étude pour l'isolement des champignons antagonistes ont été prélevés lors des prospections réalisées à partir des parcelles infestées par le genre *Globodera*. L'origine, les cultures ainsi que le nombre d'échantillons de sol analysés sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2. Origines, cultures et nombre d'échantillons de sol.

Wilayates	Cultures	Nombre d'échantillons
Alger	Staoueli	18
	Zéralda	29
Bouira	El Asnam	22
	Ain Bessam	34
Boumerdes	Hammadi	20
	Chebacheb	25
El Oued	Ourmes	32
	Nakhla	16
Mostaganem	Sirat	28
	Mesra	28
	Hassi mamache	28
	Ain sidi cherif	24
	Debdaba	14
	Sayada	20
Tipaza	Bou Ismail	42
	Chenoua	24
		Total 404

1. 4 Extraction et isolement des nématodes

Plusieurs méthodes sont utilisées pour extraire les nématodes soit à partir du sol ou des tissus végétaux. En ce qui concerne l'extraction des kystes de *Globodera* spp. à partir des échantillons prélevés, la méthode que nous avons adoptée est celle de Fenwick (1940) dont le principe est basé sur la densité du kyste par rapport à celle de l'eau (Annexe 5). Les kystes sont récoltés puis comptés sous loupe binoculaire à l'aide d'un compteur manuel et sont conservés à sec et à température ambiante dans des tubes eppendorf pour une utilisation ultérieure.

1.5 Isolement des champignons antagonistes à partir du sol

Les antagonistes fongiques ont été directement isolés du sol en saupoudrant environ 1 g de terre à la surface du milieu de culture Water Agar (WA) coulé dans des boîtes de Petri. Ces dernières,ensemencées avec l'échantillon de sol sont ensuite incubées pendant plusieurs semaines à 15 °C (Péloille et Cayrol, 1979).

Alternativement, la méthode de dilution décrite par Elad et *al.* (1981) a été utilisée, en mélangeant 10 g de terre de chaque échantillon avec 90 ml d'eau distillée par agitation magnétique pendant 1 h pour une bonne dispersion des particules.

A partir d'une solution mère de 10^{-1} à 10^{-9} , des séries de dilutions ont été effectuées en étalant les aliquotes diluées sur des boîtes Petri contenant le milieu de culture WA favorable à l'isolement et au développement de champignons antagonistes, ce dernier stimule la formation des pièges et facilite leur mise en évidence à partir du sol, ces boîtes sont incubées dans l'obscurité à 26 °C.

Après incubation des boîtes de Petri contenant les échantillons de sol pendant une à deux semaines, la présence du champignon dans le sol se traduit par son développement sur le milieu de culture avec l'observation de ses structures. Lorsque les colonies fongiques apparaissent, elles sont transférées dans une boîte de Petri contenant différents milieux de culture (Potato Dextrose Agar : PDA, Corn Meal Agar : CMA ou Czapeck-Dox Agar : CDA) pour favoriser leur croissance. Les milieux de culture CMA et CDA sont propices au développement des champignons prédateurs, tandis que le milieu PDA est non sélectif, il permet la croissance de tous les champignons.

En règle générale, les milieux pauvres en nutriments doivent être utilisés pour l'isolement des champignons antagonistes et les milieux riches en nutriments doivent être utilisés pour leur purification. La composition des milieux de culture utilisés dans cette étude est consignée dans l'annexe 6.

1.6 Isolement des champignons antagonistes à partir des kystes de *G. rostochiensis*

Les kystes, en provenance de Bouira, El Oued, Mostaganem et Boumerdes sont préalablement désinfectés dans une solution d'hypochlorite de sodium NaOCl à 0.1 % pendant 5 min, ensuite transférés dans une solution de streptomycine à une concentration de 100 µl/l pendant 15 min puis dans de l'eau distillée stérile pendant 5 min. Ces kystes sont ensuite séchés sur du papier buvard stérilisé. Dans une boîte de Petri contenant le milieu de culture WA (WaterAgar), cinq kystes sont placés, un au centre et le reste aux quatre coins de la boîte. Les boîtes sont mises à incuber à 22 °C sous lumière continue jusqu'à l'apparition des structures fongiques. Lorsque les colonies fongiques émergent des kystes, ces dernières sont transférées dans une autre boîte de Petri contenant un milieu gélosé (PDA, CMA ou Czapeck) pour leur purification et identification.

1.7 Repiquage des champignons antagonistes

Quand le champignon est présent dans l'échantillon, il se développera sur milieu de culture où il est facile d'observer ses structures au bout d'une dizaine à une vingtaine de jours. Le repiquage des souches ainsi obtenues se fait par prélèvement à l'aide d'emporte-pièce d'un explant mycélien de 6 mm de diamètre que l'on dépose au centre d'une nouvelle boîte de Petri contenant le milieu PDA ou CMA, qu'on laisse incuber pendant 5-7 jours à 20 ± 2 °C.

1.8. Purification des champignons antagonistes

Dans le but d'identifier et de caractériser les champignons antagonistes, il est nécessaire de purifier les souches obtenues. La technique de la culture monospore permet d'obtenir une culture pure du champignon à partir d'une seule spore consistant à prélever un explant mycélien de 6 mm de diamètre à partir de la périphérie de la boîte et l'introduire dans un tube contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Après agitation, une suspension sporale est obtenue à partir de laquelle des dilutions au dixième sont réalisées : 1 ml de la suspension sporale est prélevé puis introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile. A partir des deux dernières dilutions (10^{-3} et 10^{-4}), 1 ml est prélevé puis étalé à l'aide de pipette stérile sur milieu PDA.

Après 24 h d'incubation à 20 ± 2 °C, la délimitation des spores en germination est effectuée sous loupe binoculaire. Ces dernières sont prélevées puis déposées dans de nouvelles boîtes de Petri contenant du milieu PDA. Les cultures sont ensuite incubées à une température de 20 ± 2 °C pendant une semaine (Rappily, 1968) et puis conservées dans le laboratoire de mycologie du département de botanique à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (El Harrach-Alger).

1.9 Isolement des bactéries nématoparasites à partir des kystes de *G. rostochiensis*

L'isolement des bactéries a été effectué de la même manière que pour les champignons. Après incubation, les colonies bactériennes associées aux kystes sont purifiées par une série de dilutions et de repiquages. Les isolats bactériens ont été maintenus en ajoutant 10^{-2} de suspension bactérienne diluée dans de l'eau distillée stérile sur Nutrient Agar (NA). Les boîtes ont ensuite été incubées à 26 °C dans l'obscurité, avant de collecter les colonies de cellules individuelles.

1.10. Identification des antagonistes obtenus

1.10.1 Identification morphologique

L'identification des champignons isolés est basée sur la clé de détermination de Barnett et Hunter (1998). Cette clé prend en considération les systèmes de classification de Saccardo et de Hughes-Tubaki-Barron respectivement basés sur les caractéristiques morphologiques des conidies et sur l'ontogénie sporale, conduisant à la détermination des genres. L'identification des espèces appartenant au genre *Fusarium* a été réalisée en se basant sur les clés de détermination établies par Toussoun et Nelsson (1976), Burgess et *al.* (1994), ainsi que sur l'ouvrage de Leslie et Summerell (2008). Cette classification est basée sur des critères macroscopiques et microscopiques tels que :

1. La coloration des colonies sur milieu PDA, la présence de pigments dans le milieu.
2. La présence ou l'absence de microconidies, la présence ou l'absence de sporodochies.
3. La morphologie des conidies.

La caractérisation des bactéries isolées est basée sur les caractères morphologiques des colonies : La forme, la couleur, la taille, le relief, le type de bordure, l'opacité et la présence ou l'absence du mucus.

1.10.2 Identification moléculaire

Les différences dans les séquences d'ADN et d'ARN des gènes ont été exploitées pour appuyer l'identification morphologique des antagonistes de *G. rostochiensis*. Pour cela les isolats fongiques ont été caractérisés à l'aide d'une méthode moléculaire basée sur le séquençage des régions ITS et celles du gène Rpb2, validées par comparaison avec les séquences disponibles dans la « GenBank ». En revanche, les genres bactériens identifiés sont obtenus par amplification PCR du gène ribosomal de l'ARNr 16S.

1.10.2.1 Extraction de l'ADN

Le matériel fongique a été obtenu à partir de cultures pures maintenues dans des boîtes de Petri contenant du milieu PDA. L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir du mycélium cultivé sur

milieu solide en utilisant la **procédure d'extraction manuelle au Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) avec Colonne de Rotation (Spin Column) modifiée** :

- 200 mg de matériel fongique ont été ajoutés à un tube de micro centrifugation de 2 ml.
- Un tampon d'extraction CTAB (500 µl) a été ajouté (2 % cetyl triméthylammonium bromide, 1 % polyvinyl pyrrolidone, 1,4M NaCl, 100 mM Tris pH8, 20 mM EDTA).
- Le mélange a été placé dans un bain-marie pendant 30 minutes à 60 °C.
- Une fois retirés, les tubes ont été centrifugés pendant 10 minutes à 13 000 x g.
- Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube où 5 µl de RNaseA ont été ajoutés.
- Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 15 minutes.
- Le lysat a été extrait en ajoutant un volume égal de chloroforme/alcool iso amylique, puis il a été mélangé au vortex et ensuite centrifugé.
- La couche aqueuse supérieure a été transférée dans un nouveau tube de micro centrifugation. Cette étape a été répétée jusqu'à ce que la phase supérieure soit claire.
- L'ADN a été précipité en ajoutant 0,7 du volume d'isopropanol, puis incubé à -20 °C pendant 15 minutes.
- L'échantillon a été transféré dans une colonne d'essorage et centrifugé pendant une minute à 8000 x g pour lier l'ADN à la colonne.
- La colonne a été lavée deux fois avec 250 µl d'éthanol à 70 %, en centrifugeant après chaque lavage.
- L'ADN a été élué dans 30 µl d'eau ou de tampon TE et recueilli dans un tube de micro fusion propre et conservé à -20 °C.

Le **DNeasy Plant Mini KIT** établi pour l'extraction d'ADN des plantes et des champignons a été fourni par **Norgen Biotek Corp., Canada** par la suite et a été utilisé en suivant les instructions du fabricant (Annexe 7).

* Quantification de l'ADN

Les deux méthodes de quantification de l'ADN sont : la mesure de la photométrie en utilisant le « Nanodrop », ayant pour avantage la mesure de la pureté ; et la mesure de la fluorescence en utilisant le « Qubit », pour des lectures de concentrations précises. La mesure photométrique des acides nucléiques est basée sur les propriétés intrinsèques d'absorptivité des acides nucléiques (ADN) en déterminant le rapport 260/280 alors que la mesure fluorométrique des acides nucléiques est basée sur l'utilisation de colorants fluorogènes qui se lient sélectivement à l'ADN.

1.10.2.2 Séquençage des ITS

La région du gène ribosomique de l'espaceur interne transcrit (ITS1-5,8S-ITS2) a été amplifiée avec les amorces ITS1 et ITS4 (White et *al.*, 1990) dans un thermocycleur BioRad T100 (BioRad, Hercules, CA, USA).

Le volume de la réaction PCR était de 25 µl contenant 2,5 µl 10X DreamTaq™ Tampon vert, 200 µM de chacun des désoxynucléotide triphosphates (dNTP), 1 mM d'amorces forward et reverse, 2 U/µl d'ADN polymérase de démarrage à chaud DreamTaq (ThermoFisher Scientific, USA) et 2 µl (100 ng) d'ADN de chaque champignon.

Les amplifications par PCR ont été effectuées selon le protocole suivant : 95 °C pendant 5 min (dénaturation initiale), ensuite 35 cycles de 95 °C pour 30 s, 55 °C pour 30 s et 72 °C pour 1 min, une élongation finale à 72 °C pour 7 min et un stockage à 12 °C à la fin.

La qualité des produits PCR et leur séparation a été contrôlée sur un gel d'agarose à 1,5 %, un marqueur de taille de 100 pb a été ajouté et les bandes ont été visualisées via une coloration de « Gel Red™ (Biotium, Fremont, CA, USA) » après une électrophorèse. Les images ont été capturées et stockées avec un système de documentation et d'analyse des gels (Kodak, Rochester, NY, USA). L'ADN a été élué en ajustant les produits de la PCR à un volume de 12,5 µl pour chaque ITS1 et ensuite séquencé par un fournisseur commercial (Macrogen, Madrid, Espagne).

1.10.2.3 Séquençage des Rpb2

Pour confirmer l'identification des isolats au niveau de l'espèce, le gène de la sous-unité 2 (Rpb2) de la séquence de l'ARN polymérase a également été utilisé (Chaverri et al., 2003 ; Jaklitsch et Voglmayr, 2015).

Le volume de la réaction PCR était de 25 µl contenant 2,5 µl 10X DreamTaq™ Tampon vert, 200 µM de chacun des désoxynucléotide triphosphates(dNTP), 1 mM d'amorces forward et reverse, 2 U/µl d'ADN polymérase de démarrage à chaud DreamTaq (ThermoFisher Scientific, USA) et 2 µl (100 ng) d'ADN de chaque champignon.

Les amorces forward et reverse utilisées étaient : fRpb2-5F 5'-GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C)GG-3' et fRpb2-7cR 5'-CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT (A/G)CCCAT-3', respectivement (Chaverri et al., 2003; Liu et al., 1999).

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur BioRad T100 (BioRad, Hercules, CA, USA) avec les étapes suivantes : une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 min ; 30 cycles de 1 min à 95 °C, 2 min à 55 °C et 2 min à 72 °C, et une élongation finale à 72 °C pendant 10 min, les produits de la PCR ont été stockés à -20 °C. Par la suite, ils ont été séparés par électrophorèse sur des gels d'agarose à 1,8 %, en purifiant les fragments de 1,1 Kb de taille avec un kit commercial (GeneAll Expin™ Combo GP kit) pour l'extraction, puis ligaturés au pGEM®-T Easy Vector Systems, pendant 16 h à 4 °C et clonés dans des cellules d'*E.coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA), comme recommandé par le fabricant.

Les clones recombinants avec des bandes de la taille attendue ont ensuite été séquencés par un service commercial (Macrogen, Madrid, Espagne).

1.10.2.4 Séquençage de l'ARNr 16S bactérien

Pour l'amplification par PCR de l'ARNr 16S bactérien, les cellules ont été prélevées à partir de cultures âgées de 48 heures à l'aide d'une spatule sur gélose nutritive et conservées à 26 °C. L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide d'un kit d'extraction de l'ADN génomique des bactéries (Norgen Biotek Corp., Canada).

Le volume de la réaction PCR était de 25 µl, contenant une concentration finale de tampon PCR 10X, 200 µM de chacun des dNTP, 1 mM des deux amorces 27F (forward) et 1492R (reverse) (Frank et al., 2008), 2 U/µl d'ADN polymérase de démarrage à chaud DreamTaq (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) et 2 µl de chaque extrait de culture bactérienne. L'ARNr 16S a été amplifié dans les conditions suivantes : une dénaturation à 95 °C pendant 5 min, ensuite 35 cycles de 95 °C pendant 30 s, 49 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 1 min, avec une élongation finale à 72 °C pendant 7 min et 12 °C pour le stockage. La qualité des produits PCR et leur séparation a été contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose Tris à 1,5 %, en visualisant les bandes par coloration avec le « Gel Red™ (Biotium, Fremont, CA, USA) » et le système de documentation et d'analyse des gels (Kodak, Rochester, NY, USA). L'ADN a ensuite été élué et séquencé par un fournisseur commercial (Macrogen, Madrid, Espagne).

1.10.2.5 Séquençage des gènes des trichothécènes

Afin d'évaluer la présence des membres du groupe du gène TRI, codant pour la biosynthèse des trichothécènes chez *Trichoderma* spp., la séquence du gène TRI a été utilisée (Cardoza et al., 2011). Le volume de la réaction PCR était de 50 µl contenant 1,25 U d'ADN Taq polymérase EURx et 0,2 mM de chacun des désoxynucléotide triphosphates (dNTP). Quatre paires d'amorces forward et reverse : (TRI3, TRI11, TRI12 et TRI14) ont été testées sur les isolats de *Trichoderma* : T4, T7, T25 et T26 (Tableau 3). La PCR a été réalisée dans un BioRad T100 Thermocycleur (BioRad, Hercules, CA, USA) avec les étapes suivantes : une dénaturation initiale à 95° C pendant 3 min ; 35 cycles de 30 s à 95 °C, 45 s à 57,5 °C et 40 s à 72 °C et une élongation finale à 72 °C pendant 10 min. La qualité des produits PCR a été contrôlée sur un gel d'agarose Tris à 1,5 %, en visualisant les bandes par coloration avec le « Gel Red™ (Biotium, Fremont, CA, USA) » avec une électrophorèse et le système de documentation et d'analyse des gels (Kodak, Rochester, NY, USA), en purifiant les fragments de 604 pb de taille, le marqueur utilisé est d'une taille moléculaire de 1 kb. L'ADN a ensuite été élué et séquencé par un fournisseur commercial (Macrogen, Madrid, Espagne).

1.10.2.6 Analyses phylogénétiques

Les séquences ITS1-2 et Rpb2 produites ont été validées par comparaison avec celles disponibles dans la « GenBank » utilisant l'outil d'analyse en ligne BLAST. Des alignements de séquences multiples ont été construits avec un Interface Windows™ pour CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1997) fournie par BioEdit ver. 7.0.1, avec les paramètres par défaut (Hall, 1999), en utilisant les séquences produites avec les séquences les plus proches déposés dans la GenBank pour *Trichoderma* spp.

La distance d'évolution des taxons a été déduite avec le logiciel MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) en utilisant les alignements ajustés, éliminant les postes présentant des lacunes externes ou des données manquantes. Des arbres phylogénétiques ont été construits selon la méthode du neighbour- joining (Saitou et Nei, 1997) et les métriques de Jukes-Cantor, en appliquant la suppression par paire de positions ambiguës (région ITS1-2) ou en supprimant toutes les positions présentant des lacunes et des données manquantes (gène Rpb2) (Jukes et Cantor, 1969 ; Felsenstein, 1985).

Tableau 3. Gènes TRI cibles des trichotécènes, amorces et séquences utilisées pour l'amplification par PCR.

Gènes	Amorces	Séquences (5'-3')
TRI14	T14int5 T14int	CACAGGTGTTACTGAGCT CCAGCATAAGTGCCATTG
TRI12	T12int5 T12int3	CAACGTTATAGCGACAGG AACGCAGCAGTGAAGATC
TRI11	T11int3 T11int5b	CCCACAAGAAGTGTGTCT CGTTGCAGTACAACCTCGT
TRI3	T3int3 T3int5	CCTCCTCCTGACTGTAAT TATTGAGGAGCTGCGAGA

2. Résultats

2.1 Isolement des antagonistes de *G. rostochiensis*

Les résultats des isollements effectués à partir du sol et des kystes de *G. rostochiensis* nous ont permis d'obtenir 123 isolats au total, dont 117 isolats fongiques et 6 bactériens.

L'analyse des données a dévoilé la présence d'une flore fongique abondante dont 64 % des champignons sont associés aux kystes de *G. rostochiensis*. La flore fongique isolée à partir des kystes représente 41 % d'El Oued, 29 % de Bouira, 18 % de Boumerdes et 12 % de Mostaganem.

Ainsi neuf (9) genres fongiques ont été isolés avec des fréquences d'occurrence variables (Fig. 9), où 89 % appartiennent aux Hypocreales ; représentés par les familles des *Nectriaceae* et des *Hypocreaceae* avec respectivement 44 % et 45 % ; suivies de la famille des *Pleosporaceae* représentée par 5 %, *Davidiellaceae* (3 %), *Orbiliaceae*, *Trichomaceae* et *Sphaerioidaceae* représentées par 1 % pour chaque famille, appartenant à différents ordres (Tableau 4).

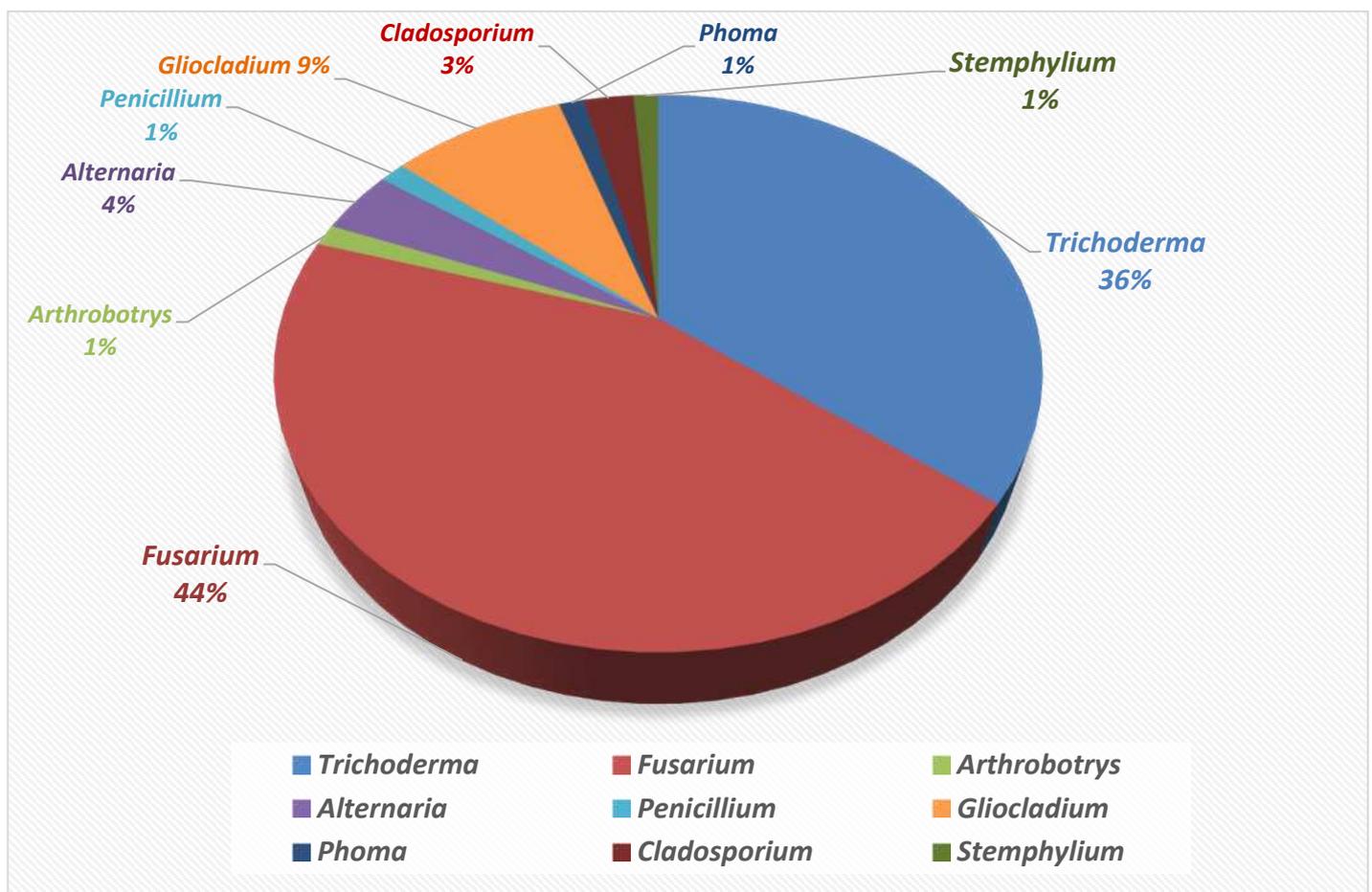


Figure 9. Fréquence d'occurrence des principaux genres fongiques identifiés.

Tableau 4. Principaux genres, ordres et familles fongiques isolés

Genres	Familles	Ordres
<i>Fusarium</i>	<i>Nectriaceae</i>	Hypocreales
<i>Trichoderma</i>	<i>Hypocreaceae</i>	Hypocreales
<i>Gliocladium</i>	<i>Hypocreaceae</i>	Hypocreales
<i>Alternaria</i>	<i>Pleosporaceae</i>	Pleosporales
<i>Stemphylium</i>	<i>Pleosporaceae</i>	Pleosporales
<i>Cladosporium</i>	<i>Davidiellaceae</i>	Capnodiales
<i>Phoma</i>	<i>Sphaerioidaceae</i>	Sphaeropsidales
<i>Penicillium</i>	<i>Trichomaceae</i>	Eurotiales
<i>Arthrotrys</i>	<i>Orbiliaceae</i>	Orbiliales

La flore bactérienne associée aux kystes de *G. rostochiensis* est par contre moins abondante avec six (6) isolats, quatre (4) ont été identifiés, il s'agit de *Bacillus* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Rhizobium* spp. et *Brucella* spp.

2.2 Identification morphologique

❖ Champignons

Dans un premier temps, l'identification des champignons isolés a été faite sur la base des caractères macroscopiques et microscopiques.

Les observations macroscopiques sont réalisées sur les cultures maintenues sur milieu PDA ou CMA, concernent la couleur et l'aspect de la culture. Les observations microscopiques sont faites concernent la morphologie du mycélium, des conidies, des conidiophores et des chlamydospores sur des fragments mycéliens contenant les formes de fructification colorées au bleu de coton, placées entre lame et lamelle. La caractérisation morphologique nous a permis d'identifier quelques isolats au niveau du genre, ainsi neuf genres ont été décrit, il s'agit de *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Arthrotrys*, *Penicillium*, *Gliocladium*, *Phoma*, *Cladosporium* et *Stemphylium* (Figure 10, Tableau 5).

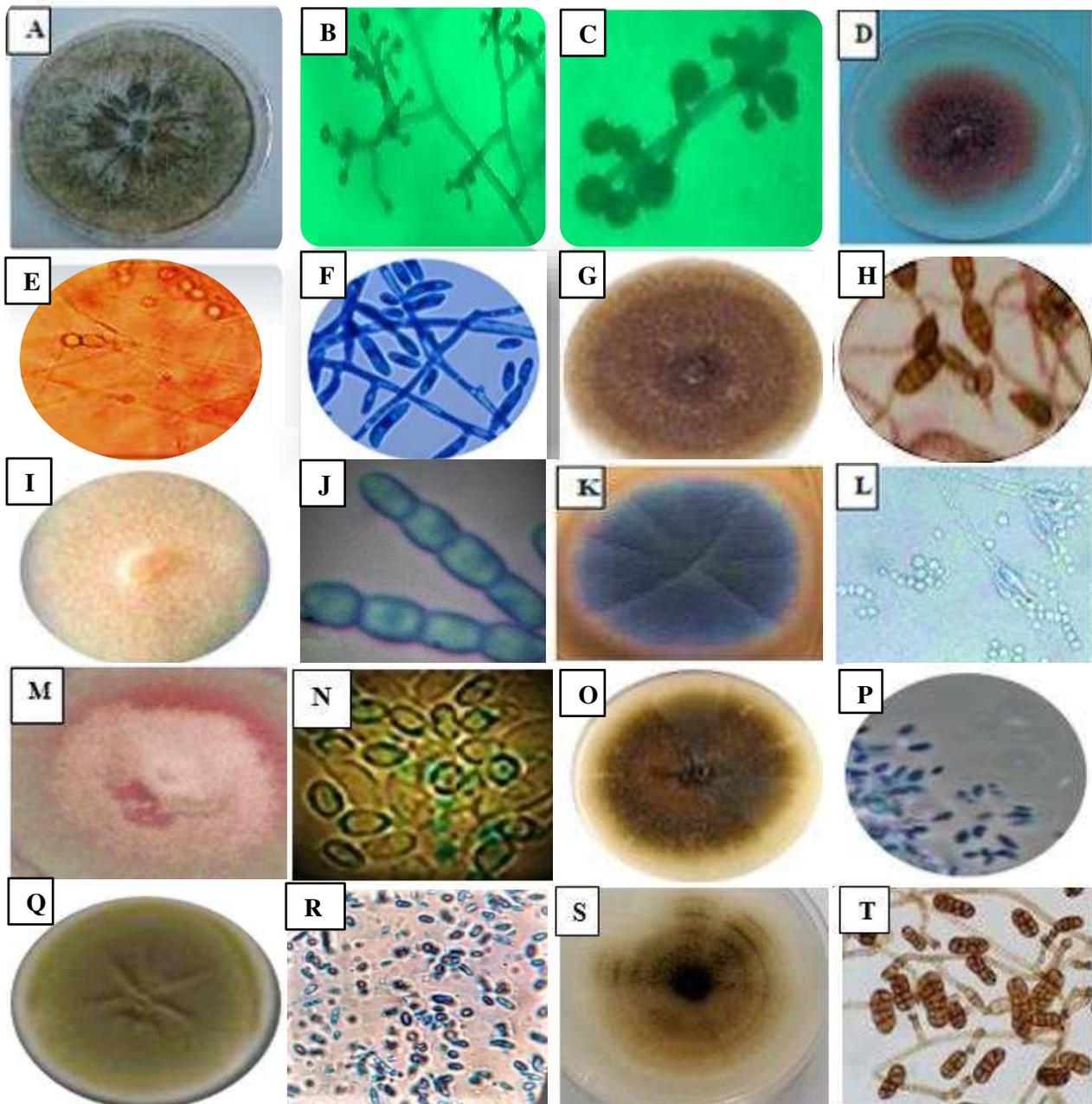


Figure 10. Aspect cultural et microscopique au Gr : 40x10 de *Trichoderma* sp., A : Aspect cultural, B : Conidiophore , C : spores, *Fusarium* sp., D : Aspect cultural, E: Chlamydo-spores, F: Macroconidies et microconidies, *Alternaria* sp., G: Aspect cultural, H: conidies, *Arthrobotrys* sp., I : Aspect cultural, J: conidies, *Penicillium* sp., K: Aspect cultural, L: Phialides et conidies, *Gliocladium* sp., M: Aspect cultural, N: conidies, *Phoma* sp., O : Aspect cultural, P: conidies, *Cladosporium* sp., Q : Aspect cultural, R: conidies, *Stemphylium* sp., S : Aspect cultural, T: conidies (Originales).

Tableau 5. Caractéristiques morphologiques des principaux genres fongiques identifiés.

Genres fongiques identifiés	Aspect cultural	Caractères morphologiques
<i>Trichoderma</i> Persoon.	<p>Mycélium de couleur blanchâtre (Fig.10A).</p> <p>Vitesse de croissance rapide et sporulation abondante sur milieu de culture.</p> <p>Les spores de coloration blanchâtre à verdâtre.</p>	<p>Conidiophores fortement ramifiés selon une structure pyramidale, se terminant par une ou plusieurs phialides, pouvant être cylindriques ou sub-globuleuses, regroupées en masse ou solitaires (Fig.10B).</p> <p>Conidies hyalines, unicellulaires et ovoïdes (Fig.10C).</p>
<i>Fusarium</i> Link.	<p>Mycélium aérien abondant de couleur blanche, jaune, rose à violette (Fig.10D).</p>	<p>Conidiophores courts ou longs selon les espèces, ramifiés de façon irrégulière ou portant un verticille de phialides, simples ou groupés en sporodochies.</p> <p>Chlamydospores variant selon les espèces, de rares à très abondantes (Fig.10E), terminales ou intercalaires.</p> <p>Conidies hyalines, variables, principalement de deux types, macroconidies pluricellulaires et légèrement arquées et/ou microconidies unicellulaires ou bicellulaires, ovoïdes à oblongues (Fig.10F), portées isolément ou en chaînes.</p>
<i>Alternaria</i> Nees.	<p>Mycélium brun foncé ((Fig. 10G).</p>	<p>Hyphe septés, courts, ramifiés.</p> <p>Conidiophores foncés, le plus souvent simples, déterminés ou sympodiaux, plutôt courts ou allongés.</p> <p>Dictyospores allongées, foncées, typiquement avec des septa transversaux et longitudinaux (Fig. 10H) ; de forme variée, obclavé à elliptique ou ovoïde, fréquemment porté acropétalement dans un appendice apical simple ou ramifié.</p>

<i>Arthrotrys</i> Corda.	Mycélium hyalin à rose orangé (Fig. 10I).	Hyphes septés et ramifiés. Conidiophores longs, minces, simples, septés, hyalins, légèrement élargis à l'apex. Conidies hyalines, ovales-oblongues (Fig. 10J), produites en groupes successifs sur un axe principal à croissance sympodiale.
<i>Penicillium</i> Link.	Mycélium hyalin à grisâtre (Fig. 10K).	Hyphes septés. Conidiophores surgissant du mycélium de façon isolée ou plus rarement en synnématique, ramifiés près de l'apex, pénicillaires, se terminant en un groupe de phialides Conidies hyalines ou de couleur vive, unicellulaires, globuleuses à ovoïdes, en chaînes basipétales sèches (Fig. 10L).
<i>Gliocladium</i> Corda.	Mycélium cotonneux de couleur blanchâtre à rosâtre (Fig. 10M). Sporulation rapide	Conidiophores ramifiés et orientés verticalement, ayant une structure en brosse. Conidies blanches à vert foncé, unicellulaires et cylindriques, s'accumulant en gouttelettes mucilagineuses à l'extrémité des phialides (Fig. 10N).
<i>Phoma</i> Desm.	Mycélium hyalin à brun (Fig. 10O). Présence de pycnides sur milieu de culture	Hyphes septés. Conidies unicellulaires, hyalines et de forme ovale, chaque conidie contient généralement deux gouttelettes d'huile (Fig. 10P). Présence de chlamydo-spores disposées individuellement ou en chaînes.
<i>Cladosporium</i> Link.	Mycélium à texture veloutée-poudreuse, de couleur vert-olive à noire (Fig. 10Q).	Hyphes septés. Conidiophores sombres, dressés, ramifiés de façon variable près de l'apex, groupés ou uniques. Conidies sombres, monocellulaires ou bicellulaires, de forme et de taille variables, ovoïdes à cylindriques et

		irrégulières, certaines en forme de citron ; souvent en chaînes acropètes simples ou ramifiées (Fig. 10R).
<i>Stemphylium</i> Wallr.	Mycélium cotonneux de couleur brun-noir (Fig. 10S).	<p>Hyphes septés.</p> <p>Conidiophores simples ou ramifiés, portant des gonflements ou des nœuds vésiculaires.</p> <p>Conidies solitaires, oblongues ou subsphériques et arrondies à l'extrémité, de couleur brun clair à noire et à paroi rugueuse ou lisse. Elles présentent des septations transversales et verticales et une constriction typique au niveau du septum central (Fig. 10T).</p>

❖ Bactéries

L'identification morphologique des colonies bactériennes s'est faite en se basant sur les caractères cellulaires et culturaux qui sont élucidés dans la figure 11 et le tableau 6.

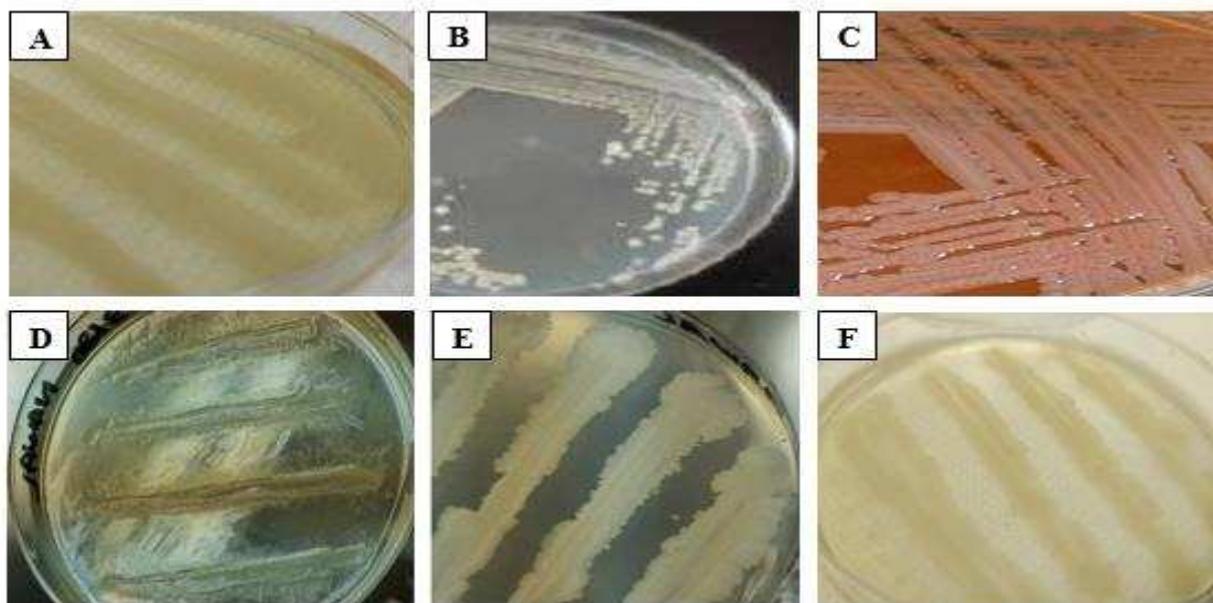


Figure 11. Aspect cultural des isolats bactériens obtenus sur milieu Nutrient Agar (NA), A : Dig B ; B : NaKB ; C : NaB ; D : Kj ; E : Nadj ; F : NaB1.

Tableau 6. Caractéristiques morphologiques des isolats bactériens obtenus.

Isolats / Caractères	Forme	Couleur	Diamètre (taille)	Relief	Bordure	Opacité	Mucus
Dig B	bâtonnets	jaunâtre	0,5–0,7 μm	lisse	convexe	translucide	présent
NaKB	bâtonnets	crème	0,5–0,9 μm	bombé	filamenteuse	Opaque	présent
NaB	circulaire	crème	0,4–0,7 μm	lisse	régulière	translucide	présent
Kj	bâtonnets	blanchâtre	2-4 mm	bombé	filamenteuse	translucide	présent
Nadj	circulaire	crème	2-3 mm	bombé	filamenteuse	opaque	présent
NaB1	bâtonnets	crème	1 mm	lisse	régulière	opaque	présent

1. Identification moléculaire

3.1 Séquençage des ITS et des Rpb2

L'identification à l'échelle de l'espèce est confirmée par l'analyse des séquences de la région ITS (ITS1-5.8S-ITS2) amplifiées avec les amorces ITS1 et ITS4 et celles du gène Rpb2 en utilisant les amorces fRpb2-5F et fRpb2-7cR, ces séquences ont été validées par comparaison avec celles disponibles dans la « GenBank » utilisant l'outil d'analyse en ligne BLAST.

Les résultats de l'analyse moléculaire des espèces séquencées nous ont permis de confirmer l'identité de soixante-dix-neuf (79) isolats fongiques des 117 isolés, appartenant à neuf genres différents, l'aspect morphologique de ces isolats est indiqué dans la figure 11 ci-dessus.

Les champignons associés à *G. rostochiensis* en Algérie, isolés et identifiés dans la présente étude comprennent des espèces des genres *Trichoderma* (28 isolats) et *Fusarium* (35 isolats), qui étaient les plus dominants, suivis des espèces d'autres genres : *Gliocladium* (7 isolats), *Alternaria* (3 isolats), *Cladosporium* (2 isolats), *Penicillium*, *Phoma*, *Stemphylium* et *Arthrotrys* (1 isolat de chaque).

Les *Trichoderma* spp. ont été isolées à partir du sol, des femelles et des kystes de *G. rostochiensis*, ces espèces ont montré une fréquence plus élevée dans les kystes (60 % des isolats). *T. harzianum* et *T. afroharzianum* ont été les plus fréquentes (représentant 68 % et 21 % des isolats de *Trichoderma* spp., respectivement). Ces deux espèces ont été suivies par *T. hirsutum* et *T. atroviride*, qui sont apparues avec une fréquence beaucoup plus faible, correspondant à un isolat de chaque.

En outre, pour les *Fusarium* spp., la plupart des isolats provenait des kystes de *G. rostochiensis*, avec *F. oxysporum* comme espèce la plus fréquente (Figure 12). Trente-huit (38) isolats fongiques isolés à partir du sol et des kystes n'ont pas pu être identifiés.

L'analyse factorielle des correspondances (AFC) montre que l'axe 1 contribue pour 33,74 % d'informations, alors que l'axe 2 totalise une contribution de 21,92 % (Figure 13).

L'AFC fait ressortir six groupes, la diversité la plus élevée est observée dans la région d'El Oued qui représente le premier groupe avec les espèces *T. harzianum*, *T. afroharzianum*, *Trichoderma* sp., *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *Fusarium* spp., *Stemphylium* sp., *Cladosporium cladosporoides* et *Gliocladium roseum*.

Le second groupe comporte les espèces *F. solani*, *Penicillium* sp. et *Cladosporium* sp. avec la région de Mostaganem, alors que le troisième regroupe les espèces *T. hirsutum*, *Arthrotrys* sp. et *Alternaria* sp. avec la région de Tipaza.

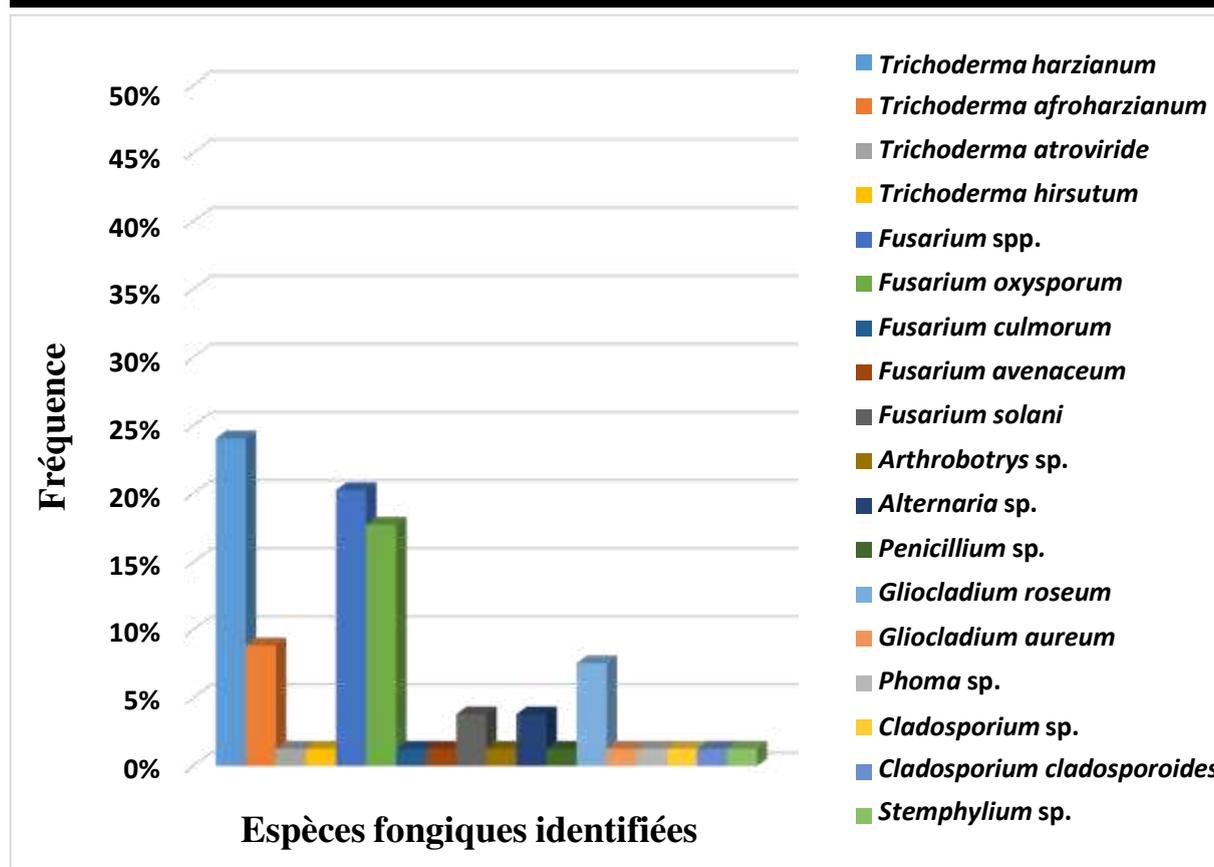


Figure 12. Fréquence d'occurrence des espèces fongiques identifiées.

Le quatrième groupe correspond à la présence des espèces *Gliocladium aureum* et *Phoma sp.* avec la région de Bouira. Le cinquième est représenté par l'espèce *T. atroviride* observée à la région d'Alger. Enfin, le sixième et dernier groupe correspond à l'espèce *F. culmorum* observée à la région de Boumerdes.

L'analyse des coordonnées des observations des axes F1 et F2 de l'AFC montre une différence hautement significative entre la région d'El Oued et les autres régions, cela est probablement dû aux différences écologiques entre cette région qui est située au Sud algérien dans un climat désertique et les autres régions, situées au Centre, à l'Est et à l'Ouest d'Algérie avec des climats humides, sub-humides ou semi-arides, d'où la différence dans la distribution des espèces fongiques isolées.

Par ailleurs, les résultats indiqués dans les figures 14, 15, 16, 17, 18 et 19 ont montré que les amorces utilisées pour l'identification des espèces étudiées ont amplifié des bandes se situant aux alentours de 500 pb, ainsi, l'amplification des isolats de *Trichoderma spp.* a donné des bandes de 532-592 pb.

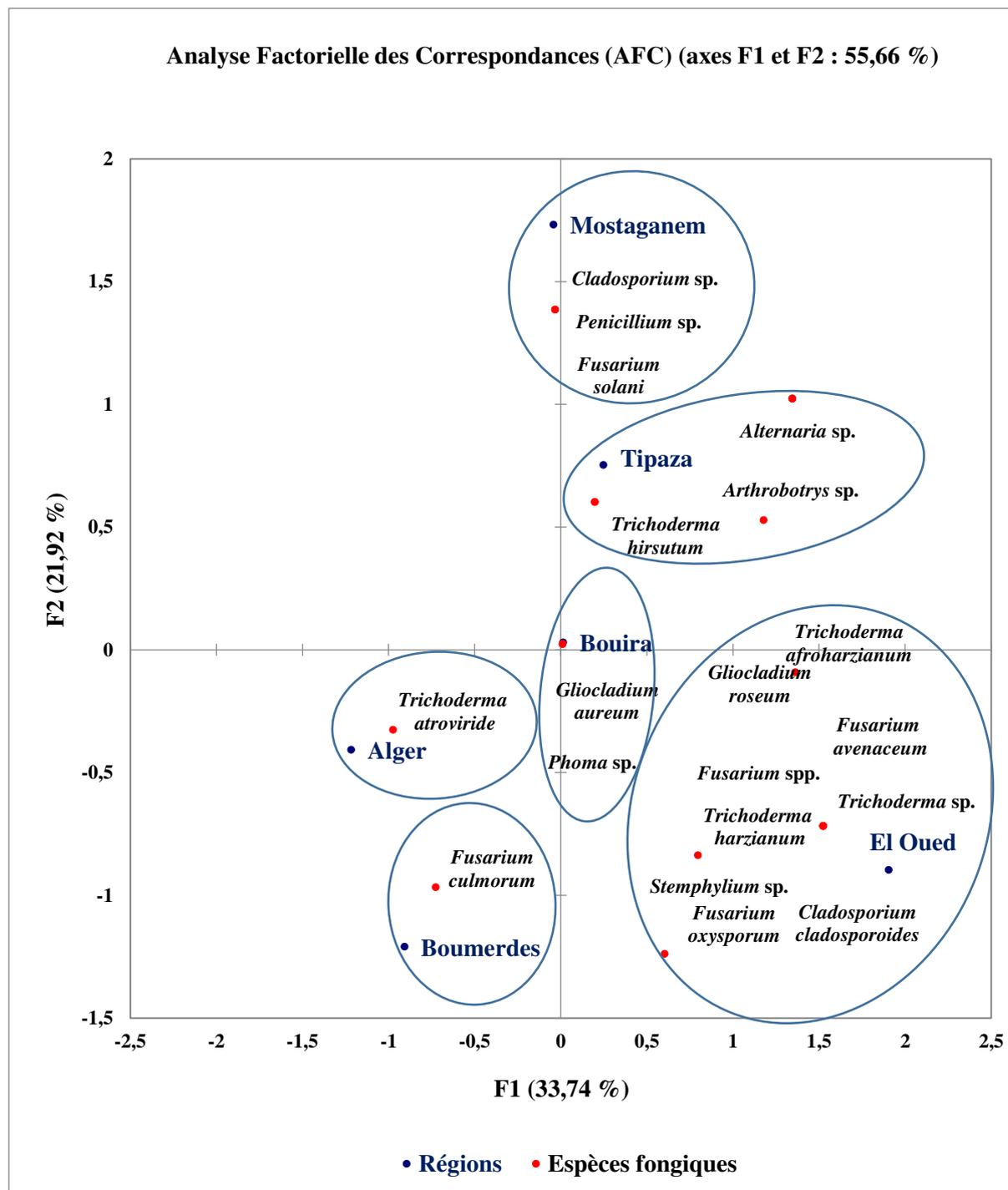


Figure 13 : Projection de la distribution des espèces fongiques isolées avec les régions sur le plan de coordination 1 et 2 de l'AFC.



Figure 14. Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de *F. oxysporum* (isolats Mc101, K10-2(1)), *Gliocladium roseum* (isolat KM1') et *Fusarium spp.* (isolats KM8' et KM8) ainsi que *T. harzianum* (isolats T1, T8, T9 et T28) et *T. afroharzianum* (isolats T6 et T22) en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.

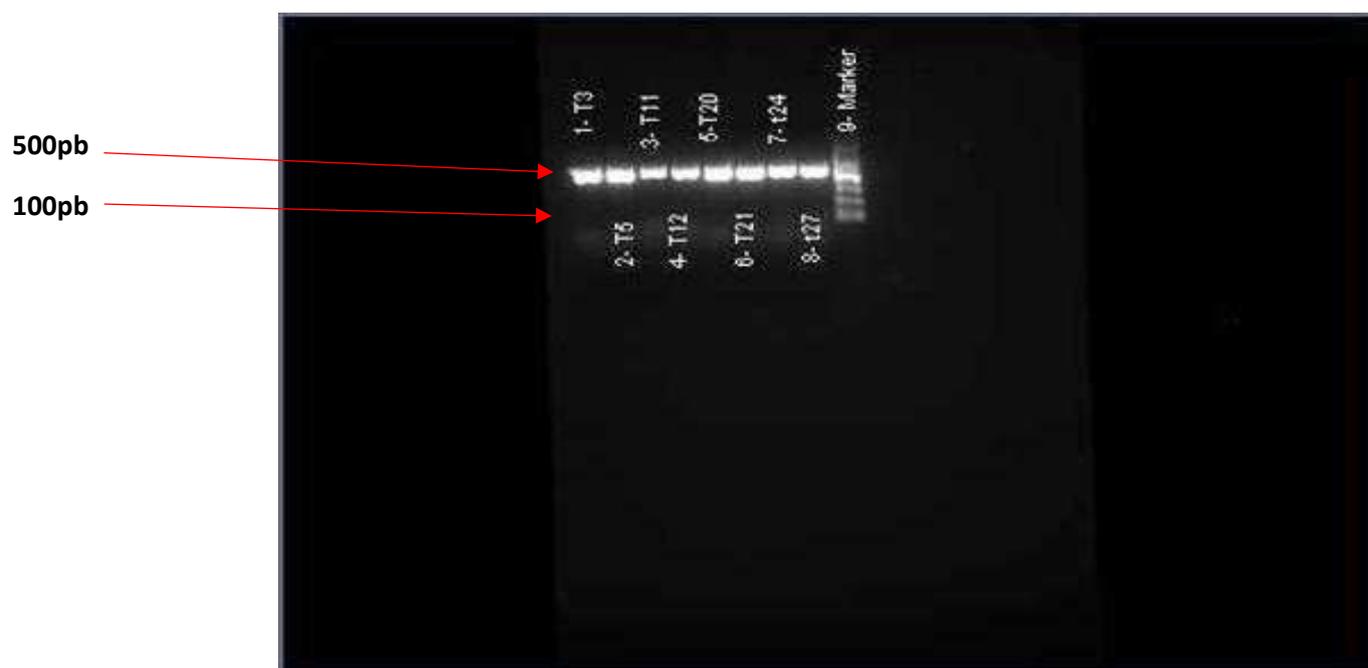


Figure 15. Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de *T. harzianum* (isolats T3, T11, T12, T20, T24 et T27) et *T. afroharzianum* (isolat T5) en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.



Figure 16. Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de *T. harzianum* (isolats T2, T7, T12, T14, T17, T18, T19, T23, T24 et T27), *T. afroharzianum* (isolats T7, T10, T14) et *T. hirsutum* (isolat T29) en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.



Figure 17. Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de *Penicillium* sp. (isolat T13), *Gliocladium roseum* (isolat F42-2(2)'), *Fusarium* sp. (isolat K10-2), *T. afroharzianum* (isolat T16), *T. harzianum* (isolat T26) et *T. atroviride* (isolat T25) en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.

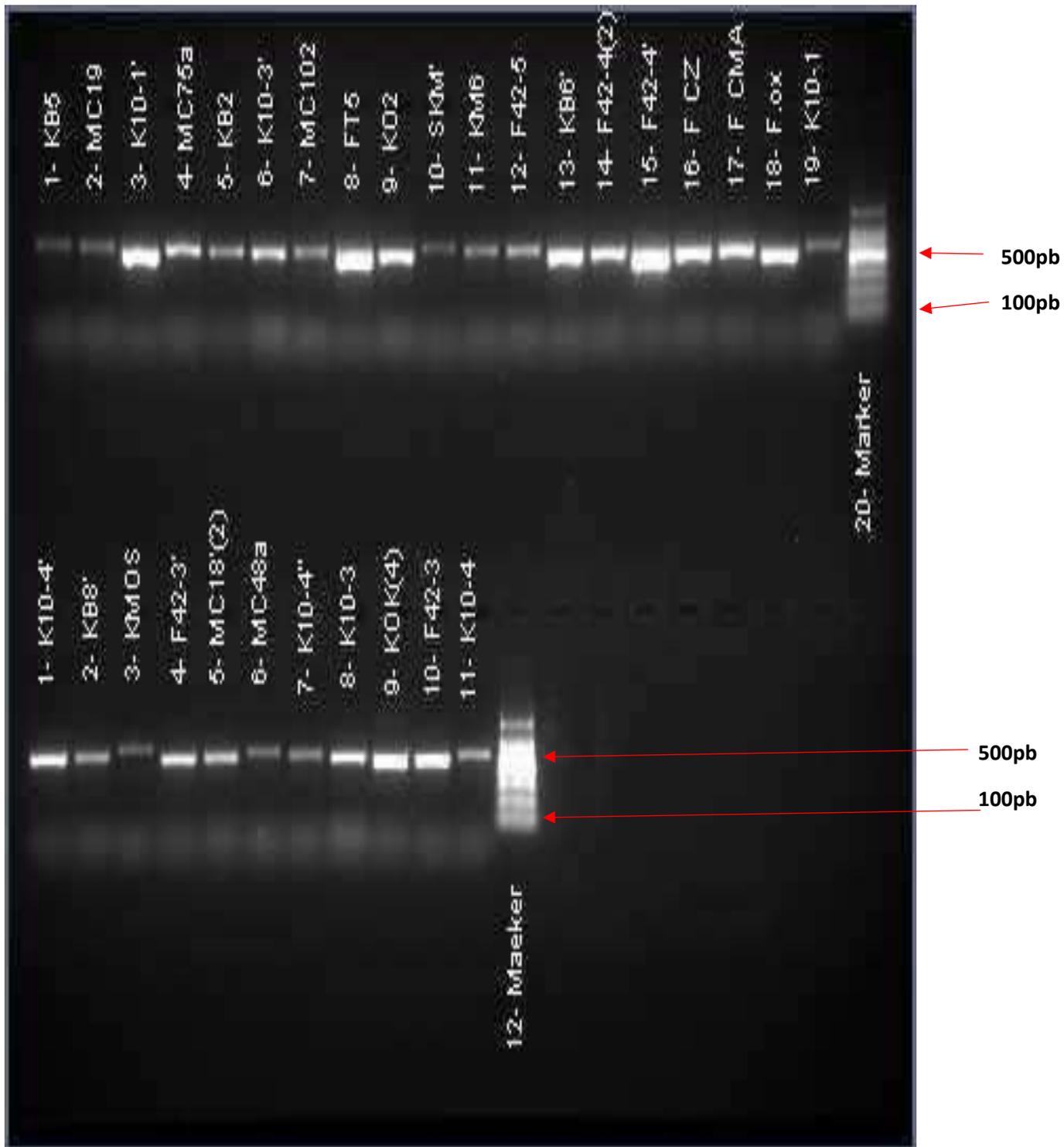


Figure 18. Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de *Fusarium* spp. (isolats KB5, F CZ, K10-1, K10-3, F42-3, K10-4), *F. oxysporum* (isolats K10-1', F42-4(2), F42-4', F.ox), *F. culmorum* (isolat KB2), *Gliocladium roseum* (isolats K10-3', K10-4'), *Alternaria* sp. (isolat FT5), *Fusarium* sp. (isolat KB6'), *Arthrobotrys* sp. (isolat F CMA) et *F. solani* (isolat KOK(4)) en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.

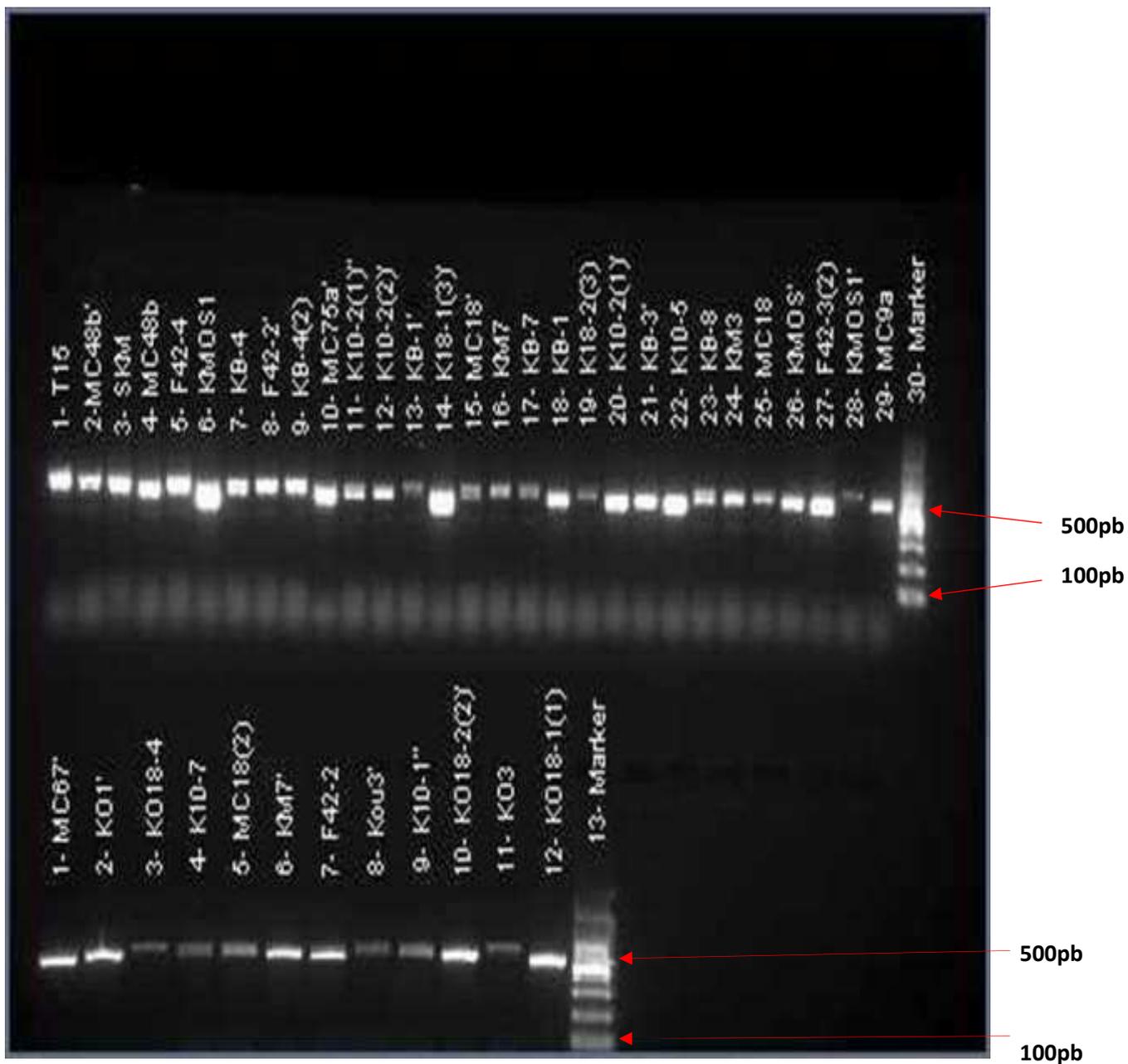


Figure 19. Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de *T. harzianum* (isolat T15), *Gliocladium roseum* (isolats MC 48b', MC75a', Kou3'), *F. oxysporum* (isolats SKM, MC 48b, F42-4 (2), K10-2 (1)''', KB3', MC18, F42-3(2), MC67'), *Alternaria sp.* (isolats F42-4, K18-1(3)'), *Fusarium spp.* (isolat MC18', KB8, KB7, KB1, KO1', KO18-4), *F. solani* (isolat K18-2(3), KM7'), *Phoma sp.* (isolat K10-5), *Stemphylium sp.* (isolat MC18-2(2)'), *Cladosporium sp* (isolat MC18(2), KO18-1(1)) et *F. avenaceum* (isolat KO3) en utilisant les paires d'amorces ITS1 et ITS4 correspondantes aux gènes ITS1-2.

3.2 Bactéries identifiées

Les analyses BLAST des séquences du gène ribosomal de l'ARNr 16S amplifiées par PCR des isolats bactériens obtenus à partir des kystes présentaient des identités variables, permettant leur identification préliminaire en tant que membres des clades *Brucella.*, *Rhizobium.*, *Stenotrophomonas.* et *Bacillus* (Tableau 7). Les bandes d'ADN correspondantes aux espèces bactériennes visualisées sont indiquées dans la figure 20. En outre, les résultats rapprochés des requêtes BLAST NCBI pour les séquences amplifiées par PCR sont indiqués dans le tableau 7 pour les quatre espèces identifiées. L'isolat « NaB1 » n'a pas été séquencé tandis que l'isolat « Nadj » a été séquencé mais n'a pas pu être identifié.



Figure 20. Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir des isolats bactériens *Brucella* spp. (isolat Dig B), *Rhizobium* spp. (isolat NaKB), isolat Nadj (**non identifié**), *Bacillus* spp. (isolat Kj) et *Stenotrophomonas* spp. (isolat NaB) en utilisant les paires d'amorces 27F et 1492R correspondantes à l'ARNr 16S.

Tableau 7. Isolats bactériens identifiés obtenus à partir des kystes de *G. rostochiensis*

Isolats	Origines	Accessions et genres les plus rapprochés de la GenBank	Couverture de requête BLAST (%)	Identité BLAST (%)
DigB	Bouira	KJ634686.1 <i>Brucella</i>	76	91,87
NaKB	Bouira	EU748920.1 <i>Rhizobium</i>	29	78,67
NaB	Bouira	KY079269.1 <i>Stenotrophomonas</i>	23	86,49
Kj	Mostaganem	MH497609.1 <i>Bacillus</i>	40	87,84

3.3 Séquençage des gènes des trichothécènes

Les produits amplifiés par PCR des quatre gènes TRI (TRI3, TRI11, TRI12 et TRI14), codant pour la biosynthèse des trichothécènes chez *Trichoderma* spp. ont été obtenus à partir des isolats T4, T25 et T26, mais pas T7, qui ne présentait qu'une faible bande pour le gène TRI-11 (Figure 21). Les analyses BLAST ont montré qu'ils se sont regroupés avec une protéine hypothétique de *T. harzianum* avec une forte nt-similarité (>98 %) (Tableau 8).

Tableau 8. Les meilleures correspondances Blast des amplicons séquencés des gènes Tri des isolats de *Trichoderma* spp.

Isolats	Gène ciblé	Longueur (nt)	Accessions BLAST	Identité (%)	Couverture de requête BLAST (%)
T4	TRI3	269	XM_024915040.1	98,02	73,0
T4	TRI3	645	XM_024923427.1	99,69	98,0
T4	TRI14	436	XM_024921455.1	99,06	97,0
T25	TRI3	645	XM_024923427.1	99,69	98,0
T25	TRI11	1218	XM_024912120.1	96,59	52,0
T25	TRI14	436	XM_024921455.1	99,06	97,0
T26	TRI3	269	XM_024915040.1	98,02	73,0
T26	TRI14	436	XM_024921455.1	99,06	97,0

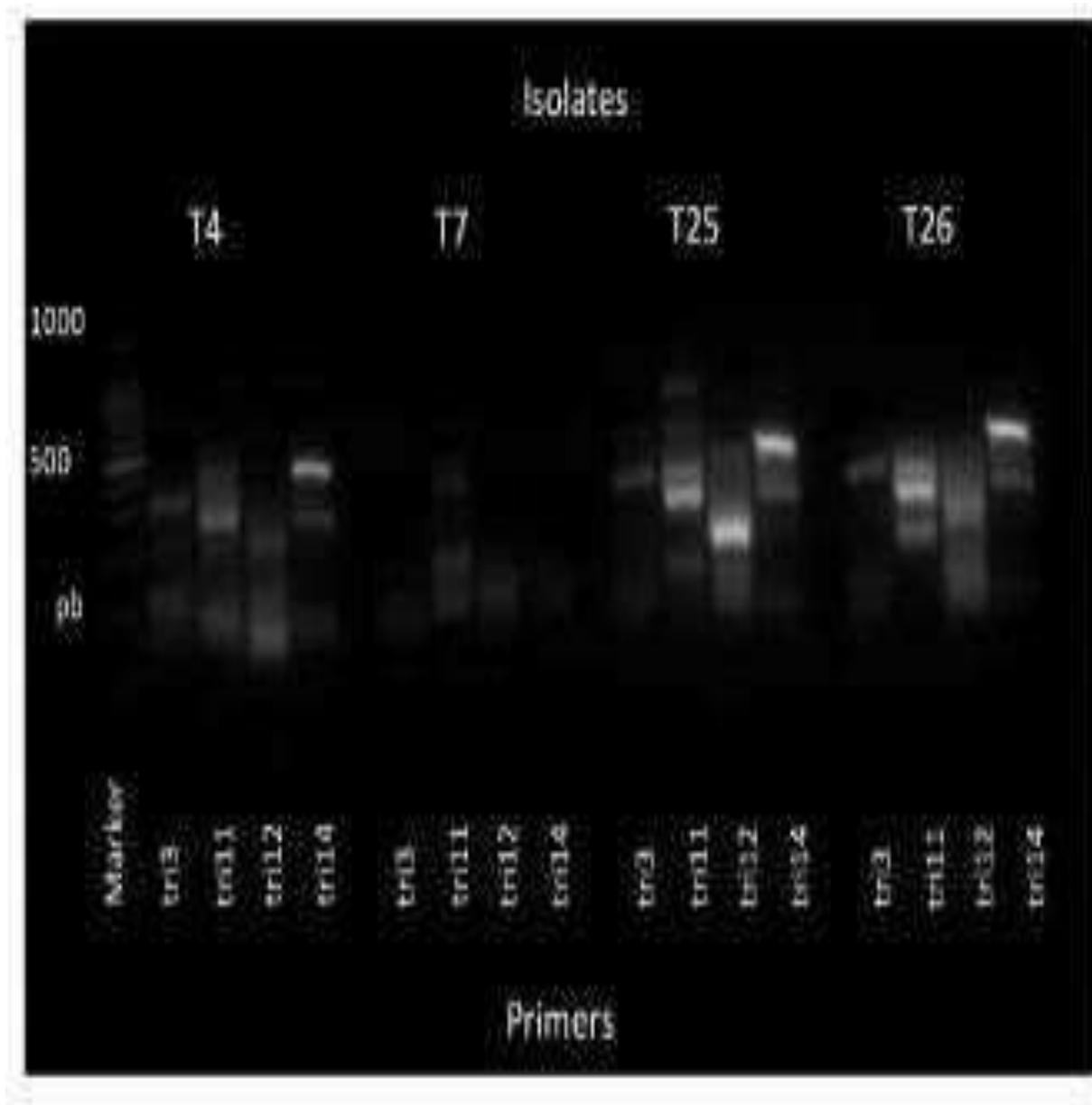


Figure 21. Electrophorèse sur gel des produits PCR obtenus à partir de *Trichoderma afroharzianum* (isolat T7), *T. atroviride* (isolats T4 et T25) et *T. harzianum* (isolat T26), en utilisant les paires d'amorces correspondantes aux gènes des trichothécènes Tri-3 (T3int3 et T3int5), Tri-11 (T11int3 et T11int5b), Tri-12 (T12int5 et T12int3) et Tri-14 (T14int5 et T14int).

3.4 Analyse phylogénétiques

Les produits de la PCR de l'espaceur interne transcrit (ITS) et des séquences du gène Rpb2 ont été obtenus pour 26 des 28 isolats de *Trichoderma*. Les regroupements des séquences produites avec celles des espèces connues ont permis l'identification de tous les isolats sauf T14 (identification non résolue) et T15 (non amplifié). Leur séquençage a permis la construction de deux dendrogrammes cohérents, basés sur la méthode de neighbour-joining et les métriques de Jukes-Cantor (Figure 22 A, B).

Les séquences brutes obtenues ont été analysées et corrigées, puis comparées à celles de la banque de gènes « GenBank NCBI ».

Ainsi, les isolats T4 et T28 ont présenté des séquences ITS à faible pourcentage de similarité (56 %) avec les séquences de l'isolat *T. harzianum* KF454871.1.

Tandis que l'isolat T26 a présenté des séquences Rpb2 à 97 % de similarité avec les séquences de l'isolat *T. harzianum* FJ442708.1 et l'isolat T5 a présenté des séquences à 71 % de similarité avec la séquence ITS de l'isolat *T. afroharzianum* NR-137304.1.

L'isolat T6 et les isolats T4 et T7 ont présenté des séquences à 98 % et 63 % de similarité respectivement avec la séquence Rpb2 de l'isolat *T. afroharzianum* FJ442691.1. C'est la séquence avec laquelle le pourcentage de similarité est le plus élevé.

Enfin, un seul isolat (T25) avait présenté une séquence à 97 % de similarité avec la séquence Rpb2 de l'isolat *T. atroviride* FJ442754.1 et un seul autre isolat (T29) avait présenté une séquence à faible pourcentage de similarité (53 %) avec la séquence ITS de l'isolat *T. hirsutum* NR-154565.1 (Fig. 22).

Les ITS ne sont pas concluant pour les *Trichoderma*, c'est pour cela qu'on doit les combiner avec d'autres gènes : les Rpb2 ou bien le TEF-1 alpha.

Ainsi, il ressort de ces résultats que le séquençage de la région ITS et des séquences du gène Rpb2 a abouti aux mêmes résultats par rapport à la similarité des séquences des 26 isolats de la collection avec ceux de la base des données « GenBank NCBI ».

On peut conclure que les isolats T4, T26 et T28 font partie de l'espèce *T. harzianum* ; T5, T6, et T7 appartiennent à l'espèce *T. afroharzianum*, alors qu'un seul isolat T25 est affilié à l'espèce *T. atroviride* et un seul autre isolat T29 à l'espèce *T. hirsutum*.

L'identification basée sur l'espaceur interne transcrit (ITS1-2) et/ou sur les données des séquences du gène Rpb2 nous permet aussi de conclure que les isolats T1, T2, T3, T8, T9, T11, T12, T17, T18, T19, T20, T21, T23, T24 et T27 appartiennent à l'espèce *T. harzianum* tandis que les isolats T10, T16 et T22 sont affiliés à l'espèce *T. afroharzianum*.

Enfin, l'isolat T13 a présenté des séquences Rpb2 qui n'ont aucune similarité avec les séquences de l'isolat *T. harzianum* FJ442708.1 malgré qu'ils sont représentés sur le même axe dans le dendrogramme, ni avec aucune autre séquences de *Trichoderma* spp., représentant une branche à part. Nous pouvons conclure que l'isolat T13 appartient à un autre genre (*Penicillium*) confirmée par les résultats rapprochés des requêtes BLAST NCBI pour les séquences de la région ITS et du gène Rpb2.

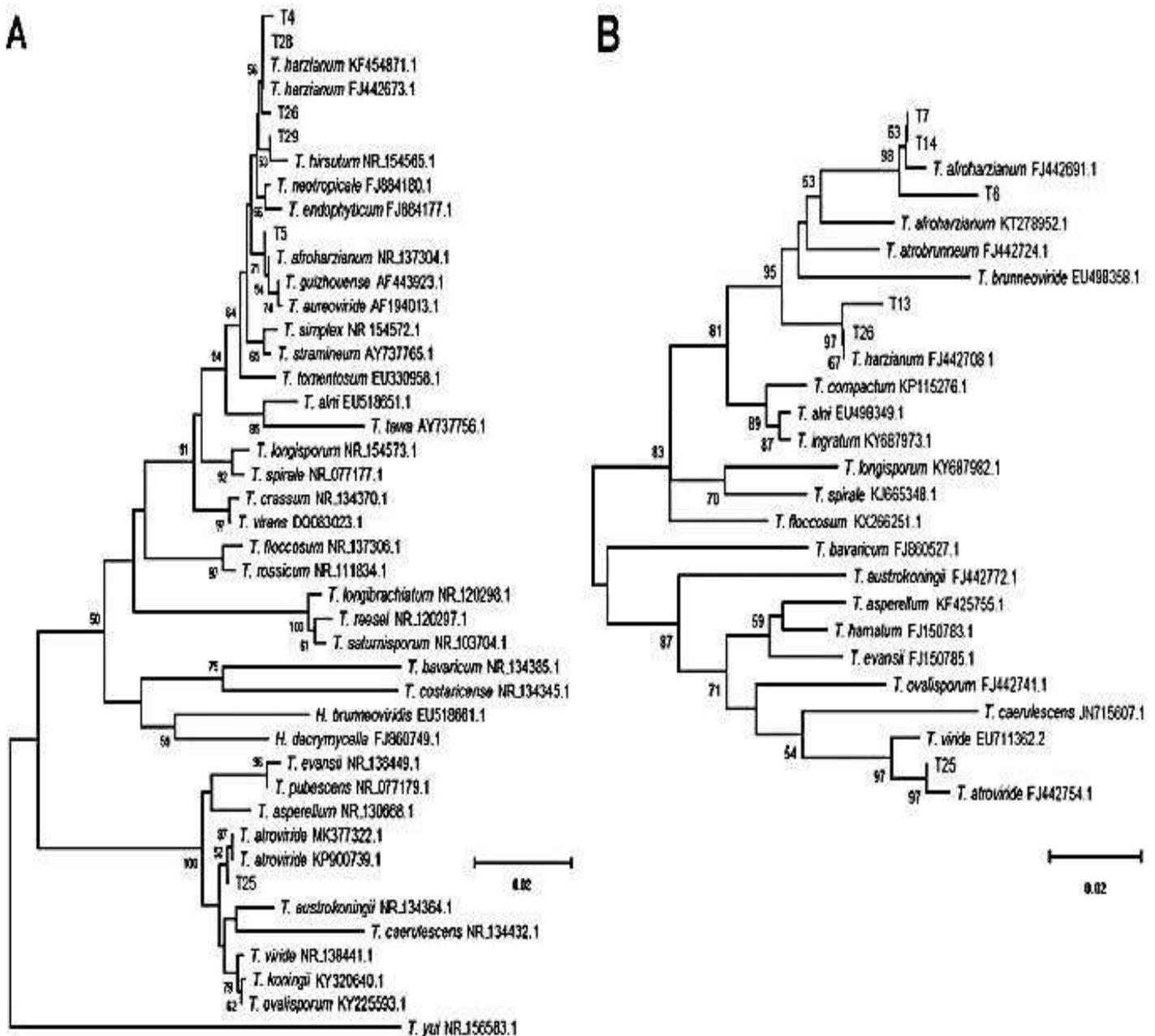


Figure 22. Arbre phylogénétique de *Trichoderma* spp. construit en utilisant les séquences produites avec les entrées les plus proches extraites de la GenBank. Les dendrogrammes sont déduits avec MEGA X, en appliquant les méthodes du neighbour-joining et de Jukes-Cantor aux séquences alignées des régions des gènes ITS1-2 (A) et Rpb2 (B). Les pourcentages de regroupement des taxons associés dans le test bootstrap (100 réplicats) est indiqué à côté des branches (seuil=0,5). Les arbres optimaux, dont la somme des longueurs de branches = 0,54914559 (A) et 0,56187331 (B), sont dessinés à l'échelle, en nombre de substitutions de bases par site.

Les séquences obtenues ont été inscrites sur la banque de gènes NCBI (National Center of Biotechnology Information) et un numéro d'accèsion a été attribué pour chacune d'elles (Tableau 9).

Tableau 9. Les isolats séquencés et leurs accèsions ITS sur la banque de gènes NCBI

Isolats	Accessions ITS de la GenBank
T1	MW857209 (<i>T. harzianum</i>)
T2	MW857210 (<i>T. harzianum</i>)
T3	MW857211 (<i>T. harzianum</i>)
T4	MW857233 (<i>T. harzianum</i>)
T5	MW857226 (<i>T. afroharzianum</i>)
T6	MW857231 (<i>T. afroharzianum</i>)
T7	MW857227 (<i>T. afroharzianum</i>)
T8	MW857212 (<i>T. harzianum</i>)
T9	MW857213 (<i>T. harzianum</i>)
T10	MW857228 (<i>T. afroharzianum</i>)
T12	MW857214 (<i>T. harzianum</i>)
T14	MW857215 (<i>Trichoderma</i> sp.)
T16	MW857229 (<i>T. afroharzianum</i>)
T18	MW857216 (<i>T. harzianum</i>)
T19	MW857217 (<i>T. harzianum</i>)
T20	MW857218 (<i>T. harzianum</i>)
T21	MW857219 (<i>T. harzianum</i>)
T23	MW857220 (<i>T. harzianum</i>)
T24	MW857221 (<i>T. harzianum</i>)
T25	MW857234 (<i>T. atroviride</i>)
T26	MW857237 (<i>T. harzianum</i>)
T27	MW857222 (<i>T. harzianum</i>)
T28	MW857223 (<i>T. harzianum</i>)
T29	MW857224 (<i>T. hirsutum</i>)
F42-4	MW857225 (<i>Alternaria</i> sp.)

II. Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence d'une forte biodiversité de microorganismes dans l'écosystème de la pomme de terre. Les isolements réalisés ont montré une prédominance des genres *Trichoderma* et *Fusarium*, suivis des genres ayant une fréquence inférieure à 10 % : cas de *Penicillium*, *Alternaria*, *Stemphyllium*, *Phoma* et *Cladosporium*, ils

sont ainsi considérés comme des opportunistes ou parasites secondaires (Ownley Gintis et al., 1983 ; Kerry, 1988). Le taux de colonisation des kystes, œufs et femelles des nématodes à kystes par les champignons dans les agrosystèmes varient de 10-90 % pouvant affecter leur viabilité (Clovis et Nolan, 1983).

Cependant, les espèces appartenant au genre *Trichoderma* représentent les champignons les plus répandus dans le monde entier dans toutes les zones climatiques et elles sont bien adaptées à différentes niches écologiques (Harman, 2004). En outre, ces espèces sont présentes dans la plupart des types de sols (Sariah et al., 2005) et elles sont capables de se développer dans des sols dont le pH est compris entre 2,5 et 9,5. De plus, ce genre a une forte capacité colonisatrice de son habitat et un avantage sur de nombreux autres microorganismes telluriques par mobilisation et absorption facile des nutriments du sol, le rendant plus compétitif (Harman, 2000). Les espèces de ce genre s'adaptent à différentes conditions environnementales avec une croissance rapide (Felix et al., 2014 ; Siddiquee et al., 2014).

Par ailleurs, *Fusarium* est l'un des champignons telluriques les mieux caractérisés en terme de distribution géographique dans le monde, il est omniprésent dans tous les types de sols agricoles (Silvestro et al., 2013). Des études ont montré que la fréquence d'isolement de certaines espèces de *Fusarium* était en corrélation avec les caractéristiques physicochimiques du sol (Windels et Kommedahl, 1974). Selon Saeedi et Jamali (2021), le CaCO₃, le carbone, la matière organique et le pH ont été reconnus comme les variables environnementales les plus importantes pour la distribution des espèces de *Fusarium* dans le sol, ainsi l'abondance de ce champignon est plus élevée dans les sols riches en matière organique et dans les sols des champs cultivés par rapport aux sols des prairies et des forêts (Yergeau et al., 2009 ; Edel-Hermann et al., 2015). Ces paramètres expliquent la grande abondance des *Trichoderma* spp. et de *Fusarium* spp. au sein de nos isolats.

En revanche, la diversité et l'abondance des *Trichoderma* spp. et des *Fusarium* a été rapportée par de nombreux travaux ; ainsi, en Inde, cent quatre espèces fongiques ont été isolées à partir d'échantillons de sol de pomme de terre et de kystes de *Globodera* spp. collectées dans 67 régions ont révélé la dominance de *Trichoderma* avec 36 isolats, 21 *Fusarium*, 16 *Aspergillus*, 15 *Paecilomyces*, 8 *Verticillium* et 71 espèces fongiques non identifiées (Devrajan et al., 2011). En Russie, l'identification des *Trichoderma* spp. par les séquences ITS 1 et 2 de l'ADNr des isolats obtenus ont été comparées à celle des souches types de *Trichoderma* taxonomiquement établies. Trente-neuf isolats ont été identifiés comme étant *T. atroviride*, *T. virens*, *T. hamatum*,

T. asperellum, *T. koningii* et *T. oblongisporum*. Vingt-six autres isolats ont donné six types de séquences ITS1/2 étroitement apparentées, mais similaires aux différentes souches de *T. harzianum* (Kullnig et al., 2000). En Autriche, quarante-six souches ont été identifiées au niveau de l'espèce par l'analyse des caractères morphologiques et par des séquences ITS1 et 2 de l'ADNr et dans certains cas un fragment du gène du facteur d'élongation de la traduction (*tef1*) et l'analyse RAPD ont montré une grande diversité génétique de *Trichoderma* (Wuczowski et al., 2003).

Par ailleurs, en Australie 46 échantillons de sols ont permis la mise en évidence de *V. chlamydosporium* et *P. lilacinus* (Stirling et West, 1991). Enfin, la colonisation des kystes d'*H. schachtii* et de *Globodera* spp. par les espèces appartenant aux genres *Acremonium*, *Chaetomium*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Humicola*, *Mariannaea*, *Nematophthora*, *Periconia*, *Phoma* et *Verticillium* a été rapportée par Yu et Coosemans (1998) où *F. oxysporum* était l'espèce prédominante.

D'autre part, la variabilité génétique au sein de 69 isolats de *Trichoderma* obtenus à partir de différents lieux géographiques a été étudiée, les données des séquences obtenues à partir de la région ITS1 de l'ADNr et d'un fragment du gène *tef1* ont été utilisées dans l'analyse phylogénétique, 21 types de séquences ITS1 et 17 types de séquences *tef1* distincts ont été identifiés parmi les 69 isolats (Hermosa et al., 2004).

L'étude menée par Szabó et al. (2012) sur des combinaisons de dix-huit souches de cinq espèces de *Trichoderma* : *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. rossicum*, *T. tomentosum* et *T. virens* avec six souches de quatre espèces de champignons nématophages à savoir *Arthrobotrys oligospora*, *A. tortor*, *Monacrosporium haptotylum* et *M. cionopagum* ont révélé que les souches de *T. harzianum* possèdent la plus forte capacité d'inhibition de l'éclosion des œufs du nématode *Caenorhabditis elegans* et la meilleure compatibilité avec *M. cionopagum* étant donné que les systèmes enzymatiques chitinolytiques de *Trichoderma* jouent un rôle important dans le processus d'inhibition de l'éclosion des œufs, l'activité transcriptionnelle des *chi18-5* (*chit42*) et *chi18-12* (*chit33*) de *T. harzianum* (SZMC 1647) a également été caractérisée.

En Chine, une étude parmi mille neuf cent dix souches de *Trichoderma* isolées à partir du sol en utilisant la séquence de la région ITS 1 et 2 de l'ADNr et les séquences partielles du facteur d'élongation *tef1- α* a révélé la présence de 23 espèces avec une dominance de *T. harzianum* (H, lixii) (Sun et al., 2012)

Egalement, une enquête à grande échelle sur la diversité de *Trichoderma* au Sud Européen et en Macronésie a permis l'identification de 90 espèces dont 17 espèces nouvellement décrites, le séquençage d'un fragment du gène *tef1* a révélé une variation génétique au sein des différents isolats (Jaklitsch et Voglmayr, 2015).

Au Maroc, dix-sept souches de *Trichoderma* ont été isolées à partir d'échantillons de sol de différentes origines (forêts d'arganiers et champs de cultures). Trois espèces ont été identifiées par amplification du facteur d'élongation (*tef1*), regroupées dans deux sous-clades différents : *T. afroharzianum* et *T. guizhouense* appartenant au clade *Harzianum* et *T. reseei* appartenant au clade *Longibrachiatum* (Mokhtari et al., 2017).

En Algérie, neuf isolats de *Trichoderma* ont été obtenus à partir de la rhizosphère de l'olivier dans les régions de Bouira et Boumerdes, puis purifiés et identifiés sur la base de la morphologie, Cette analyse a permis de subdiviser la collection en deux groupes phénotypiques à savoir *T. harzianum* avec cinq isolats et *T. atroviride* avec 4 isolats (Benzina et al., 2020).

Chihat et al. (2021) ont isolé quarante-six souches de *Trichoderma* spp. à partir des sols de différents endroits et écosystèmes d'Algérie, ces souches ont été identifiées au niveau de l'espèce par l'analyse des ITS1 et ITS2 de l'ADNr et du TEF 1- α . Elles ont été assignées à *T. atroviride* (12 souches), *T. gamsii* (10), *T. orientale* (1) et 23 au complexe d'espèces *T. harzianum* (*T. harzianum*, *T. afroharzianum*, *T. atrobrunneum* et *T. guizhouense*). Ces auteurs rapportent *T. gamsii*, *T. orientale*, *T. atrobrunneum* et *T. guizhouense* pour la première fois en Algérie. Parallèlement, quinze isolats de *Trichoderma* spp. obtenus à partir de la rhizosphère de tomate, fraise et vigne et d'un bio-compost commercial (Bio-composte®) des régions d'Alger, Bejaia, Biskra, Boumerdes et Tipaza ont révélé sur la base de l'analyse des séquences d'ADN de quatre gènes (ITS, *tef1*, *Rpb2* et *acl1*) les espèces *T. afroharzianum* (quatre isolats), *T. gamsii* (quatre isolats), *T. longibrachiatum* (trois isolats), *T. atroviride* (un isolat), *T. brevicompactum* (un isolat), *T. breve* (un isolat) et *T. lixii* (un isolat), les trois dernières espèces sont la première signalisation en Algérie (Hammad et al., 2021).

Il est important de signaler que les espèces *T. afroharzianum* et *T. hirsutum* ont été recensées pour la première fois en Algérie dans notre étude tandis que l'espèce *T. harzianum*, la plus dominante dans nos isolats a déjà été identifiée avec *T. atroviride* par Boureghda et Bouznad (2009). En outre, un total de 369 isolats de *Trichoderma* ont été isolés à partir du sol au Kenya, puis identifiés et classés sur onze espèces en suivant les clés taxonomiques de Samuels et al. (2006) et de Gams et Bissett (1998). Les espèces identifiées étaient : *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. spirale*, *T. virens*, *T. tomentosum*, *T. brevicompactum*,

T. crassum et *T. hamatum*, l'espèce la plus abondante était *T. harzianum* avec une fréquence d'isolement de 38,87 % (Maina et al., 2015).

Parmi les espèces de *Fusarium* spp. isolées dans notre étude, *F. oxysporum* est l'espèce la plus dominante. Ce constat concorde avec des études antérieures qui décrivent l'association de cette espèce aux nématodes à kystes. *Fusarium* spp. sont des parasites secondaires des kystes, cependant ils jouent un rôle non négligeable dans la suppression naturelle des nématodes (Goswami et Rumpfenhorst, 1978 ; Eapen et al., 2005).

Certains isolats de ce genre sont considérés comme des agents antagonistes potentiels aussi bien contre les champignons pathogènes que contre les nématodes phytoparasites. Ainsi, au Canada, *F. oxysporum* et *F. equiseti* (Corda) Saccardo ont été isolées en association aux œufs de *G. rostochiensis*, où *F. oxysporum* est le plus fréquent (Clovis et Nolan, 1983).

F. oxysporum, *F. solani* (von Martius) Saccardo et *F. sambucinum* Fuckel ont été isolées à partir des femelles de *G. rostochiensis* et *G. pallida* et des sols infestés par ces nématodes au Royaume uni (Crump et Flynn, 1995).

F. oxysporum ; *F. solani* ; *F. semitectum* Berkeley & Ravenel ; *F. heterosporum* Nees & T. Nees, *F. moniliforme* Sheldon et *F. stoveri* Booth sont associées aux kystes de *G. rostochiensis* et *G. pallida* en Belgique (Yu et Coosemans, 1998 ; Mensi et al. 2011).

De même, *F. oxysporum*, *F. solani* et *F. heterosporum* Nees & T. Nees ont été signalés dans les kystes de *G. rostochiensis* en Turquie (Karakas, 2014). Kooliyottil et al. (2017) ont isolé sept espèces fongiques à partir des œufs et des kystes de *G. pallida* aux USA dont trois espèces de *Fusarium* spp., il s'agit de *Chaetomium globosum* Kunze, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. tricinctum* (Corda) Saccardo, *Microdochium bolleyi* (Sprague) de Hoog & Hermanides-Nijhof, *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraaken, Hywel-Jones & Samson et *Plectosphaerella cucumerina* (Lindfors) Gams. Ces espèces ont toutes montré un pouvoir important de réduction de l'infection de la pomme de terre par *G. pallida*, L'espèce *C. globosum* a enregistré le taux de réduction le plus élevé de 76 %.

Fusarium oxysporum et *F. solani* se sont avérées être associées aux femelles et aux kystes d'*Heterodera glycines* (Gintis et al., 1983 in Jatala, 1986).

En Algérie, les travaux relatifs à l'isolement de ce genre a fait l'objet de nombreux travaux. Haddadi et al., 2013 ; Righi et al., 2015 , Smaha et al., 2019 l'ont signalé comme étant associé aux kystes d' *H. avenae*.

Le genre *Gliocladium* a été isolé dans la majorité des zones prospectées. En effet, le rôle de ce champignon comme parasite de nématodes est connu, ainsi la présence d'une mycoflore abondante colonisatrice des kystes de *Globodera* spp. dont *G. roseum* a été rapportée par Rodríguez-Kábana et Morgan-Jones et al. (1988) ; son association avec les *Meloidogyne* et *Globodera* a été mise en évidence par Trifonova et Karadžova (2003) et Karakaş (2014).

L'isolat *Arthrobotrys* sp. a été obtenu à partir du sol de la région de Tipaza, en effet, ce genre fait partie des champignons nématophages les plus étudiés dans le monde. Sa diversité a été mise en évidence, Cayrol (1983) a signalé l'association d'*A. irregularis* aux larves de *Meloidogyne* spp. Par ailleurs, ce genre est souvent indiqué comme un antagoniste important au genre *Meloidogyne* (Al-Hazmi et al., 1982; Singh et al., 2012; Hammache, 2012., Hastuti and Faull, 2018).

En ce qui concerne l'isolement des genres *Alternaria.*, *Phoma* et *Penicillium*, leur présence a été rapportée dans les kystes de *Globodera* et ils sont connus comme antagonistes à l'égard de ce bioagresseur mais aussi des genres *Meloidogyne* et *Heterodera* (Mensi et al., 2011 ; Martinez-Beringola et al., 2013).

Il est à préciser que les nématodes à kystes sont essentiellement parasités par *Paecilomyces lilacinus* et *Verticillium chlamydosporium* (Kerry et al., 1993 ; Dos Santos et al., 2019). L'espèce *V. chlamydosporium* est particulièrement connue pour son parasitisme à l'égard des genres *Meloidogyne*, *Heterodera* et *Globodera* (Kerry, 1990 ; Crump et Flynn, 1995 ; Yu et Coosemans, 1998 ; Martinez-Beringola et al., 2013 ; Karakaş , 2014).

Cette dernière espèce a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche depuis sa mise en évidence comme agent de lutte biologique par Jatala et al. (1979). Cependant, dans notre étude ces antagonistes n'ont pas été recensés, ceci est due probablement à leurs exigences écologiques ou encore à leur présence souvent masquée ou inhibée par la croissance rapide de bactéries ou d'autres antagonistes comme les *Trichoderma* connus pour leur croissance rapide. Il est à souligner que ces champignons méritent d'être recherchés vu leur grandes potentialités de parasitisme à l'égard des *Globodera* et leur rôle dans la bioformulation de bionématicides.

Par ailleurs, concernant l'étude préliminaire de l'isolement des bactéries à partir des kystes de *Globodera* spp. à savoir *Brucella* spp., *Rhizobium* spp. et *Stenotrophomonas* spp., les analyses BLAST n'ont pas montré de similitudes étroites entre les produits de la PCR obtenus avec des espèces bactériennes connues, il est à souligner que l'identification des souches

« Nadj » et « NaB1 » n'a pas été résolue, ce qui suggère que les isolats doivent faire l'objet d'études approfondies. L'association des genres *Brucella*, *Rhizobium* et *Stenotrophomonas* avec les kystes de *G. rostochiensis* a été observée pour la première fois.

Cependant, plusieurs *Bacillus* spp. ont été signalées en association avec les NPP dans le monde entier (Devrajan et al., 2011; Elhady et al., 2017) et il est probable qu'en raison de la grande diversité de ce clade bactérien, de nouvelles espèces ou de nouveaux taxons spécialisés dans le parasitisme des nématodes ou la stimulation de la croissance des plantes peuvent être découverts dans les zones nouvellement échantillonnées (Colagiero et al., 2018 ; Fira et al., 2018).

Chapitre 2 : Evaluation de l'activité nématocide de quelques isolats de champignons antagonistes à l'égard de *G. rostochiensis*

L'objectif de cette étude consiste à évaluer l'activité nématocide de quelques souches de champignons antagonistes sur la mortalité des larves et l'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* *in vitro* et sur le développement de ce bioagresseur et la croissance des plants de pomme de terre *in vivo*.

1. Matériel et méthodes

1.1 Test *in vitro* : activité nématocide de quelques isolats des champignons antagonistes *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp. vis-à-vis de *G. rostochiensis*

1.1.1 Matériel biologique :

*Le nématode

L'espèce de nématode utilisée au cours de notre expérimentation est *G. rostochiensis* en provenance de la région de Bouira.

*Les champignons antagonistes

Les espèces fongiques retenues au cours de notre expérimentation ont été isolées à partir du sol et des kystes de *Globodera* en provenance de plusieurs régions à vocation pomme de terre, la souche *Trichoderma atroviride* (Ta.13), nous a été fournie par Mme Boureghda, les codes et les origines des isolats sont consignés dans le tableau 10.

Tableau 10. Origines des souches fongiques testées contre *G. rostochiensis*.

Isolats	Noms/Codes	Origines	Zones d'étude / Cultures
1	<i>Trichoderma harzianum</i> Th.8 (Persoon, 1794)	Sol	Bouira (Pomme de terre)
2	<i>Trichoderma atroviride</i> Ta.13 (Bissett, 1984)	Semences	ITGC-Oued Smar, Alger (Blé)
3	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22 (Chaverri, 2015)	Kystes	Bouira (Pomme de terre)
4	<i>Fusarium oxysporum</i> F.ox (Schlechtendal, 1824)	Kystes	El Oued (Pomme de terre)
5	<i>Fusarium</i> sp. KM8' (Link, 1809)	Kystes	Mostaganem (Pomme de terre)
6	<i>Fusarium</i> sp. MC18 (Link, 1809)	Sol	Mostaganem (Pomme de terre)
7	<i>Fusarium oxysporum</i> K10-3 (Schlechtendal, 1824)	Kystes	Bouira (Pomme de terre)

Ces souches ont été entreposées au laboratoire de mycologie, Département de botanique, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (El Harrach-Alger). Par la suite, elles ont été utilisées pour la préparation de suspensions de spores fongiques.

1.1.2 Nématicide utilisé

Le nématicide utilisé au cours de notre expérimentation est le Vydate[®], c'est un carbamate dont la matière active est l'Oxamyl. Les doses préconisées pour les tests *in vitro* ont été préparées en rapportant les doses optimales recommandées (Tableau 11) à la surface des boîtes Petri utilisées.

Le choix de ce produit est dû à son utilisation par les agriculteurs et sa disponibilité. Les caractéristiques du nématicide sont présentées dans le Tableau 11.

Tableau 11. Les caractéristiques du nématicide Vydate (Anonyme, 2017)

Nom commercial	Vydate[®]
Matière active	Oxamyl
Origine	DuPont[™]
Fabricant	DuPont[™]
Formule brute	C₇H₁₃N₃O₃S
Famille chimique	Carbamates
Solubilité	Dans l'eau 280 g/l à 25 °C
Concentration de la matière active	240 g/l
Forme	Liquide vert
Utilisation et doses d'emploi	30 Kg/ha
Mode d'action	Systémique et contact
Toxicité	Très toxique

1.1.3 Préparation des souches fongiques

Les souches fongiques testées ont été préalablement conservées dans des tubes Eppendorf. Un premier repiquage est réalisé pour vérifier la pureté des souches dans des boîtes de Petri contenant un milieu PDA incubées pendant trois jours à une température de 20 ± 2 °C dans une chambre de culture. Un deuxième repiquage de ces souches a été effectué dans les mêmes conditions mais pendant 7 jours.

1.1.4 Préparation des suspensions de spores fongiques

A l'aide d'un scalpel, un fragment de champignon a été prélevé à partir du milieu de culture. Celui-ci est placé dans un Erlenmeyer contenant de l'eau distillée stérile. Après agitation, trois concentrations ont été établies 10^2 , 10^4 et 10^8 à l'aide de la cellule de Malassez.

1.1.5 Préparation des exsudats racinaires

Afin d'obtenir les exsudats racinaires, des plants de pomme de terre Var. Spunta sont cultivés dans des pots en plastique sous conditions naturelles. Après 4 à 6 semaines, chaque pot était saturé d'eau distillée puis 50 ml d'eau ont été rajoutés et la solution obtenue a été collectée, filtrée pour éliminer les débris et stockée à 4 °C jusqu'à leur utilisation ultérieure (Turner et al., 2009).

1.1.6 Activité larvicide

*Mode opératoire

Afin d'obtenir les larves du 2^{ème} stade, les kystes de *G. rostochiensis* sont préalablement mis à éclore dans de l'exsudat racinaire de pomme de terre puis une suspension contenant 50 L2 est placée dans des boîtes de Pétri de 5cm de diamètre contenant 5 ml de suspensions de spores fongiques des différents antagonistes testés aux trois doses retenues : 10^2 , 10^4 et 10^8 . Les témoins sont représentés par 5ml d'exsudats racinaires de pomme de terre et 5 ml du Vydate®. Pour chaque traitement, quatre répétitions ont été réalisées. Au total, 20 boîtes par souche ont été incubées en chambre de culture et le nombre de larves mortes a été dénombré sous loupe binoculaire après 24 h, 48 h et 72 h.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de mortalité \%} = \frac{\text{Nombre de nématodes morts}}{\text{Nombre total de nématodes}} \times 100$$

Sachant que le nombre d'individus dénombrés morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'individus tués par ce produit, il existe une mortalité naturelle qui vient s'ajouter à la mortalité provoquée par ce toxique. De ce fait, les résultats sont exprimés en taux de mortalité corrigée calculé selon la formule d'Abbott (1925) :

$$\text{Pourcentage de mortalité corrigée MC \%} = \frac{M2 - M1}{100 - M1} \times 100, \text{ Où :}$$

M1 : pourcentage de mortalité observée dans le témoin ; **M2** : pourcentage de mortalité observée dans la population traitée.

Les résultats obtenus sont transformés en probits afin de pouvoir tracer les droites de régression en fonction des logarithmes décimaux des doses utilisées.

1.1.7 Activité ovicide

*Mode opératoire

Les kystes de *G. rostochiensis* ont été écrasés à l'aide d'une pince dans une boîte quadrillée et 50 œufs ont été placés dans des boîtes de Pétri contenant 5ml de suspensions de spores aux trois doses étudiées : 10^2 , 10^4 et 10^8 . Les témoins sont représentés par 5ml d'exsudats racinaires de pomme de terre et 5 ml du nématicide (Vydate®). Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque traitement, au total 20 boîtes par souche ont été incubées en chambre de culture. Le comptage d'œufs non éclos a été effectué après 24 h, 48 h et 72 h sous loupe binoculaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs corrigée selon la formule d'Abbott (1925) :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs corrigée PC\%} = \frac{P2 - P1}{100 - P1} \times 100$$

Où : **P1** : pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs observé dans le témoin ; **P2** : pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs observé dans la population traitée.

1.2 Test *in vivo* : Effet de *T. harzianum* (Th.8) et *F. oxysporum* (F.ox) sur le développement de *G. rostochiensis*

1.2.1 Matériel biologique

*Le Nématode

Le nématode utilisé au cours de notre expérimentation est *Globodera rostochiensis*. L'inoculation a été réalisée à partir des kystes de ce dernier à raison de 35 kystes (environ 7000 œufs) par pot, ces derniers ont été placés dans un petit sac en polyester disposés au centre du pot (Martinez-Beringola et al., 2013).

*Les champignons antagonistes

Les champignons antagonistes utilisés sont : *Trichoderma harzianum* (Th.8) et *Fusarium oxysporum* (F.ox) et leur combinaison (*T.harziaum* Th.8+ *F.oxysporum* Th.8).

1.2.2 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de notre expérimentation est la pomme de terre *Solanum tuberosum* L. variété Spunta, provenant du Centre National de Contrôle et Certification des semences et des plants (CNCC, Alger), connue pour sa sensibilité aux nématodes à kystes *Globodera* spp.

1.2.3 Nématicide utilisé

Une formulation de Vydate® a été utilisée au cours de notre expérimentation. Les doses préconisées pour le test *in vivo* ont été préparées en rapportant les doses préconisées dans l'index phytosanitaire au volume des pots utilisés.

1.2.4 Test de pathogénicité de la souche *F. oxysporum* (F.ox) *in vivo*

Cet essai a été effectué dans des pots en plastique de 22 cm de diamètre, contenant 2/3 de sol et 1/3 de terreau préalablement stérilisés, mené sur des plantules de pomme de terre Var. Spunta et de tomate Var. Marmande.

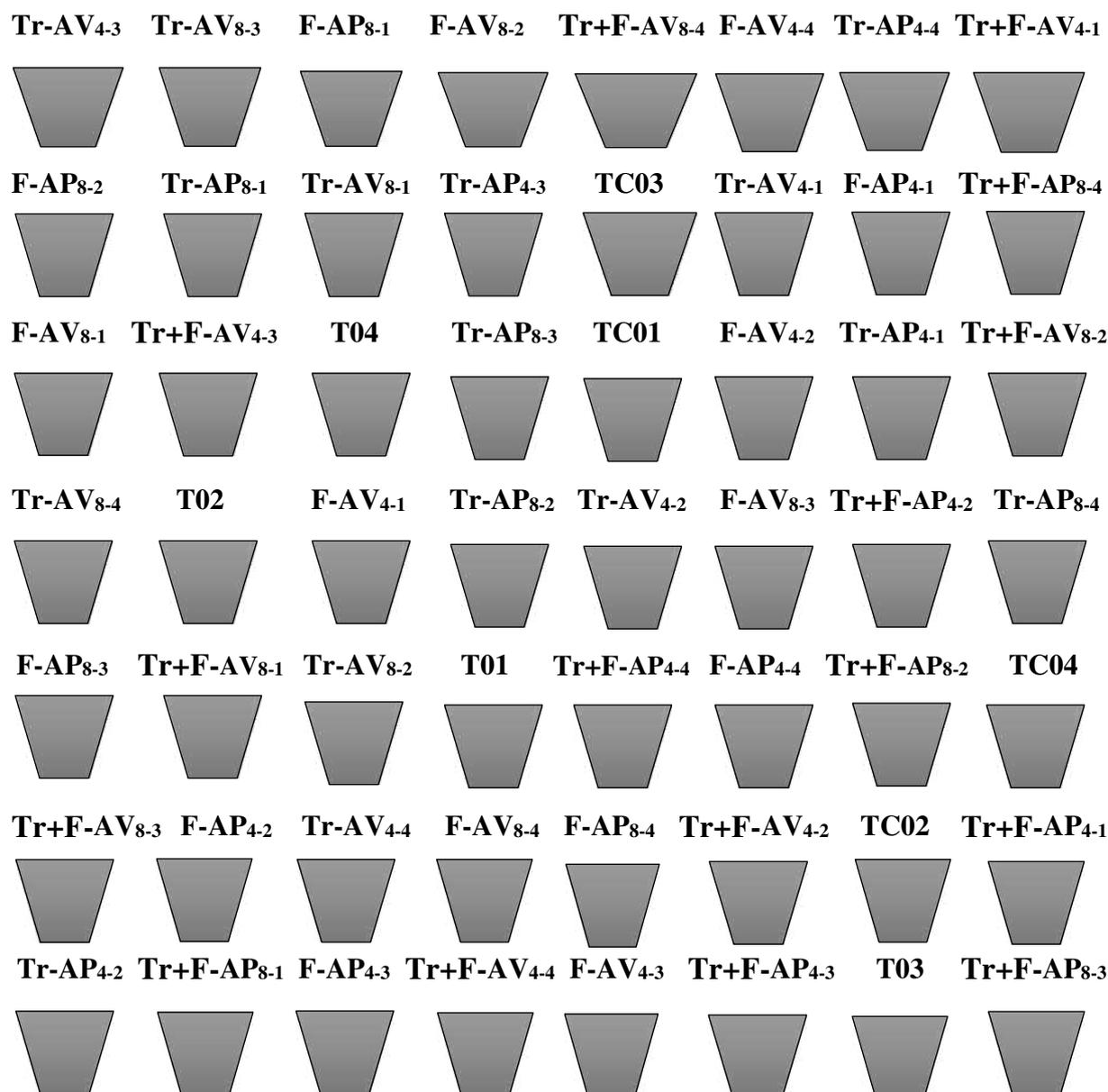
L'inoculation est réalisée environ une semaine après émergence des premières feuilles, en irriguant chaque pot par 100 ml de suspensions de spores du champignon ajustée à 10^6 spores ml⁻¹. Ce test de pathogénicité sur plants est conduit pour la souche *F. oxysporum* F.ox isolée et conservée au laboratoire de mycologie de l'ENSA. Les témoins sont représentés par les plants non inoculés avec les suspensions de spores de *F. oxysporum*. Les pots ont été placés dans des conditions naturelles, irrigués régulièrement suivant les besoins des plants et les conditions environnantes et organisés selon un dispositif complètement aléatoire. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque traitement.

Les paramètres retenus sont l'apparition ou non de symptômes typiques de flétrissement vasculaire (jaunissement hémiplogique des feuilles de la base, brunissement vasculaire et évolution ascendante de la maladie, nombre de feuilles flétries par tige). Après 3 mois, les plants qui ne présentent pas de flétrissement sont considérés comme sains.

1.2.5 Dispositif expérimental

L'essai a été effectué dans des pots en plastique de 22 cm de diamètre contenant 3 kg de terre composé de 2/3 de sol et 1/3 de terreau préalablement stérilisés.

Les témoins sont représentés par des plants inoculés avec des kystes de *G. rostochiensis* : (T) et des plants traités avec le nématicide (Oxamyl) : (TC). Les doses utilisées dans cet essai sont les deux doses les plus efficaces *in vitro* : (10^4) et (10^8). Chaque traitement (*T. harzianum* Th.8, *F. oxysporum* F.ox et *T. harzianum* Th.8+ *F. oxysporum* Th.8) a été appliqué 7 jours avant (AV) ou après plantation (AP). Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque traitement. Les pots ont été placés dans des conditions naturelles et irrigués régulièrement et organisés selon un dispositif complètement randomisé à blocs aléatoires (Figure 23).

**Légendes:**

F : *Fusarium oxysporum* F.ox

Tr : *Trichoderma harzianum* Th.8

Tr+F: Combinaison *T. harzianum* Th.8+ *F. oxysporum* F.ox

TC: Témoin chimique

T : Témoin

AV: Traitement avant plantation

AP: Traitement après plantation

4-1 ; 4-2 ; 4-3 ; 4-4 : Répétitions de la dose 10^4 des traitements fongiques.

8-1 ; 8-2 ; 8-3 ; 8-4 : Répétitions de la dose 10^8 des traitements fongiques.

Figure 23. Schéma du dispositif expérimental.

Enfin, les kystes sont extraits après 120 jours de plantation (en fin de culture), après homogénéisation du sol, un échantillon de 500 g de sol par pot a été analysé selon la méthode de Fenwick.

Les paramètres retenus pour l'évaluation de l'efficacité de ces traitements :

- ❖ Le nombre de nouveaux kystes et œufs, comptés sous loupe binoculaire ;
- ❖ Le pourcentage d'œufs non éclos ;
- ❖ Le taux de reproduction : ($R = P_f / P_i$), où : P_f = population finale de nématodes dans le sol ; P_i =inoculum initial de nématodes ;
- ❖ La croissance des plants de pomme de terre, déterminée en mesurant la hauteur des tiges ;
- ❖ Le poids sec moyen des racines de pomme de terre.

1.2.6 Analyses statistiques

Afin de déterminer l'efficacité des différents traitements, l'analyse de la variance (ANOVA) avec le logiciel (DAASTAT) a été effectuée dans le but de comparer les différentes variations des paramètres étudiés puis le classement des moyennes a été réalisé par le test de comparaison multiple de Duncan ($P < 0,05$).

2. Résultats

2.1 Test de pathogénicité de la souche *F. oxysporum* (F.ox)

D'après les observations effectuées, les plants de pomme de terre et de tomate inoculés par les suspensions de spores de *F. oxysporum* F.ox ne présentaient aucun symptôme de flétrissement et sont considérés donc comme sains. En effet, nous pouvons affirmer que cette souche n'est pas pathogène et peut être testée contre *G. rostochiensis* dans nos essais.

2.2 Evaluation *in vitro* de l'activité nématicide de quelques isolats des champignons antagonistes *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp. à l'égard de *G. rostochiensis*

*Activité larvicide

Les résultats de l'évaluation de quelques isolats des champignons antagonistes *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp. à l'égard des larves (J2) de *G. rostochiensis* à différentes concentrations exprimées en pourcentage de mortalité corrigée sont consignés dans le tableau 12 et illustrés dans la figure 24. La lecture des données révèle que tous les champignons testés présentent une activité nématicide vis à vis des larves de *G. rostochiensis*, celle-ci augmente avec l'élévation de la concentration et la période d'exposition et varie d'un isolat à un autre.

Concernant le genre *Trichoderma*, avec la concentration élevée (10^8) et après une période

d'exposition de 72 heures, *T. afroharzianum* T22 et *T. atroviride* Ta13 affichent des taux de mortalité de 66,76 et 70,12 % respectivement. *T. harzianum* Th.8 a manifesté une mortalité des larves (J2) plus élevée avec 83,50 %.

A une concentration de 10^4 et après 72 h, ce genre a présenté des taux de mortalité de 57,47 ; 61,59 et 73,17 % respectivement pour *T. afroharzianum* T22, *T. atroviride* Ta.13 et *T. harzianum* Th.8.

Avec une concentration plus faible (10^2), *T. afroharzianum* T22, *T. atroviride* Ta.13 et *T. harzianum* Th.8 enregistrent des taux de mortalité de 40,41 ; 45,00 et 62,13 % respectivement après 72 h d'exposition (Tableau 12).

Le genre *Fusarium* présente un taux de mortalité des larves très variable selon l'isolat, ainsi, à une concentration élevée (10^8) et après 72 h d'exposition, ce taux s'élève à 58,81 ; 61,65 ; 68,53 et 81,36 % pour *F. oxysporum* K10-3, *Fusarium* sp. MC18, *Fusarium* sp. KM8' et *F. oxysporum* F.ox respectivement.

Avec une concentration moyenne (10^4) et toujours à 72 h, ce genre a montré des taux de mortalité des larves de 53,34 ; 55,73 ; 60,10 et 76,00 % respectivement pour *F. oxysporum* K10-3, *Fusarium* sp. MC18, *Fusarium* sp. KM8' et *F. oxysporum* F.ox.

Mais à une concentration plus faible (10^2) et après 72 h d'exposition, nous notons un taux de mortalité des larves de 60,73 % pour *F. oxysporum* F.ox tandis que *F. oxysporum* K10-3, *Fusarium* sp. MC18 et *Fusarium* sp. KM8' enregistrent des taux de mortalité inférieurs à 50 %.

Il est à signaler que les espèces *T. harzianum* Th.8 et *F. oxysporum* F.ox sont les plus efficaces *in vitro* en manifestant des taux de mortalité des larves supérieurs à 50 % pour les trois concentrations et les trois périodes d'exposition. De ce fait, ces deux espèces ont été retenues pour les tests *in vivo*.

Concernant le témoin, le pourcentage de mortalité des larves est très faible, il varie de 1,96 à 7,84 % après 24 h et 72 h d'exposition, le traitement nématocide à l'Oxamyl a enregistré une mortalité de 80,00 % après 72 h d'exposition (Tableau 12).

L'analyse de la variance a révélé une différence hautement significative entre le témoin exsudat, le témoin chimique et les trois concentrations des traitements fongiques.

Les droites de régression représentées dans la figure 24 montrent des coefficients de corrélation R^2 significatifs.

Tableau 12. Effet des antagonistes testés sur la mortalité des larves (J2) de *G. rostochiensis*.

Souches testées et périodes d'exposition	Pourcentage de mortalité naturelle des larves (J2) à différentes concentrations (%)			Pourcentage de mortalité corrigée des larves (J2) à différentes concentrations (%)		
	10 ⁸	10 ⁴	10 ²	10 ⁸	10 ⁴	10 ²
<i>Trichoderma atroviride</i> Ta.13						
24 h	59,42	55,80	38,28	58,61	54,92	37,05
48 h	64,10	59,30	42,99	62,64	57,64	40,66
72 h	72,46	64,60	49,31	70,12	61,59	45,00
<i>Trichoderma harzianum</i> Th.8						
24 h	66,80	59,46	53,94	66,14	58,65	53,02
48 h	72,65	65,98	58,10	71,53	64,11	56,39
72 h	84,79	75,27	65,10	83,50	73,17	62,13
<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22						
24 h	57,44	52,50	36,69	56,59	51,55	35,42
48 h	62,42	55,74	41,73	60,89	53,93	38,31
72 h	69,37	60,80	45,07	66,76	57,47	40,41
<i>Fusarium oxysporum</i> F.ox						
24 h	69,66	60,48	52,67	69,05	59,69	51,72
48 h	74,93	68,72	55,33	73,91	67,44	53,51
72 h	82,82	77,88	63,81	81,36	76,00	60,73
<i>Fusarium sp.</i> KM8'						
24 h	58,00	54,29	37,66	57,16	53,38	36,41
48 h	63,00	57,54	42,00	61,03	55,81	39,63
72 h	71,00	63,22	47,83	68,53	60,10	43,39
<i>Fusarium sp.</i> MC18						
24 h	55,50	52,69	36,00	54,61	51,74	34,72
48 h	60,90	54,30	39,30	59,30	52,44	36,82
72 h	64,66	59,20	44,83	61,65	55,73	40,14
<i>Fusarium oxysporum</i> K10-3						
24 h	52,94	51,00	34,51	52,00	50,02	33,21
48 h	57,51	53,00	39,67	55,78	51,08	37,21
72 h	62,04	57,00	44,31	58,81	53,34	39,57
Témoin exsudat						
24 h	1,96	-	-	-	-	-
48 h	3,92	-	-	-	-	-
72 h	7,84	-	-	-	-	-
Témoin chimique (Vydate®)						
24 h	52,40	-	-	-	-	-
48 h	63,80	-	-	-	-	-
72 h	80,00	-	-	-	-	-

***Activité ovicide**

L'efficacité des souches fongiques testées a été également évaluée par le pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* à différentes concentrations, les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs corrigée, ces derniers sont consignés dans le tableau 13.

La lecture de ce tableau montre que tous les champignons testés présentent une activité nématocide à l'égard des œufs de *G. rostochiensis* qui augmente avec l'élévation de la

concentration et la période d'exposition. Cependant, le total d'éclosion est inversement proportionnel à la concentration (Tableau 13).

Concernant le genre *Trichoderma*, avec une concentration élevée (10^8) et après 72 h d'exposition, *T. harzianum* Th.8 s'est avéré le plus efficace avec un taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 87,82 % suivi de *T. atroviride* Ta.13 et *T. afroharzianum* T22 qui affichent des taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 71,52 et 67,83 % respectivement. (Tableau 13).

Avec une concentration moyenne (10^4) et toujours à 72 h, *T. afroharzianum* T22, *T. atroviride* Ta.13 et *T. harzianum* Th.8 enregistrent des taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 51,67 ; 62,94 et 75,86 % respectivement.

Pour une concentration plus faible (10^2), *T. afroharzianum* T22, *T. atroviride* Ta.13 et *T. harzianum* Th.8 manifestent des taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 48,09 ; 54,18 et 69,55 % respectivement après 72 h d'exposition.

Concernant le genre *Fusarium*, à la concentration élevée (10^8) et après 72 h d'exposition, *F. oxysporum* F.ox affiche un taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 86,35 %, suivi de *Fusarium* sp. KM8', *Fusarium* sp. MC18 et *F. oxysporum* K10-3 avec des taux de 69,27 ; 60,20 et 58,24 % respectivement.

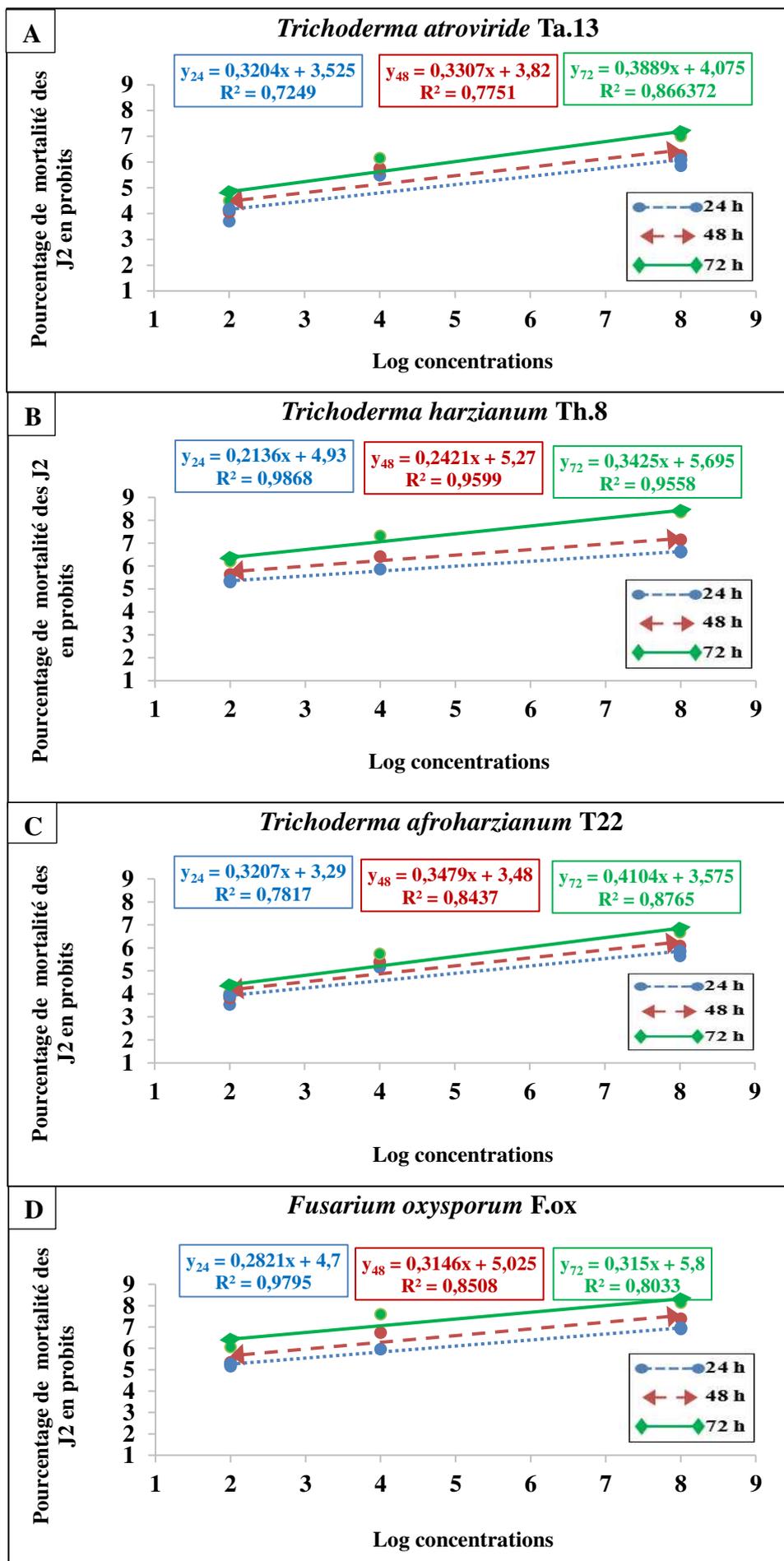
A la concentration moyenne (10^4) et toujours à 72 h, ce genre a présenté des taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 49,17 ; 51,54 ; 61,38 et 82,03 % respectivement pour *F. oxysporum* K10-3, *Fusarium* sp. MC18, *Fusarium* sp. KM8' et *F. oxysporum* F.ox.

Enfin, pour une concentration faible (10^2) et après 72 h d'exposition, *F. oxysporum* F.ox manifeste un taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 73,06 %, suivi de *Fusarium* sp. KM8', *Fusarium* sp. MC18 et *F. oxysporum* K10-3 qui affichent des taux de 42,08 ; 41,29 et 40,11 %.

Le témoin a montré un taux d'inhibition de l'éclosion des œufs faible pour les trois périodes d'exposition, la majorité des œufs ont éclos après ces trois périodes d'exposition, pour le témoin chimique (Vydate®), nous notons un pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs de 71,73 % après une durée d'exposition de 72 heures (Tableau 13).

L'analyse de la variance montre une différence hautement significative entre les différents traitements utilisés. Ce même test a enregistré des différences hautement significatives entre les trois doses des traitements fongiques et entre les trois périodes d'exposition.

Les droites de régression représentées dans la figure 25 montrent des coefficients de corrélation R^2 significatifs.



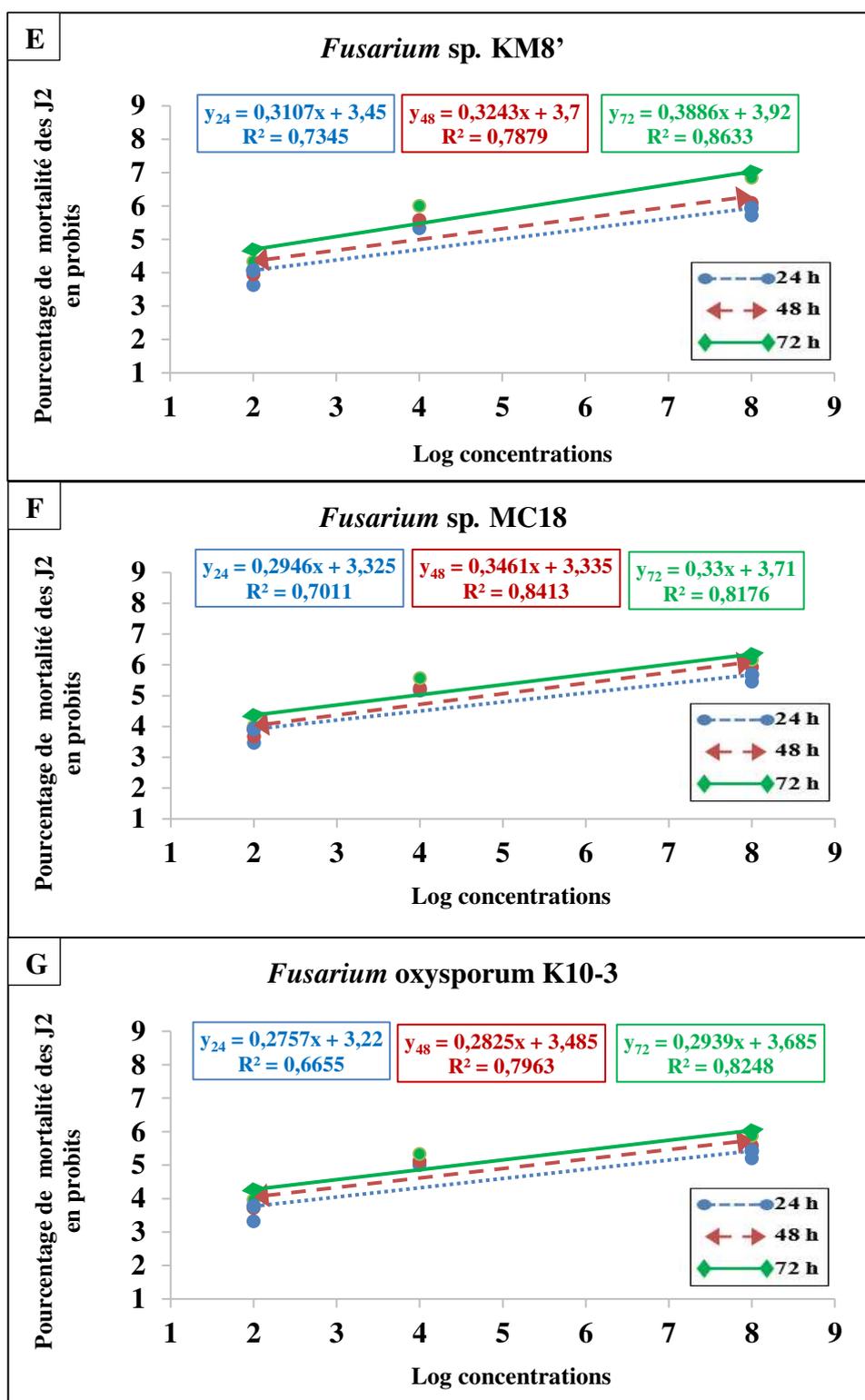
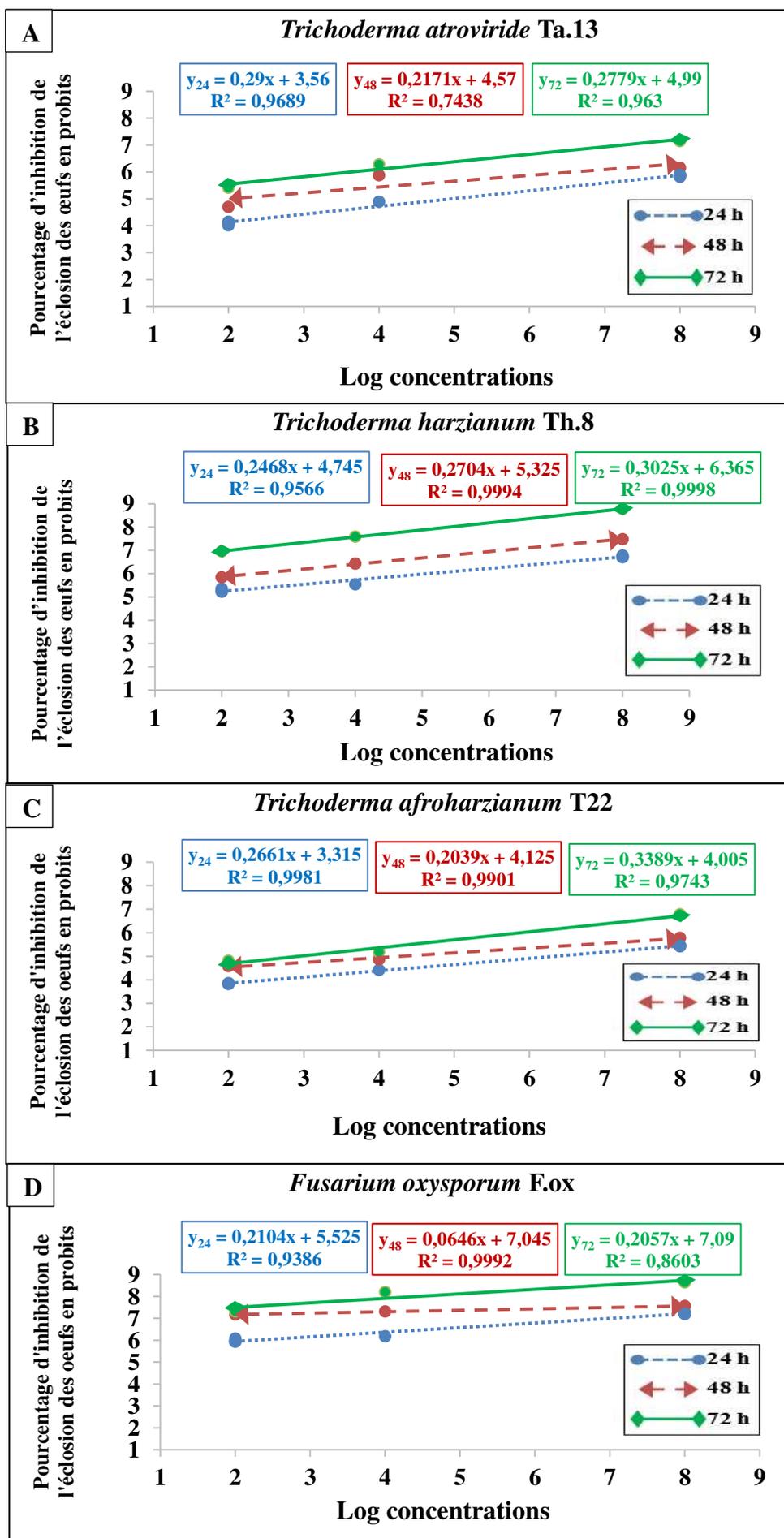


Figure 24. Droites de régression des probits à différentes concentrations de **A** : *T. atroviride* Ta.13, **B** : *T. harzianum* Th.8, **C** : *T. afroharzianum* T22, **D** : *F. oxysporum* F.ox, **E** : *Fusarium* sp. KM8', **F** : *Fusarium* sp. MC18 et **G** : *F. oxysporum* K10-3 testées sur la mortalité des larves (J2) de *G. rostochiensis*.

Tableau 13. Effet des antagonistes testés sur l'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis*.

Souches testées et périodes d'exposition	Pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs naturelle à différentes concentrations (%)			Pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs corrigée à différentes concentrations (%)		
	10 ⁸	10 ⁴	10 ²	10 ⁸	10 ⁴	10 ²
<i>Trichoderma atroviride</i> Ta.13						
24 h	59,05	50,01	41,44	58,21	48,99	40,24
48 h	64,56	61,99	51,19	61,60	58,82	47,12
72 h	75,91	68,65	61,24	71,52	62,94	54,18
<i>Trichoderma harzianum</i> Th.8						
24 h	68,45	56,38	54,53	67,81	55,49	53,60
48 h	76,69	67,08	61,73	74,75	64,33	58,54
72 h	89,70	79,58	74,24	87,82	75,86	69,55
<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22						
24 h	55,21	45,30	39,47	54,30	44,18	38,23
48 h	61,05	52,68	49,94	57,81	48,73	45,76
72 h	72,78	59,11	56,08	67,83	51,67	48,09
<i>Fusarium oxysporum</i> F.ox						
24 h	73,26	62,61	61,69	72,71	61,84	60,70
48 h	77,50	75,14	73,88	75,62	73,07	71,70
72 h	88,45	84,80	77,21	86,35	82,03	73,06
<i>Fusarium</i> sp. KM8'						
24 h	64,00	56,00	35,00	63,27	55,10	33,67
48 h	69,33	61,50	41,50	66,77	58,29	36,62
72 h	74,00	67,33	51,00	69,27	61,38	42,08
<i>Fusarium</i> sp. MC18						
24 h	51,67	45,00	38,67	50,68	43,88	37,42
48 h	55,67	50,00	44,00	51,97	45,83	39,33
72 h	66,33	59,00	50,33	60,20	51,54	41,29
<i>Fusarium oxysporum</i> K10-3						
24 h	53,67	48,00	36,67	52,72	46,94	35,38
48 h	59,33	52,00	43,33	55,94	47,99	38,60
72 h	64,67	57,00	49,33	58,24	49,17	40,11
Témoin						
24 h	2,00	-	-	-	-	-
48 h	7,70	-	-	-	-	-
72 h	15,40	-	-	-	-	-
Témoin chimique (Vydate)						
24 h	50,51	-	-	-	-	-
48 h	64,44	-	-	-	-	-
72 h	71,73	-	-	-	-	-



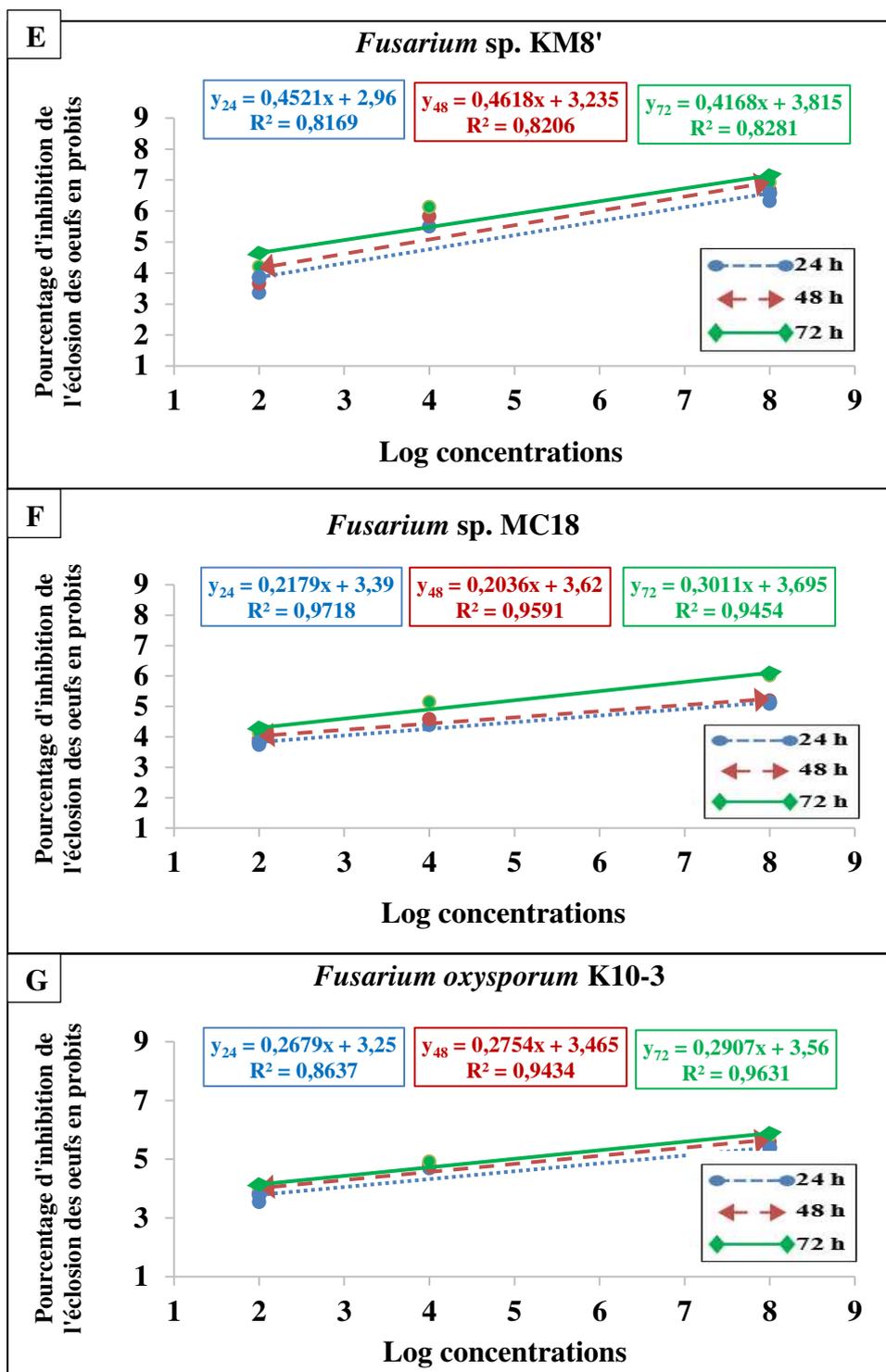


Figure 25. Droites de régression des probits à différentes concentrations de **A** : *T. atroviride* Ta.13, **B** : *T. harzianum* Th.8, **C** : *T. afroharzianum* T22, **D** : *F. oxysporum* F.ox, **E** : *Fusarium sp.* KM8', **F** : *Fusarium sp.* MC18 et **G** : *F. oxysporum* K10-3 testées sur l'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis*.

2.3. Activité nématocide de *T. harzianum* (Th.8) et *F. oxysporum* (F.ox) à l'égard de *G. rostochiensis* *in vivo*

Les résultats concernant l'effet de l'application des différents traitements de *T. harzianum* Th.8 et *F. oxysporum* F.ox et leur combinaison à différentes concentrations sur la multiplication de *G. rostochiensis* sur pomme de terre (variété Spunta) sont représentés dans le tableau 14.

Ce dernier montre que le nombre moyen de kystes dans le sol le plus faible a été enregistré dans le traitement avant plantation avec 22 ; 26 et 33 kystes respectivement pour *T. harzianum* Th.8 + *F. oxysporum* F.ox, *T. harzianum* Th.8 et *F. oxysporum* F.ox et avec 44 ; 47 et 50 kystes pour le traitement après plantation pour la dose 10^8 .

Avec une dose plus faible (10^4), ces traitements fongiques ont présenté un nombre de kystes dans le sol de 29 ; 32 et 35 pour le traitement avant plantation et 48 ; 56 et 58 kystes pour le traitement après plantation respectivement.

Ainsi, les pourcentages de réduction des effectifs enregistrés étaient de 55,41 ; 64,87 et 70,28 % et de 48,55 ; 56,76 et 60,82 % pour *F. oxysporum* F.ox, *T. harzianum* Th.8 et *T. harzianum* Th.8 + *F. oxysporum* F.ox avant plantation et inférieurs à 50 % après plantation, aux doses 10^8 et 10^4 respectivement. Toutefois, le traitement à l'Oxamyl a permis une réduction du nombre de kystes de *G. rostochiensis* de 73 % avec un nombre de 20 kystes dans le sol. Une différence hautement significative a été enregistrée entre les traitements appliqués et le témoin (Annexe 8).

L'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* (Tableau 15) varie en fonction du traitement et de la dose (Annexe 9). A la dose la plus élevée (10^8), le taux d'inhibition de l'éclosion des œufs obtenu avec l'application de *F. oxysporum* F.ox et *T. harzianum* Th.8 avant plantation est respectivement de 37,82 et 44,44 %. Cependant, le pourcentage le plus élevé est atteint avec la combinaison de ces deux champignons (57,14 %). Après plantation, les taux d'inhibition de l'éclosion des œufs enregistrés sont de 24,66 ; 30,00 et 33,06 % respectivement pour les trois traitements fongiques.

A une dose plus faible (10^4), *F. oxysporum* F.ox, *T. harzianum* Th.8 et *T. harzianum* Th.8 + *F. oxysporum* F.ox affichent des taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* de 34,87 ; 40,28 et 51,43 % avant plantation et de 22,69 ; 26,47 et 31,71 % après plantation respectivement.

Les données sur la croissance de la pomme de terre (Tableau 16) ont montré que les traitements fongiques enregistrent une augmentation de la croissance des plants de pomme de

terre de 8,42 ; 12,10 et 14,73 % avant plantation et de 3,15 ; 5,26 et 6,31 % après plantation pour *F. oxysporum* F.ox, *T. harzianum* Th.8 et *T. harzianum* Th.8 + *F. oxysporum* F.ox respectivement à la plus forte dose (10^8).

Pour une dose plus faible (10^4), *F. oxysporum* F.ox, *T. harzianum* Th.8 et *T. harzianum* Th.8 + *F. oxysporum* F.ox montrent des pourcentages d'augmentation de la croissance de 5,78 ; 10,52 et 11,58 % avant plantation et de 1,05 ; 2,10 et 2,63 % après plantation respectivement.

Les poids secs des racines enregistrés étaient de 0,91 ; 1,02 et 1,07 g ; 0,82 ; 0,89 et 0,95 g pour le traitement avant plantation, aux doses 10^8 et 10^4 respectivement et de 0,74 ; 0,80 et 0,88 g ; 0,61 ; 0,70 et 0,99 g pour le traitement après plantation respectivement aux mêmes doses (10^8 et 10^4).

Une différence hautement significative est enregistrée entre les effets des deux souches fongiques et leur combinaison, du témoin et du témoin chimique sur la croissance des plants de pomme de terre d'après l'analyse de la variance Anova et le test de comparaison multiple de Duncan (Annexe 10).

Le traitement à l'Oxamyl a montré un taux de croissance des plants le plus élevé de l'ordre de 20 %, suivi de *T. harzianum* Th.8 + *F. oxysporum* F.ox, *T. harzianum* Th.8 et *F.oxysporum* F.ox respectivement.

L'analyse des données relatives au poids sec des racines de pomme de terre a montré une différence hautement significative entre le témoin, les traitements fongiques (*T. harzianum* Th.8, *F.oxysporum* F.ox et leur combinaison) et le traitement chimique (Tableau 16, Annexe 11).

Tableau 14. Effet de *T. harzianum* (Th.8), *F. oxysporum* (F.ox) et leur combinaison sur la multiplication de *G. rostochiensis*.

Traitements	Nombre de kystes/ 500 g de sol		R = (Pf/Pi)		Pourcentage de réduction des effectifs (%)	
	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁴
Avant plantation						
<i>F. oxysporum</i> (F.ox)	33 ± 2,25**	35 ± 3,25**	0,94	1,00	55,41	48,55
<i>T.harzianum</i> (Th.8)	26 ± 1,25**	32 ± 2,75**	0,74	0,91	64,87	56,76
<i>T.harzianum</i> + <i>F. oxysporum</i>	22 ± 1,50**	29 ± 2,25**	0,63	0,83	70,28	60,82
Après plantation						
<i>F. oxysporum</i> (F.ox)	50 ± 3,00*	58 ± 4,00*	1,43	1,66	32,44	21,63
<i>T.harzianum</i> (Th.8)	47 ± 5,75*	56 ± 1,75*	1,34	1,60	36,49	24,33
<i>T.harzianum</i> + <i>F. oxysporum</i>	44 ± 4,25*	48 ± 3,63*	1,26	1,37	40,55	35,14
Traitement nématocide Oxamyl	20 ± 2,00**		0,57		72,98=73	
Témoin	74 ± 1,50		2,11		/	

** P < 0,05 : Réduction des effectifs hautement significative.

Tableau 15. Inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* par *F. oxysporum* (F.ox), *T. harzianum* (Th.8) et leur combinaison.

Traitements	Nombre d'œufs parasités		Nombre d'œufs non parasités		Nombre d'œufs total		Parasitisme (%)	
	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁴
Avant plantation								
<i>F. oxysporum</i> (F.ox)	74±2,38**	99±2,50**	45±2,50**	53±2,50**	119	152	37,82	34,87
<i>T.harzianum</i> (Th.8)	65±2,50**	86±1,50**	52±2,50**	58±1,50**	117	144	44,44	40,28
<i>T.harzianum</i> + <i>F.oxysporum</i>	48±2,50**	68±3,00**	64±4,00**	72±2,75**	112	140	57,14	51,43
Après plantation								
<i>F. oxysporum</i> (F.ox)	110±3,00*	147±3,00*	36±3,00*	43±2,25*	146	190	24,66	22,63
<i>T.harzianum</i> (Th.8)	91±2,75**	125±3,00*	39±1,50**	45±3,25*	130	170	30,00	26,47
<i>T.harzianum</i> + <i>F.oxysporum</i>	83±2,50**	112±2,50**	41±2,50**	52±3,00**	124	164	33,06	31,71
Témoin chimique (Oxamyl)		-		-	99			-
Témoin		-		-	198			-

** P < 0,05 : Parasitisme des œufs hautement significatif.

Tableau 16. Effet de *T. harzianum* (Th.8), *F.oxysporum* (F.ox) et leur combinaison sur la croissance des plants de pommes de terre.

Traitements	Hauteur moyenne des plants (cm)		Pourcentage d'augmentation de la croissance des plants (%)		Poids sec moyen des racines (g/pot)	
	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁸	10 ⁴
Avant plantation						
<i>F. oxysporum</i> (F.ox)	51,50 ± 3,25**	50,25 ± 3,50*	8,42	5,78	0,91 ± 0,12**	0,82 ± 0,10**
<i>T.harzianum</i> (Th.8)	53,25 ± 2,00**	52,50 ± 2,13**	12,10	10,52	1,02 ± 0,15**	0,89 ± 0,11**
<i>T.harzianum</i> + <i>F. oxysporum</i>	54,50 ± 2,25**	52,50 ± 2,25**	14,73	11,58	1,07 ± 0,17**	0,95 ± 0,14**
Après plantation						
<i>F. oxysporum</i> (F.ox)	49 ± 2,00*	48 ± 1,50*	3,15	1,05	0,74 ± 0,11*	0,61 ± 0,10*
<i>T.harzianum</i> (Th.8)	50 ± 4,00*	48,5 ± 3,50*	5,26	2,10	0,80 ± 0,12*	0,70 ± 0,11*
<i>T.harzianum</i> + <i>F. oxysporum</i>	50,5 ± 2,50*	48,75 ± 1,88*	6,31	2,63	0,88 ± 0,15**	0,99 ± 0,13**
Témoin chimique (Oxamyl)	57 ± 5,00**		20		1,09 ± 0,17**	
Témoin	47,5 ± 2,50		/		0,32 ± 0,10	

** P < 0,05 : Augmentation de la croissance hautement significative.

3. Discussion

L'analyse des données relatifs à l'évaluation de l'activité nématocide des champignons isolés à l'égard de *G. rostochiensis* a permis de mettre en évidence l'efficacité des isolats fongiques testés *in vitro* et *in vivo*. Cependant, cette activité dépend de l'espèce, de la concentration et du temps d'exposition.

L'évaluation de l'effet *in vitro* de quelques isolats des champignons antagonistes *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp. a montré que *T. harzianum* Th8 s'est avéré être l'isolat le plus efficace, suivi de *F. oxysporum* F.ox, en manifestant des taux de mortalité des larves et d'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* supérieurs à 50 % pour les trois concentrations et les trois périodes d'exposition.

En effet, les *Trichoderma* spp. possèdent un potentiel élevé de gestion des bioagresseurs par différents mécanismes, notamment le parasitisme, l'antibiose et la concurrence. En effet, plusieurs espèces ont été signalées comme étant des antagonistes des nématodes et/ou comme promoteurs de la croissance des plantes (Spiegel et Chet, 1998 ; López-Bucio et al., 2015 ; Al-Noman et Ibrahim et al., 2020).

De même, ces antagonistes figurent parmi les microorganismes les plus efficaces dans le biocontrôle des nématodes notamment les *Meloidogyne* et les *Globodera* par les deux principaux mécanismes à savoir la production de métabolites secondaires et le parasitisme direct (Sharon et al., 2001, 2011 ; Dandurand et Knudsen, 2016).

L'antibiose est un mécanisme majeur chez *Trichoderma*, les métabolites sécrétés par plusieurs espèces de ce genre sont directement impliqués dans l'activité antagoniste contre les nématodes phytoparasites (Lorito et al., 2010). Ces champignons produisent plusieurs enzymes lytiques (glucanases, chitinases, protéases et lipases) pour dégrader les cuticules des œufs et des larves composées principalement par des microfibrilles de chitine et de protéines (Elad et al., 1982 ; Blaxter et Robertson, 1998; Suarez et al., 2005). Leur capacité à produire des enzymes chitinolytiques joue un rôle majeur dans l'inhibition de l'éclosion des œufs des nématodes phytoparasites, ainsi, la forte expression des gènes *chi18-12* et *chi18-5* par *T. harzianum* durant le processus d'inhibition de l'éclosion des œufs des nématodes a été élucidée (Szabó et al., 2012).

Par ailleurs, l'évaluation de l'effet *in vivo* des champignons testés, *T. harzianum* Th.8, *F. oxysporum* F.ox et leur combinaison sur *G. rostochiensis* a montré une diminution significative du nombre de kystes dans le sol et une amélioration de la croissance des plants de pomme de terre.

Les effets positifs résultant des inoculations combinées de ces deux agents ont conduit à une diminution assez importante des kystes dans le sol, probablement attribuée aux effets additifs ou synergiques des mécanismes associés de ces antagonistes.

Selon Lin-Chao et Bremer (1986), il est possible de diminuer l'antagonisme entre les organismes de lutte biologique en appliquant des agents qui occupent des espaces comme la rhizosphère.

Ces données suggèrent que les agents fongiques antagonistes pourraient être utilisés seuls ou en différentes combinaisons, la connaissance de l'écologie de ces organismes et leurs interactions aidera à déterminer si l'activité sera complémentaire et s'ils devraient être étudiées dans une lutte intégrée contre les nématodes phytoparasites (Naz et al., 2021).

L'étude a aussi révélé que les associations des antagonistes entraînent une augmentation de la croissance, ceci concorde avec les travaux de Gautam et al. (1995) qui rapportent que lorsque les deux antagonistes *Paecilomyces lilacinus* et *Bacillus subtilis* sont associés, une augmentation de la croissance des plants de tomate a été enregistrée. De même, l'application combinée de *T. harzianum* et *P. lilacinus* permet d'améliorer la vigueur des plants de papayes (Khan et al., 2001). L'association des inoculations de *T. atroviride* et de *B. subtilis* manifeste une forte stimulation de la croissance des plants de haricot (Yobo et al., 2011).

Une meilleure efficacité contre *Meloidogyne incognita* par une combinaison de *Trichoderma virens* et des bactéries du complexe *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Holmes) Yabuuchi, Kosako, Oyaizu, Yano, Hotta, Hasimoto, Ezaki & Arakawa est rapportée par Meyer et al. (2001).

Par ailleurs, l'efficacité des applications simples ou combinées de *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces lilacinus* et *Bacillus firmus* à l'égard de *Radopholus similis* sur bananier a été rapportée. Ainsi, la combinaison de *F. oxysporum* et de *P. lilacinus* a entraîné une réduction des effectifs de l'ordre de 68,5 % tandis qu'en applications individuelles cette diminution est respectivement de 27,8 % et 54,8 %. Par ailleurs, l'application combinée de *F. oxysporum* et de *B. firmus* a permis une diminution de 86,2 % des effectifs de *R. similis*, cependant cette baisse est de 63,7 % pour *B. firmus* appliqué seul (Mendoza et Sikora, 2009).

En effet, les mécanismes de *Trichoderma* intervenant sur la croissance des plantes impliquent la sécrétion de vitamines et de phytohormones par la production d'auxines, d'éthylène (ET), d'acide Indole acétique (IAA) et de gibbérellines ; l'amélioration de la disponibilité des nutriments nécessaires pour les plantes, principalement le phosphore et l'azote à travers la minéralisation de la matière organique (Haque et al. 2012 ; Mukherjee et al. 2012); l'action positive sur le système racinaire et l'induction de la résistance systémique (Contreras-Cornejo

et *al.*, 2009 ; Hermosa et *al.*, 2012 ; Marra et *al.*, 2019). En raison de leurs propriétés de nombreux isolats de *Trichoderma* sont la base des bioformulations, appliquées pour protéger les plantes et/ou améliorer leur croissance (Oskiera et *al.*, 2015).

Nos résultats concordent avec ceux de nombreux travaux précédents qui ont montré l'efficacité de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de plusieurs agents pathogènes y compris les nématodes à kystes grâce à leurs propriétés antagonistes.

L'application de *T. viride* a réduit les populations de *Globodera* spp. dans le sol et les racines de pomme de terre et a permis d'améliorer les paramètres de croissance des plants ainsi que le rendement de pomme de terre (Umamaheswari et *al.*, 2012). De même, le traitement du sol par *T. harzianum* a réduit le taux de reproduction des kystes de *G. pallida* de 43 % et 48 % respectivement pour deux années consécutives (Dandurand et Knudsen, 2016). Le traitement du sol avec *Trichoderma* spp. réduit les kystes et les œufs de *Globodera* sp de 71 % et 74 % respectivement (Kooliyottil et *al.*, 2017).

Par ailleurs, *T. longibrachiatum* (T6) a permis une réduction des larves (J2) et des kystes d'*Hetrodera avenae* dans le sol de 89,8 % et 92,7 % et dans les racines de l'ordre de 88,3 % et 91,3 % respectivement (Zhang et *al.*, 2017). Ces mêmes auteurs ont établi que cette activité nématocide est due à la pénétration de la cuticule des larves (J2) de ce nématode par les hyphes de *T. longibrachiatum* (T6) causant leur déformation ainsi qu'à l'augmentation significative des activités des chitinases et β -1, 3-glucanases stimulées par les concentrations élevées de TL6.

Différents isolats de *T. harzianum* et *T. lignorum* testés pour leur activité nématocide à l'égard des *M. javanica* (Treb) Chitwood ont induit une diminution de l'indice de galles racinaires (Spiegel et Chet, 1998 ; Sharon et *al.*, 2001). L'application de *T. harzianum* vis-à-vis de *M. javanica* *in vitro* et *in vivo* diminue de manière significative le potentiel d'éclosion des œufs de ce nématode (Sahebani et Hadavi, 2008). Ces mêmes auteurs suggèrent que l'inhibition de l'éclosion des œufs est attribuée à l'augmentation de l'activité des chitinases extracellulaires et l'induction des mécanismes de défense des plantes, menant à une résistance systémique, ces deux derniers sont les principaux mécanismes utilisés par *T. harzianum* contre *M. javanica*.

Naserinasab et *al.* (2011) ont signalé l'induction de l'inhibition de l'éclosion des œufs de *M. javanica* par *T. harzianum* avec un pourcentage élevé de l'ordre de 84 % ainsi que la capacité de ce champignon à coloniser les masses d'œufs et les J2 de *Meloidogyne* spp. *in vitro*, à réduire l'indice de galles, à stimuler la croissance des plants de tomate et à augmenter leur rendement sous serre (Zaidi et Singh, 2013 ; Javeed et Al-Hazmi, 2015). Par ailleurs, *T. citrinoviride* (isolat Snef1910) et les filtrats de culture de *T. atroviride* et de *T. harzianum* ont

montré une mortalité des J2 et une inhibition de l'éclosion des œufs significatives vis-à-vis de *M. incognita* (Sellami et al., 2017 ; Fan et al., 2020).

D'autre part, les espèces de ce genre sont connues pour être des antagonistes d'autres genres de nématodes, c'est le cas des nématodes spiralés : *Helicotylenchus* spp. Steiner et *Scutellonema* spp. Andrassy (Chanu et al., 2015) et des champignons phytopathogènes comme : *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo and K. Sato (Foc), agent du flétrissement du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) (Fabaceae), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Saccardo) Snyder and Hansen, agent du flétrissement de la tomate, *Verticillium dahlia* Klebahn, agent causal du flétrissement verticillien (verticilliose) et *Botrytis cinerea* Persoon, agent de la pourriture grise, avec une diminution de l'incidence de la maladie (Bouregghda et Bouznad., 2009 ; Debbi et al., 2018 ; Benzina et al., 2020; Hammad et al., 2021).

Dans nos conditions expérimentales, l'évaluation de l'activité nématicide de *F. oxysporum* F.ox à l'égard de *G. rostochiensis* a révélé son efficacité. Celle-ci est attribuée aux mycotoxines produites par les *Fusarium* spp., leur permettant d'avoir un effet antagoniste contre les nématodes, il s'agit principalement des trichothécènes, zéaralénones et des fumonisines (Fattah et Webster, 1989 ; Pitt, 2000 ; Ji et al., 2019). Ainsi, la toxicité de *Fusarium* spp. contre les nématodes phytoparasites se manifeste soit par une déformation des larves soit par une inhibition de l'éclosion des œufs de ces bioagresseurs (Desjardins et Proctor, 2007).

Le pouvoir antagoniste des *Fusarium* spp. à l'égard des nématodes phytoparasites notamment contre *G. rostochiensis* a été mis en évidence avec un pourcentage d'infection des femelles variant de 40.5 % à 48.9 % et un pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs variant de 36.0 % à 44.4 %, ce champignon a amélioré le rendement et la croissance des plants de pomme de terre de 9.9 % (Trifonova, 2010). De même, l'inhibition de l'éclosion des œufs de *Globodera* spp. par *Fusarium* spp. est supérieure à 50 % (Indarti et al., 2010).

L'impact potentiel de diverses souches de *Fusarium* sur le développement des effectifs d'*Heterodera schachtii* Schmidt a été rapporté par Gao et al. (2008), avec un pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs variant de 17 % à 34 %.

Le pouvoir antagoniste de *Fusarium* spp. vis-à-vis *M. incognita* a permis de mettre en évidence l'activité larvicide et ovicide ainsi que la diminution des effectifs du nématode à galles dans les racines des cultures par ce champignon (Martinuz et al., 2012 ; Shah et al., 2017).

Dans cette présente étude, il est important de souligner que les isolats de *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp. testés ont montré un effet ovicide plus important en comparaison à l'effet

larvicide contre *G. rostochiensis*, concordant avec les travaux cités précédemment.

Les autres genres isolés dans cette étude à faible fréquence notamment *Gliocladium roseum*, *G. aureum*, *Cladosporium* spp., *Phoma* spp. et *Alternaria* spp. possèdent une activité nématocide à l'égard de plusieurs nématodes phytoparasites (Ashraf et Khan, 2007 ; Wang et al., 2012). De ce fait il serait souhaitable d'étudier leur pathogénécité et les tester à l'égard de ces bioagresseurs, particulièrement *Globodera* et *Meloidogyne*.

Dans nos conditions expérimentales, le traitement nématocide à base de l'oxamyl vis-à-vis de *G. rostochiensis* s'est avéré plus efficace que les traitements testés, il permet une réduction des densités de *G. rostochiensis* et améliore la croissance des plants de pomme de terre.

Ces données sont en accord avec plusieurs auteurs qui rapportent que ce nématocide affecte l'activité et le développement des juvéniles de deuxième stade (J2) de *G. rostochiensis*, réduit le taux de reproduction de ce bioagresseur de 83,3 % et permet une augmentation du rendement de 15,8 % (Evans et Wright, 1982 ; Trifonova, 2012 ; Galfout, 2014 ; Hajji-Hedfi et al., 2017).

D'autre part, pour améliorer les performances de la lutte biologique, plus de considération doit être donnée aux interactions entre les souches combinées dans les préparations et que ces associations peuvent avoir un avenir très prometteur dans la gestion des nématodes phytoparasites.

Enfin, le sol est un réservoir pour la microflore dont la composition et l'activité sont très variées, les données de cette présente étude nous permettent d'avancer que les champignons antagonistes constituent une source prometteuse en lutte biologique, particulièrement *Trichoderma* spp. et *Fusarium oxysporum* qui possèdent un potentiel très prometteur contre *G. rostochiensis* et figurent parmi les microorganismes les plus efficaces dans la gestion de ce bioagresseur.

Chapitre 3 : Caractérisation des métabolites secondaires (SMs) de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et de *F. oxysporum* (F.ox)

Les métabolites secondaires des champignons antagonistes apparaissent comme une approche alternative très prometteuse dans la gestion de *Globodera* spp. Ainsi, l'objectif de cette présente étude est de tester les métabolites secondaires de quelques isolats des genres *Trichoderma* et *Fusarium* pour leur activité nématocide à l'égard de *G. rostochiensis in vitro* après leur purification et caractérisation biochimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel biologique

Les cultures pures de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et de *F. oxysporum* (F.ox) ont été cultivées sur milieu PDA (HiMedia Bombay, Inde) et incubées à 25 °C pendant 5-7 jours (Figure 26).

Les principaux métabolites secondaires ont été extraits et caractérisés selon le protocole décrit par Vinale et *al.* (2006), fractionnés par des approches chromatographiques et quantifiés par LC-MS.

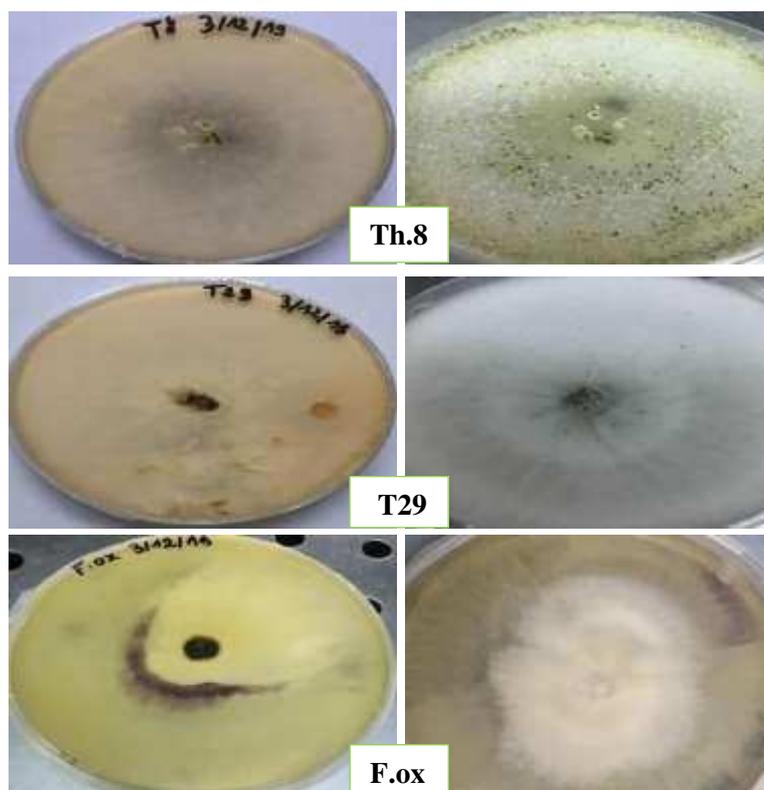


Figure 26. Cultures de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* (F.ox).

1.2 Extraction des métabolites secondaires (SMs) fongiques

Afin d'extraire les métabolites secondaires de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et de *F. oxysporum* (F.ox), cinq fragments de cultures fongiques fraîchement préparés de 7 mm de diamètre (Figure 27 A) ont été inoculés dans un flacon conique de 5 L contenant 2 L de PDB (Potato Dextrose Broth, HiMedia Bombay, Inde) pour produire les molécules bioactives (Figure 27 B-C).

Les cultures stationnaires de chaque souche ont été incubées pendant 31 jours à 25 °C (Figure 27 D), ensuite filtrées sous vide à travers un filtre Whatman (Figure 27 E). L'extraction liquide-liquide a été adoptée, elle est basée sur la séparation des composés organiques dans un solvant. Nous avons utilisé un volume d'acétate d'éthyl (EtOAc) (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) égale à la moitié du volume du filtrat de culture, à trois répétitions pour extraire la majorité des métabolites secondaires produits par ces champignons (Figure 27 F), les fractions organiques obtenues ont été séchées avec du Sodium anhydre Na₂SO₄ et le solvant a été évaporé sous vide à 35 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (IKA® RV10-Bushi® R200 Rotavapor) (IKA, USA) (Figure 27 G). Après évaporation de l'acétate d'éthyle, les résidus brun-rouge obtenus (Figure 27 H) sont lavés avec du méthanol (MeOH) (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) (Figure 27 I).

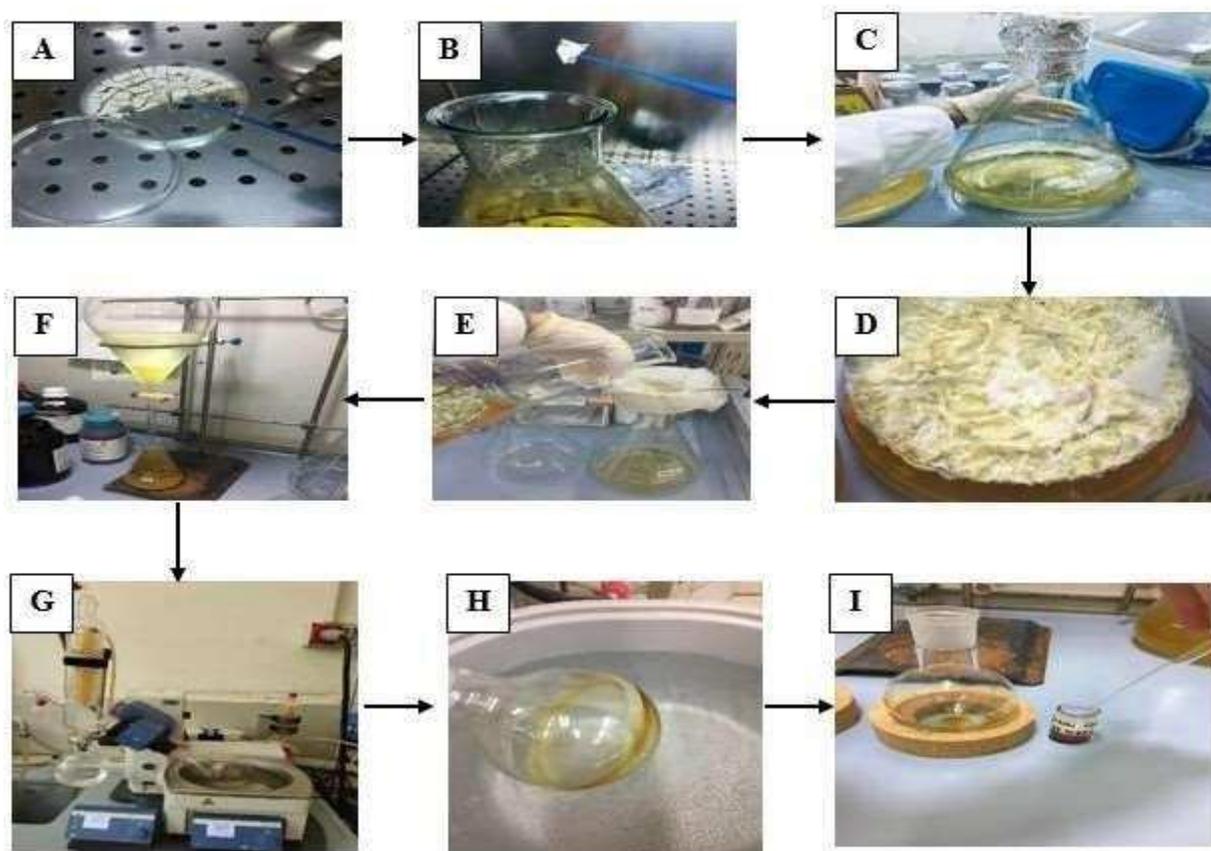


Figure 27. Protocole d'extraction des métabolites secondaires fongiques (Vinale et *al.*, 2006).

Les flacons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective des extraits fongiques obtenus, ces derniers sont soumis à une analyse LC-MS pour la quantification et la caractérisation des métabolites secondaires (Vinale et *al.*, 2006).

1.3 Fractionnement et purification des SMs fongiques

La séparation chromatographique a été réalisée par chromatographie sur colonne avec le gel de silice comme phase stationnaire, l'éluion a été faite par un gradient combiné de dichlorométhane / méthanol : DCM / Met, 99:1 ; 98:2 ; 97:3 ; 95:5 ; 90:10 ; 85:15 et 80:20 (phase liquide). La séparation des composés est provoquée par l'écoulement continu de l'éluant passant dans la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. Les composés sont entraînés par l'éluant à des vitesses différentes en fonction de leurs affinités avec la silice et avec l'éluant (Figure 28A).

Les fractions récupérées ont été analysées par chromatographie sur couche mince (analytique) sur plaques de gel de silice en aluminium (TLC Si gel 60 F254, 0,2 mm, 20×20 cm, Merck-EMD Darmstadt, Allemagne) comme phase stationnaire ; la phase mobile est représentée par la combinaison dichlorométhane / méthanol : DCM / Met.

Les plaques sont placées dans des cuves en verre, saturées avec l'éluant approprié (Figure 28B). Elles sont ensuite observées sous lumière UV afin de distinguer les molécules possédant un chromophore.

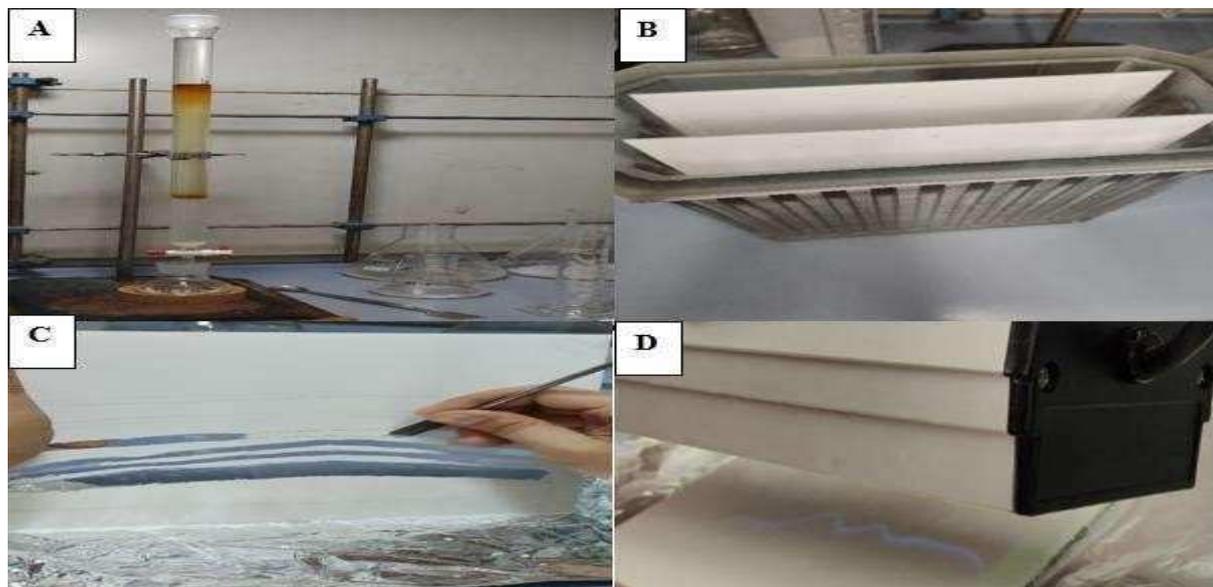


Figure 28. Technique de séparation et de purification des métabolites secondaires fongiques, A : Chromatographie sur colonne, B-C : Chromatographie sur couche mince analytique et préparative, D : Visualisation de la migration des bandes sous UV.

La CCM permet de vérifier la présence et l'état de pureté des produits élués. Les fractions présentant des profils similaires ont été combinées et purifiées en utilisant la chromatographie sur couche mince (préparative) sur plaques de gel de silice en verre (PLC Si gel 60 F254, 1 mm, 20×20 cm Merck-EMD Darmstadt Allemagne), avec la même phase liquide dichlorométhane / méthanol : DCM/Met (Figure 28C), les plaques sont ensuite observées sous lumière UV (Figure 28D).

Les fractions récupérées sont remises en suspension dans de l'acétate d'éthyle (EtOAc) puis filtrées dans des ballons à travers un papier filtre quantitatif de 0.17 mm de diamètre. Le solvant a été évaporé sous vide à 35 °C à l'aide de l'évaporateur rotatif (Rotavapor).

Les flacons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des fractions. Les fractions purifiées ont été ensuite séchées, stockées à 4 °C puis analysées par LC-MS.

1.4 Analyse et caractérisation des métabolites secondaires par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les métabolites purifiés de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et de *F. oxysporum* (F.ox) ont été caractérisés par une analyse LC-MS qTOF enregistrée avec un système Agilent (6400) (Figure 29).

La spectrométrie de masse permet la caractérisation des composés en se basant sur la différence du rapport masse/charge (m/z) des molécules ionisées pour les séparer les unes des autres. La spectroscopie de masse donne des informations chimiques et structurales des molécules, cette méthode est puissante pour la séparation de mélanges complexes.

Les analyses par spectrométrie de masse (MS) ont été effectuées sur un spectromètre de masse triple quadripôle API 3000 (Applied Biosystems, Toronto, Canada) équipé d'une source de nébulisation chauffée fonctionnant en mode ion positif/négatif (Vinale et *al.*, 2009). Les échantillons ont été dissous dans du MeOH-H₂O et ont été analysés à une concentration de 0,5 mg/ml. La phase stationnaire est une colonne HPLC à phase renversée. Les spectres de masse des différents composés de l'échantillon sont générés en mode positif / négatif et les différentes fragmentations des composés ont été automatiquement enregistrées par l'appareil.

La caractérisation des constituants a été faite sur la base de la comparaison de leurs temps de rétention (RT) et leurs rapports masse/charge (m/z) avec ceux des composés standards de la banque de données : Fungi (ID Browser Identification Fungi Database).



Figure 29. Appareil d'analyse LC-MS qTOF Agilent (6400) - API 3000.

1.5 Évaluation de l'activité nématocide des SMs fongiques à l'égard de *G. rostochiensis*

Les fractions des extraits fongiques ont été d'abord dissous dans du méthanol (70 %) puis dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 2 % pour obtenir des concentrations de 25 ; 50 et 100 µg/ml. Le protocole adopté est celui de Khan *et al.* (2020) modifié.

En effet, les J2 (50) et les œufs (50) de *G. rostochiensis* contenus dans 100 µl d'eau distillée stérile ont été exposés à des SMs dans des boîtes quadrillées. Chaque boîte renfermait 100 µl d'eau distillée stérile contenant les J2 (50) et les œufs (50) de *G. rostochiensis* séparément, 390 µl d'eau distillée stérile et 10 µl de SMs fongiques aux trois concentrations testées (25 ; 50 et 100 µg/ml). Quatre répétitions ont été réalisées et les boîtes ont été incubées à 25 °C, le témoin est représenté par une dilution de DMSO à 2 %.

La formule d'Abbott (1925) a été utilisée pour le calcul du :

❖ Pourcentage de mortalité des larves (J2) corrigée, dont la formule a été mentionnée dans le chapitre II : Evaluation de l'activité nématocide de quelques isolats de champignons antagonistes à l'égard de *Globodera rostochiensis*.

Les doses létales 50 % (DL50) ont été calculées pour chaque extrait fongique aux trois périodes d'exposition pour une meilleure comparaison de l'activité nématocide.

❖ Pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs corrigée dont la formule a été mentionnée dans le chapitre cité ci- dessus.

1.6 Analyses statistiques

Concernant le test de l'activité nématocide des SMs fongiques sur *G. rostochiensis*, les données ont été analysées par l'ANOVA en utilisant le logiciel "Mass Hunter Profinder" et la signification de chaque traitement a été déterminée en utilisant le test post hoc Tukey HSD à un niveau de signification $p = 0,05$. Les régulations des composés ont été comparées avec le test Fold change, la signification statistique a été déterminée à $p = 2,0$. Le programme "GraphPad Prism 8" a été utilisé pour l'élaboration des régressions linéaires.

2. Résultats

2.1 Extraction des métabolites secondaires fongiques

Les résultats relatifs à l'extraction des métabolites secondaires des trois espèces fongiques étudiées ont permis de déterminer la teneur respective de chaque extrait organique, ainsi, environ 246 ; 258 et 320 mg d'extraits bruts ont été obtenus à partir de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* (F.ox) respectivement (Figure 30).



Figure 30. Extraits bruts des métabolites secondaires de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* (F.ox) et révélation des chromatogrammes sous UV.

2.2 Fractionnement et purification des SMs fongiques

Les métabolites purifiés des extraits d'acétate d'éthyle de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* (F.ox) ont été ensuite caractérisés par des approches chromatographiques.

Pour T29, environ 93 ; 18 ; 12 ; 5 et 2 mg ont été obtenus pour les fractions T29 (10), T29 (11), T29 (12-13), T29 (14) et T29 (19) respectivement après séparation par chromatographie sur colonne (Figure 31). Pour les fractions DCM-4 et 5-9, les quantités extraites étaient très faibles (0,4 mg).



Figure 31. Révélation des chromatogrammes des fractions de *T. hirsutum* (T29) sous UV.

En ce qui concerne Th.8, quatre fractions majeures ont été collectées : Th.8 (12), Th.8 (14-17), Th.8 (18) et Th.8 (Me OH) avec des quantités approximatives de 17 ; 2 ; 48 et 47 mg (Figure 32A). Enfin, pour Fox, les principales fractions obtenues sont : FR.8-9 ; FR.10 ; FR.11-13 ; FR.19-21 avec des quantités approximatives de 4 ; 4 ; 8 et 4 mg respectivement (Figure 32B).

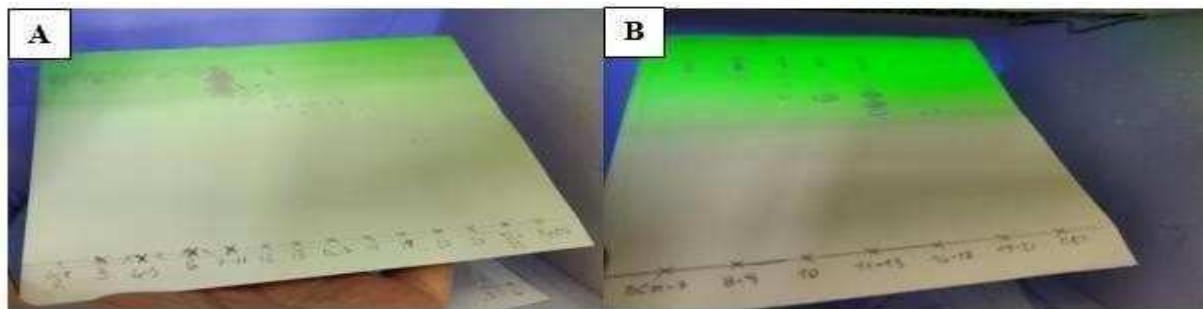


Figure 32. Révélation des chromatogrammes des fractions de : A. *T. harzianum* (Th.8) et B. *F. oxysporum* (F.ox) sous UV.

Pour la séparation CCM préparative, environ 21 mg de la fraction T29 (10A) ont été recueillis. Cependant, pour les fractions T29 (11 A, B, C, D, E, F), les quantités étaient infimes (0,2 ; 0,2 ; 0,1 ; 0,3 ; 0,6 et 0,4 mg respectivement).

2.3 Analyse et caractérisation des SMs fongiques par LC-MS

La composition chimique des métabolites secondaires des extraits bruts de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et de *F. oxysporum* (F.ox) a été analysée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), les principaux composés chimiques caractérisés sont représentés dans le tableau 17.

En effet, l'arbre des conditions hiérarchiques (Figure 33) et le rapport de l'analyse en composantes principales (Figure 34) ont révélé que les isolats de *Trichoderma* partagent des métabolites communs qui sont généralement différents de ceux de *Fusarium oxysporum*.

Le screening chimique a révélé la présence de vingt-quatre (24) composés dans l'extrait brut de *T. harzianum* (Th.8), six d'entre eux ont été caractérisés, le composant principal s'est avéré être « l'Acide harzianique » (Fig. 35-1) dont la formule chimique est $C_{19}H_{27}NO_6$, le temps de rétention (RT) est de 6-7 min, le rapport masse/charge (m/z) = 366 et la masse moléculaire est de 365 Da. Ce composé est considéré comme métabolite secondaire commun de ce champignon, accompagné de l' α -Pinène ($C_{10}H_{16}$), RT= 6 min, (m/z) = 159 et la masse moléculaire est de 136 Da, ainsi que de l'Ampelomin B ($C_7H_{12}O_2$), dont RT= 6 min, (m/z) = 151 et la masse moléculaire est de 128 Da (Tableau 17).

Dix-huit (18) des 57 composés ont été caractérisés dans l'extrait brut de *T. hirsutum* (T29) où le « Dehydro-harzianolide » (C₁₃ H₁₆ O₂), dont RT= 6 min, (m/z) = 205 et la masse moléculaire est de 204 Da est le constituant principal, accompagné de « la Mycosporine » (C₁₁ H₁₉ N O₆), RT= 1 min, (m/z) = 262 et la masse moléculaire est de 261 Da, métabolite azoté hydrosoluble, qui est présent dans l'extrait de T29 ainsi que dans celui de *F. oxysporum* (F.ox), ce dernier a également montré la présence de « l'Acide hydroxycinnamique », dérivé de l'acide cinnamique de formule brute C₉H₈O₃, RT= 1 min, (m/z) = 165 et la masse moléculaire est de 164 Da ainsi que 39 autres métabolites inconnus.

Les analyses LC-MS des fractions obtenues après séparation et purification des extraits bruts ont révélé la présence de composés majeurs principalement « l'Harzianolide » C₁₃ H₁₈ O₃, RT= 5-7 min, (m/z) = 223 et la masse moléculaire est de 222 Da (Fig. 35-2), « le T39 buténolide » C₁₃ H₁₆ O₃, RT= 6 min, (m/z) = 221 et la masse moléculaire est de 220 Da (Fig. 35-3) et « le Dehydro-harzianolide » (Fig. 35-4) chez les fractions des deux isolats de *Trichoderma* (Th.8 et T29).

En revanche, le Cyclo-(L-Phe-L-Pro) C₁₄ H₁₆ N₂ O₂ dont RT= 5 min, (m/z) = 245 et la masse moléculaire est de 244 Da (Fig. 35-5) ; la Bikaverine, C₂₀ H₁₄ O₈, RT= 7 min, (m/z)=383 et la masse moléculaire est de 382 Da (Fig. 35-6) et l'Acide fusarique C₁₀H₁₃O₂, RT= 6 min, (m/z) = 179 et la masse moléculaire est de 179 Da (Fig. 35-7) étaient les composés majeurs des fractions de *F. oxysporum* (Tableau 18).

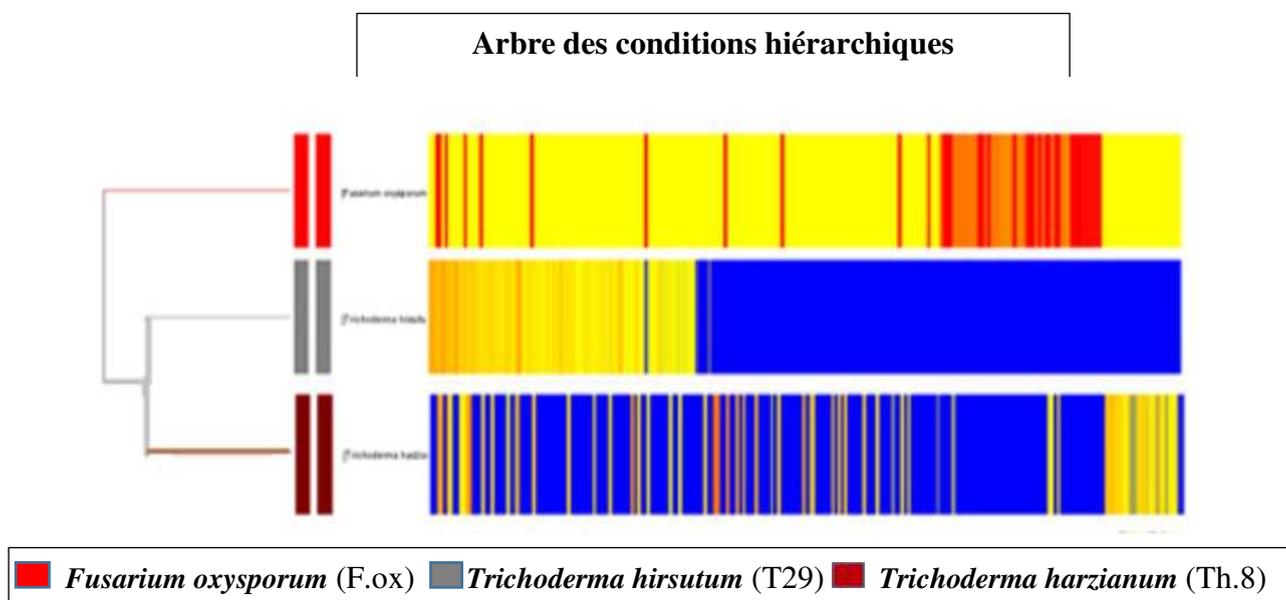


Figure 33. Arbre des conditions hiérarchiques sur le rapport entre les espèces : *F. oxysporum* (F.ox), *T. hirsutum* (T29) et *T. harzianum* (Th.8).

Tableau 17. Métabolites secondaires caractérisés à partir des extraits bruts de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* (F.ox) après analyse LC-MS.

Isolats fongiques	Composés Chimiques	Formules brutes	masse/charge (m/z)	Temps de Rétention RT (min)	Masse (Da)
<i>T. harzianum</i> (Th.8)	α -Pinene	C10 H16	159,114	5,682	136,1249
<i>T. harzianum</i> (Th.8)	Ampelomin B	C7 H12 O2	151,0726	5,682	128,0834
<i>T. harzianum</i> (Th.8)	Acide harzianique	C19 H27 NO6	366,1919	6,014	365,1846
<i>T. harzianum</i> (Th.8)	Acide harzianique	C19 H27 NO6	366,1925	6,188	365,1851
<i>T. harzianum</i> (Th.8)	Acide harzianique	C19 H27 NO6	366,1924	6,748	365,1852
<i>T. harzianum</i> (Th.8)	Acide harzianique	C19 H27 NO6	366,1926	7,151	365,1851
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Mycosporine	C11 H19 NO6	262,1275	0,882	261,1201
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Acide diaportinique	C13 H12 O7	281,0658	4,651	280,0585
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Acide italinique	C15 H18 O6	295,1181	5,308	294,1108
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Corymbiferan lactone D	C15 H14 O5	275,0919	5,48	274,0846
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Altenuene	C15 H16 O6	293,1028	5,48	292,0955
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Gibberelline A4	C19 H24 O5	333,1703	5,657	332,163
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Gibberelline A82	C19 H26 O6	351,1809	5,663	350,1736
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Pichiacin A	C13 H18 O3	245,1146	5,702	222,1255
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Dehydro-harzianolide	C13 H16 O2	205,1223	5,703	204,115
<i>T. hirsutum</i> (T29)	16-O-Demethyl-19-deoxydideacetyl-3-epifusicoccin	C31 H50 O9	567,3499	5,787	566,3425
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Wortmannilactone B	C25 H36 O6	433,259	5,846	432,2516
<i>T. hirsutum</i> (T29)	16-O-Demethyl-19-deoxydideacetyl-3-epifusicoccin	C31 H50 O9	567,3513	5,88	566,3439
<i>T. hirsutum</i> (T29)	19-Deoxydideacetylisofusicoccin	C32 H52 O9	581,3679	5,997	580,3604
<i>T. hirsutum</i> (T29)	19-Deoxydideacetylisofusicoccin	C32 H52 O9	581,367	6,083	580,3596
<i>T. hirsutum</i> (T29)	25-O-Methylarugosin A	C26 H30 O6	439,2124	6,204	438,2051
<i>T. hirsutum</i> (T29)	Gibberelline A4	C19 H24 O5	333,1704	6,773	332,1632
<i>T. hirsutum</i> (T29)	16-O-Demethyl-19-deoxydideacetyl-3-epifusicoccin	C31 H50 O9	567,3514	7,315	566,3439
<i>T. hirsutum</i> (T29)	19-Deoxydideacetylisofusicoccin	C32 H52 O9	581,3672	7,464	580,3597
<i>F. oxysporum</i> (F.ox)	Mycosporine	C11 H19 NO6	262,128	0,845	261,1207
<i>F. oxysporum</i> (F.ox)	Acide hydroxycinnamique	C9 H8 O3	165,054	0,951	164,0468

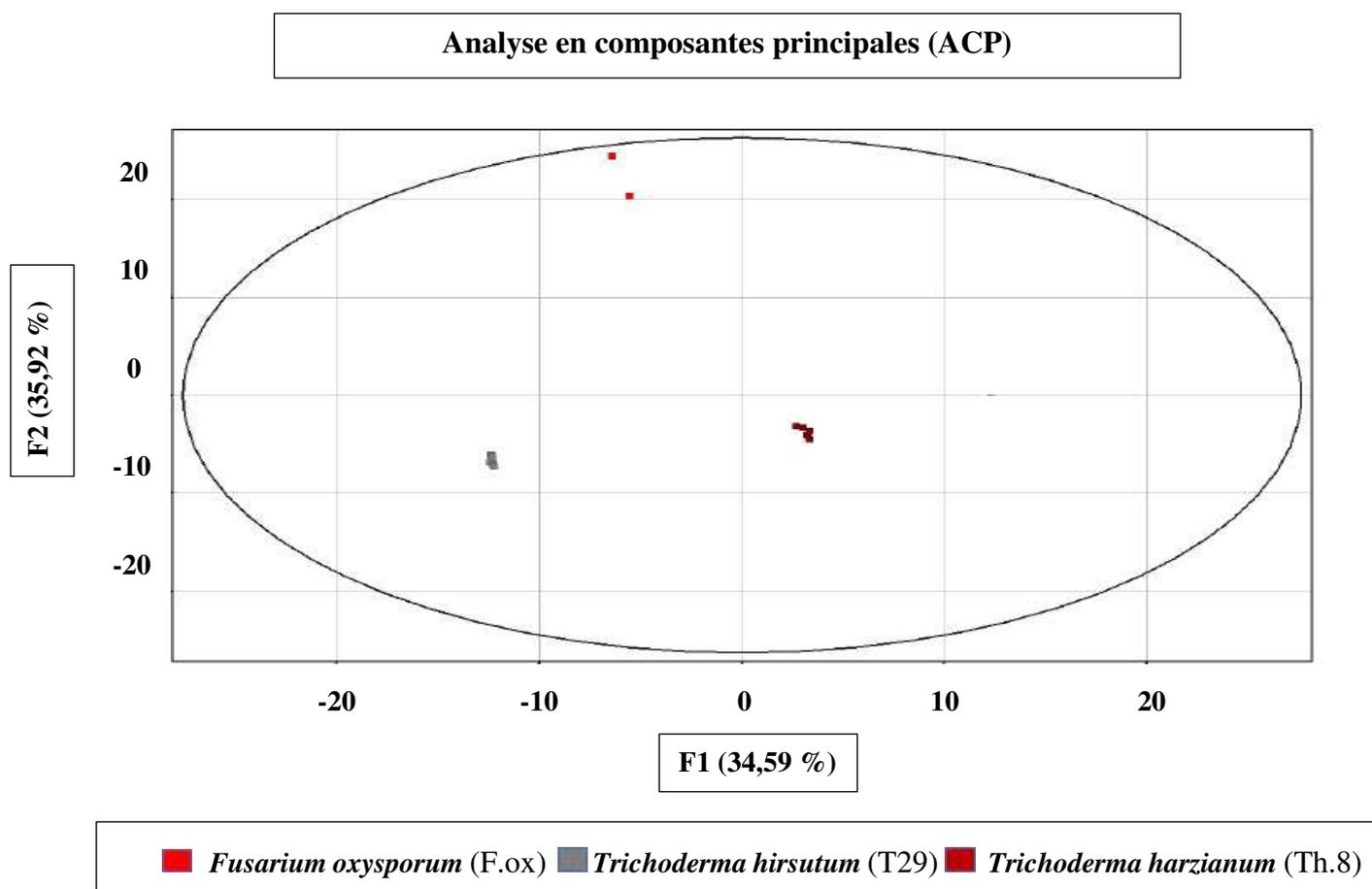


Figure 34. Rapport de l'analyse en composantes principales (ACP) de *F. oxysporum* (F.ox), *T. hirsutum* (T29) et *T. harzianum* (Th.8).

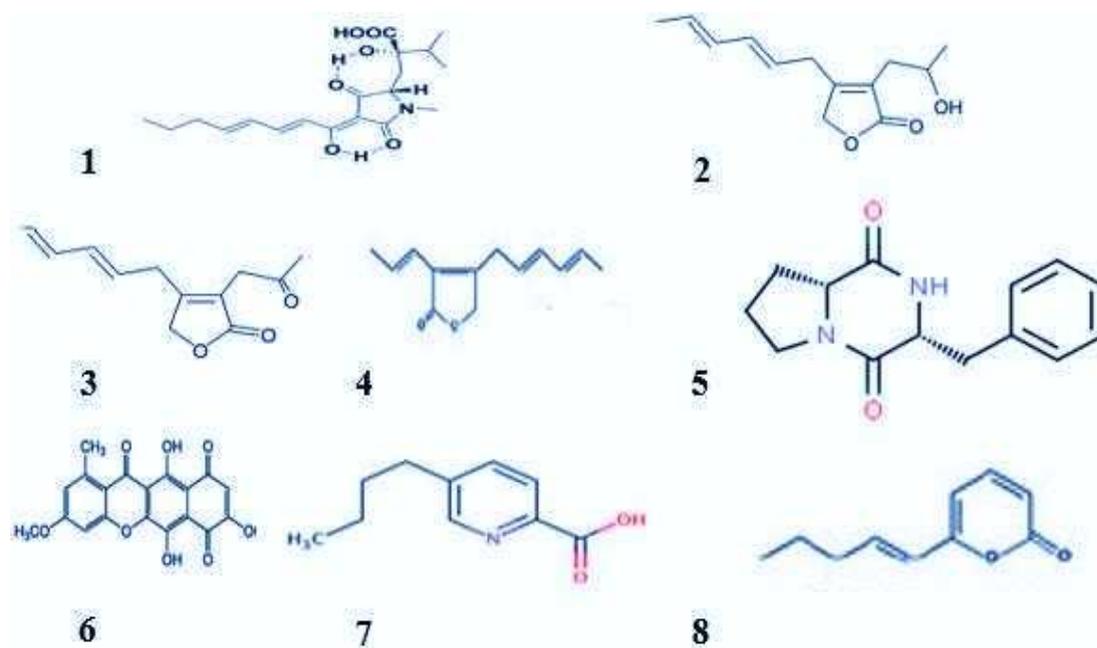


Figure 35. Structure chimique des métabolites secondaires majeurs purifiés : 1. Acide harzianique, 2. Harzianolide, 3. T39 butenolide, 4. Dehydro-harzianolide, 5. Cyclo-(L-Phe-L-Pro), 6. Bikaverine, 7. Acide fusarique, 8. 6-pentyl- α -pyrone.

Tableau 18. Métabolites secondaires de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F.oxysporum* (F.ox) caractérisés après analyse LC-MS.

Fractions fongiques	Composés Chimiques	Formules brutes	masse/charge (m/z)	Temps de rétention RT (min)	Masse (da)
<i>T. harzianum</i> Th8 12	Dehydro-harzianolide	C13 H16 O2	205,1218	5,846	204,1145
<i>T. harzianum</i> Th8 12	Methoxycurvularin	C17 H22 O6	345,1295	5,849	322,1403
<i>T. harzianum</i> Th8 12	Tropolactone C	C26 H32 O6	441,2253	5,924	440,2180
<i>T. harzianum</i> Th8 12	25-O-Methylarugosin A	C26 H30 O6	439,2095	6,118	438,2030
<i>T. harzianum</i> Th8 12	Asperfuran	C13 H14 O3	219,1007	6,318	218,0934
<i>T. harzianum</i> Th8 12	Eugenetin	C12 H12 O4	221,0798	6,621	220,0726
<i>T. harzianum</i> Th8 12	7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin	C11 H10 O4	207,0645	6,629	206,0572
<i>T. harzianum</i> Th8 12	7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin	C11 H10 O4	207,0645	6,740	206,0572
<i>T. harzianum</i> Th8 12	Dehydro-harzianolide	C13 H16 O2	205,1215	7,049	204,1142
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	Maculosin	C14 H16 N2 O3	261,1221	4,189	260,1149
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	(3S,4R)-6-Acetyl-3,4-dihydroxy-2,2-dimethylchromane	C13 H16 O4	237,1112	4,219	236,1039
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	Terrein	C8 H10 O3	155,0697	4,373	154,0624
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	Terrein	C8 H10 O3	155,0697	4,499	154,0624
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	Radicinol	C12 H14 O5	239,0902	4,559	238,0829
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	Striatisorolide A	C11 H16 O4	235,0949	4,947	212,1057
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	8R- Acide hydroxylinoléique	C18 H32 O3	319,2241	5,588	296,2350
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	3,5-Dimethyl-8-hydroxy-7-methoxy-3,4-dihydroisocoumarin	C12 H14 O4	223,0953	5,61	222,0881
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	Dehydro-harzianolide	C13 H16 O2	205,1214	6,223	204,1141
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	Pichiacin A	C13 H18 O3	223,1318	6,223	222,1245
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin	C11 H10 O4	207,0644	6,755	206,0571
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	Eugenetin	C12 H12 O4	221,0800	6,783	220,0727
<i>T. harzianum</i> Th8 14-17	7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin	C11 H10 O4	207,0644	6,842	206,0571
<i>T. hirsutum</i> T2910	Citeodiol	C11 H18 O4	237,1105	4,703	214,1213
<i>T. hirsutum</i> T2910	Phenol A	C11 H16 O3	219,0999	4,74	196,1109
<i>T. hirsutum</i> T2910	Phenol A	C11 H16 O3	219,0999	5,307	196,1107
<i>T. hirsutum</i> T2910	O-Cymol	C10 H14	157,0990	5,838	134,1100
<i>T. hirsutum</i> T2910	Exo-1, 2,7,7-Tetramethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	C11 H20 O	191,1407	6,174	168,1515
<i>T. hirsutum</i> T2910	Lucidone B	C24 H32 O5	423,2137	6,272	400,2246

<i>T. hirsutum</i> T2910	Phenol A	C11 H16 O3	219,0999	6,564	196,1108
<i>T. hirsutum</i> T2910	7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin	C11 H10 O4	207,0649	6,792	206,0576
<i>T. hirsutum</i> T2910	SMTP 3	C26 H35 N O7	474,2465	6,795	473,2392
<i>T. hirsutum</i> T2910	Eugenetin	C12 H12 O4	221,0801	6,815	220,0728
<i>T. hirsutum</i> T2910	Harzianolide	C13 H18 O3	223,1312	6,937	222,1239
<i>T. hirsutum</i> T2911	Sohirnone A	C13 H16 O3	221,1166	4,671	220,1092
<i>T. hirsutum</i> T2911	Harzianolide	C13 H18 O3	223,1315	4,646	222,1239
<i>T. hirsutum</i> T2911	Herbarumin I	C12 H20 O4	251,1254	5,932	228,1361
<i>T. hirsutum</i> T2911	Ampelomin B	C7 H12 O2	151,0735	5,959	128,0842
<i>T. hirsutum</i> T2911	Sohirnone A	C13 H16 O3	221,1163	6,157	220,1091
<i>T. hirsutum</i> T2911	Pichiacin A	C13 H18 O3	223,1320	6,236	222,1248
<i>T. hirsutum</i> T2911	Dehydro-harzianolide	C13 H16 O2	205,1218	6,246	204,1145
<i>T. hirsutum</i> T2911	Methoxycurvularin	C17 H22 O6	345,1298	6,246	322,1406
<i>T. hirsutum</i> T2911	Tropolactone C	C26 H32 O6	441,2256	6,257	462,2003
<i>T. hirsutum</i> T2911	Lucidone B	C24 H32 O5	423,2150	6,272	440,2183
<i>T. hirsutum</i> T2911	25-O-Methylarugosin A	C26 H30 O6	439,2102	6,28	400,2257
<i>T. hirsutum</i> T2911	SMTP 3	C26 H35 N O7	474,2467	6,395	438,2028
<i>T. hirsutum</i> T2911	7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin	C11 H10 O4	207,0645	6,791	473,2394
<i>T. hirsutum</i> T2911	Eugenetin	C12 H12 O4	221,0801	6,815	220,0728
<i>T. hirsutum</i> T2911	4-O-Methylmelleolide	C24 H30 O6	415,2102	6,844	414,2029
<i>T. hirsutum</i> T2911	Militarinone A	C26 H37 N O6	460,2676	6,849	459,2603
<i>T. hirsutum</i> T2911	7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin	C11 H10 O4	207,0645	6,884	206,0573
<i>T. hirsutum</i> T2911	SMTP 3	C26 H35 N O7	474,2469	6,890	473,2397
<i>T. hirsutum</i> T2914	T39butenolide	C13 H16 O3	221,1183	5,986	220,1111
<i>T. hirsutum</i> T2914	Trichoverrol B	C23 H32 O7	443,2039	4,927	420,2148
<i>F. oxysporum</i> FR11-13	Cyclo-(L-Phe-L-Pro)	C14 H16 N2O2	245,1282	4,583	244,1209
<i>F. oxysporum</i> FR11-13	Cyclo-(L-Phe-L-Pro)	C14 H16 N2O2	245,1280	4,727	244,1208
<i>F. oxysporum</i> FR11-13	Bikaverine	C20 H14 O8	383,0748	6,791	382,0675
<i>F. oxysporum</i> FR11-13	8R-Acide hydroxylinoléique	C18 H32 O3	319,2241	7,877	296,2349
<i>F. oxysporum</i> FR11-13	Acide linoléique	C18 H32 O2	281,2464	8,195	280,2393
<i>F. oxysporum</i> FR14-18	Maculosin	C14 H16 N2O3	261,123	3,609	260,1158
<i>F. oxysporum</i> FR14-18	Acide Fusarique	C10H13NO2	179,216	5,800	179,0946
<i>F. oxysporum</i> FR14-18	Maculosin	C14 H16 N2O3	261,1226	4,282	260,1153
<i>F. oxysporum</i> FR14-18	Cyclo-(L-Phe-L-Pro)	C14 H16 N2O2	245,1273	4,570	244,1200
<i>F. oxysporum</i> FR19-21	4-O-Methylmelleolide	C24 H30 O6	415,2101	6,806	414,2028
<i>F. oxysporum</i> FR19-21	Militarinone A	C26 H37 N O6	460,2678	6,809	459,2605

2.4 Evaluation de l'activité nématocide des SMs fongiques à l'égard de *G. rostochiensis* *in vitro*

L'analyse des données de l'évaluation de l'activité nématocide des métabolites secondaires des extraits fongiques de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* (F.ox) à l'égard de *G. rostochiensis* *in vitro* à différentes concentrations sont consignés dans le Tableau 19. Tous les extraits ont montré une activité nématocide significative contre *G. rostochiensis* par rapport au témoin, qui augmente avec l'élévation des concentrations des SMs fongiques (25, 50 et 100 µg/ml) et du temps d'exposition (24 h, 48 h et 72 h) (Figure 36).

En effet, les taux de mortalité des larves (J2) enregistrés étaient statistiquement significatifs pour les trois souches fongiques testées T29, Th.8 et F.ox (Figure 36).

Ainsi, à la concentration la plus élevée (100 µg/ml) et après une période d'exposition de 72 h, la mortalité des J2 induite par l'extrait de *T. hirsutum* (T29) était la plus importante avec un taux de 87,23 %, suivie par *T. harzianum* (Th.8), qui a induit un taux de mortalité des larves significatif de 85,11 %, puis *F. oxysporum* (F.ox) avec un taux de 76,60 %.

A une concentration moyenne (50 µg/ml) et toujours à 72 h, des taux de mortalité des larves de 81,91 ; 75 et 68,09 % ont été enregistrés respectivement pour *T. hirsutum* (T29), *T. harzianum* (Th.8) et *F. oxysporum* (F.ox).

Enfin, à la concentration la plus faible (25 µg/ml), la souche T29 a également enregistré le taux de mortalité des larves le plus élevé de 78,72 %, suivi des souches Th.8 et Fox avec des taux de 68,62 % et 65,96 % respectivement, après 72 h d'exposition (Tableau 19).

Par ailleurs, le témoin DMSO a montré un taux de mortalité des larves très faible pour les trois temps d'exposition (2 %, 4 % et 6 % respectivement).

Tableau 19. Effet des métabolites secondaires de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* sur la mortalité des larves de *G. rostochiensis*.

Souches testées et périodes d'exposition	Pourcentage de mortalité naturelle à différentes concentrations (%)			Pourcentage de mortalité corrigée à différentes concentrations (%)		
	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml
<i>Trichoderma harzianum</i> (Th.8)						
24 h	55,00	46,50	37,50	54,08	45,41	36,22
48 h	69,00	64,00	55,00	67,71	62,50	53,13
72 h	86,00	76,50	70,50	85,11	75,00	68,62
<i>Trichoderma hirsutum</i> (T29)						
24 h	66,00	59,50	50,00	65,31	58,67	48,98
48 h	80,00	76,00	67,00	79,17	75,00	65,63
72 h	88,00	83,00	80,00	87,23	81,91	78,72
<i>Fusarium oxysporum</i> (F.ox)						
24 h	53,00	44,00	32,50	52,04	42,86	31,12
48 h	61,00	59,00	45,50	59,38	57,29	43,23
72 h	78,00	70,00	68,00	76,60	68,09	65,96
Témoin (DMSO)						
24 h	2,00	-	-	-	-	-
48 h	4,00	-	-	-	-	-
72 h	6,00	-	-	-	-	-

L'efficacité des métabolites secondaires des extraits fongiques testés sur la mortalité des larves de *G. rostochiensis* a également été déterminée par le calcul des DL 50 à partir des données du tableau 20 et des droites de régression représentées dans la figure 36, les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 20.

Pour tous les traitements, les valeurs de la DL50 sont inversement proportionnelles au temps d'exposition. En effet, après 72 h, les concentrations nécessaires pour provoquer une mortalité de 50 % sont plus faibles que celles de 24 h et 48 h.

Les DL50 les plus faibles sont notées avec les extraits de *T. hirsutum* (T29) étant 45,87 ; 20,53 et 17,98 µg/ml après 24 h, 48 h et 72 h d'exposition. Les extraits de *F. oxysporum* (F.ox) révèlent les plus fortes valeurs de DL50 qui sont de 85,15 ; 38,54 et 22,87 µg/ml respectivement pour les mêmes périodes d'exposition.

Enfin, pour *T. harzianum* (Th.8), les DL50 obtenues après 24 h, 48 h et 72 h étaient respectivement de 83,06 ; 24,84 et 18,74 µg/ml. Toutefois, les coefficients de corrélation sont significatifs (figure 36).

Tableau 20. DL50 ($\mu\text{g/ml}$) de l'effet des métabolites secondaires des trois champignons testés sur la mortalité des juvéniles (J2) de *G. rostochiensis* après les trois périodes d'exposition.

Souches testées	DL50 ($\mu\text{g/ml}$)		
	24 h	48 h	72 h
<i>Trichoderma harzianum</i> (Th.8)	83,06	24,84	18,74
<i>Trichoderma hirsutum</i> (T29)	45,87	20,53	17,98
<i>Fusarium oxysporum</i> (F.ox)	85,15	38,54	22,87

Par ailleurs, l'induction de l'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* par les extraits fongiques est hautement significative, les résultats sont présentés dans le tableau 21, cependant cette inhibition de l'éclosion des œufs dépend de l'espèce, du temps d'exposition et de la concentration.

Après 72 h de traitement avec les SMS des extraits de Th.8, T29 et F.ox, les trois isolats fongiques ont enregistré des taux élevés d'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* par rapport au témoin (Figure 37). En effet, *T. hirsutum* (T29) s'est avérée la plus efficace avec un taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 83,50 % à la concentration de SMS la plus élevée (100 $\mu\text{g/ml}$) par rapport au témoin et aux autres traitements, suivie de *T. harzianum* (Th.8) et *F. oxysporum* (F.ox) qui ont présenté des taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 80,38 % et 77,59 % respectivement à la même concentration et après la même période d'exposition (Tableau 21).

Des résultats similaires ont été observés avec une concentration moyenne (50 $\mu\text{g/ml}$) avec des taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 80,41 ; 78,08 et 73,15 % respectivement pour *T. hirsutum* (T29), *T. harzianum* (Th.8) et *F. oxysporum* (F.ox) après 72h d'exposition.

Avec une concentration plus faible (25 $\mu\text{g/ml}$), la souche T29 a enregistré un taux d'inhibition de l'éclosion des œufs de 75,49 %, suivie des souches Th.8 et Fox avec 70,59 % et 66,72 % respectivement, après une exposition de 72 h. Les coefficients de corrélation R^2 sont hautement significatifs (Figure 37).

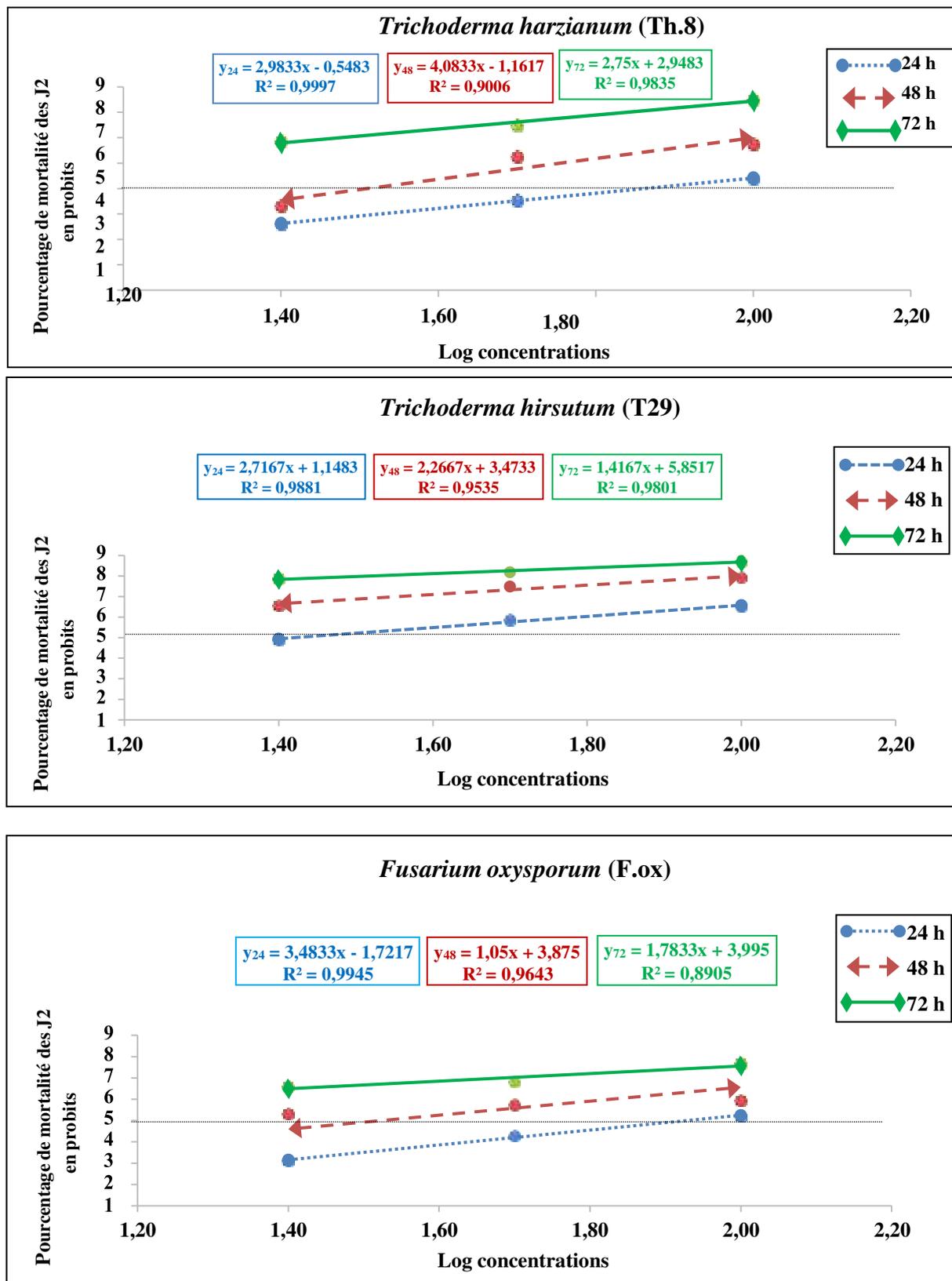


Figure 36. Droites de régression des probits à différentes concentrations des trois extraits fongiques testés sur la mortalité des larves (J2) de *G. rostochiensis*

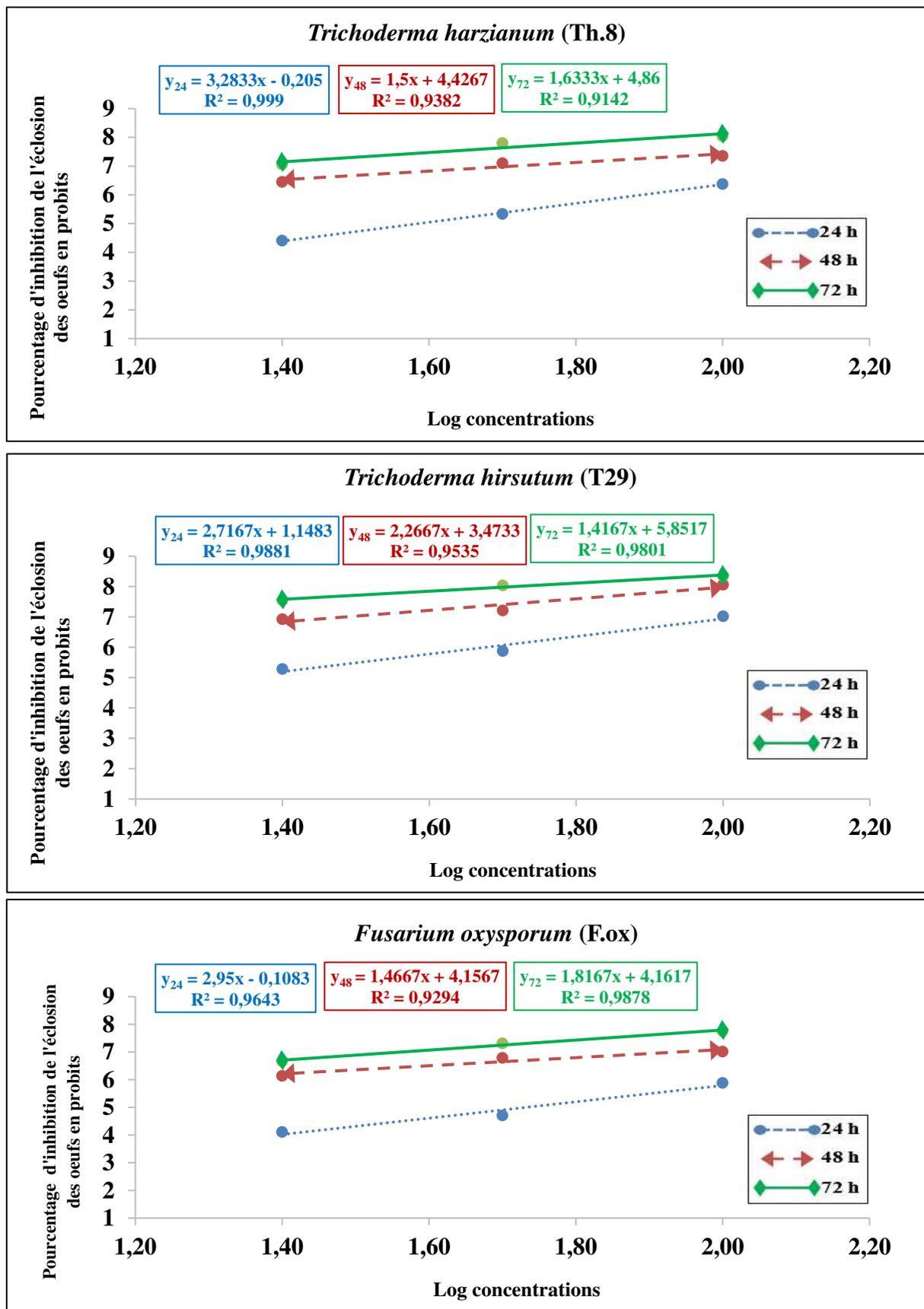


Figure 37. Droites de régression des probits à différentes concentrations des trois extraits fongiques testés sur l'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis*.

Tableau 21. Effet des métabolites secondaires de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* sur l'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis*

Souches testées et périodes d'exposition	Pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs naturelle à différentes concentrations (%)			Pourcentage d'inhibition de l'éclosion des œufs corrigée à différentes concentrations (%)		
	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	25 µg/ml
<i>Trichoderma harzianum</i> (Th.8)						
24 h	68,88	59,93	51,94	63,81	53,41	44,12
48 h	77,81	75,68	70,26	73,58	71,05	64,60
72 h	84,70	82,90	77,06	80,38	78,08	70,59
<i>Trichoderma hirsutum</i> (T29)						
24 h	74,46	64,58	59,53	70,30	58,81	52,94
48 h	83,78	76,65	74,24	80,69	72,20	69,33
72 h	87,13	84,72	80,88	83,50	80,41	75,49
<i>Fusarium oxysporum</i> (F.ox)						
24 h	64,62	54,47	49,42	58,86	47,06	41,19
48 h	74,98	73,00	67,56	70,21	67,86	61,38
72 h	82,52	79,06	74,04	77,59	73,15	66,72
Témoin (DMSO)						
24 h	14,00	-	-	-	-	-
48 h	16,00	-	-	-	-	-
72 h	22,00	-	-	-	-	-

3. Discussion

L'utilisation des microorganismes et de leurs produits suscite une attention croissante dans le contrôle des nématodes phytoparasites. L'analyse des données a montré l'efficacité des extraits organiques des trois isolats fongiques de *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et de *F. oxysporum* (F.ox) testés vis-à-vis de *G. rostochiensis*. Cette efficacité est attribuée essentiellement à leur richesse en métabolites secondaires (SMs) qui sont des composés organiques de faible poids moléculaire non directement essentiels à la croissance et à la reproduction des organismes, néanmoins ils jouent un rôle important dans la signalisation et l'interaction avec les autres organismes. Ces constituants tels que les peptaibols, les polykétides et les terpènes possèdent une activité nématocide à l'égard de nombreux nématodes phytoparasites, particulièrement les *Globodera* spp., ils représentent une alternative écologique aux pesticides synthétiques (Stadler et al., 1993; Wu et al. 2017).

En effet, de nombreuses espèces des genres *Trichoderma* et *Fusarium* ont fait l'objet de recherches approfondies en raison de leur rôle comme agents de lutte biologique (Harman, 2000 ; Dababat et Sikora, 2007), ces espèces produisent et sécrètent des métabolites secondaires chimiquement diversifiés actifs contre plusieurs microorganismes (Cardoza et al., 2005 ; Bogner et al., 2017).

D'une part, le recours aux procédés d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrophotométrie de masse (LC-MS) a permis de séparer, quantifier et caractériser les composés chimiques des extraits organiques des trois isolats fongiques testés et d'en connaître éventuellement les principaux composés actifs leur conférant les propriétés nématocides. Ainsi, le screening chimique des extraits de *T. harzianum* (Th.8) et *T. hirsutum* (T29) a abouti à la caractérisation de quelques métabolites communs, particulièrement « l'acide harzianique », composé hétérocyclique azoté appartenant structurellement au sous-groupe de l'acide diényltétramique des acides tétramiques. Les dérivés naturels de ces composés ont un grand intérêt vu leur abondance et diversité d'activités biologiques jouant un rôle important dans les interactions avec d'autres organismes (Vinale et al., 2013). Ces auteurs affirment que l'acide harzianique est un métabolite secondaire fréquent de *T. harzianum*, présentant des activités antimicrobiennes ainsi que des mécanismes de solubilisation du fer qui modifient de manière significative la disponibilité des nutriments pour les microorganismes. Ce métabolite caractérisé est accompagné de l' α -Pinène qui est un composé organique de la classe des terpènes, l'un des deux isomères du pinène. C'est un alcène qui contient un anneau réactif à quatre chaînons, on le trouve dans les huiles de nombreuses espèces végétales notamment le thym (Amarti et al., 2010) et de l'Ampelomin B également connu sous le nom de dihydromyricétine et DHM qui est un flavanonol, un type de flavonoïde. Il est présent dans certaines espèces de *Pinus* et de *Cedrus* (Zhu et al., 2011). Ces deux derniers métabolites caractérisés (α -Pinène et l'Ampelomin B) ne sont pas communs chez les *Trichoderma* spp.

Les fractions des extraits organiques de *T. harzianum* (Th.8) et *T. hirsutum* (T29) contiennent divers métabolites précédemment rapportés comme actifs contre divers agents pathogènes notamment les nématodes et l'analyse LC-MS des fractions de ces deux isolats (Th.8 et T29) a montré des quantités élevées d'« harzianolide » et de ses dérivés, à savoir le « déhydro-harzianolide » et le « T39 buténolide ». Ces résultats corroborent ceux de Cardoza et al., (2005) ; Khan et al., (2017) ; ces métabolites majeurs purifiés à partir des fractions de *T. harzianum* (Th.8) et *T. hirsutum* (T29) sont des composés hétérocycliques oxygénés, l'harzianolide, isolé pour la première fois à partir de *T. harzianum* est un métabolite dérivé polykétide qui contient un nombre impair de carbones et un groupe méthyle terminal sur les deux chaînes. Le déhydro-harzianolide dérive de la condensation de sept unités acétate avec la perte d'un carbone et le T39 buténolide (Vinale et al., 2006) qui est un lactone sur hétérocycle à quatre atomes de carbone dérivé oxydé du furane isolé d'une souche commerciale de *T. harzianum*. Les polykétides constituent un groupe de métabolites secondaires présentant une diversité remarquable tant au niveau de leur structure que de leur fonction.

Ils sont synthétisés par des réactions séquentielles catalysées par un ensemble d'activités enzymatiques appelées polykétides synthases (PKS), qui sont de grands complexes protéiques multi-enzymes contenant un groupe coordonné de sites actifs (Cardoza et al., 2005).

Un autre composé a été caractérisé à partir de *T. hirsutum* (T29), il s'agit du « Trichoverrol B » C23 H32 O7 ou Trichothec-9-ene-4,15-diol, 12,13-epoxy-4 qui fait partie des trichotécènes, toxines sesquiterpénoïdes, leur production par *Trichoderma* est limitée à quelques espèces, notamment *T. arundinaceum* et *T. brevicompactum* (Gutiérrez et al., 2020). Cependant, « la trichodermine » et « l' harzianum A » sont les trichotécènes les plus étudiées et les plus caractérisées chez *Trichoderma* spp. (Malmierca et al., 2012 ; Sharma et al., 2016), leur mécanisme d'action consiste en l'inhibition de la synthèse des protéines (Degenkolb et al., 2008).

Toutefois, le premier composé organique volatil isolé à partir de *Trichoderma* était le 6- pentyl- α -pyrone (6PP), ce composé est un agent aromatique non toxique responsable de l'arôme de noix de coco associé aux souches de *Trichoderma*. Il a été isolé pour la première fois chez *T. viride* par Collins et Halim (1972), par la suite, d'autres souches de *Trichoderma* ont également été identifiées comme productrices du 6PP. En outre, nous avons pu confirmer par analyse LC-MS que le 6PP était le composé majeur de *T. atroviride* qui est un métabolite bioactif généralement présent dans les filtrats de cultures de différentes espèces de *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum* et *T. koningii*). D'après Baazeem et al. (2021), *T. hamatum* (isolat FB10) synthétise un métabolite secondaire volatil bioactif, le 6-pentyl-alpha- pyrone qui a montré une activité nématocide vis- à-vis des œufs de *M. incognita*.

Cependant, l'effet nématocide de *Trichoderma* spp. , particulièrement *T. harzianum* est un processus complexe médié par la sécrétion de substances toxiques, des enzymes dégradantes de la paroi cellulaire des nématodes, à savoir la cellulase, hémicellulase, xylanase, pectinase, β -1,3-glucanase, chitinase et protease ainsi que des métabolites secondaires tels que l'acide harzianique, l'harzianolide, le 6pp et les composés volatils organiques (VOC) en général (Vinale et al., 2006 ; Mishra et Panda., 2017).

Les isolats de *F. oxysporum* sont connus pour produire de « l'acide fusarique » (acide 5-butyl-2-pyridinecarboxylique) et ses dérivés (Savard et al., 1997). Ainsi, ce métabolite a été découvert pour la première fois dans la culture de *Fusarium heterosporum* Nees, « la bikaverine » où 10H-benzo [b] xanthène-7, 10,12-trione ; substituée par des groupes hydroxy en positions 6 et 11, méthoxy en positions 3 et 8 et un groupe méthyle en position 1 ; considéré comme un composé organique hétérocyclique et « le cyclo-(L-Phe-L-Pro)», dicétopipérazine

formée par la fusion de la phénylalanine et de la proline, qui étaient les principaux métabolites secondaires caractérisés à partir des fractions de *F. oxysporum* (F.ox). Ces données concordent avec l'étude de Know et al. (2007) qui révèle que deux substances nématocides ont été isolées et identifiées comme étant la bikaverine et l'acide fusarique provenant de *F. oxysporum* (EF119) puis testées contre le nématode du pin, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle. Ces deux métabolites ont montré une activité nématocide non négligeable vis-à-vis de ce nématode. De même, Kundu et al. (2016) ont signalé que *F. oxysporum* produit divers composés, principalement la bikaverine, suivie de 3-O-méthyl-8-O-méthyl fusarubin, 8-O-méthyl fusarubin, l'anhydrofusarubin et le fusarubin, avec une activité nématocide élevée.

Cette présente étude a montré des taux élevés de mortalité des larves et d'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* induits par les SMs majeurs caractérisés. Ces composés sont connus pour leur toxicité à l'égard des nématodes, cependant, cette activité nématocide dépend de l'espèce, du temps d'exposition et de la concentration fongique. En effet, *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp. sécrètent des toxines diffusibles et ce avant tout contact physique entre le champignon et le nématode (López-Llorca et al., 2008). Selon Al-Ani (2019), les modes d'action des SMs de *Trichoderma* spp. contre les nématodes sont divers, ils consistent à provoquer une cytotoxicité par production de toxines, affecter l'éclosion des œufs et la motilité des juvéniles, affecter la production d'enzymes et de métabolites intercellulaires et extracellulaires et enfin diminuer le niveau de virulence de ces bioagresseurs.

Parmi les *Trichoderma* spp., *T. harzianum* a toujours été considérée comme l'espèce la plus utilisée et la plus efficace pour la gestion des nématodes et des autres bioagresseurs (Moosavi et Zare, 2012 ; Al-Ani, 2019). Toutefois, notre étude concernant la mortalité des larves (J2) et l'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis in vitro* a montré une efficacité légèrement plus importante de *T. hirsutum* (T29).

Il est important de souligner que l'espèce *T. hirsutum* a été nouvellement découverte par Chen et Zhuang (2017) et peu de travaux sur la caractérisation de ses métabolites secondaires et son activité nématocide ont été réalisés. Ainsi, les résultats relatifs à l'isolat *T. hirsutum* (T29) sont nouveaux et méritent d'être approfondis.

L'activité nématocide des principaux SMS de *T. harzianum* a été rapportée à l'égard des J2 et des œufs *M. javanica* et *M. incognita* (Nitao et al. 1999 ; Sharon et al. 2001 ; Dababat et Sikora, 2007). L'évaluation des SMS de dix espèces de *Trichoderma* spp. pour leur pouvoir antagoniste vis-à-vis de *M. incognita* a montré l'efficacité de *T. viride* par rapport aux autres espèces testées (Khan et al., 2020).

En effet, les SMS de *Trichoderma* spp. peuvent avoir d'autres potentialités phytosanitaires : contre les insectes (pucerons), les agents fongiques et bactériens ainsi que les mauvaises herbes (Ganassi et al., 2007 ; Druzhinina et al., 2011 ; Hermosa et al., 2014 ; Kuang et al., 2016). De plus, d'autres SMS peuvent induire des réponses de défense de l'hôte contre certains bioagresseurs et peuvent avoir un rôle important dans la promotion de la croissance des plantes (Mukherjee et al., 2013 ; Zeilinger et al., 2016).

Le potentiel des SMS de *F. oxysporum* à inhiber divers nématodes à différents stades de leur développement a fait l'objet de nombreuses recherches et leur action a été attribuée aux toxines réduisant la viabilité des nématodes (Hallman et Sikora, 1994 ; Trifonova, 2010 ; Waweru et al., 2014). Ainsi, Hallmann et Sikora (1996) ont démontré la production de toxines par un isolat de *F. oxysporum* à l'égard de *M. incognita*. L'effet nématocide de *F. oxysporum* (isolat B6) vis-à-vis d'*Heterodera cruciferae* Franklin a été signalé par Mennan et al. (2005), selon ces mêmes auteurs, le pourcentage d'infection des kystes de ce nématode par *F. oxysporum* était de l'ordre de 72 % après 10 jours d'inoculation, la capacité de ce champignon à pénétrer à travers la paroi des kystes d'*H. cruciferae* a été également rapportée.

Athman et al. (2006) ont testé neuf isolats de *F. oxysporum* ainsi que leurs métabolites secondaires à l'égard de *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, provoquant ainsi une mortalité des larves pouvant aller de 76,4 % à 100 % et une inhibition de l'éclosion des œufs de ce nématode. Waweru et al. (2014) rapportent les effets antagonistes des SMS produits par *F. oxysporum* à l'égard du nématode de la banane *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb) Golden.

Enfin, l'efficacité de l'indole-3-acétique (IAA) et la gibépyrone extraits de *F. oxysporum* (Fo162) à l'égard de *M. incognita* a entraîné des valeurs CL50 de 104,117 µg/ml et 134 µg/ml respectivement après 72 h d'exposition (Bogner et al., 2017).

Les résultats obtenus par la présente étude sont encourageants et montrent que *Trichoderma harzianum*, *T. hirsutum* et *F. oxysporum* peuvent offrir une opportunité

intéressante pour leur emploi comme agents de lutte biologique contre les nématodes notamment *Globodera rostochiensis*.

Selon Vinale et *al.*, (2009), les métabolites secondaires varient en fonction de l'espèce ou de l'isolat utilisé ; ainsi, la combinaison de la spectrométrie de masse, des techniques chromatographiques et des tests biologiques s'est avérée utile pour la caractérisation rapide des métabolites secondaires actifs des extraits fongiques.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Le Nématode doré de la pomme de terre *Globodera rostochiensis* est considéré comme le bioagresseur le plus redoutable sur cette culture en Algérie et dans le monde, de par son statut d'organisme de quarantaine et par les pertes qu'il peut occasionner sur pomme de terre. En effet, les *Globodera* spp. sont difficiles à combattre compte tenu de leur extrême résistance et du fait que ce sont des organismes telluriques ; leur contrôle demeure un souci majeur pour les scientifiques et les agriculteurs. Au vu des effets liés à l'utilisation des pesticides conventionnels, la lutte intégrée basée sur l'utilisation accrue de pratiques et de substances biologiques s'est développée afin de mettre au point des bio-nematicides pour le contrôle de ce bioagresseur .

Cette étude se propose de rechercher les antagonistes associés à *G. rostochiensis* et d'évaluer leur activité nématocide ainsi que la caractérisation des principaux métabolites secondaires impliqués dans le potentiel bioactif.

Les résultats des isolements effectués à partir du sol, des femelles et des kystes de *G. rostochiensis* ont permis d'obtenir une collection de 123 isolats, dont 117 isolats fongiques et 6 bactériens. Le séquençage des régions ITS et celles du gène Rpb2, validé par comparaison avec les séquences disponibles dans la « GenBank » a mené à la caractérisation de 79 isolats fongiques appartenant à 9 genres différents où *Trichoderma* et *Fusarium* sont les plus dominants ; ils sont représentés par 28 et 35 isolats respectivement, ce sont des agents de biocontrôle appropriés bien connus en raison de leur adaptabilité à divers habitats .

Les autres genres ont montré une fréquence d'occurrence plus faible, il s'agit de *Gliocladium*, représenté par 7 isolats ; *Alternaria*, représenté par 3 isolats ; *Cladosporium*, représenté par 2 isolats ; *Penicillium*, *Phoma*, *Stemphylium* et *Arthrobotrys*, représentés avec 1 isolat chacun. De même, *T. harzianum*, *F. oxysporum* et *T. afroharzianum* sont les espèces les plus fréquentes avec 19 ; 14 et 6 isolats respectivement.

La présence des genres *Phoma*, *Alternaria* et *Penicillium* a été rapportée dans les kystes de *Globodera*. Généralement ce sont des champignons phytoparasites. Cependant, malgré leur faible fréquence, leur activité nématocide a été rapportée vis-à-vis des larves du 2^{ème} stade de *Globodera*, *Heterodera* et *Meloidogyne*.

En ce qui concerne le genre *Arthrobotrys*, il serait souhaitable d'identifier l'espèce, de tester son activité nématocide à l'égard des *Meloidogyne* vu sa spécificité vis-à-vis de ces nématodes.

Le genre *Gliocladium* a été isolé dans la majorité des zones prospectées, le rôle de ce champignon comme antagoniste des nématodes est connu et son activité nématocide a été rapportée vis-à-vis de *Meloidogyne* spp. De ce fait, il serait intéressant de le tester à l'égard de ces derniers. De même, malgré sa faible fréquence, l'activité nématocide du genre *Cladosporium* a été rapportée vis-à-vis des nématodes à kystes et à galles.

Le genre *Stemphylium* a été recensé parmi les champignons associés à *G. rostochiensis*, néanmoins, il est généralement considéré comme parasite des plantes et n'a pas été rapporté auparavant comme agent de lutte biologique.

Il est important de signaler que l'association des neuf genres fongiques rapportés dans cette étude avec les kystes de *G. rostochiensis* ainsi que *T. afroharzianum* et *T. hirsutum* ont été recensées pour la première fois en Algérie dans cette présente étude.

Par ailleurs, les analyses BLAST des séquences du gène ribosomal de l'ARNr 16S des isolats bactériens obtenus à partir des kystes ont permis de caractériser 4 isolats comme étant des membres des genres *Bacillus*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas* et *Brucella*.

Un intérêt particulier doit être accordé au genre *Bacillus* ; en effet, ce dernier possède d'énormes potentialités en tant qu'agent de lutte biologique à l'égard des nématodes phytoparasites par la colonisation des racines, ses multiples modes d'action et également par sa capacité à sporuler facilement même dans des conditions défavorables. De plus, les *Bacillus* présentent une action antagoniste puissante à l'égard des champignons phytopathogènes (*Pythium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* et *Fusarium*) et des insectes nuisibles appartenant à plusieurs ordres comme : les hyménoptères, les lépidoptères et les coléoptères.

L'association de *Brucella*, *Rhizobium* et de *Stenotrophomonas* avec les kystes de *G. rostochiensis* a été observée également pour la première fois dans cette étude. Toutefois, plusieurs espèces appartenant à ces deux derniers genres sont connues pour leur grand potentiel de contrôle biologique en raison de leur capacité à promouvoir la croissance des plantes et à protéger les racines contre les stress biotiques et abiotiques, ainsi, il serait intéressant de les tester à l'égard de *G. rostochiensis*.

L'analyse des données de l'évaluation de l'activité nématocide des champignons antagonistes à l'égard de *G. rostochiensis* a révélé l'efficacité des agents fongiques testés *in vitro* sur la mortalité des larves et l'inhibition de l'éclosion des œufs, celle-ci augmente avec

l'élévation de la concentration et la période d'exposition. Cependant, certains isolats ont montré des pourcentages de mortalité des larves et d'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* plus importants que d'autres dépassant les 80 % particulièrement pour les espèces les plus efficaces dont *T. harzianum* (Th.8) et *F. oxysporum* (F.ox). Ainsi, les taux de mortalité des larves et d'inhibition de l'éclosion des œufs enregistrés sont inférieurs à 50 % pour les doses faibles aux trois périodes d'exposition excepté pour ces deux espèces.

Le traitement chimique à l'oxamyl montre une activité nématocide élevée à l'égard des larves et des œufs du nématode doré de la pomme de terre *in vitro*, les résultats relevés par ce dernier sont similaires à ceux mentionnés sur *T. harzianum* (Th.8) et *F. oxysporum* (F.ox) sur la mortalité des larves de ce nématode et inférieurs à ceux notés par ces derniers sur l'inhibition de l'éclosion des œufs. Cependant, ces mêmes résultats affichés par l'oxamyl sont supérieurs à ceux enregistrés par les autres isolats testés.

Les données obtenues sur l'effet de ces deux espèces et leur combinaison testées contre *G. rostochiensis in vivo* ont montré une diminution des kystes dans le sol de l'ordre de 55 ; 65 et 70 % , une inhibition de l'éclosion des œufs de l'ordre de 38 ; 44 et 57 % et une amélioration de la croissance des plants de pomme de terre de 8 ; 12 et 15 % respectivement pour *F. oxysporum* (F.ox), *T. harzianum* (Th.8) et *T. harzianum* (Th.8) + *F. oxysporum* (F.ox) dans le traitement préventif. Cependant ces diminutions restent faibles après plantation.

Le traitement à l'oxamyl a permis une réduction du nombre de kystes de *G. rostochiensis* et une augmentation de la croissance des plants de pomme de terre le plus élevé qui est de l'ordre de 73 % et 20 % respectivement.

Ces résultats montrent une plus grande efficacité quand les isolats sont combinés et laissent supposer que le système de lutte est plus stable. Cependant, des essais au champ sont nécessaires pour confirmer pleinement leur efficacité et leur potentiel sur le terrain.

Par ailleurs, le screening chimique des métabolites secondaires a révélé que *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* (F.ox) analysés par LCMS sont riches en métabolites secondaires tels que les peptaibols, les polykétides, les terpènes et les trichotécènes, possédant une activité nématocide à l'égard de nombreux nématodes phytoparasites, particulièrement les *Globodera* spp. Les principaux métabolites caractérisés des trois isolats fongiques testés sont l'acide harzianique, l'harzianolide et l'acide fusarique respectivement qui ont montré un pouvoir antagoniste important vis-à-vis des larves et des œufs de *G. rostochiensis in vitro* augmentant avec l'élévation des concentrations de SMs (25,

50 et 100 µg/ml) et du temps d'exposition (24, 48 et 72 h). Les pourcentages de mortalité des larves et d'inhibition de l'éclosion des œufs de *G. rostochiensis* enregistrés dépassent les 80 % pour les concentrations élevées, particulièrement pour les isolats les plus efficaces dont *T. hirsutum* (T29) et *T. harzianum* (Th.8).

L'efficacité des métabolites secondaires des extraits fongiques testés sur la mortalité des larves de *G. rostochiensis* a également été déterminée par le calcul des DL 50, les valeurs sont inversement proportionnelles au temps d'exposition.

Les résultats de cette présente étude s'avèrent très intéressants et encourageants et méritent d'être poursuivis ; de ce fait, il serait souhaitable de développer et d'approfondir les recherches sur les champignons et les bactéries associés à *G. rostochiensis* en Algérie afin d'exploiter les potentialités et la diversité des métabolites secondaires bioactifs synthétisés par ces espèces, notamment *Trichoderma* spp. et *Fusarium* spp. qui peuvent offrir une opportunité pour le développement de formulations de bio-nématicides en tant qu'alternatives aux produits chimiques.

En revanche, ce bioagresseur classé organisme de quarantaine dans la liste A2 doit faire l'objet de mesures de lutte obligatoire. Lorsque la présence du nématode à kystes est confirmée par une analyse nématologique, les parcelles infestées doivent être soumises à des mesures spécifiques, il est indispensable d'empêcher sa dissémination vers de nouvelles parcelles et de réduire les populations dans les parcelles contaminées. Ainsi, les semences de pommes de terre utilisées doivent être saines et exemptes de *Globodera* spp., de ce fait, une vulgarisation auprès des agriculteurs serait souhaitable.

Les résultats obtenus lors de ce présent travail sont encourageants et représentent une approche alternative très prometteuse dans la gestion du nématode doré de la pomme de terre *G. rostochiensis*. Cependant, de nombreuses questions restent posées offrant plusieurs champs d'étude considérables et scientifiquement très riches restent à explorer :

- des investigations complémentaires sur les BCA dans d'autres zones potentielles de pomme de terre sont nécessaires, vu que certains champignons nématophages mondialement connus n'ont pas pu être recensés dans nos isolats, à savoir *Paecilomyces lilacinus* et *Verticillium chlamydosporium* en tenant compte des exigences écologiques favorables à ces derniers.

- il serait également intéressant de cribler directement l'activité recherchée des BCA *in natura* pour avoir une meilleure idée de l'activité réelle.
- de déterminer leurs mécanismes d'actions.
- d'étudier les facteurs environnementaux affectant leur multiplication, leur persistance et leur efficacité et l'évaluation des risques liés à leur métabolisme secondaire ainsi que l'évaluation de leur interaction avec d'autres microorganismes de l'écosystème étudié.

Résumés

Titre : « Contribution à la recherche des antagonistes du nématode doré de la pomme de terre : *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) et Evaluation de l'activité nématocide de quelques isolats de champignons antagonistes à l'égard de ce bioagresseur ».

Résumé : Les nématodes à kystes du genre *Globodera* sont considérés comme les bioagresseurs les plus redoutables sur culture de pomme de terre en Algérie et dans le monde, le contrôle de ces organismes de quarantaine est obligatoire. Ainsi, dans le but de développer des méthodes de lutte biologiques alternatives aux produits chimiques, les champignons et les bactéries associés à ce bioagresseur en Algérie ont été isolés et caractérisés. Au total 123 isolats ont été obtenus, dont 117 sont fongiques et 6 bactériens. Nous avons retenu 79 isolats fongiques appartenant à 9 genres différents et qui ont été caractérisés par amplification PCR des séquences des régions ITS et celles du gène Rpb2. *Trichoderma* et *Fusarium* sont les plus dominants avec 28 et 35 isolats respectivement, suivis des autres genres qui sont faiblement représentés, il s'agit des genres : *Gliocladium* ; *Alternaria*; *Cladosporium* avec 7 ; 3 et 2 isolats respectivement ; *Penicillium*; *Phoma*; *Stemphylium* et *Arthrotrix* représentés avec 1 isolat chacun. Les espèces les plus fréquentes sont *T. harzianum*, *F. oxysporum* et *T. afroharzianum* avec 19 ; 14 et 6 isolats respectivement. Il est important de signaler que l'association des neuf genres fongiques rapportés dans cette étude avec les kystes de *G. rostochiensis*, ainsi que les espèces *T. hirsutum* et *T. afroharzianum* ont été recensées pour la première fois en Algérie. Enfin, 4 isolats bactériens ont été caractérisés par séquençage du gène ribosomal de l'ARNr 16S comme étant *Bacillus* spp., *Rhizobium* spp., *Stenotrophomonas* spp. et *Brucella* spp. L'association de ces genres avec les kystes de *G. rostochiensis* a été observée pour la première fois.

Les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité nématocide de quelques isolats de champignons antagonistes à l'égard de *G. rostochiensis* ont montré que tous les isolats fongiques testés provoquent une mortalité des larves du deuxième stade (J2) et inhibent l'éclosion des œufs de cette espèce. Cette activité nématocide augmente avec l'élévation de la concentration et du temps d'exposition, dépassant ainsi les 80% chez les souches les plus efficaces dont *T. harzianum* (Th.8) et *F. oxysporum* (F.ox). L'analyse des données sur l'effet de ces deux espèces testées et leur combinaison vis-à-vis de *G. rostochiensis* *in vivo* a révélé que ces traitements réduisent le développement de ce nématode et améliorent la croissance des plants de pommes de terre particulièrement en application préventive, en enregistrant une diminution des kystes dans le sol de l'ordre de 55 ; 65 et 70 % , un parasitisme des œufs de l'ordre de 38 ; 44 et 57 % et une amélioration de la croissance des plants de pomme de terre de 8 ; 12 et 15 % pour *F. oxysporum* (F.ox), *T. harzianum* (Th.8) et *T. harzianum* (Th.8) + *F. oxysporum* (F.ox) respectivement.

Cette étude est complétée par la purification et la caractérisation biochimique des molécules actives responsables de l'efficacité contre *G. rostochiensis*. Le screening chimique a révélé que les champignons antagonistes analysés par LCMS, à savoir *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) et *F. oxysporum* (F.ox) sont riches en métabolites secondaires tels que les peptaibols, les polykétides, les terpènes et les trichotécènes. Les principaux métabolites caractérisés des extraits organiques des trois isolats fongiques testés sont l'acide harzianique, l'harzianolide et l'acide fusarique respectivement qui ont montré un pouvoir antagoniste important vis-à-vis des larves et des œufs de *G. rostochiensis* *in vitro*, qui augmente avec l'élévation des concentrations de SMs (25, 50 et 100 µg/ml) et du temps d'exposition (24, 48 et 72h). Les pourcentages de mortalité des larves et d'inhibition de l'éclosion des œufs enregistrés par ces métabolites dépassent les 80 % pour les concentrations élevées, particulièrement pour les isolats les plus efficaces dont *T. hirsutum* (T29) et *T. harzianum* (Th.8). Les valeurs des DL 50 calculées pour l'évaluation de l'efficacité des métabolites secondaires des extraits fongiques testés sur la mortalité des larves de *G. rostochiensis* sont inversement proportionnelles au temps d'exposition.

Enfin, l'utilisation de ces microorganismes antagonistes et de leurs métabolites secondaires offre une opportunité pour le développement de formulations de bio-nématocides et apparaît comme une approche alternative très prometteuse dans le cadre d'une gestion durable du nématode doré de la pomme de terre.

Mots clés : *Globodera rostochiensis* ; pomme de terre ; biocontrôle ; *Trichoderma* spp. ; *Fusarium oxysporum* ; activité nématocide, métabolites secondaires.

Title: "Contribution to the research of the potato golden nematode: *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) antagonists and Evaluation of the nematicidal activity of some isolates of antagonistic fungi towards this bioaggressor".

Abstract: Cyst nematodes of the genus *Globodera* are among the most dangerous bioaggressors of potato crops in Algeria and worldwide. The control of these quarantine organisms is mandatory. Indeed, in order to develop biological control methods alternative to chemical products, fungi and bacteria associated to this bioaggressor in Algeria were isolated and characterized. A total of 123 isolates were obtained, of which 117 are fungal and 6 bacterial. We have retained 79 fungal isolates belonging to 9 different genera which were characterized by PCR amplification of the ITS regions sequences and those of the Rpb2 gene. *Trichoderma* and *Fusarium* are the most dominant with 28 and 35 isolates respectively, followed by the other genera, which are poorly represented; these genera are: *Gliocladium*; *Alternaria*; *Cladosporium* with 7; 3 and 2 isolates respectively; *Penicillium*; *Phoma*; *Stemphylium* and *Arthrobotrys* represented with 1 isolate each. The most frequent species are *T. harzianum*, *F. oxysporum* and *T. afroharzianum* with 19; 14 and 6 isolates respectively. It is important to note that the association of the nine fungal genera reported in this study with *G. rostochiensis* cysts, as well as the species *T. hirsutum* and *T. afroharzianum* were recorded for the first time in Algeria. Finally, 4 bacterial isolates were characterized by 16S rRNA ribosomal gene sequencing as *Bacillus* spp., *Rhizobium* spp., *Stenotrophomonas* spp. and *Brucella* spp. The association of these genera with *G. rostochiensis* cysts was observed for the first time.

Results on the evaluation of the nematicidal activity of some antagonistic fungal isolates against *G. rostochiensis* showed that all fungal isolates tested cause mortality of second stage larvae (J2) and inhibit egg hatching of these species. This nematicidal activity increases with the elevation of concentration and exposure time, exceeding 80% in the most effective strains including *T. harzianum* (Th.8) and *F. oxysporum* (F.ox). The analysis of the data on the effect of these two tested species and their combination towards *G. rostochiensis in vivo* revealed that these treatments reduce the development of this nematode and improve the growth of potato plants especially in preventive application, recording a decrease of cysts in the soil by 55; 65 and 70 %, an inhibition of egg hatching by 38; 44 and 57 % and an improvement of the growth of potato plants by 8; 12 and 15% for *F. oxysporum* (F.ox), *T. harzianum* (Th.8) and *T. harzianum* (Th.8) + *F. oxysporum* (F.ox) respectively.

This study is completed by the biochemical purification and characterization of the active molecules responsible for the efficiency against *G. rostochiensis*. The chemical screening revealed that the antagonistic fungi analyzed by LCMS, namely *T. harzianum* (Th.8), *T. hirsutum* (T29) and *F. oxysporum* (F.ox) are rich in secondary metabolites such as peptaibols, polyketides, terpenes and trichotecenes. The main metabolites characterized from the organic extracts of the three fungal isolates tested are harzianic acid, harzianolide and fusaric acid respectively, which showed a significant antagonistic power towards *G. rostochiensis* larvae and eggs *in vitro*, which increases with increasing SMs concentrations (25, 50 and 100 µg/ml) and exposure time (24, 48 and 72h).

The percentages of larval mortality and egg hatching inhibition recorded by these metabolites exceeded 80 % for high concentrations, particularly for the most effective isolates including *T. hirsutum* (T29) and *T. harzianum* (Th.8). The LD50 values calculated for the evaluation of the efficacy of the secondary metabolites of the fungal extracts tested on the mortality of *G. rostochiensis* larvae are inversely proportional to the exposure time.

Finally, the use of these antagonistic microorganisms and their secondary metabolites offers an opportunity for the development of bio-nematicide formulations and appears to be a very promising alternative approach for the sustainable management of the potato golden nematode.

Key words: *Globodera rostochiensis*; potato; biocontrol; *Trichoderma* spp.; *Fusarium oxysporum*; nematicidal activity, secondary metabolites.

العنوان: "المساهمة في البحث عن مضادات النيماطود الذهبي للبطاطس" *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) وتقييم نشاط بعض عزل الفطريات المضادة لهذا المعدي البيولوجي"

الملخص: النيماطودات من النوع *Globodera* هي واحدة من أخطر الآفات على محاصيل البطاطس في الجزائر وفي العالم. حاليا، البحث عن طرق مكافحة البديلة ضد هذه النيماطودات ضروري. وبالتالي، بهدف تطوير أساليب مكافحة البيولوجية البديلة للمبيدات الكيميائية تم عزل الفطريات والبكتيريا المرتبطة بهذه الآفة في الجزائر والتعرف عليها. تم الحصول على ما مجموعه 123 عزلة، منها 117 فطرية و6 بكتيرية. تم التعرف على 79 عزل فطرية تنتمي إلى 9 أجناس مختلفة بواسطة تضخيم PCR لتسلسل المناطق ITS و Rpb2. *Trichoderma* و *Fusarium* هي الأكثر هيمنة مع 28 و 35 عزل على التوالي، تليها الأجناس الأخرى الممثلة تمثيلا ضعيفا: *Alternaria*; *Gliocladium*; *Cladosporium*; مع 7؛ 3 و 2 عزل على التوالي، *Arthrotrichum*; *Stemphylium*; *Phoma* و *Penicillium* ممثلة بعزلة لكل جنس. الأنواع الأكثر شيوعا هي *T. harzianum*، *F. oxysporum* و *T. afroharzianum* مع 19؛ 14 و 6 عزل على التوالي. ومن المهم ملاحظة أن ارتباط الأجناس الفطرية التسعة مع أكياس *G. rostochiensis* وكذلك الأنواع *T. hirsutum* و *T. afroharzianum* تم تسجيلها لأول مرة في الجزائر. وأخيرا، تم التعرف على 4 عزلات بكتيرية من خلال تسلسل الـ 16S ARN على أنها: *Brucella* spp.، *Bacillus* spp.، *Rhizobium* spp.، *Stenotrophomonas* spp. وقد لوحظ ارتباط هذه الأجناس مع أكياس *G. rostochiensis* للمرة الأولى.

كما أظهرت نتائج تقييم نشاط بعض العزلات الفطرية المضادة لـ *G. rostochiensis* أن جميع العزلات سببت وفاة يرقات الطور الثاني J2 ومنع تفقيس بيض هذا النيماطود. زاد التأثير مع ارتفاع التركيز ووقت التعرض، وتجاوز 80٪ لدى السلالات الأكثر فعالية بما في ذلك *F. oxysporum* (F.ox) و *T. harzianum* (Th.8). وأظهرت تجربة الجسم الحي مع بوغ نفس العزلات والجمع بينهما أن معالجات التربة خفضت بشكل كبير تكاثر هذا النيماطود وحسنت نمو نباتات البطاطس لا سيما في التطبيق الوقائي عن طريق تسجيل انخفاض الأكياس في التربة مقدر بـ 55؛ 65 و 70٪، منع تفقيس البيض مقدر بـ 38؛ 44 و 57٪ وتحسن في نمو البطاطا بقدر 8؛ 12 و 15٪ لـ *F. oxysporum* (F.ox) + *T. harzianum* (Th.8) و *T. harzianum* (Th.8) على التوالي.

تتكمّل هذه الدراسة من خلال التنقية والتوصيف البيوكيميائي للجزيئات النشطة ضد *G. rostochiensis*. كشف الفحص الكيميائي أن الفطريات العدائية التي حللتها LCMS: *T. harzianum* (Th.8)، *T. hirsutum* (T29) و *F. oxysporum* (F.ox) غنية بالأبيض الثانوي مثل البيبتايبول، البوليكيتيدات، تيربين وتريكوثيسان بشكل رئيسي حمض هارزيانينك، هارزيانوليد وحمض الفوساريك على التوالي. كشفت هذه المركبات قوة عدائية كبيرة تجاه يرقات وبيض *G. rostochiensis* في المختبر، والتي تزداد مع ارتفاع تركيزات SMS (25، 50 و 100 ميكروغرام / مل) ووقت التعرض (24، 48 و 72 ساعة). وتجاوز النسب المئوية لوفيات اليرقات ومنع تفقيس البيض التي سجلتها هذه الأيضات 80٪ بالنسبة للتركيزات العالية، ولا سيما بالنسبة للعزلات الأكثر فعالية بما في ذلك *T. harzianum* (Th.8) و *T. hirsutum* (T29). قيم الـ DL 50 المحسوبة لتقييم فعالية الأيض الثانوي للمستخلصات الفطرية التي تم اختبارها على وفيات يرقات *G. rostochiensis* تتناسب عكسيا مع وقت التعرض.

وأخيرا، فإن استخدام هذه الكائنات الدقيقة العدائية ونواتجها الأيضية الثانوية يتيح فرصة لتطوير تركيبات مبيدات النيماطود البيولوجية، ويبدو بديلا واعدة للغاية في سياق الإدارة المستدامة للنيماطود الذهبي للبطاطس.

الكلمات المفتاحية

Globodera rostochiensis؛ البطاطس؛ مكافحة البيولوجية؛ *Trichoderma* spp.؛ *Fusarium oxysporum*؛ النشاط المضاد للنيماطودات؛ الأبيض الثانوي.