

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Département de : Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Thème

Recherche des peptaibols dans les extraits de fermentation de
Trichoderma harzianum 127a.

Présenté et soutenu par :

Le : 02.06.2019

- Messikh Roumeissa.
- Briek Amel.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. DEHIMAT L. Pr. (Professeur – UCM Constantine).

Encadreur : Mme ALMI HIBA (MCB -UCM Constantine).

Examinatrice : M^{lle} ABDELAZIZ Wided (MCB- UCM Constantine).

Année universitaire

2018-2019

Table des matières

❖ Dédicace	
❖ Remerciements	
❖ Liste des abréviations	
❖ Liste des figures	
❖ Liste des tableaux	
I. Introduction	1
II. Revue bibliographique	4
1-Trichoderma harzianum	4
1.1 Généralité	4
1.2 Description d'espèce	4
1.3 Classification	5
1.4 Cycle biologique	6
1.5 Mode d'action	6
- Antibiose	6
- Compétition	6
- Mycoparasitisme	6
1.6 Production des métabolites secondaire	7
- Production d'enzyme	7
- Production des substances bioactives	7
- Sécrétion des peptaibols	7
2-Les peptaibols	8
1- Définition et structure	9
2- Origine	9
3- Classification	11
4- La voie de biosynthèse	12
5- Mode d'action	12
- Activité protozoaire	12
-Activité antiviral	13
- Activité antibactérienne	13
- Activité antifongique	14
3-La fermentation liquide	14
III. Matériels et méthodes	15
1. Matériel	15
1.1 La Souche fongique de Trichoderma harzianum	15
1.2 Milieu de culture	15

1.2.1 Milieu PDA.....	15
1.2.2 Les milieux Sabouraud et Czapeck-dox	16
2. Méthodes.....	16
1 Réactivation de <i>T.harzianum</i> 127a.....	16
2 Repiquage de <i>T. harzianum</i> 127a	16
3 Confirmation d'identification	17
3.1 Identification macroscopique	17
3.2 Identification microscopique.....	17
4 Conservation de la souche	17
5 élections d'un milieu de culture optimum pour la production des métabolites secondaire.....	17
6 La fermentation	18
7 Extraction des métabolites.....	18
8 Chromatographie sur couche mince (CCM).....	19
9 Révélation des peptaibols.....	20
IV. Résultats et discussion.....	21
1. Résultats.....	21
1.1.Réactivation de <i>T. harzianum</i> 127a.....	21
1.2. Repiquage de <i>T. harzianum</i> 127a.....	21
1.3.Confirmation de l'identification	22
1.4.Sélection d'un milieu de culture optimum pour la production des métabolites secondaire	22
1.5.Fermentation et extraction	24
1.6.Chromatographie sur couche mince (CCM)	25
2. Discussion	26
V. Conclusion.....	28
Annexe	
Référence bibliographie	
Résumé	
Abstract	
الملخص	

Dédicase

Je dédie ce modeste travail....:

À mon père que dieu le bénisse

À ma Mère

Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir.

En témoignage, t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entourée.

À mes frères: seif eddine, mohamed el yazid, nour el islam.

À mes sœurs: houda, nawel.

À mon fiancé : Abd Arazek.

À mes petits princes: iyed, yaakoub, anes.

Ma chère copine et binôme «AMEL» et toute sa famille.

À tout mes À tout mes chères amis : lamia, safa, chaïma, rayen , amira, lilya, ferial.... je leur souhaitant tout le succès, tout le bonheur.

À Toute la famille MESSIKH ainsi que la famille BOUGHARA pour lesquelles j'éprouve beaucoup d'affection et de respect.

À Tous ceux que j'aime

ROUMEISSA

Dédicace :

*Je dédie ce mémoire à celle qui m'a donné la vie ; qui s'est sacrifiée pour ma réussite et mon bonheur, à ma mère Puisse Dieu de m'aider à la rendre plus fière de moi ; merci
maman.*

*A Mon père symbole de tendresse, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager ; m'aider et me protéger Je t'aime
papa.*

A mes frères :Oualid , Housseem

A ma sœur : Amira

A tous mes collègues et amies

A mon binôme : Roumeïssa

A mon amis :houcine

Remerciement

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à Dieu qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.



*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à madame **Almi hiba** pour ses conseils, ses encouragements, sa patience sa compétence et sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.*

Nous voudrions également remercier l'ensemble des membres de jury pour nous avoir fait l'honneur de leur présence.

Liste des abréviations

% : pourcentage

C° : degré

al. : Collaboration

Gr : grossissement

min : minute

ml : millilitre

mm: millimètre

N°: numéro

PDA: Potato Dextrose Agr

Sab : sabouraud

Czp : czapack-dox

KM : kohlmeyer medium

sp : espèce

cm : centimètre

mg : milligramme

g : gramme

µl : microlitre

v/v : volume à volume

Rf : Rapport Frontal

Listes des Figures :

Figure	Description	Page
Revue bibliographique		
Figure 01	a. Aspect macroscopique sur milieu PDA après 6 jours d'incubation à 25°C (Bekkar, 2016) b. Morphologie de <i>Trichoderma</i> : (A et B) Conidiophores montrant une ramification vaste. (C et D) Phialides montrant la production de conidies (E) Conidies (Barnett et Hunter, 1977).	
Figure 02	Acétyle diméthyl- α dialkyl α amine acide (Acide U).	
Figure 03	Les importants genres fongiques impliqués dans la bio-synthèse des peptaïbols.	
Figure 04	Exemples de quelques peptaïbols appartenant au trois classes (Solfrizzo et al., 1994 ; Bodo, 1996).	
Matériel et méthode		
Figure 05	Schéma de la réactivation des souches fongique.	
Figure 06	Extraction des métabolites secondaires.	
Figure 07	Evaporation sous vide a l'aide d'un rotavapeur.	
Figure 08	Schéma représente la chromatographie sur CCM.	
Résultats et discussion		
Figure 09	Souche <i>T. harzianum</i> 127a de réactivée sur milieu PDA.	
Figure 10	Aspect de la souche <i>T. harzianum</i> 127a sur milieu PDA après repiquage.	
Figure 11	Observation macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>T.</i>	

	<i>harzianum 127a.</i>	
Figure 12	Aspect macroscopique de <i>Trichoderma harzianum 127 a</i> sur différent milieux à 30 °C : (A) milieu PDA, (B) milieu Sabouraud, (C) milieu Czapack Dox, (D) milieu KM	
Figure 13	Evaluation de la croissance mycélienne de <i>T. harzianum 127a</i> sur les cinq milieux de culture : PDA, Sabouraud, Czapek-dox et KM.	
Figure 14	Résultats de fermentation liquide avant et après incubation.	
Figure 15	Extrait de métabolites secondaires avant et après dilution dans le Chloroforme.	
Figure 16	Résultats de révélation des peptaïbols par CCM.	

Liste des tableaux :

Tableau	Description	Page
Revue bibliographie		
Tableau 3 :	Classification de <i>Trichoderma</i> (Bissett, 2004).	

I - Introduction

Depuis des milliers d'années, les êtres humains se servent des microorganismes, bactéries et champignons pour fabriquer des produits alimentaires ou pharmaceutiques. Ces microorganismes, omniprésents dans notre environnement sont actuellement de remarquables agents de production de nombreuses molécules organiques obtenues par fermentation et utilisées pour leurs propriétés fonctionnelles dans des domaines extrêmement variés.

Les microorganismes dont les micromycètes ont la capacité de synthétiser, par des voies métaboliques complexes, de nombreux composés qu'ils utilisent pour diverses fonctions. Les micromycètes produisent une multitude de produits chimiques : enzymes, antibiotiques...etc. qui présentent une large variété d'activités biologiques (antivirale, antimicrobienne, antifongique...). Il est par ailleurs aujourd'hui reconnu que les micromycètes constituent une source importante de molécules bioactives.

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma sp* a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934), concernant un antifongique (Papavizas, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino et *al.*, 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990). Parmi ces métabolites bioactifs, les antibiotiques qui sont représentés par la famille des peptaïbols.

Les peptaïbols présentent un large spectre d'activité biologique, considérées pour la plupart comme les résultats de leurs propriétés membranaire (Rebuffat et *al.*, 1999; Chugh et Wallace ,2001) .

Le cadre bibliographique de cette problématique est présenté dans ce manuscrit qui est organisé en deux parties : la première partie constitue une synthèse

bibliographique comportant une présentation de la souche *Trichoderma harzianum*. Ensuite, on expose des données issues de la recherche dans la littérature sur les peptaïbols. Ce contexte bibliographique s'achèvera sur la nouvelle technologie de production des métabolites secondaires : la fermentation.

Dans la deuxième partie les travaux expérimentaux, qui exposent donc la problématique du mémoire. Cette partie concerne principalement les objectifs suivants :

- i. Sélection d'un milieu de culture adéquat pour la production des métabolites secondaires et en particulier les peptaïbols ;
- ii. Production dans des Erlenmeyer des peptaïbols ;
- iii. Recherche des peptaïbols dans les extraits de fermentation par la méthode CCM.

Enfin les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité ont été dégagées.

II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

II. 1. *Trichoderma harzianum*

II.1.1. Généralités

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

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

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

II.1.2. Description de l'espèce

Le genre *Trichoderma* est caractérisé par une vitesse de croissance rapide et une sporulation abondante sur milieu de culture (Gams et Bissett, 1998). Il est facilement reconnaissable en culture grâce à la couleur généralement verte de ses spores (Dubos, 1986). Les conidies de *Trichoderma* donnent naissance à un mycélium floconneux d'abord blanc. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium (Chabasse et al., 2002) (Figure 1).

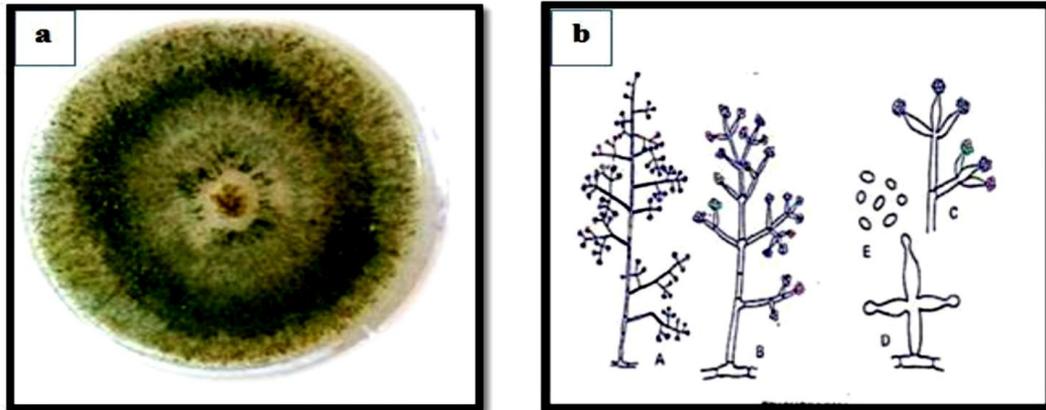


Figure 1 : a. Aspect macroscopique sur milieu PDA après 6 jours d'incubation à 25°C (Bekkar, 2016) b. Morphologie de *Trichoderma* : (A et B) Conidiophores montrant une ramification vaste. (C et D) Phialides montrant la production de conidies (E) Conidies (Barnett et Hunter, 1977).

II.1.3. Classification

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

Tableau 3 : Classification de *Trichoderma* (Bissett, 2004).

Embranchement	Amastigomycota
Sous- embranchement	Ascomycotina
Classe	Sordariomycètes
Ordre	Hypocréales
Famille	Hypocraceae
Genre	<i>Trichoderma</i>
Espèce	<i>Trichoderma harzianum</i>

II.1.4. Cycle biologique

Les espèces du genre *Trichoderma* ont une reproduction exclusivement asexuée (Roquebert, 1996). En effet, après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour un feutrage épais se superpose à la culture (Corbaz, 1990).

II. 1.5. Mode d'action

Le *Trichoderma sp* est capable d'attaquer différents agents pathogènes par des mécanismes variés dont les principaux sont le parasitisme, l'antibiose et la compétition (Howell, 2003 ; Vinale et *al.*, 2007).

II. 1.5.1. L'antibiose

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

II.1.5.2. La compétition

Le *Trichoderma* est parmi les microorganismes rhizosphériques les plus compétitifs qui pourront tirer profit de l'apport nutritif libéré par le système racinaire et tenter de coloniser la racine des plantes (Yedidia et *al.*, 1999, 2000 ; Metcalf et *al.*, 2001).

II. 1.5.3. Mycoparasitisme

Le mycoparasitisme implique une reconnaissance de *Trichoderma* aux parois de son hôte suivie par l'enroulement des hyphes du mycoparsite sur ceux de l'agent phytopathogène cela avec des sécrétions d'enzymes de dégradation de la paroi de l'hôte. Ce phénomène est suivi par une lyse cellulaire de l'hôte (Howell, 2003).

II. 1.6. Production des métabolites secondaires de *Trichoderma harzianum*

Les espèces de *Trichoderma* sont capables de produire plus de 180 métabolites secondaires différents, selon les conditions environnementales, le sol, la plante et l'agent pathogène auquel elles sont confrontées. Ces métabolites appartenant à différentes classes de composés chimiques (Gams et Bisset, 1998; Reino et al., 2008). Ces composés ont été caractérisés et classés en des composés volatiles, des composés diffusibles et des peptaïbols (Ghisalberti et Sivasithamparam, 1991). La littérature n'indique que les métabolites importants de *Trichoderma sp.*, qui sont principalement des enzymes et des molécules bioactives :

II. 1.6.1. Production d'enzymes

La production des enzymes est variable d'une souche à une autre. Les enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes, comme les chitinases, β -1,3-glucanases, cellulases, protéases et autres hydrolases, sont parmi les métabolites diffusibles impliqués dans le mécanisme d'antibiose exercé par *Trichoderma* (Howell, 2003; Harman et al., 2004; Eziashi et al., 2006 ; Castro et al., 2010). Elles sont exploitées dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek et al., 2003).

II. 1.6.2. Production de substances bioactives

Trichoderma harzianum est capable de produire différentes molécules bioactives, y compris l'antibiotique 6-pentyl- α -pyrone (6PAP) qui appartient au groupe des métabolites volatiles jouant un rôle dans la lutte biologique à l'égard des champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* (Jeleń et al., 2013 ; Błaszczuk et al., 2014).

II. 1.6.3. Sécrétion des peptaïboles :

Ce sont des polypeptides ayant des effets antifongiques, antibactériens (Gram +) et antiviraux. Les composés appartenant à cette classe comprennent : les Viridines, Trichotoxines A et B, Trichorzianines A et B, Trichorzines et autres (Reino et al., 2008 ; Andrabi et al., 2011).

II.2. Les peptaïbols

II. 2.1. Définition et structure

D'origine seulement fongique (Lee et al., 1999), les peptaïbols sont définis comme étant une classe de molécules antibiotiques (Reiber et al., 2003 ; Shenkarev et al., 2004) et toxiques importantes (Becker et al., 1997 ; Wada et Tanaka, 2004). Selon Degencolb et al. (2003), le nom peptaïbols² (peptides acide α -amino isobutyrique amino alcool) a été proposé pour la première fois par Benedetti et al. (1982) et Brückner et al. (1984). Il désigne les peptides dotés des caractéristiques suivantes :

- i. Poids moléculaire variant entre 500 et 2200 Da ;
- ii. Structure linéaire ;
- iii. Abondance d'AA inhabituels hydrophobes non codés : les α -alkyl- α -aminoacides, surtout l'acide α,α -diméthyl amino acide ou acide α -amino isobutyrique (U) et l'Isovaline (J) (Reiber et al., 2003) ;
- iv. Origine fongique ;
- v. Issus d'une biosynthèse protéique non ribosomique ;
- vi. En milieu neutre, comprenant une partie N-terminale hydrophobe chargée positivement souvent constituée d'un résidu U acétylé (Figure 2) et une partie C-terminale hydrophile chargée négativement souvent constituée d'un amino alcool (Iida et al., 1995 ; Rebuffat et al., 1995 ; Becker et al., 1997 ; Grigoriev et al., 2002 ; Brückner et Koza, 2003).

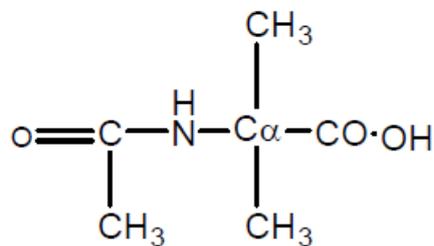


Figure 2: Acetyl diméthyl- α -alkyl α amine acide (Acide U).

II. 2.2. Origine

Les peptaïbols sont des métabolites exclusivement fongiques produits par différents genres de champignons terrestre ou marine. La plupart de ces champignons sont des moisissures appartenant au sous embranchement des Ascomycètes.

En effet, 75% des séquences de peptaïbols décrites jusqu'ici, sont bio synthétisés par les souches du genre *Trichoderma* (Figure3), parmi eux : *T. atroviridae*, *T. harzianum*, *T. longibrachitum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei*, *T. polysporum*, *T. saturnisporum*, *T. virens* et *T. viridae* ; *T. asperellum*) (Oh et al., 2000 ; Chutrakul et Peberdy, 2005).

D'autres genres et espèces synthétisent également ces métabolites secondaires mais avec une gamme bien plus restreinte ; il s'agit de : *Acremonium* sp., *Paecilomyces* sp., *Boletus* sp., *Cephalosporium* sp., *Emericellopsis* sp., *Gliocladium deliquensens*, *Hypocrea* sp., *Mycogone cervina*, *M. rosea*, *Samarospora* sp., *Sepedonium chrysospermum*, *Stibella erythrocephala*, *S. fimetaria*, *S. flavipes*, *Tolypocladium inflatum*, *Verticimonosporium ellipticum* (Lee et al., 1999 ; Oh et al., 2000 ; Jaworski et Brückner, 2000 ; Jaworski et Brückner, 2001 ; Dogenkolb et al., 2003 ; Wilhelm et al., 2004).

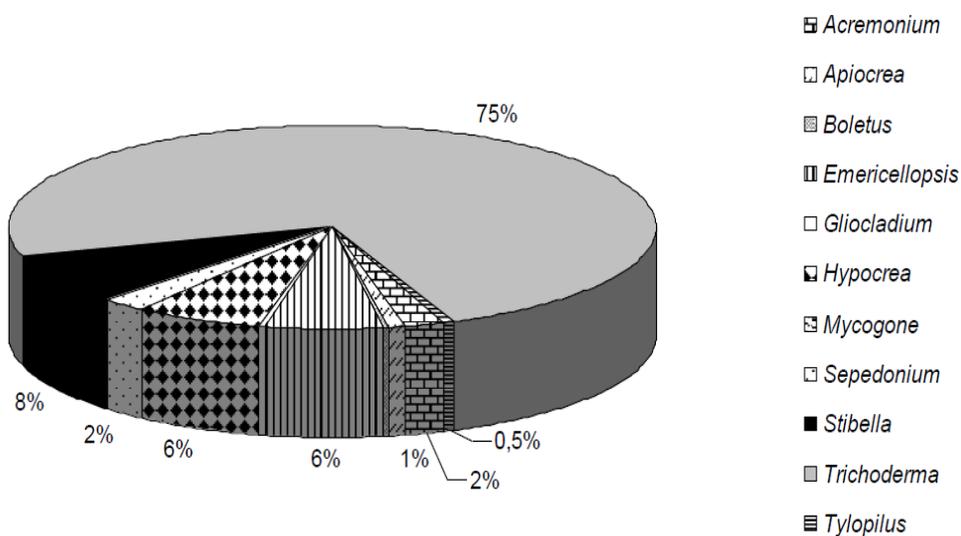


Figure 3: Les importants genres fongiques impliqués dans la bio synthèse des peptaïbols.

II. 2.3. Classification

Les peptaïbols sont répartis en trois sous-classes (Helimi et *al.*, 1995) (Figure4) :

- i. Les peptaïbols à longue séquence comportant entre 18 et 20 acide aminés avec une proline, en général, au deux tiers de la structure ;
- ii. Les peptaïbols à courte séquence avec 11 à 16 résidus et plusieurs proline répartis régulièrement dans la chaîne ;
- iii. Les lipopeptaïbols comprenant 7 à 11 acides aminés avec une acylation de l'extrémité N-terminale par un acide gras comme l'acide octanoïque ou l'acide décénoïque.

Peptaïbols à longue séquence

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Alaméthiçines																					
F 30 I	Ac	Aib	Pro	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Glu	Gln	Pheol
F 50	Ac	Aib	Pro	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
Paracelsines																					
A	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
B	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
C	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Ala	Aib	Gln	Aib	Val	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
D	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Ala	Aib	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
Saturnisporines																					
SA I	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Aib	Gln	Gln	Pheol
SA II	Ac	Aib	Ala	Aib	Ala	Aib	Ala	Gln	Aib	Leu	Aib	Gly	Aib	Aib	Pro	Val	Aib	Iva	Gln	Gln	Pheol
Trichorzianines																					
TA IIIc	Ac	Aib	Ala	Ala	Aib	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ser	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Ileu	Gln	Gln	Trpol	
TB IIIc	Ac	Aib	Ala	Ala	Aib	Aib	Gln	Aib	Aib	Aib	Ser	Leu	Aib	Pro	Val	Aib	Ileu	Gln	Glu	Trpol	

Peptaïbols à courte séquence

Zervamicines																				
ZL	Ac	Leu	Ileu	Gln	Iva	Ileu	Thr	Aib	Leu	Aib	Hyp	Gln	Aib	Hyp	Aib	Pro	Pheol			
Harzianines																				
HC III	Ac	Aib	Asn	Leu	Aib	Pro	Ser	Val	Aib	Pro	Iva	Leu	Aib	Pro	Leuol					
HC VI	Ac	Aib	Asn	Leu	Aib	Pro	Ala	Val	Aib	Pro	Aib	Leu	Aib	Pro	Leuol					
HC IX	Ac	Aib	Asn	Leu	Aib	Pro	Ala	Ileu	Aib	Pro	Iva	Leu	Aib	Pro	Leuol					

Lipopeptaïbols

Trichogines																				
GA IV	Oc	Aib	Gly	Leu	Aib	Gly	Gly	Leu	Aib	Gly	Ileu	Leuol								
Trichodécéines																				
TD II	Dc	Gly	Gly	Leu	Aib	Gly	Leu	Leuol												

Figure4 : Exemples de quelques peptaïbols appartenant au trois classes (Solfrizzo et *al.*, 1994 ; Bodo, 1996).

II. 2.4. Voie de biosynthèse biologique

les peptaïboles sont synthétisés par des complexes multienzymatiques qui sont des peptides synthétases, ce qui explique la grande diversité des peptides produits mais présuppose aussi de la complexité du mélange élaboré par les différentes souches (Brückner et pryzbylski, 1984). De plus, du fait de la présence d'acide aminé non codé, on considère généralement que bien que les peptaïbols soient des peptides, ils sont issus du métabolisme secondaires.

Leur biosynthèse se fait par un système complètement indépendant de la synthèse protéique classique (acide nucléique et ribosome).

Les acides aminés (AA) constitutifs sont d'abord activés sous la forme diaminoacyl adénilate (AAA), sous l'action d'une amino-acyl-ARNt ligase adénilate avec la consommation d'un ATP. Les résidus issus de cette première étape (AAA) ont une affinité pour une autre enzyme : une phosphatase synthétase. Cette dernière comprend de site actif, sur le premier vont se fixer les AAA par une liaison thioester. Les AAA, en présence d'ATP, vont être transférés vers le second site de la phosphatase synthétase, qui contient un groupement thiol. En fin de ce transfert les AAA redeviennent des AA fixés sur l'enzyme. Le premier site de l'enzyme se trouve ainsi libéré, et peut recevoir un autre AAA, chaque AA va se lier, par des liaisons peptidiques, à l'AA arrivant donnant naissance à la fin à un peptaïbol (Mouhamed-benkada.M. et al, 2003).

II. 2.5. Mode d'action

Les peptaïbols, semblent être un moyen de défense et de compétition pour les ressources nutritives. Par leur bio activité, les peptaïbols contribuent à la survie et au dynamisme des organismes producteurs. Dans certaines conditions, ils sont capables d'inhiber la croissance d'autres organismes contigus, et protègent les spores de la consommation animale (Moss, 1986 ; Oren et Shai, 1998 ; Weber et Marahiel, 2001 ; Marahiel et al, 2003).

Les activités biologiques principales de ces peptides sont les suivantes :

II. 2.5.1. Activité antibactérienne

Les propriétés antibactériennes de peptaïbols ont été principalement démontrées sur les bactéries à Gram positif et dans une moindre mesure sur les bactéries à Gram négatif (Rebuffat et al., 1999 ; Szekeres et al., 2005 ; Xiao-Yan et al., 2006).

De nombreux tests ont également été conduits sur différents genres de molécules, bactéries parasites dépourvues de paroi pour lesquelles très peu d'antibiotiques efficaces sont connus (Rebuffat et al., 1995 ; Beven et Wroblewski ;1997 ; Duval et al., 1997 ; Leclerc et al., 2001). Ces tests, réalisés dans des conditions de manipulation identiques, ont permis une comparaison entre les différents peptaibols testés. Une activité similaire a ainsi été observée pour les longobrachines LGA IV, LGB II et LGB III, la trichorzine PA VI et l'alméthicine F50, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises dans une même gamme de valeurs (0.56 à 12.5 μM) (Leclerc et al., 2001). L'activité bactéricide observée est essentiellement due à la perméabilisation de la membrane plasmique. En comparaison, l'activité des molécules à courte séquence (harzianines HK VI et HC IX) est un peu plus faible (CMI = 12.5 à 50 μM) (Rebuffat et al., 2000).

II. 2.5.2. Activité antivirale

L'activité des antivirales des peptaibols a été reportée pour la première fois par Yun et al. (2000). Dans une perspective de recherche d'agent antiviraux permettant de lutter contre le virus de la mosaïque du tabac, ces auteurs isolèrent les peptaivirines A et B, présentant une activité antivirale élevée pour des concentrations de l'ordre de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

II. 2.5.3. Activité antiprotozoaire

L'activité antiprotozoaire des peptaibols a été reportée pour la première fois pour l'antiamoebine, peptaibol à 16 résidus isolé d'une souche d'*Emericellopsis poonesis* (Thirumalachar, 1968).

Cette activité a également été mise en évidence pour des peptaibols à longue séquence, les trichorzianines A et B (El hajji et al. 1989). Ces composés inhibent la croissance de l'amibe *Dictyostelium discoideum*. La modification de perméabilité membranaire par les peptaibols aboutit à la lyse des cellules. La trichorzianine B, incluant un Glu18, présente une activité quatre fois plus.

II. 2.5.4. Activités antifongique

L'action inhibitrice des peptaibols a été mise en évidence sur la croissance de nombreuses espèces fongiques et de levures (Szekeres et al. 2005). Grigoriev et al. (2003) ont ainsi montré que l'activité biologique de quatorze peptaibiotiques naturels sur la souche fongique *Phoma* destructive a été positivement corrélée aux capacités membranaires de ces peptides. Les molécules à longue séquence, dont l'activité membranaire est élevée, entraînent une inhibition de la croissance du champignon, alors que les molécules à courte séquence induisent seulement la formation de pigments.

D'autre part, une synergie d'action a été démontrée entre les enzymes hydrolytiques et les trichorzianines, synthétisées en parallèle par une souche de *Trichoderma harzianum* utilisée comme agent de lutte biologique (Schimbock et al, 1994). Cette interaction pourrait avoir un rôle important dans le mécanisme d'action antagoniste de ce micromycète à l'encontre des champignons phytopathogènes (Lorito et al, 1996).

II. 3. La fermentation liquide

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

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

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

III. Matériels et méthodes

Le présent travail porte sur la recherche des peptaïbols dans des extraits de fermentation de *Trichoderma harzianum* 127a. Ce travail a été étalé sur plusieurs axes de recherche :

- i. Sélection d'un milieu adéquat pour la fermentation
- ii. Fermentation sur milieu liquide suivie par extraction des métabolites secondaire
- iii. Recherche des peptaïbols dans les extraits obtenus

Les essais ont été conduits au niveau du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM)) et le Laboratoire de Biochimie, de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université des frères Mentouri Constantine 1.

1. Matériel

1.1. Souche fongique

La souche *Trichoderma harzianum* 127a utilisés dans cette étude nous a été gracieusement fournie par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM). Cette dernière nous a été transmis sous forme liquide (conserver dans des tubes contenant le milieu PDA liquide et du Glycérol à une température -20°C).

1.2. Milieux de culture (Annexe)

Pour toutes les manipulations réalisées, l'eau utilisée est de l'eau distillée, et tous les milieux autoclavés pendant 20 minutes à 121°C avant leurs utilisations.

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés en vue d'optimiser le procédé de fermentation pour l'isolat de *Trichoderma*, en l'occurrence, le milieu PDA, le milieu KM (Kohlmeyer Medium), le milieu Sab (Sabauraud), et le milieu Czp (Czapeck-Dox).

1.2.1. Le milieu PDA

Le milieu gélose dextrose à la pomme de terre (en abrégé PDA, pour Potato Dextrose Agar) est le milieu usuel de culture pour la plupart des champignons.

Le PDA a été préparé à partir d'un mélange de pommes de terre lavées et découpées en petits morceaux et d'eau distillée. Le mélange est mis à ébullition au Bain-Marie et la bouillie obtenue est filtrée. L'agar et le glucose sont ajoutés et la quantité d'eau est complétée jusqu'à 1000 ml (Ronald et Atlas, 1997).

1.2.2. Les milieux Sabouraud, KM et Czapek dox

La préparation de ces milieux, consiste à dissoudre les différents ingrédients dans 1000 ml d'eau distillée.

La stérilisation de tous les milieux a été faite à une température de 120°C pendant 20 minutes.

2. Méthodes

2.1. Réactivation de *Trichoderma harzianum* 127a

La réactivation de *T. harzianum*127a a été effectuée à partir d'une culture pure sous forme liquide initialement congelée. Cette dernière est décongelée dans l'étuve à une température de 30°C.

0,1 ml de la suspension a été étalée de manière uniforme sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. La manipulation se fait dans la zone de sécurité du bec Bunsen. Les boîtes sont ensuite incubées au terme de 7 jours à 30°C (Figure5).

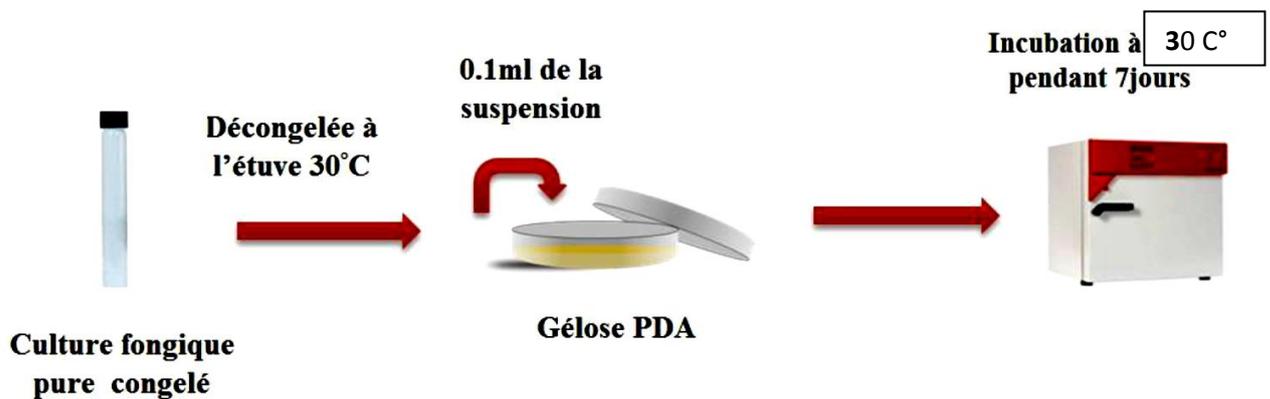


Figure5 : Schéma de la réactivation des souches fongique.

2.2. Repiquage de *T. harzianum* 127a

Le repiquage de la souche à partir des boîtes issues de la réactivation, est fait dans l'objectif de garder les souches active et mature. La technique consiste à prélever une petite bouture mycélienne à la marge du thalle et à repiquer sous forme d'un disque à l'aide d'une pipette de pasteur stérile et de la transféré dans de nouvelle boîte de Pétri contenant du milieu PDA.

La manipulation se fait dans la zone de sécurité du bec Bunsen. Les boîtes sont mises en incubation dans l'étuve à température de 25°C pendant 5 à 7 jours.

2.3. Confirmation d'identification

L'identification des champignons, fait essentiellement appel aux caractères culturels et morphologiques des moisissures isolées à l'état pure (Botton et *al.*, 1990).

2.3.1. Identification macroscopique

L'identification se fait à l'œil nue, elle se base essentiellement sur la vitesse de croissance de la souche, aspect du mycélium, couleur de la partie aérienne de la colonie, couleur de la partie de la colonie en contact avec le milieu (revers).

2.3.2. Identification microscopique

L'observation microscopique a été réalisée selon la technique de drapeau, qui consiste à prélever un petit fragment mycélien avec du ruban adhésif et le déposer sur une lame contenant une goutte d'eau distillée stérile sous microscope optique à l'objectif X 40.

2.4. Conservation de la souche

A la fin des différentes manipulations la souche a été de nouveau conservée. La méthode de conservation la plus communément utilisée, consiste à repiquer la souche en tubes sur milieu PDA liquide additionné d'une quantité de Glycérol, les cultures sont maintenues pendant 7 jours à 30°C, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leurs viabilités et limiter les possibilités des variations (Botton et *al.*, 1990).

2.5. Sélection d'un milieu de culture optimum pour la production des métabolites secondaire

L'optimisation des procédés microbiologique passe principalement par la sélection de milieux simple et économiques ainsi qu'une technique de culture optimale (Pavlovicova, 1998).

Pour la sélection d'un milieu de culture adéquat pour une bonne fermentation quatre milieux culturels ont été testés : le milieu PDA, milieu KM, milieu Czapek-Dox et milieu Sabouraud. La mise en culture de *Trichoderma harzianum* se fait par repiquage d'un fragment de *T.*

harzianum au centre des boites de pétri coulée préalablement par l'un des milieux de culture cité précédemment. Deux répétitions sont faite pour chaque milieu de culture testé.

L'évolution de la croissance mycélienne est estimée par la mesure des diamètres des colonies toutes les 24 heures, durant 7 jours.

2.6. La fermentation

La souche de *T. harzianum* 127a a été cultivée pendant 15 jours à 30°C en boite de Pétri contenant le milieu PDA. Après la période d'incubation, des disques d'environ 6 mm ont été faite sur la surface des boite de Pétri contenant la souche en question. Un aliquote de 10 mL d'eau distillé stérile et Tween 80 est ajouté au boite de Pétri. Cet émulsifiant favorise le mouillage des phialospores, pour mieux les décrocher des hyphes mycéliens Le mycélium est ensuite raclé à l'aide d'une spatule stérile jusqu'à sa libération totale. La suspension obtenue est filtrée. Après filtration sur gaze, les spores sont dénombrées dans les filtrats (par comptage sur cellule de Malassez) et la concentration est ajusté à 10^5 UFC/mL à l'aide d'une (Niranjana et al. 2009). 1 ml de la suspension est ensuite introduit dans un Erlen Mayer, contenant 200 ml de milieu KM et incubée sous agitation à 80 rpm, à 30°C pendant 21 jours (Mohamed-Benkada, 2006).

2.7. Extraction des métabolites

Après 21 jours d'incubation, la faible biomasse formée a été éliminée en filtrant le milieu KM à travers du papier filtre type Wattman N° 01 (Figure6).

Le filtrat obtenu a été additionné à un volume égal de chloroforme, le mélange a été rigoureusement agité pendant 10 min puis laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation (Figure6). Cette opération a été répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation.



Figure6 : Extraction des métabolites secondaires.

La phase chloroformique a été concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rota vapeur dans des ballons à fond conique de 50 ml baignant dans un bain marie à 45°C (Figure7). Une fois sec, l'extrait a été remis en suspension dans 500µl de méthanol et placé dans un flacon en verre parafilmé pour l'analyse CCM (Gengan et *al.* 1999).



Figure7: Evaporation sous vide a l'aide d'un rota vapeur.

2.8. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines et leur identification avec une bonne précision. Elle a été faite sur une plaque CCM (20 x 20 cm x 0,20 mm de gel de silice) sur laquelle sont déposés un spot de 0.4 mg et un autre de 0.5 mg de chaque extrait chloroformique concentré. La plaque a été ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'éluion constitué de chloroforme et méthanol de volume (70/30 v/v) respectivement (Figure8) (Mohamed-Benkada, 2006).

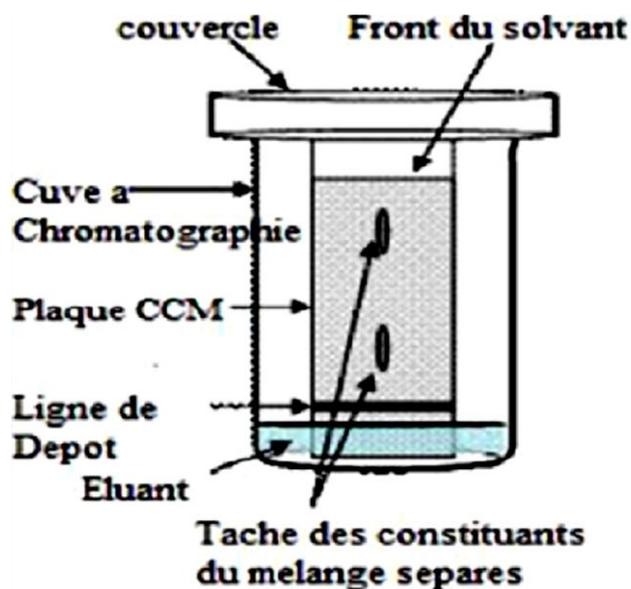


Figure 8: Schéma représente la chromatographie sur CCM.

2.9. Révélation des peptaïbols

Après migration, La plaque développée est séchée dans une étuve à 100°C pendant 15 min, puis pulvérisée du réactif 1, sans excès. Après un nouveau séchage de 10 min, une légère pulvérisation de la plaque avec le réactif 2 suffit pour mettre en évidence la présence de peptaïbols sous forme de taches d'abord vertes, puis bleues vertes et enfin noires durant quelques heures.

Le réactif peut être conservé un mois à température ambiante et à l'abri de la lumière (Von Arx, et *al.*, 1976 ; Brückner et *al.*, 1983 ; 1985 ; Landreau, 2001).

Composition du révélateur au TDM (4,4' tétraméthyl-diamino-diphényl méthane, réactif usuel des peptaïbols)

- Réactif 1 solution d'hypochlorite de sodium à 13% de chlore actif.
- Réactif 2 : solutions A (60 ml) + B (100 ml) puis ajout de 1,5 ml de la solution C.
 - Solution A : 2,5 g de 4, 4' tétraméthyl-diamino-diphényl méthane dans 10 ml d'acide acétique glacial, le tout dilué dans 50 ml d'eau.
 - Solution B : 5 g d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau.
 - Solution C : 0,3 g de ninhydrine dans 90 ml d'eau et ajout de 10 ml d'acide acétique glacial

IV. résultats et discussion

1. Résultats

Le présent travail a porté sur la recherche des peptaïbols dans des extraits de fermentation de la souche *Trichoderma harzianum* 127a.

1.1. Réactivation de *T. harzianum* 127a

La réactivation de la souche sur gélose PDA, à partir d'une culture pure initialement congelée, a donné le résultat suivant (Figure9):



Figure 9: Souche *T. harzianum* 127a de réactivée sur milieu PDA (Almi.H).

1.2. Repiquage de *T. harzianum* 127a

Le repiquage de la souche a pour objectif de garder la culture jeune. Les résultats obtenues sont illustrés dans la (figure10).

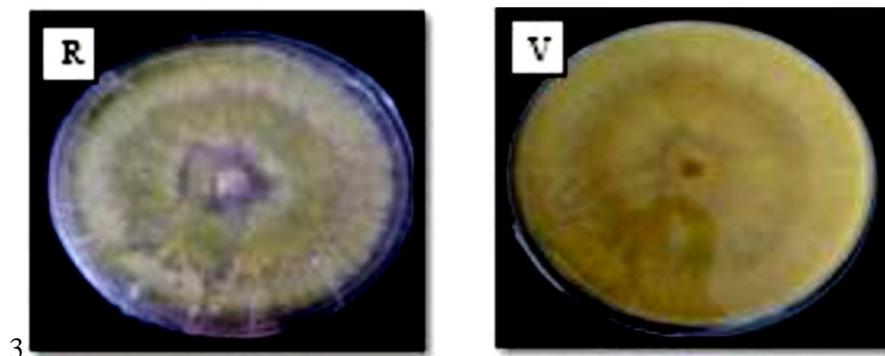


Figure 10: Aspect de la souche *T. harzianum* 127a sur milieu PDA après repiquage (Almi.H).

1.3. Confirmation de l'identification

La souche *T. harzianum* 127a, repiquée sur milieu PDA a montré une croissance rapide et extensive avec un aspect laineux de couleur blanche au départ, puis verte avec le temps. L'observation microscopique du *T. harzianum*, a révélée des conidies unicellulaires globuleuses, phialides en forme de quille, verticillées sur des conidiophores ramifiés à angle droit sur branches latérale ces différents critères se rapprochent énormément de ceux qui ont été cité par Chabasse (2002) (Figure11).

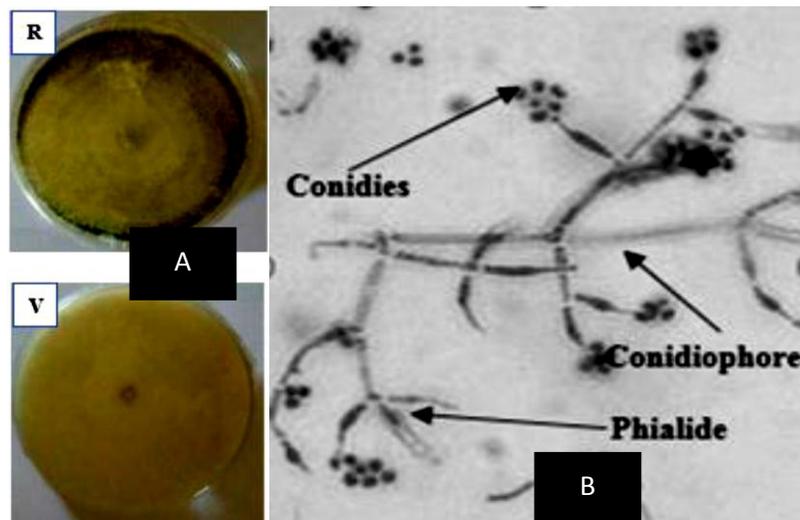


Figure11 : Observation macroscopique (A) et microscopique (B) de *T. harzianum* 127a (Almi.H).

1.4. Sélection d'un milieu de culture optimum pour la production des métabolites secondaire

La sélection du milieu de culture adéquat pour la production de la biomasse a une quantité élevée a été effectuée dans des boites de Pétri contenant des milieux de culture conçus pour la croissance fongique. L'analyse des résultats après sept jours d'incubation à 30°C a montré, une importante croissance sur les milieux Sabouraud et PDA et une moindre croissance avec les milieux KM et Czapek Dox (Figure12).

En effet, la croissance maximale a été observée sur le milieu Sabouraud et le milieu PDA où le diamètre des colonies a été maximal (86mm environ) après trois jours d'incubation, par contre, la croissance minimale a été relevée pour les milieux KM et Czapek Dox avec une croissance maximale moyenne d'environ 38 mm.

Résultats et discussion

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

Les résultats obtenus nous permis de constater, que le meilleur milieu pour la production des métabolites secondaires et le milieu KM.

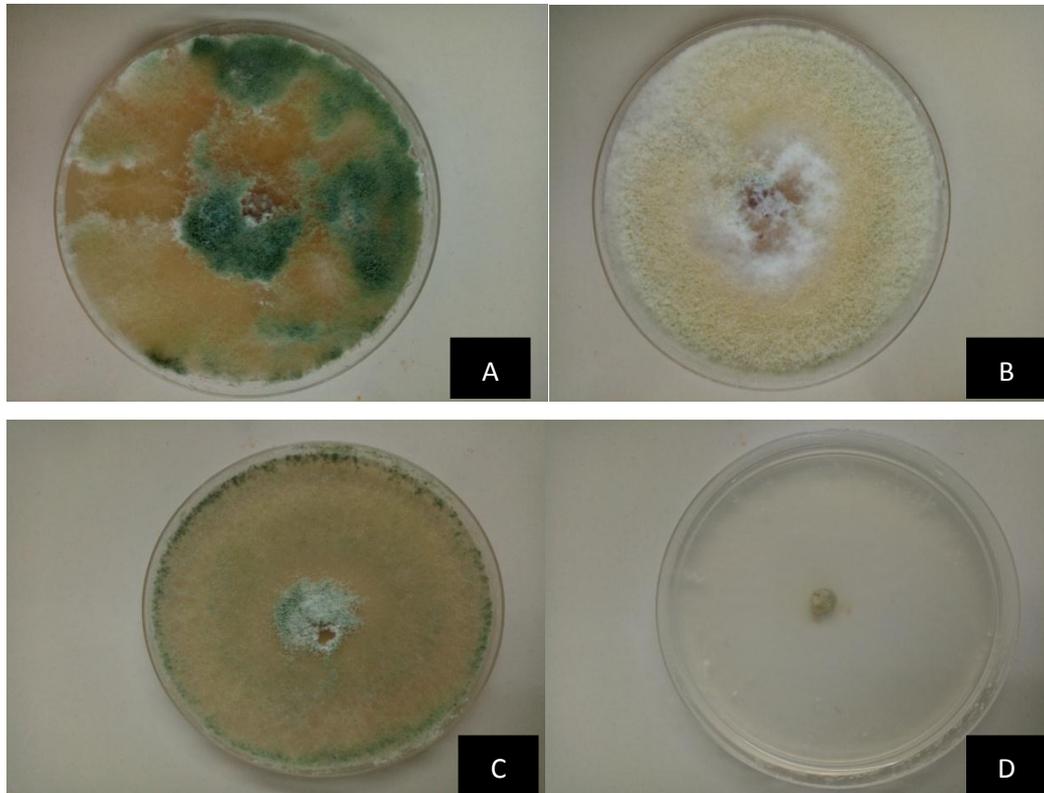


Figure12 : Aspect macroscopique de *Trichoderma harzianum* 127 a sur différents milieux à 30 °C : (A) milieu PDA, (B) milieu Sabouraud, (C) milieu Czapack Dox, (D) milieu KM.

Les résultats obtenus nous permis de constater, que le meilleur milieu pour la production des métabolites secondaires et le milieu KM.

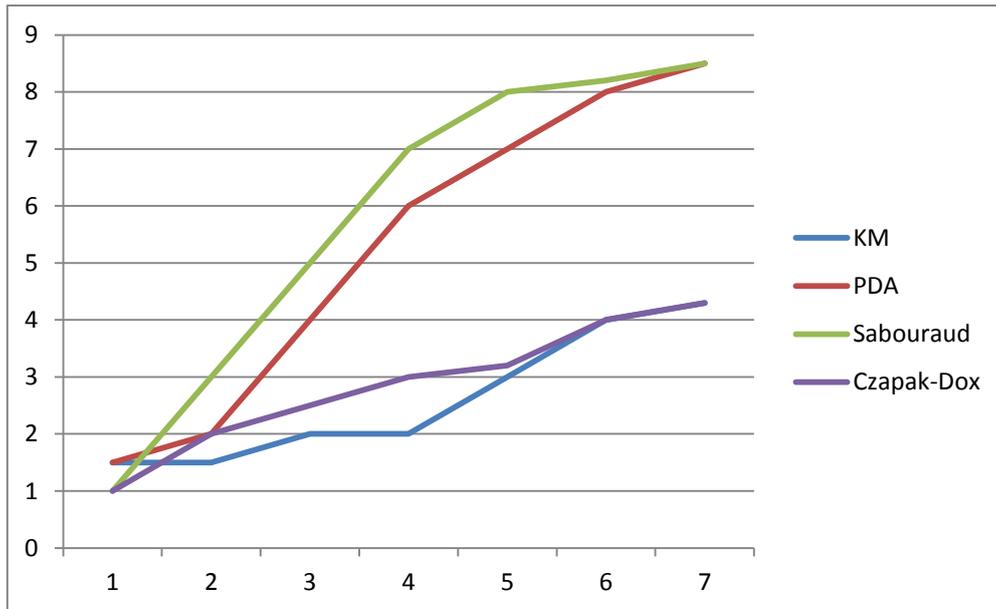


Figure 13: Evaluation de la croissance mycélienne de *T. harzianum* 127a sur les cinq milieux de culture : PDA, Sabouraud, Czapek-dox et KM.

1.5. Fermentation et extraction

Pendant 21 jours d'incubation sur plaque sous agitation, les Erlens ont été contrôlés hebdomadairement pour confirmer l'absence de contamination par d'autres espèces fongiques. A la fin d'incubation, le milieu a pris une coloration jaunâtre indication de la production des métabolites secondaire. Par ailleurs, nous avons constaté une absence d'une masse mycélienne (Figure14).



Figure 14: Résultats de fermentation liquide avant et après incubation.

L'extraction des métabolites secondaires a été réalisée à l'aide du Chloroforme. Le résultat de l'extrait concentré obtenu après passage au rotavapeur est illustré dans la figure suivante :

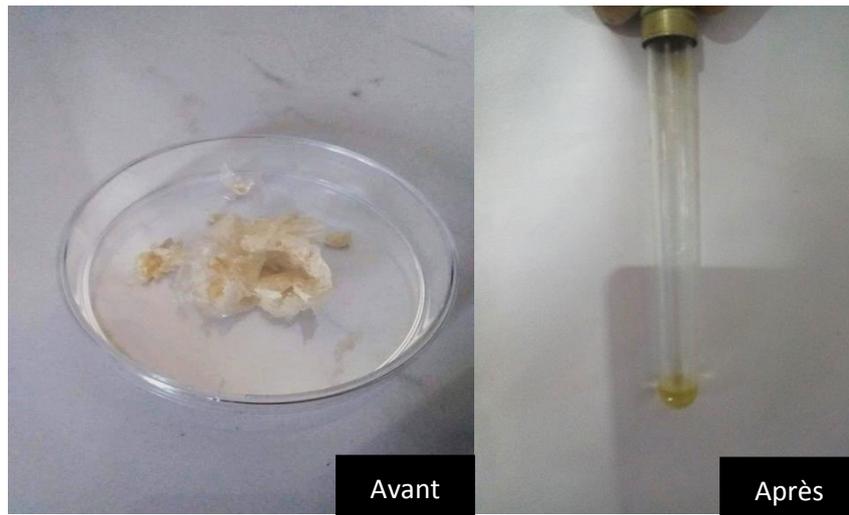


Figure 15 : Extrait de métabolites secondaires avant et après dilution dans le Chloroforme.

1.6. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince de l'extrait de *Trichoderma harzianum* 127 a a permis de révéler la présence de peptaïbols, apparus sous formes de tache colorée en vert olive clair et un $R_f=0,11$ (Figure 16).



Figure 16: Résultats de révélation des peptaïbols par CCM.

2. Discussion

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

Les peptaïbols figurent parmi la liste des antibiotiques produits par voie biologique (Principalement à partir des souches de *Trichoderma harzianum*) les plus efficaces en lutte contre une multitude de pathogènes. De ce fait, notre travail a porté globalement sur les points suivants:

- i. Production en Erlen des métabolites secondaires de *Trichoderma harzianum* 127a ;
- ii. Révélation des peptaïbols dans l'extrait de ces métabolites par le biais de la CCM.

Pour la réalisation de des différentes expérimentations, quatre milieux de culture : PDA, Sabouraud, Czapeck Dox et KM. Ces milieux sont utilisés sous la forme solide afin d'obtenir des colonies distinctes les unes des autres (Davet et Rouxel, 1997). En effet, les milieux PDA, Sabouraud et Czapeck Dox, sont des milieux standards conçus pour la culture d'un large spectre de mycètes. Ces milieux sont décrits par plusieurs auteurs (Moreau, 1991 ; Samson *et al.*, 2000 ; Leontopoulos *et al.*, 2002 ; Lund *et al.*, 2002), leurs compositions est simple et riche en matière glucidique (Chabasse *et al.*, 1999). Par contre, le milieu KM, est un milieu pauvre en éléments glucidique ce qui lui confère une approche nutritive d'un environnement défavorable. De ce fait, ce milieu de culture est conseillé pour la production des métabolites secondaires et notamment les peptaïbols (Mohamed-Benkhadra, 2006).

Par ailleurs, les résultats de la sélection d'un milieu de culture adéquat pour la fermentation, ont montrés un bon développement de la souche de *Trichoderma harzianum* sur la majorité des milieux de culture. Cependant, la croissance mycélienne a été plus rapide sur les milieux PDA et Sabouraud suivie par les milieux Czapek-dox et KM.

Résultats et discussion

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

Pour produire les métabolites secondaires et en particulier les peptaïbols, *Trichoderma harzianum* 127a a été cultivé sur milieu liquide pauvre en source de carbone et d'énergie : le milieu KM et ceci pour l'orienté directement vers la production.

Après une extraction par le chloroforme l'extrait actif a été soumis à une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).

L'application de l'extrait sur le gel de silice (CCM) a révélé une tache verte olive clair, dont les peptaïbols caractérisés par un Rf de 0,11. L'absence du virage de la couleur vers le noir et due à l'absence de réactif 4, 4' tétraméthyl-diamino-diphényl méthane. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Mohamed-Benkada(2006).

V. conclusion

L'objectif principal de ce travail a été la recherche des peptaïbols dans des extraits issus de fermentation liquide d'une souche de *Trichoderma harzianum*.

Dans ce cadre, nous avons tout d'abord sélectionné un milieu de culture adéquat pour la production optimale des peptaïbols. Ensuite, la technique de fermentation et plus exactement une fermentation liquide a été choisie pour avoir les métabolites secondaires. Enfin, après extraction et concentration de l'extrait, la méthode CCM a été le choix pour détecter ou non la présence des peptaïbols.

Les résultats de réactivation et repiquage de la souche *T. harzianum 127a* obtenus, montrent que la souche représente toujours les mêmes caractéristiques macroscopique et microscopique spécifique à cette espèce.

Par ailleurs, pour la sélection d'un milieu de culture optimal pour la production des métabolites secondaires et notamment les peptaïbols, quatre milieux ont été testés sur boîte de Pétri, en l'occurrence : le milieu PDA, le milieu Sabouraud, le milieu Czapek-dox et le milieu KM. Les résultats de mesure des différents diamètres de croissance sur un intervalle de sept jours, ont révélé une croissance très importante pour les deux premiers milieux et moins importante dans les derniers. De ce fait, on a conclu que le milieu KM est le milieu optimal pour la production des peptaïbols.

Après 21 jours de fermentation sous conditions contrôlées de température et agitation, un virage de la couleur de milieu KM a suffi pour confirmer la production de métabolite secondaire.

Aussi, l'extraction et concentration des métabolites a permis l'obtention d'une poudre coulée sur la paroi du ballon de rota vapeur. Après dilution dans le chloroforme un extrait visqueux de couleur jaunâtre a été obtenu. Cet extrait a servi pour la visualisation des peptaïbols par CCM.

La révélation des peptaïbols sur plaque CCM après séchage de la plaque a été effectuée par le biais du révélateur 4, 4' tétraméthyl-diamino-diphényl méthane. Les résultats obtenus ont confirmé la présence des peptaïbols dans l'extrait apparu sous forme d'une tache verte.

Enfin cette étude qui a été menée et finalisée malgré toutes les difficultés rencontrées, n'est pas une fin en soi, mais une modeste approche à la connaissance des nombreux problèmes, aussi

nous souhaiterions que ce travail soit un exemple pour d'autres études similaires, pour cela, plusieurs perspectives sont liées à ce travail, en l'occurrence :

- i. Refaire la production en fermentation solide pour avoir plus de métabolites ;
- ii. Complétez le révélateur pour mieux visualiser les peptaïbols ;
- iii. Séparez et identifier les peptaïbols par des technique plus précises et plus juste tels que l'HPLC, l'RMN.....etc.

Résumé

Résumé

Les caractéristique macroscopique et microscopique décrits dans les différents référence, ont été observés de nouveau après réactivation et repiquage de la souche *Trichoderma harzianum 127a*. Aussi, les différents milieux microbiologique (PDA, Sabouraux, Czapek dox et KM) choisis et utiliser pour la sélection d'un milieu de culture adéquat pour la fermentation, on permit à *T.harzianum 127a* de se croitre quoique, la croissance été maximale pour le milieu PDA et Sabouraux sont meilleurs pour développement de la biomasse ; tandis que, les milieux Czapek dox et KM sont plus performant pour la production des métabolites secondaire. Par ailleurs, les résultats de fermentation extraction et concentration au rota vapeur nous ont donne une poudre blanchâtre devenue jaune après dilution avec le chloroforme. La révélation des peptaïbols avec chromatographie sur couche mince (CCM) avec le révélateur au TDM (4,4' tétraméthyl-diamino-diphényl méthane, réactif usuel des peptaïbols), a permis de confirmé la présence des peptaïbols sous forme de tâche verte à un RF de 0,11.

Mots clés : peptaïbols, *Trichoderma harzianum*, Fermentation.

Abstract

The macroscopic and microscopic characteristics described in the various references were observed again after reactivation and transplanting of the strain *Trichoderma harzianum* 127a. Also, the different microbiological environments (PDA, Sabouraux, Czapek dox and KM) chosen and used for the selection of a culture medium suitable for fermentation, allowed *T.harzianum* 127a to grow although, the growth was maximum for PDA and Sabouraux are better for biomass development; while, Czapek dox and KM mediums are more efficient for the production of secondary metabolites. On the other hand, the results of fermentation extraction and concentration with steam rota gave us a whitish powder which became yellow after dilution with chloroform. The revelation of peptaiboles with thin layer chromatography (TLC) with TDM (4,4'-tetramethyldiamino-diphenylmethane, usual peptaibol reagent) confirms the presence of peptaibols in the form of a green spot at an RF of 0.11.

Keywords : peptaibols, *Trichoderma harzianum*, fermentation.

الملخص

وقد لوحظت الخصائص المجهرية والمجهريّة الموصوفة في المراجع المختلفة مرة أخرى بعد إعادة تنشيط وزرع سلالة *Trichoderma harzianum* 127a. أيضًا، تم اختيار البيئات الميكروبيولوجية المختلفة (PDA و Sabouraux و Czapek dox و KM) واستخدامها لاختيار وسيط ثقافي مناسب للتخمير، مما سمح لـ *T.harzianum* 127a بالنمو على الرغم من أن النمو كان الحد الأقصى لـ PDA و Sabouraux أفضل تطوير الكتلة الحيوية. بينما، تعد وسائط Czapek dox و KM أكثر فعالية لإنتاج المستقلبات الثانوية. من ناحية أخرى، أعطتنا نتائج استخراج التخمير والتركيز مع روتا البخار مسحوقًا أبيضًا أصبح أصفرًا بعد التخفيف باستخدام الكلوروفورم. يؤكد الكشف عن بيتيول مع كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) مع 4،TDM 4، رباعي ميثيل ألديامينو-ثنائي فينيل ميثان، كاشف بيتيول المعتاد) وجود بيتيول على شكل بقعة خضراء عند RF من 0.11.

الكلمات الرئيسية : بيتيول، التخمير، *Trichoderma harzianum*

Référence bibliographie

ARX, E.V. ; FAUPEL, M. & BRUGGER, M. Das 4,4'-Tetramethyldiamino-Diphenylmethan reagens (TDM) eine modifikation der Chlor-o-tolidin Farbereaktion für die Dünnschichtchromatographie. *J. Chromatogr. A*, 1976, 120 (1) : 224-228.

BECKER, D. ; KIESS, M. & BRÜCKNER, H. Structures of peptaibol antibiotics hypomurocin A et B from the ascomycetous fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto. *Liebigs Ann-Rech*, 1997, 767-772.

Benhamou N and Chet I. (1997). Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol* p: 2095–2099.

Bozzini A. , (1988). Origin, distribution, and production of durum wheat in the world. In: Fabiani G. et Lintas C. (éd). *Durum: Chemistry and Technology*. AACC (American Association of Cereal Chemists) , Inc. St. Paul, Minnesota, États-Unis. pp 1-16.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. (a) *Can. J. Bot.*, 1991, 69 : 2373-2417.

BRÜCKNER, H. & PRZYBYLSKI, M. Methods for the rapid detection, isolation and sequence determination of "peptaibols" and other Aib-containing peptides of fungal origin. (b) *Chromatographia*, 1984, 19 : 188-199.

BRÜCKNER, H. & JUNG, G. Identification of N-acetyl-_-aminoisobutyric acid after selective trifluoroacetylation of Alamethicin and related peptide antibiotics.

Chromatographia, 1980, 13 (3) : 170-174

Bissett J .,1991. A revision of the genus *Trichoderma* .I.section longibrachiatum sect . Nov. Can .J.Bot, 69 : 2373-2419.

CAFISO, D.S. Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions. Annu. Rev. Biophys. Struct., 1994, 23 : 141-165.

Corbaz R. 1990. Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes . 650 . presses polytechniques universitaires,Paris (FR).

Chabasse D., Bouchara J.P., de Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P., 2002. Les Champignons d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Cahier de Formation Bioforma, Edition Bioforma Paris, 25: 26 - 45.

Cournut, B.,(1984). Le genre *Trichoderma hyphomycètes*. Th : Pharmacie : Marseille : 77 p.

Camporta P.,(1985). Antagonisme in vitro de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Agronomie 5(7) : 613-620.

COURNUT, B. Le genre *Trichoderma hyphomycètes*. Th. : Pharmacie : Marseille : 1984 ; 77 p.

Daami- Remadi M., El Mahjoub M. (2001). Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. Ann. l'INRAT 74, p:167–186

Denis C and Webster I. (1971). « Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* (II) production of volatile antibiotic. *Trans.Br. Mycol* p:41-48 .

Dubos B. (1985). L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* (Pers. Ex. fr.) pouzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botritis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, p:35-49. INRA, Paris (FR).

DEMAIN, A.L. & FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng., Biotechnol.*, 2000, 69 : 1-39

EL HAJJI, M. ; REBUFFAT, S. ; LECOMMANDEUR, D. & BODO, B.

Isolation and sequence determination of trichorzianines A antifungal peptides from *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1987, 29 : 207-215.

FRISVAD, J.C. & FILTENBORG, O. Classification of Terverticillate penicillia based of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *App. Environ. Micorb.*, 1983, 46 (6) : 1301-1310.

GRIGORIEV, P.A. ; SCHLEGEL, B. ; KRONEN, M. ; BERG, A. ; HÄRTL, A. & GRÄFE, U. Differences in membrane pore formation by peptaibols. *J. Pept. Sci.* [en ligne]. 2003, Vol. 9 (11-12) , [réf. du 5 novembre 2003], p. 763-768. Disponible sur : <http://www.interscience.wiley.com>

GOULARD, C. ; HLIMI, S. ; REBUFFAT, S. & BODO, B. Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum* I. Fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, 1995, 48 (11) :1248-1253.

GRONDONA, I. ; HERMOSA, R. ; TEJADA, M. ; GOMIS, M.D. ; MATEOS, P. S. ; BRIDGE, P. D. ; MONTE, E. & GARCIA-ACHA, I. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *App. Environ. Microb.*, 1997, 63 (8) : 3189-3198

Gams, W . et Bissett, j. Morphology and identification of *Trichoderma* sp . *Trichoderma & Gliocladium*, Volume 1 : Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Londres : Kubicek,C.P.; Haman, G.E.& Ondik,KL.,CRC Press, 1998, 3-14.

Herman L., Verbeken A and Daeseleire E. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates.*Mycotox. Res.* p: 1-11.

Hmi., Rebuffat G., Goulard C Duchamp S., BOBO B.;1995Trichorzins HA et MA Antibiotic peptide from *Trichoderma harzianum* il sequence determination *J., Antibiot .*, 48 (11) , 1254- 1261.

Kubicek, C.P; Bissett, J.; Druzhinina, I., Kullining-Grzdinger, C. et Szakacs, G.,(2003).Genetic and métabolic diversity of *Trichoderma* sp.; a case study on south east asian isolates. *Fungal Genet. Biol.*, ,38 (3) : 310-319.

KUSSIN, T. & KRIPP, T. Detection of new peptaibol antibiotics (mycotoxins) in species and strains of the fungal genus *Trichoderma*. Chemistry and Biology, tenth American symposium (10 ; 1987 ; Saint Louis) (d) St. Louis (USA) : Peptides, 23-28 mai, 1987, XXIII, pp 650-652, 690 p.

Landreau, A.,(2002). Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii Oudemans* isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Th. : Pharmacie : Nantes. 201p.

Lorito; Roberta Marra; Brian W. Skelton et Emilio L. Ghisalberti.,(2009). Acide Harzianic, une antifongique croissance des végétaux et la promotion des métabolites de *Trichoderma harzianum*, J. Nat. Prod. , 72 (11), pp 2032-2035.

Lyrat, G. ; Joffin, J-N.,(1998).Microbiologie technique 2eme éd. Bordeaux :CRDP. ISBN 2_86617-334-1.P285-297. Chapitre 9.Champignons.

Mouhamed-benkada.M. , montagu M., biard J.F mondegur F. , Pouchus Y.F., 2003 .production des peptaibols par des souches marins de *Trichoderma sp* .J.de l'asphiète,2003

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

Pavlovicova, R. , 1998 secondry metabolites of the fungus Trichoderm .mycologia 53 .267-275.Goulard , C. ; Hlimi,S. ; Rebuffat , S . & Bodo, B. Trichorzins HA, and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum* . I . Fermentation , isolation and biological properties.j.Antibiot ., 1995,48 (11) : 1248- 1253 .

Rifai, 2004. le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* paris 55-56

Référence bibliographie

Roquebert, M.-F. , 1996 Interaction antagonists des *Trichoderma* sp. Dans les systèmes telluriques: systématique, biologie et écologie des organismes. Comptendu des 4 émes rencontres en toxinologie . paris, 13-15.

Samuels, G. J. ; Petrini, O. et Mangui, S., (1994). Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 86: 421-435.

Sivasithparam K. and Ghisalberti E.L., (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor and Francis. Lendon. UK.

Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widner, T., Samuels, G.L., Ismaiel, A., Begoude, A.D., M., Bateman, R., Fontem, D. and Hebbar, K.P. (2007) Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol. Control*, 43: 202–212.

Vining, L.C. 1990. Function of secondry metabolites annu. *Rev .microbiol .*,44 : 395-400

Widden P. and Abitbol J., (1980). Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia*, 72: 775-784.

Zhihe, C. ; Qingping , W; Miiflong , X. et al., (1998). Advance of biocontrol of *Trichoderma* and *Gliocladhan*. *J. Microbiol*, 25(5) : hyyyyy 284-286.

Site web :

Référence bibliographie

https://fr.wikipedia.org/wiki/Trichoderma_harzianum

<https://betterknowamicrobe.tumblr.com>

<https://agronomie.info/fr/trichoderma-harzianum/>

Annexe

❖ Milieu PDA (Ronald et Atlas, 1997) : pH 5.6

Composants	Quantités g/l
Pomme de terre	200
D-glucose	20
Agar	20

❖ Milieu Sabouraud

Composants	Quantités g/l
Glucose	20
Peptone	10
Agar	20

❖ Milieu Czapeck-Dox (Atrassi et al ., 2005) : pH 6.5

Composants	Quantités g/l
Sucrose	30
Extrait de levure	5
Na NO ₃	3
K ₂ HPO ₄	1
KCL	0.5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5
Fe SO ₄ . 7H ₂ O	0.01

❖ Milieu KM landreau (2002) pH 6.3

Composants	Quantités g/l
Glucose	10
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.4
NH ₄ NO ₃	2.4
Tampon Tri	1.21
Eau distillé stérile	1

Recherche des peptaïbols dans des extraits de fermentation de *Trichoderma harzianum* 127a.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie des Mycètes.

Les caractéristiques macroscopique et microscopique décrits dans les différents référence, ont été observés de nouveau après réactivation et repiquage de la souche *Trichoderma harzianum* 127a. Aussi, les différents milieux microbiologique (PDA, Sabouraux, Czapek dox et KM) choisis et utiliser pour la sélection d'un milieu de culture adéquat pour la fermentation, on permit à *T.harzianum* 127a de se croitre quoique, la croissance été maximale pour le milieu PDA et Sabouraux sont meilleurs pour développement de la biomasse ; tandis que, les milieux Czapek dox et KM sont plus performant pour la production des métabolites secondaire. Par ailleurs, les résultats de fermentation extraction et concentration au rota vapeur nous ont donné une poudre blanchâtre devenue jaune après dilution avec le chloroforme. La révélation des peptaïboles avec chromatographie sur couche mince (CCM) avec le révélateur au TDM (4,4' tétraméthylidiamino-diphényl méthane, réactif usuel des peptaïbols), a permis de confirmé la présence des peptaïbols sous forme de tâche verte à un RF de 0,11.

Mots clés : Peptaïbols, *Trichoderma harzianum*, fermentation.

Laboratoire de recherche : Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne à Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. DEHIMAT L. Pr. (Professeur - UMC Constantine 1).

Encadreur : Mme ALMI HIBA (MAB -UMC Constantine 1).

Examinatrice: M^{lle} ABDELAZIZ Wided (MCB- UMC Constantine 1).

Date de soutenance : 02/06/2019