



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية عاوم الطبيعة و الحياة

Département : biologie et écologie végétale

قسم: البيولوجيا وايكولوجيا النبات

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : biologie et génomique végétale

Intitulé :

**Culture et clonage d'un tissu de champignon de paris
(*Agaricus bisporus*)**

Présenté et soutenu par :

M^{elle} : KERFEZ Khaoula

Le : 16/06/2015

Mr : BRIK Oussama

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Pr. YKHLEF N.

Pr. Université F M Constantine.

Encadreur : Pr. DJEKOUN A.

Pr. Université F M Constantine.

Examineur : Dr. MAOUGAL R.T.

M.C.B. INATAA. Université F M Constantine.

Année universitaire

2014 – 2015

Remerciements

Tout d'abord, grâce à ALWWAHID qui nous a créé, nous a protégé, qui est toujours avec nous et qu'il ne nous laisse jamais seules.

Louanges à ALLAH.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos Remerciements les plus sincères et notre profond respect à Monsieur DJEKOUN.A professeur à l'Université des Frères Mentouri, Constantine, pour la confiance qu'il nous a témoigné en nous proposant ce sujet, et qui nous a donné la chance de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions. Qu'il trouve ici l'expression de toute notre reconnaissance, et notre respectueuse considération.

Nous exprimons notre gratitude et notre profonde reconnaissance à M^{elle} YKHELF.N, professeur à Université des Frères Mentouri, Constantine pour sa disponibilité, son soutien, mais aussi pour nous avoir accueilli, formé et dirigé, et qui a nous fait l'honneur de présider le jury.

Nos sincères Remerciements vont à Mme MAOUGAL R.T.Maitre de conférence à INATAA. qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail.

Nous sommes particulièrement reconnaissants à Mr BELBEKRI.N et Mme BOULDJADJ.R, ingénieurs au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales, pour leur soutien moral, technique, leur disponibilité et leur dynamisme.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma très chère mère Samia qui a toujours cru en moi, pour les sacrifices et tous les efforts qu'elle a fait pour moi, l'homme que je suis aujourd'hui. Que dieu la récompense pour tous ces bienfaits.

Ma chère Khaoula qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.

J'espère qu'elle trouve à travers ce travail l'expression de toute ma reconnaissance et mon amour

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mon très cher père Abd el aziz, et ma très chère mère Dalila qui ont toujours cru en moi, pour les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour faire de moi la femme que je suis aujourd'hui, j'espère qu'ils seront fiers de moi. Que dieu les récompense pour leurs bienfaits.

Mes frères : Islam, Ishak, Abd el rahim et mes sœurs : Selma, Chaima, Rima pour leur soutien, leur encouragement, leur affection et leur patience.

Mon meilleur ami Oussama qui a su être là pour moi quand j'en avais besoin.

Résumé

La culture des champignons est très bien adaptée à l'agriculture durable et a plusieurs avantages : Elle réutilise les déchets agricoles, donne une production élevée par surface cultivée et le substrat utilisé après la récolte fournit un excellent amendement du sol. Les champignons constituent un apport supplémentaire de protéines, de vitamines indispensables et de minéraux, enfin, elle procure des revenus non négligeables. L'Algérie est très riche d'un grand nombre d'espèces de champignons, parmi lesquelles certains sont comestibles et sont d'excellentes qualités.

L'objectif de ce travail est de favoriser à partir de la culture d'*Agaricus bisporus*, le développement du mycélium sur un substrat adéquat et stérile à base de grains de sorgho, blé dur, maïs, seigle et du riz. Le produit obtenu à l'issue de cette opération est appelé « blanc-mère » ou « blanc de semis » qui sera utilisé ultérieurement pour ensemercer le substrat de fructification qui est à base de fumier de cheval, marc de café, terreau, et de vermiculite. A partir des Kits de cultures, on a réalisé des cultures pures de mycélium sur milieu gélosé (PDA), qu'on a ensuite inoculé dans différents substrats de semis dans des conditions de stricte asepsie. Nous avons pu conclure d'après les résultats obtenus, que le substrat constitué de grains de sorgho et de seigle, a permis une meilleure conservation du mycélium, et que le terreau représente le meilleur support d'envahissement par rapport aux autres supports de fructification.

Mots clés : champignon, mycélium, *Agaricus bisporus*, substrats de colonisation, supports de fructification.

Summary:

The cultivation of mushrooms has many advantages, it does not require arable land, because they are grown on agricultural wastes processed into fertilizer and soil conditioners, fungi are an additional intake of protein, essential vitamins and minerals, finally, it provides significant revenues.

Algeria is very rich of a large number of species, among which some edible and excellent qualities.

The objective of this work is to succeed the cultivation of *Agaricusbisporus*, after having obtained the mycelium inoculated on the nutrient medium that will be transferred on different source of blanc, the success of culture will be completed after having selected the most suitable substrate.

We present the culture of a Kit, then using techniques inoculation on the Agar, and the transfer of the mycelium to cereals..

Key words: mushroom, mycelium, *Agarigusbisporus*, substrates for colonization, fruiting brackets.

الملخص:

تعتبر زراعة الفطر من أهم الزراعات المستدامة فهي تمتلك مزايا عديدة من بينها استخدام النفايات الزراعية ومساهمتها في تحسين الأوساط المعيشية كما يحتوي الفطر على مخزون معتبر من البروتينات و الفيتامينات كما اصبحت الدراسات أن الجزائر تتمتع بكمية كبيرة من أنواع الفطريات القابلة للأكل ذات الصفات الجيدة.

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو إنتاج الفطر الذي يتبين نجاحه من خلال الحصول على المشيحة الأم هذه الحبوب التي ستنقل إلى أوساط مختلفة كسماد الصناعي وحبوب القهوة بالإضافة المزروعة على بعض الحبوب سيمكننا من تحديد الأوساط الأكثر ملائمة إلى سماد الأحصنة والرمل النهري.

ابتداء من الفطر التجاري قمنا بزراع الأنسجة و الابواغ الجديدة على محلول مغذي و المشيحة المحصل عليها تم نقلها إلى مختلف الأوساط للإكثار من خلال النتائج المحصل عليها وجدنا أن حبوب السور قو أفضل ركيزة حبيبية للمشيحة الأم كما سجل السماد الصناعي نتائج معبرة فيما يخص الأوساط السمادية.

كلمات البحث: الفطر. المشيحة . الأوساط الحبيبية . الأوساط المثمرة .

Liste des figures

Figure 1 : Illustration des basidiomycètes.	9
Figure 2 : Le cycle de vie de champignon de paris.	14
Figure 3 : Les cycles génétiques d' <i>Agaricus bisporus</i>	15
Figure 4 : Morphologie d' <i>Agaricus bisporus</i>	17
Figure 5 :Le Kit de champignon de paris.	19
Figure 6 : L'étalement de terre de gobetage.	20
Figure 7 : L'incubation dans le phytotron.	20
Figure 8 :Préparation des boites de Pétri.	22
Figure 9 : Obtention de l'empreinte des spores.	22
Figure 10 : Inoculation des spores libres.	23
Figure 11 : Culture d'un tissu sur le milieu PDA.	24
Figure 12 : Incubation des boites de pétri dans l'étuve.	24
Figure 13 : les boites d'inoculation.	26
Figure 14 :Inoculation des spores en solution.	27
Figure 15 : Une culture liquide de mycelium.	28
Figure 16 : colonie de mycelium.	28
Figure 17 : Inoculation d'un morceade mycélium sur le substrat de Colonisation.	28
Figure 18 :L'ensemencement des bacs de substrats.	33
Figure 19 : L'évolution d' <i>Agaricus bisporus</i> sur le Kit.	36
Figure 20 : Développement des boutons.	37
Figure 21 : Récupération des spores libres.	38
Figure 22 : Observation microscopique des spores d' <i>Agaricus bisporus</i> au microscope. .	38
Figure 23 : mesure de l'envahissement mycélien sur le milieu PDA.	40
Figure 24 : La colonisation totale sur le milieu PDA.	40
Figure 25 : Les infections primaires.	41
Figure 26 :Envahissement total sur les grains du sorgho et du seigle.	42
Figure 27 :Envahissement sur le et du seigle.	42
Figure 28 : Croissance mycélienne sur les céréales (sorgho. seigle. blé. maïs.riz).	43
Figure 29 : Contamination des substrats de colonisation.	44

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification proposée par Fries (1821).....	6
Tableau 2 :Classification proposée par Whittaker (1969).....	6
Tableau 3 :Classification proposée par Lecointre et Le Guyader (2001)	7
Tableau 4 : Composés polaires issus du métabolisme primaire des basidiomycètes.....	11
Tableau 5 : Classifications de champignon de paris	13
Tableau 6 : Préparation des boites de céréales.....	25
Tableau 7 : Les composés du milieu liquide.....	27
Tableau 8 : Les distances polaires et équatoriales des spores d' <i>Agaricus bisporus</i>	39

Sommaire

Introduction générale	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUES	
I-La mycologie.....	3
1-Lerègnede Fungi.....	3
2-Les champignons	3
II-Ecologie des champignons	4
1-Comment senourrissentles champignons	5
2-Les champignons Saprophytes	5
III-Classification systématique des champignons	5
1-Classification morphologique	5
2-Classification morpho-anatomique	6
3-Classification phylogénétique actuelle	7
IV-Les basidiomycètes	8
1-La reproduction chezles basidiomycètes.....	8
2-Les composésorganiques des basidiomycètes.....	10
V-La culture des champignonnes comestibles.....	12
1-Classification de champignon de paris.....	12
2-Le cycle de vie de champignon de paris.....	13
3-La génétique chez <i>Agaricus bisporus</i>	14
4-La morphologie d' <i>Agaricus bisporus</i>	16
MATERIEL ET METHODES	
I-Matériel	18
1-Matériel fongique	18
2-Les substratsde colonisation	18
3-Les substratsde fructification	18
II-Méthodes.....	18
1-La culture de champignon deparisavecun Kit	19
2-La culturesur l'Agar	21
2.1-Préparation du milieu de culture	21
2.2-Récupération des spores	22

2.3-Observation microscopique des spores	23
2.4-Techniques d'inoculation de l'Agar	23
2.4.1-Inoculation des spores libres	23
2.4.2- Clonage d'un tissu	24
2.5-Mise en condition d'incubation	24
3-Les substrats de colonisation	25
3.1-Préparation du substrat de colonisation	25
3.2-Ensemencement des boites des céréales	26
3.2.1-Inoculation des spores en solution	26
3.2.2-Une culture liquide de mycélium	27
3.2.3-Clonage d'un morceau de gélose nutritive sur les céréales	28
3.3-Mise en condition d'inoculation	28
4-Les substrats de fructification	29
4.1-Les types des substrats	29
4.1.1-Le fumier de cheval	29
4.1.2-Marcs de café	30
4.1.3-La vermiculite	31
4.1.4- Le terreau	31
4.2-Traitements des substrats à la chaleur	31
4.2.1-La stérilisation	32
4.2.2-La pasteurisation	32
4.3-L'humidification	32
4.4-L'ensemencement	32
4.5-La croissance du mycélium pendant l'incubation	33
4.6-Le gobetage	33
4.7-La chute de température et la fructification	34
RESULTATS ET DISCUSSION	
I-L'obtention de tissu et des spores à partir d'un Kit	35
1-Etalement de terre de gobetage	35
2-Envahissement dans la terre de gobetage	35
3-Formation des boutons	36
4-Développement des boutons.....	37
5-La Sporulation	37

5.1-Morphologie des spores.....	38
II-Colonisation du milieu de culture PDA	39
1-Les infections primaires	41
III-La sélection d'un substrat de colonisation	41
1-Influence d'aération	42
2-Contamination des céréales	44
3-Les exigences des supports de fructification	45
4-Envahissement sur les substrats	45
5-Etalement de gobtage	45
IV-La fructification d' <i>agaricus bisporus</i>	45
Conclusion et perspectives	47
Références bibliographique	
Annexes	

Introduction générale

Introduction générale

La croissance démographique mondiale implique une augmentation de plus en plus importante de la consommation de viande, et par conséquent, une intensification de l'élevage et des besoins en protéines alimentaires. On s'accorde à penser que l'accroissement des productions de protéines d'origine végétale ne suffira pas à couvrir ces besoins et qu'il est nécessaire d'envisager les possibilités offertes par les protéines des microorganismes tels que les bactéries, les levures et les champignons. (Alexander *et al*, 2002).

Sous le vocable de "biotechnologie" sont rassemblées des techniques spécifiques "informées" par les progrès de la microbiologie, de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la génétique, du génie chimique et de l'informatique... Celles-ci ont en commun le fait qu'elles sont partie prenante dans un "procédé biotechnologique", c'est à dire la production à grande échelle d'un "produit d'intérêt" comme les champignons qui est susceptible d'être commercialisé (Amolds, 1991).

Des essais de culture de champignons ont été réalisés dans les temps anciens, mais ils ont souvent échoué parce que leur nature biologique n'était pas comprise. Les premiers documents sur le sujet mentionnent que le champignon «Oreille de Judée» est cultivé depuis 600 après J.-C. (FAO.2004)

La culture des champignons présente de nombreux avantages: elle n'exige pas de terre arable, puisqu'on les cultive sur des déchets agricoles transformés en engrais et conditionneurs de sol; de plus, les champignons constituent un apport supplémentaire de protéines, de vitamines indispensables et de minéraux; enfin, elle procure des revenus non négligeables (FAO, 2007).

La flore mycologique de l'Algérie est très riche d'un grand nombre d'espèces, parmi lesquelles certains sont comestibles et d'excellentes qualités, commercialisées depuis longtemps. Une cinquantaine d'espèces se trouvent sur le territoire algérien notamment au centre et au Nord-Ouest, dont trente sont très fréquemment rencontrées dans le bois, présentant les meilleures qualités organoleptiques.

L'unité ZACCAR à Oran est une société avec une capacité de production actuelle qui ne dépasse pas les 2 à 3 tonnes de champignons frais par trimestre. La culture du champignon a été introduite à Oran à l'époque coloniale par les Espagnols et les Français. Elle se pratiquait dans des grottes, des tunnels et autres galeries aux quartiers de "Ras El Ain", "Sanawbar" et "Sidi El Houari". Toutefois, la production ne subvenait pas aux besoins.

L'objectif de notre travail est de réussir une culture d'*Agaricus bisporus*, et essais des substrats. Après avoir obtenue un mycélium inoculé sur un milieu PDA qui sera transféré sur différentes sources de blanc, la réussite de la culture va dépendre de la sélection du substrat le plus adéquat.

Notre travail est effectué au niveau du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales (GBBV) à l'université des Frères Mentouri (UFC)

Ce mémoire est subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre représente une synthèse bibliographique qui porte sur les recherches faites dans ce domaine.

Le deuxième chapitre présente une description du matériel fongique, le matériel végétal, et les méthodes d'analyses suivies lors de cette expérimentation.

Le troisième chapitre comporte la partie des résultats obtenus dans notre étude et leur discussion.

Et enfin, le mémoire s'achève par une conclusion et des perspectives.

Revue bibliographique

I- La mycologie

La mycologie est une science relativement récente. Cependant les champignons sont apparus depuis le début de la vie sur terre il y a environ 4,5 milliards d'années et la plupart datent du Crétacé et du tertiaire, dont on peut voir les vestiges dans certains fossiles et surtout dans l'ambre (Bouchet *et al*, 1999). Les premiers fossiles ressemblant aux champignons actuels remontent au Silurien, soit environ 410 millions d'années. Certains Ascomycètes ont été reconnus du Carbonifère. On dénombre actuellement plus de 400 genres issus des fossiles trouvés sur notre planète. L'amadouvier *Fomes fomentarius* par exemple, était déjà connu au Mésolithique pour entretenir le feu à partir des étincelles du silex, c'est en quelque sorte l'ancêtre préhistorique du briquet (Ramirez ,1982).

1- Le règne de Fungi

Les champignons appartiennent au règne des Fungi, un groupe qui se distingue nettement des végétaux, des animaux et des bactéries. Il leur manque la caractéristique principale des végétaux : la capacité d'utiliser directement l'énergie du soleil grâce à la chlorophylle. Ils doivent donc assurer leur alimentation à partir d'autres organismes, en absorbant les substances nutritives du matériel organique dans lequel ils vivent. (Pomerleau, 1980).

L'organisme vivant des Fungi est un mycélium constitué d'un fin réseau de filaments appelés hyphes. Sous certaines conditions, les hyphes sexuellement compatibles fusionnent et forment des spores. Les structures les plus grandes (supérieures à 1 mm) produisant des spores sont appelées champignons. C'est la partie que l'on remarque le plus dans la nature, mais elle ne constitue qu'une fructification. La partie la plus importante se trouve sous le sol ou à l'intérieur du bois (Peter, 2005).

2- Les champignons

Le mot « champignon » vient du latin « *campaniolus* » (qui signifie : produit de la campagne), qui a évolué vers 1350 en « *champineul* », pour aboutir en 1398 au mot actuel. Le terme savant « mycologie », qui est la partie de la botanique qui étudie les champignons, vient du grec « *mukès* », champignon (Pardoetal, 2001).

Les champignons, appelés aussi Fungi ou Mycètes, constituent un règne à part entière, au même titre que les procaryotes (bactéries et archaebactéries), les protistes (eucaryotes unicellulaires), les végétaux, les animaux. Ils constituent un ensemble très diversifié, que l'on estime entre 2,5 et 50 millions d'espèces. Heureusement le nombre d'espèces impliquées en pathologie humaine est bien inférieur, entre 300 et 500 espèces (Chabasse, 2001).

Ce sont des eucaryotes, uni- ou pluricellulaires, immobiles. Ils sont dépourvus de pigments assimilateurs de type chlorophylle et sont donc incapables de photosynthèse. Il s'agit d'organismes hétérotrophes dont la nutrition carbonée est dépendante de la présence de matière organique préformée. Les champignons se nourrissent par absorption : ils sécrètent des enzymes protéolytiques qui transforment le substrat, sur lequel ils se développent, en sous-unités plus petites et donc assimilables (glucose, maltose). Ces composés sont ensuite stockés sous forme de glycogène et de lipides (Chabasse *et al.*, 2002).

II-Ecologie des champignons

Les champignons ont développé des adaptations très diverses, de telle sorte qu'on les trouve dans pratiquement tous les milieux du monde. Les plus répandues sont les *Penicillium* et les *Aspergillus*. On les trouve sous tous les climats et sous toutes les latitudes (Florent, 1993).

Quelques espèces sont adaptées à la sécheresse, d'autres vivent au contraire dans l'eau (eaux douces, océans, ou eaux usées). Certaines supportent bien des pressions osmotiques élevées (dans les milieux très salés, ou très sucrés, par exemple) et arrivent à contaminer les salaisons, le miel, ou les confitures (Florent, 1993).

Des champignons aimant la chaleur se trouvent dans les composts (à 70-75 °C) Mais on trouve aussi des champignons dans les toundras arctiques ; en haute montagne, l'hygrophore printanier se récolte à la fonte des neiges (2 °C) ; et certains champignons peuvent encore pousser dans les chambres réfrigérées (*Sporotrichum carnis*) peut altérer des viandes pourtant conservées à 5 °C (Tachenon, 1999).

1-Comment se nourrissent les champignons

Les champignons dépendent du matériel mort et vivant pour leur croissance. Ils obtiennent leurs substances nutritives de trois façons essentielles (Bouchet *etal*, 1999):

- SAPROPHYTE : florissant sur de la matière morte organique.
- SYMBIOTIQUE : florissant en collaboration avec d'autres organismes.
- PATHOGENE ou PARASITE : causant du mal à un autre organisme.

2-Les champignons Saprophytes

Les champignons saprophytes se nourrissent en dégradant les matières organiques en décomposition. En milieu naturel, ils poussent sur des feuilles mortes, des excréments d'animaux ou des souches de bois mort. Certains décomposent les poils des mammifères, tandis que d'autres exploitent les plumes d'oiseaux. Leur rôle dans la nature consiste à décomposer les structures organiques complexes issues de végétaux ou d'animaux et à les faire rejoindre les minéraux et les autres substances nutritives présentes dans le substrat. Les *pleurotes* dégradent le bois mort dans la nature ; on peut les cultiver sur une grande variété de déchets lignocellulosiques (Arora, 1999).

III-Classification systématique des champignons

Toutefois, l'impossibilité de distinguer les caractères apomorphes des caractères plésiomorphes sur des organismes si peu différenciés a conduit à établir une classification très artificielle (Guinberteau et Courtecuisse, 1997).

1- Classification morphologique :

Dans cette systématique en usage depuis Fries (1821) jusqu'au début du XX^e siècle, deux règnes (animal et végétal) sont distingués. Les champignons, inclus dans le règne végétal, se situent parmi les Cryptogames non vasculaires, formant un thalle enfoui dans le substrat (Otten, 1998).

La classification interne aux *Fungi*, hautement artificielle puisque fondée sur des

convergences d'aspect, a rapidement été remise en question par l'observation microscopique (distinction Ascomycètes- Basidiomycètes, etc.).

Tableau 1 : Classification proposée par (Fries, 1821)

Regnumvegetabile
Cryptogamae
Protophyta(Algae)
Aquatiques : Algues ss.str
Aériens : Lichens
Hysterophyta(Fungi)
Comomycetum : sporesproduitesa la surface du substrat
Hyphomycetes : thalle floconneux
Gasteromycetes : spores internes
Hymenomyceum : spores formées sur un hymenium

2-Classification morpho-anatomique

Dans le système à cinq règnes proposé par Whittaker (1969) :*Monera, Protoctista, Fungi, Plantae* et *Animalia*, les*Fungi(ouMycota)* (Courtecuisse et Duhem, 1994) sont considérés comme groupe indépendant des autres êtres vivants, incluant les lichens comme division autonome. Au sein des champignons, les groupes sont distingués par le type de spores et leur mode de formation. Les « champignons » à spores mobiles (*Mastigobionta* et*Mycobionta*) sont classés parmi les*Protoctista(Protistes)*.

Tableau 2 : Classification proposée par (Whittaker , 1969)

Règne des Fungi
Zygomycotina
Ascomycotina
Deutéromycotina(stade sexué inconnu)
Lichenes
Règne des Protoctista(Protistes)
Myxobionta(Myxomycètes)
Mastigobionta(Mastigomycètes.Oomycètes et Chytridiomycètes)

3-Classification phylogénétique actuelle

La phylogénie moléculaire a démontré que les « champignons » définis précédemment étaient fondamentalement un groupe polyphylétique (Lecointre et Guyader, 2001). Au sein des Eucaryotes, les Champignons (*Mycota* ou *Fungi*) ne regroupent plus que les espèces à spores non mobiles du règne précédent, ainsi que le groupe unicellulaire et flagellé des Chytridiomycètes (classé préalablement dans les protistes). Les Myxomycètes d'une part, les Oomycètes d'autre part, sont classés indépendamment des champignons au sens strict, mais sont de plus classés chacun dans un *phylum* indépendant.

Tableau 3 : Classification proposée par (Lecointre et Le Guyader, 2001)

Eucaryota	
Mycota ou Fungi (Champignon)	
Chytridiomycetes	
Zygomycetes	
Basidiomycetes	incluant lichens et Deutéromycètes
Ascomycetes	
Mycetozoaires (Myxomycètes)	
Stramenopiles	
Oomycetes	
Plasmodiophoromycetes	

IV-Les basidiomycètes

Les basidiomycètes sont les plus évolués des mycètes (Aaronson, 2000). Ils se distinguent par un hyphes cloisonné, chaque segment d'hyphes étant séparé par un dolipore (un type de cloison particulier à ce phylum), par la production de basidiospores issus de basides portées par un basidiocarpe et enfin, par la présence d'anses d'anastomose au cours de la phase dicaryotique (Adhikari et Durrieu, 1996).

1- La reproduction chez les basidiomycètes

Les champignons se reproduisent par des spores (**Figure 1**). Selon un mode asexué et/ou sexué. Celui des basidiomycètes est sexué et illustré par la structure habituelle de ces champignons est constituée d'un stipe et d'un chapeau ou carpophore. L'hyménium où des lamelles peuvent être disposées en rayons sous l'envers du chapeau. La surface des lamelles est tapissée de basides en forme de massue (Wozniak *et al.*, 2001).

Quand une basidiospore atterrit dans un milieu propice, elle germe et produit des hyphes qui pénètrent le sol. Ces hyphes se développent et forment un mycélium haploïde (Wozniak *et al.*, 2001).

Après un certain temps des boutons de masses compactes d'hyphes se forment à la surface du sol. Le bouton se transforme en champignon. À l'intérieur de chaque baside, les noyaux haploïdes s'unissent pour former une cellule diploïde. La méiose se produit, et quatre noyaux haploïdes se forment. Chaque noyau devient une basidiospore (Safrag, 2000).

Une fois les basidiospores parvenues à maturité, elles se détachent des basides et sont dispersées par le vent vers des nouveaux milieux (cours francosite, 2012).

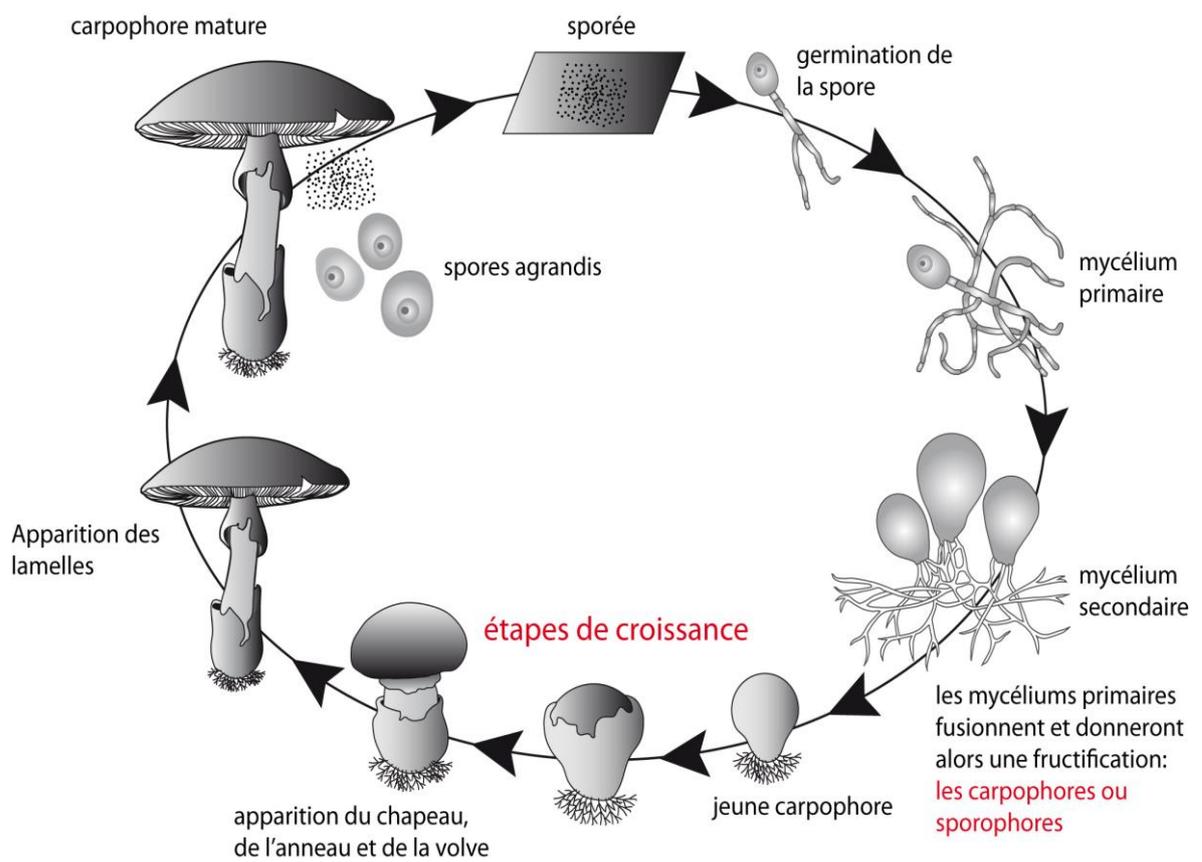


Figure 1 : Illustration des basidiomycètes (Vertil, 2012).

2-Les composés organiques des basidiomycètes

Les champignons sont constitués de différents polysaccharides et hétéropolysaccharides ayant des fonctions de structure (paroi cellulaire) et de stockage (Griffin, 1994). On retrouve entre autres de la chitine (-acétylglucosamine), des glucans et du glycogène.

Les protéines, qui représentent 4 à 35 % (p/p) du poids sec (Ps) des champignons, contiennent de nombreux acides aminés essentiels (32,9 - 48,5 g/100g de protéines) tels que la leucine, l'isoleucine, la valine, la lysine et la thréonine. Les basidiomycètes contiennent en outre des acides nucléiques (2,7 - 4,1 % (p/p) Ps), des acides organiques (1 460 - 9 800 mg/kg Ps) et des vitamines, dont plusieurs vitamines du complexe B, et de la vitamine C (17 - 25 mg/100 g Ps) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Composés polaires issus du métabolisme primaire des basidiomycètes

Classe de composés	Contenu dans les champignons comestibles
Glucides totaux (% (p/p) Ps)[1]	50,7-82,8
Glucides non azotés	40-74,3
Fibres	3,7-19,
Protéines (% (p/p) Ps) [1]	4,2-34,8
Acides aminés essentiels (g /100g de protéines)	32,9-48,5
Leucine	4,5-7,9
Isoleucine	3,4-7,8
Valine	2,5-9,7
Tryptophane	1,1-2,0
Lysine	3,9-9,9
Thréonine	3,5-6,1
Phénylalanine	2,6-7,0
Méthionine	0,9-3,0
Histidine	1,7-4,2
Acides nucléiques totaux (% (p/p) Ps) [1]	2,7-4,1
ADN	0,2-0,4
ARN	2,4-3,9
Vitamines (mg ou µg /100g Ps) [2]	
B1 (mg)	0,6-0,9
B2 (mg)	1,8-5,1
B3 (mg)	31-65
C (mg)	17-25
Acide folique (µg)	300-640
B12 (µg)	0,6-0,8
Acides organiques (mg/kg Ps) [3]	1460-9800
Acide oxalique	4,6-536
Acide malique	405-3890
Acide succinique	0,04-8,7
Acide fumarique	11,6-397

[1]-Données tirées de (Chang et Miles, 2004).

[2]-Données tirées de (Mattilaetal, 2001).

[3]- Données tirées de (Valentãoetal, 2005)

V- La culture des champignons comestibles

Il y a presque cent espèces de champignons qui peuvent être cultivées. Tous sont saprophytes. *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* et *Pleurotus spp*, dominent les marchés commerciaux, et ceux-ci représentent presque trois quarts des champignons de culture cultivés dans le monde entier (Chang, 1999). Les espèces principales de culture sont cultivées sur une variété de substrats organiques, incluant les déchets de la production de fumier de cheval, coton et de marc du café. Les technologies sont bien établies et des industries de champignon à succès ont été établies dans beaucoup de pays. Il y a eu une énorme augmentation de la production ces dix dernières années, surtout suite à une capacité accrue en Chine (Chang, 1999).

Le nombre d'espèces saprophytes cultivées augmente régulièrement et des conseils et de l'information pratique sont facilement accessibles (Stamets, 2000). Le Champignon de Paris Champignon le plus cultivé et le plus consommé (aussi nommé «champignon de couche»). Champignon de paris «*Agaricus bisporus* ».

1- Classification de champignon de paris

Les champignons de Paris ont des lamelles roses lorsque le champignon est jeune, puis brun-noir à noires en vieillissant. Le chapeau est rond, d'un blanc velouté qui se tache par la suite d'ocre ou de brun. Il est attaché au pied par un voile quand il est très jeune (on n'aperçoit pas ses lamelles) puis il va s'ouvrir et libérer ainsi un petit anneau. En vieillissant, le chapeau va s'aplatir. Est une espèce de champignons basidiomycètes de la famille des *Agaricaceae*. Champignon le plus cultivé en champignonnière car il est simple et rapide à cultiver (Alexander et al, 2002).

Tableau 5 : Classifications de champignon de paris (Chang, 1996).

Régne	Fungi
Division :	<i>Basidiomycota</i>
Classe :	<i>Agaricomycetes</i>
Sous-classe :	<i>Agaricomycetidae</i>
Ordre :	<i>Agaricales</i>
Famille :	<i>Agaricaceae</i>
Genre :	<i>Agaricus</i>
Espèce :	<i>Agaricusbisporus</i>

2- Le cycle de vie de champignon de paris

La naissance d'un champignon survient lors de la germination d'une spore (Fig 2 a).

Cela produit un filament mycélien dit mycélium primaire, dont les cellules renferment un seul noyau à n chromosomes (Fig 2b). Ce mycélium va se développer et grandir en envahissant le milieu sur lequel il pousse.

Dans certaines conditions très variables, la reproduction va intervenir, de manière qui peut-être « sexuée » : deux mycéliums de « polarité » complémentaire (on ne peut parler de sexe au sens habituel mais de « polarité ») vont s'associer et former par plasmogamie (fusion des cytoplasmes Fig 2 c) un mycélium secondaire (Fig 2 d) à deux noyaux cette fois, mais non encore fusionnés cheminant côte à côte, lorsque les hyphes (filaments) grandissent.

Va alors se développer un sporophore (la partie visible du champignon) sur lequel vont prendre naissance les cellules fertiles : les basides qui délivrent des spores « libres » ou asques dans lesquels les spores sont enfermées dans un sac qui s'ouvre en libérant les spores.

Dans ces cellules fertiles intervient alors la fécondation par fusion nu-cléaire (Fig 2f) donnant un noyau à $2n$ chromosomes (Fig 2 g).

Cette fusion est de suite suivie d'une série de 3 divisions qui redistribuent les spores dans un stock nucléaire haploïde (Fig 2 h), c'est-à-dire ne comportant qu'un seul exemplaire de chaque paire de chromosomes.

Les spores sont ensuite libérées sur le sol et leur germination donnent un nouveau mycélium (Fao, 2004).

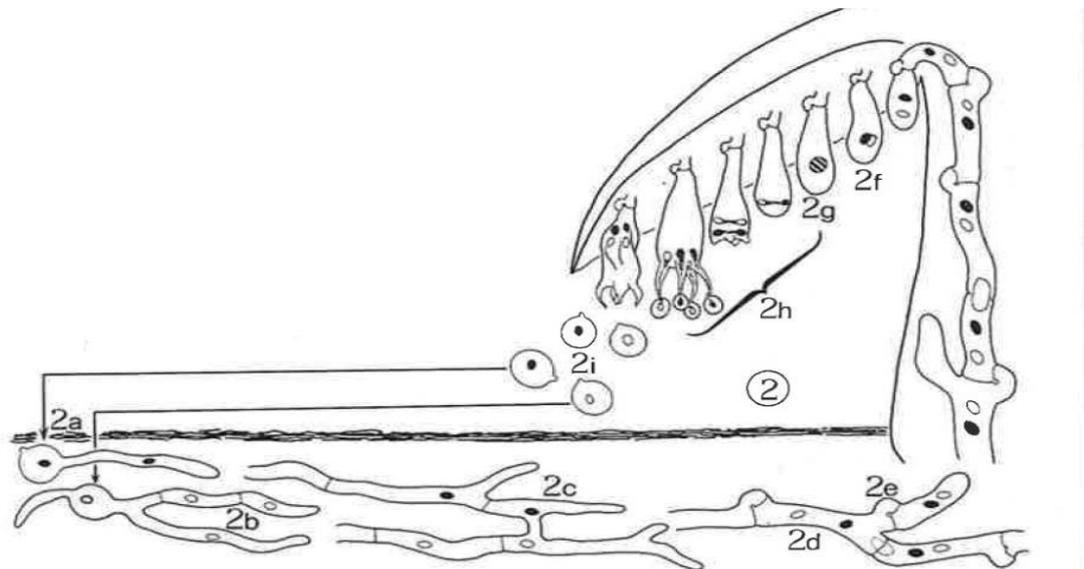


Figure 2 : Le cycle de vie de champignon de paris (Esser, 1979).

Les spores sont ensuite libérées sur le sol et leur germination donnent un nouveau mycélium primaire permettant au cycle de recommencer

3- La génétique chez l'*Agaricus bisporus*

Le cycle d'*A. bisporus* est dit « amphitallique » car il est à la fois pseudohomothallique et hétérothallique selon les spores considérées (**Figure 2**). En effet, les sporocarpes possèdent à la fois des basides bisporées qui produisent des spores hétérocaryotiques ($n+n$) fertiles et des basides tétrasporées qui produisent des spores homocaryotiques (n) stériles. Les cultivars et la plupart des populations sauvages appartiennent à la variété *bisporus* caractérisée par des basides en grande majorité bisporées qui lui confèrent un cycle pseudohomothallique (ou homothallique secondaire) prédominant (Raper *et al.*, 1972). Les spores hétérocaryotiques produites par ces basides

reçoivent deux noyaux non frères de la méiose et conservent en grande partie l'hétérozygotie parentale car les *crossing-over* sont peu fréquents (Kerrigan *et al.*, 1993). Ceci a deux conséquences : premièrement, on pourrait s'attendre à ce que les populations naturelles soient constituées de lignées pseudo clonales générées par intramixie (pseudohomothallisme); deuxièmement, seules les rares spores homocaryotiques peuvent être utilisées pour réaliser des croisements par hybridation *in vitro* (hétérothallisme), ce qui est un handicap pour les programmes de sélection. Il existe toutefois deux autres variétés dont les basides sont majoritairement tétrasporées et qui produisent essentiellement des spores homocaryotiques (Philippe *et al.*, 2003).

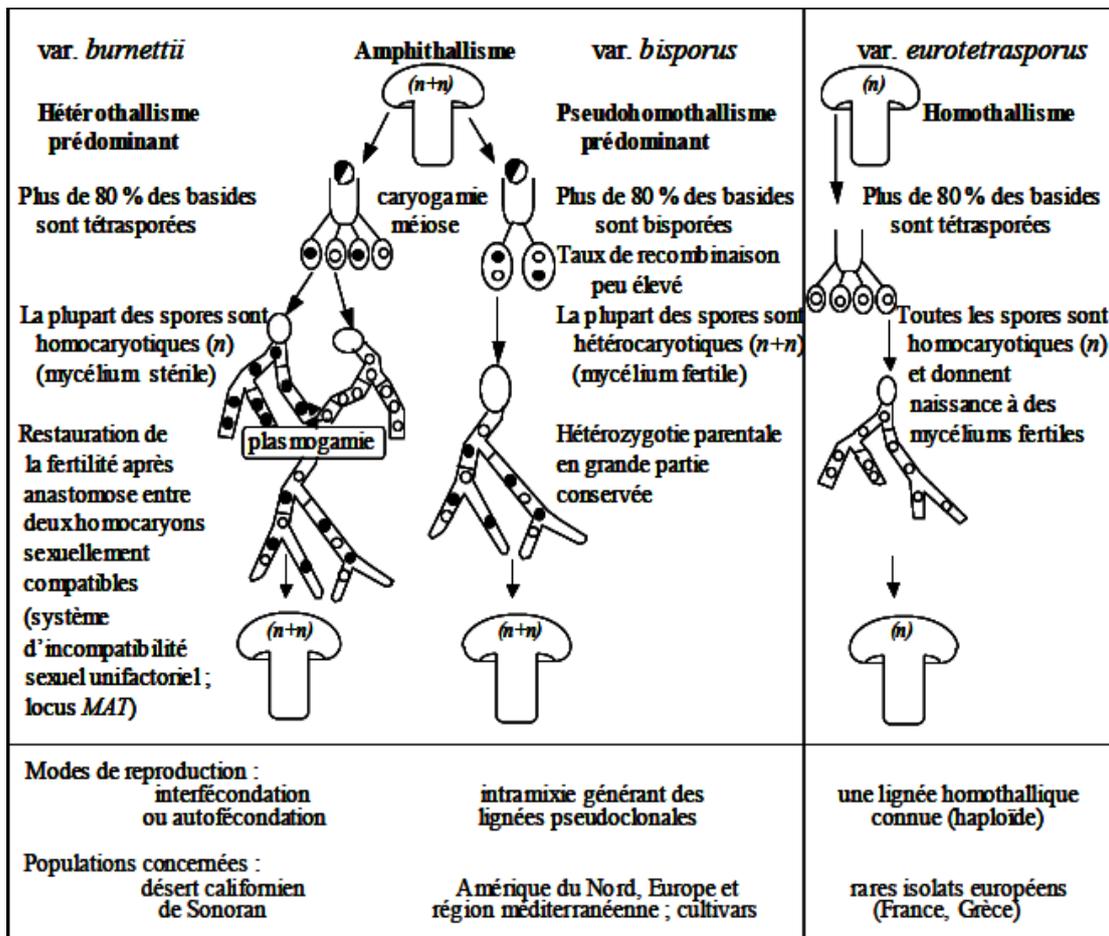


Figure 3 : Les cycles génétiques d'*Agaricus bisporus* (Legendre, 1998).

4- La morphologie d'*Agaricusbisporus*

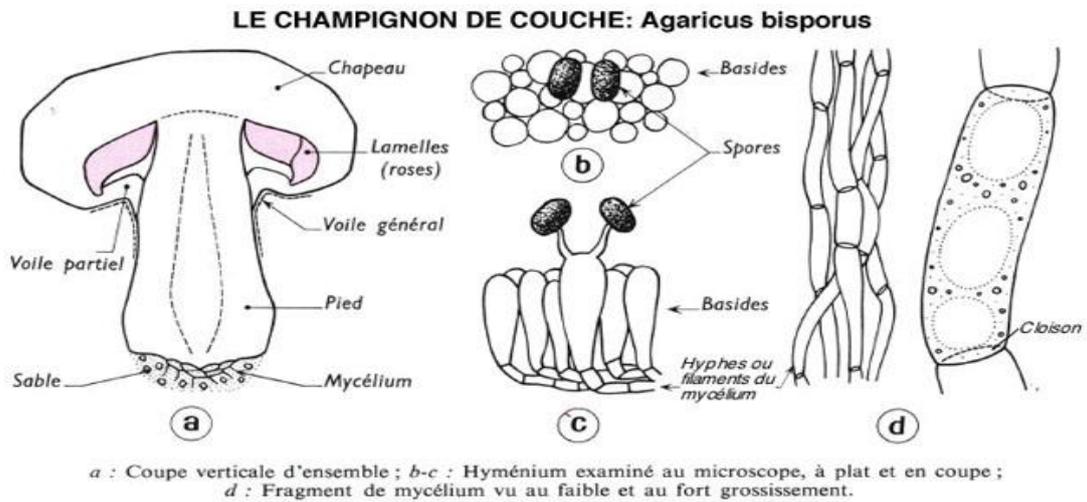
La morphologie du champignon de couche se décompose (**Figure 4**) :

- en une partie pratiquement invisible "le mycélium" qui est l'appareil végétatif des champignons. Il est formé par un amalgame de filaments ramifiés.

- en une partie visible "le carpophore" qui est en fait la fructification du mycélium.

Le carpophore comprend :

- Le pied, Il peut être orné d'un anneau descendant, ascendant, mixte, à roue dentée.
- Le chapeau.
- Le voile qui relie le pied et le chapeau lorsque le champignon est encore jeune puis se déchire lors de la croissance du champignon.
- Les lamelles qui se situent sur la face inférieure du chapeau.
- L'épiderme dont la teinte est variable suivant les variétés de champignons. (Kernaghan et Harper, 2001).



Quelques phases du développement de l'Agaric

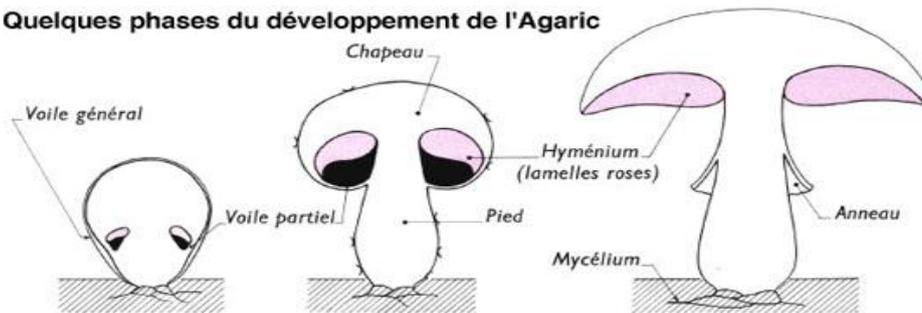


Figure4 : Morphologie d'*Agaricus bisporus* (Feedrochinko, 2004)

Matériel et Méthodes

I- Matériel

1- Matériel fongique

La partie expérimentale de ce travail a porté sur le champignon de paris ou le champignon de couche (*Agaricus bisporus*) qui appartient à la famille des *agaricales*. Qui permet l'obtention de spores et de tissus.

2- Les substrats de colonisation

Pour la préparation des substrats de colonisation nous avons utilisé les déchets des céréales comme : le sorgho, le blé dur, le maïs, le seigle et le riz.

3- Les substrats de fructification :

Nous avons utilisé comme substrat de fructification : le fumier de cheval, marc de café, le terreau, et la vermiculite.

II-Méthodes

Les étapes de la culture des champignons mises en œuvre dans le cadre de notre étude sont détaillées ci-après.

Après une culture d'un Kit, L'isolement est réalisé sur milieu gélosé (PDA). Le mycélium est ensuite transféré sur un substrat adéquat et stérile à base de grains de céréales. Le produit obtenu à l'issue de cette opération est appelé « blanc-mère » qui sera utilisé ultérieurement pour ensemencher différents substrats de fructification qui nécessitent un traitement thermique, répondant aux critères suivants :

- homogénéité du développement mycélien dans tous les substrats.
- stérilisation du milieu et conditions aseptiques sont nécessaires.
- simplicité des appareillages à mettre en œuvre.
- possibilité d'étude des mécanismes et des paramètres de croissance mycélienne.

1- La culture de champignon de paris avec un Kit

Le Kit de culture utilisé nous facilite l'obtention du champignon afin de récupérer les spores et les tissus pour la production de mycélium.

Les champignons sont cultivés en atmosphère contrôlée. Les éléments indispensables à la bonne culture sont : l'humidité, les rejets de CO₂ en adéquation avec les apports en oxygène et une température adaptée.

➤ Le premier jour

Nous avons utilisé un kit de culture de champignon (White mushrooms ou champignon blanc de paris) qui existe au niveau du marché. Ce Kit contenant une caisse en polystyrène dans laquelle se trouve un mélange de paille et fumier composté, un sachet de terre de gobetage, et un couvercle en carton perforé (**Figure 5**).



Figure 5 : Le Kit de champignon de paris.

➤ Le septième jour

Après une semaine de culture à une température de 20-25°C, le compost est devenu blanc, nous éparpillons ensuite la terre de gobetage sur le compost et on replace à présent l'emballage pendant 5-8 jours à une température de 20-25°C avec le couvercle fermé, en l'arrosant régulièrement à l'aide d'un vaporisateur (**Figure 6**).



Figure 6: Etalement de terre de gobetage.

➤ **Le quinzième jour**

A ce stade, on transfère le dispositif vers le phytotron pour l'incubation(**Figure 7**), où la température est de 15° à 18°C, et l'humidité à 90 % dans l'obscurité totale.



Figure 7: L'incubation dans le phytotron.

➤ **Du 15^{ème} au 30^{ème} jour**

Durant ce temps, le mycélium se développe à travers la couche de terre de gobetage vers la surface. Lorsque la terre de gobetage est recouverte de flocons blancs, nous ouvrons les trous d'aération sur les côtés du couvercle.

Lorsqu'un bon nombre de boutons apparaissent, nous arrosons le bac à l'aide d'un petit arrosoir d'eau (150 ml). La terre doit rester humide. Les premiers champignons apparaissent au bout de 18^{ème} jours.

➤ **cinquième semaine**

A ce stade, nous avons des champignons vigoureux à partir d'une jeune fructification.

2-La culture sur l'Agar

La culture de démarrage (ou culture mère) se fait à partir d'une fructification fraîche et saine, qui provient d'un Kit. Elle permet de produire plusieurs cultures qui servent à inoculer du blanc dans des récipients plus volumineux puis à inoculer le substrat final de blanc.

2.1- Préparation du milieu de culture

L'aspect le plus important de la culture des champignons est le choix d'un milieu de culture qui assure le bon développement de mycélium.

Pour le bon développement des champignons, il faut que les milieux contiennent suffisamment de substances nutritives, et un agent solidifiant (Agar ou Gélatine).

La plupart des espèces comme : *Agaricusbisporus* poussent sur le milieu PDA

PDA : Milieu gélosé de dextrose et d'extrait de pomme de terre, (voir **Annexe 2**).

Après avoir Laver, peser et couper les pommes de terre en petits morceaux, elles sont bouillies pendant 20 min jusqu'à ce qu'elles ramollissent. On les retire et on ajoute de l'eau au bouillon pour obtenir exactement 500 ml. On rajoute ensuite le dextrose et l'Agar en veillant à

l'exactitude des quantités, faute de quoi le mélange deviendrait trop mou ou trop dur. On mélange de temps en temps, et on chauffe doucement jusqu'à ce que l'Agar ait fondu. Après un autoclavage de 20 min à 121°C. L'Agar ne doit pas être chaud quand on le verse dans les boîtes de Pétri (**Figure 8**), sinon il forme des grumeaux .



Figure 8 : Préparation des boîtes de Pétri.

2.2- Récupération des spores :

La technique habituellement utilisée pour récupérer des spores consiste à poser des chapeaux lamellés de champignons à maturité(**Figure 9**), privés de leur stipe ou non directement sur un support (papier aluminium), attendre la sporulation après 24h puis prélever les spores.



Figure 9: L'obtention de l'empreinte des spores.

2.3- Observation microscopique des spores

Après avoir remarqué que la couleur des lamelles a changé (devenues noires), on fait glisser quelques *spores* sur une lame de verre et on observe, au microscope : **Leica DM 4000 B LED** avec un logiciel **Métamorphe V.4.1.0**

2.4- Techniques d'inoculation de l'Agar (du milieu PDA)

La culture de départ peut être réalisée à partir d'un carpophore frais et sain, ou d'une culture de collection. A partir de cette première culture on prépare de nombreuses cultures sur PDA. Elles servent à inoculer les bocaux avec du blanc, et ces dernières permettent d'inoculer le substrat final de la fructification.

2.4.1- Inoculation des spores libres

Après stérilisation du couteau/scalpel, par passage de quelques secondes sur la flamme, attendre quelques secondes pour qu'il refroidisse (car nos spores seront instantanément tués) procéder au grattage des empreintes.

On ouvre la boîte de quelques centimètres (**voir la Figure 10**), et on étale nos spores sur l'Agar, puis on referme aussitôt.



Figure 10: Inoculation des spores libres.

Cet ensemble de technique est appelé : *technique stérile*. Lors de cultures il faut toujours travailler sous hotte en milieu stéril

2.4.2- Clonage d'un tissu :

On déchire le champignon dans le sens de la longueur (on évite l'utilisation d'un couteau parce que les contaminants de la surface risqueraient d'adhérer à la lame). On essaye de ne pas toucher la surface intérieure avec les mains. A l'aide du scalpel passé à la flamme, on prélève un petit morceau (de 1cm²) du tissu intérieur. Puis on le place au milieu de l'Agar (**Figure 11**).

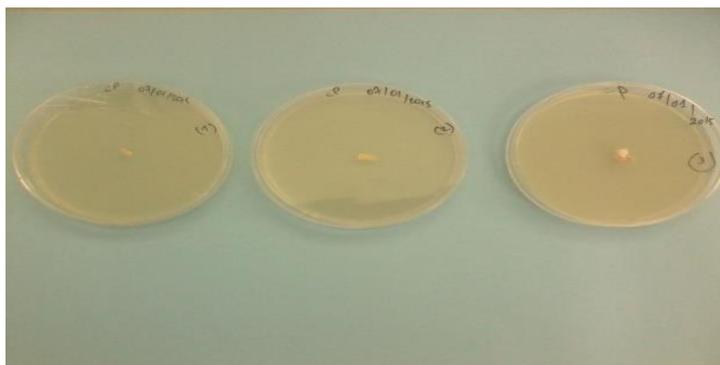


Figure 11: Culture d'un tissu sur le milieu PDA.

2.5- Mise en condition d'incubation :

On incube les boîtes de Pétri nouvellement inoculées à 25 °C (voire l'**Annexe1**). Au bout de trois à quatre jours, le mycélium aura recouvert le tissu et se ramifiera sur l'Agar (**Figure 12**).



Figure 12 : Incubation des boîtes de Pétri dans l'étuve.

3-Les substrats de colonisation

Dans la nature, les champignons se multiplient en libérant des spores. Celles-ci, extrêmement petites, sont difficiles à manipuler; elles sont de plus, assez longues à germer, de sorte que des champignons concurrents pourraient se développer plus rapidement. C'est pourquoi, on inocule dans le substrat une culture pure du mycélium désiré, afin de le favoriser par rapport aux autres. Ce procédé est appelé «lardage» et la culture pure porte le nom de «blanc».

Le substrat est le matériel sur lequel pousse le mycélium.

Au début de chaque cycle, il faut démarrer avec du blanc frais. Si l'on utilise du mycélium âgé (qui a déjà produit des champignons), tous les contaminants présents seront inoculés en même temps que le mycélium du champignon à cultiver et compromettront la culture.

3.1- Préparation du substrat de colonisation

On a utilisé différentes sortes de grains comme le blé, le seigle, le riz et le sorgho, et le maïs (**Tableau 6**). La qualité est très importante. Le grain doit être fraîchement récolté et ne contient que très peu de cassures.

Tableau 6: Préparation les boites des céréales.

	Poids	bouillir	L'eau distillée	autoclavage
Blé	160g	20min	160ml	20min
Riz	160g	20min	160ml	20min
Sorgho	160g	10h	160ml	20min
Maïs	160g	1h	160ml	20min
Seigle	160g	20min	160ml	20min

Nous avons rempli et nettoyé soigneusement les bouteilles, après l'autoclavage, les boîtes peuvent être inoculés (**Figure13**).

Le degré d'humidité des céréales, après cuisson, doit avoisiner les 50%. S'il est plus élevé, le mycélium croît peut-être plus vite mais le risque d'apparition de bactéries sera d'autant plus grand. Si ce taux est inférieur à 35 %, la croissance mycélienne sera plus lente.



Figure 13: les boîtes d'inoculation.

3.2-Ensemencement des boîtes des céréales

Il existe plusieurs méthodes pour inoculer nos grains stérilisés:

3.2.1- Inoculation des spores en solution

Nous avons mis des spores en solution dans de l'eau ultra pure contenue dans un petit bocal. Après avoir rempli à moitié un bocal de 50 ml avec de l'eau distillée.

L'inoculation est réalisée avec une seringue qui facilite l'introduction des spores dans le bocal (**Figure 14**) en ouvrant le couvercle des boîtes aussi brièvement que possible.



Figure 14: L'inoculation des spores en solution.

3.2.2- Une culture liquide de mycélium :

Cette technique est la plus utilisée. Il faut tout d'abord obtenir un bout d'Agar contenant une souche fraîche.

Après la stérilisation d'un bocal de 50 ml rempli à moitié d'eau distillée contenant du : Maltose, Saccarose, Glucose (**Tableau 7**).

Tableau 7: Lescomposés de milieu liquide.

	2g /100ml	2g /100ml
1 ^{er} solution	Glucose	Maltose
2em solution	Glucose	Saccarose

On découpe 2-3 morceaux de 1cm² dans l'Agar de la boîte de Pétri (**Figure 15**). Ensuite on met ces carrés dans le bocal, sans oublier de le fermer strictement.

Laissez incuber durant 1 semaine et secouez énergiquement tout les deux jours.

La durée de l'incubation est d'une semaine environ, en secouant chaque deux jour pour permettre une bonne homogénéisation du milieu (**Figure 16**).



Figure 15 : colonie demycélium



Figure 16: Une culture liquide de mycélium

3.2.3- Clonage d'un morceau de gélose nutritive sur les céréales :

Pour l'inoculation du mycélium (**Figure 17**). Nous avons utilisé une parcelle de blanc de la culture mère de 10 x 10 mm pour un flacon de 250 ml ou deux parcelles pour un flacon plus grand.



Figure 17: Inoculation d'un morceau de mycélium sur le substrat de colonisation.

- Suggestion pour introduire de l'air

Pour que le mycélium se développe correctement, et pour diminuer le risque de contamination bactérien (anaérobique) il faut veiller à garder une certaine quantité d'air dans le récipient.

3.3-Mise en condition d'inoculation

Nous avons incubé les flacons jusqu'à ce que le mycélium ait envahi le substrat.

La température doit avoisiner la température optimale de croissance mycélienne de 25°C (voire l'**Annexe1**).

4-Les substrats de fructification

Les champignons ne contiennent pas de chlorophylle, ce qui les rends incapables de produire de l'énergie à partir de la lumière ; la culture en cave leur siéra parfaitement, pour peu qu'ils y trouvent de la matière organique.

On peut décrire la culture du champignon de Paris par le triptyque préparation du compost, ensemencement et gobetage.

Le champignon de Paris possède en outre la particularité d'être décomposeur : il se nourrit de matière en décomposition. Le mycélium, élément se développant dans le sol, et qui constitue l'appareil végétatif sou terrain du champignon, nécessite un support végétal décomposé dans lequel il puise l'eau et les minéraux dont il a besoin, parmi ces support on a choisi : le fumier de cheval, marc du café, et le terreau.

4.1- Les types des substrats

4.1.1- Le fumier de cheval

-Compostage de Fumier de cheval

Le compostage des substrats a été réalisé au niveau de la serre (laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie végétale).

-Principe

Le compostage est un procédé de dégradation et de transformation de la matière organique en milieu aéré par l'action combinée d'une multitude de bactéries. Il s'accompagne d'une montée en température et aboutit à l'élaboration du compost.

Technique de préparation du fumier de cheval

Le fumier de cheval peut être composté seul ou en mélange avec des déchets verts, des effluents d'élevages (ovins, porcins, volailles,...) ou des déchets de l'industrie du papier. Le compostage est une fermentation aérobie durant laquelle on peut déceler trois phases principales,permet ses grâce à un soutien technique (arrosage, retournement des andains).

➤ **La phase mésophile**

Qui est caractérisée par l'augmentation de l'activité des micro-organismes au sein de l'andain de fumier entraînant des dégagements gazeux de CO₂, de H₂O et d'ammoniac.

Des études ont montré que lors que cette phase a lieu sous de basses températures, la matière organique est d'autant mieux décomposée.

Cependant, s'il y a de fortes températures, l'élimination des pathogènes est plus efficace.

➤ **La phase thermophile**

Qui est caractérisée par une augmentation de la température jusqu'à 80°C.

➤ **La phase de refroidissement**

Qui caractérise la fin du compostage avec l'obtention d'un produit fini désodorisé.

Après ces trois phases, le compost produit va entrer en période de maturation.

-Les pertes lors du compostage :

Lors du compostage, le fumier subit une diminution de volume. Les éléments présents initialement se retrouvent donc concentrés dans le compost. Cependant, il y a une perte de certains éléments au cours du compostage :

- L'azote se volatilise sous forme d'ammoniac.
- La potasse est lessivée par les intempéries.
- Le carbone se volatilise sous forme de CO₂.
- Le phosphore insoluble ne subit pas de perte.

4.1.2-Marc de café

Des études sur la culture de champignons comestibles (*Agaricus bisporus*) ont donné des résultats relativement satisfaisants. Un procédé semi-industriel avec une capacité à traiter une tonne de marc du café par jour, donne une production journalière approximative de 150 kg de champignons frais, soit une production mensuelle de 4,5 tonnes (Fritsche, 1978).

-Technique de préparation du marc de café

On peut utiliser le marc de café aussi bien frais que séché. Le marc de café frais doit s'égoutter pendant quatre à huit heures puis fermenter. Le disposer en sac de 60cm de hauteur. Couvrir les sacs de plastique pour empêcher les pertes d'eau et d'énergie.

La teneur en eau des sacs doit être de 60 à 80 %. En deux jours, la température à l'intérieur des sacs doit atteindre 50-60 °C. Certains composants facilement accessibles du marc de café se décomposent alors. Au bout du deuxième ou troisième jour, on fait retourner le sac pour éviter que des micro-organismes anaérobies ne s'installent et produisent des substances nocives pendant leur croissance. De plus, au bout de dix jours de fermentation, le substrat est moins adapté à la culture d'*Agaricus bisporus*; il vire au noir et a tendance à se compacter facilement.

4.1.2- La vermiculite

La vermiculite est le nom géologique donné à un groupe de minéraux laminaires hydratés qui sont des silicates d'aluminium-fer-magnésium, ressemblant au mica en apparence. La pierre et les autres impuretés sont retirées du minerai brut, qui est ensuite trié et broyé en différentes tailles. On va le mélanger avec le terreau (Byrne *etal*, 1995).

4.1.3- Terreau

Le terreau est très avantageux pour les plants de la pépinière, soit dans un lit des semences ou une pépinière où ils germent, soit dans des pots ou dans des fosses dans lesquels(les) les jeunes plants ou les jeunes arbres sont plantés. Le terreau peut avoir beaucoup d'utilisations, dans la culture de champignon comestible (Goessler et Pavkov, 2003).

4.2- Traitements des substrats à la chaleur

Les substrats sont soumis à un traitement par la chaleur. C'est une mesure indispensable de protection contre les insectes et les maladies. Différents types de traitement thermique peuvent être employés dans la culture d'*Agaricus bisporus* :

- la stérilisation à haute pression (autoclavage).
- la pasteurisation à la vapeur ou par immersion en eau chaude.

4.2.1- La stérilisation

Elle élimine du substrat tous les organismes vivants. Elle demande beaucoup d'énergie et nécessite des matériels spécifiques tels que des emballages stériles, un autoclave spécial, à vapeur haute pression. Il faut en effet de la pression pour atteindre la température de 121 °C. Certains organismes peuvent survivre à un traitement à 100 °C et se développer très vite sur les milieux utilisés pour la culture. Ils contamineraient alors les milieux et les rendraient inutilisables, il est absolument nécessaire de stériliser. Les sacs en plastique se fendraient plus facilement s'ils ont été stérilisés sous pression.

4.2.2- La pasteurisation

Elle a pour objectif de supprimer les organismes indésirables mais aussi de garder en vie ceux qui sont utiles. Pour atteindre ce but, il faut maintenir une température de 60 à 70 °C pendant 4h. La plupart des ennemis et des maladies sont éliminés à de telles température, à la suite d'une pasteurisation à la vapeur, on effectue souvent un conditionnement.

4.3- L'humidification

Un processus biologique tel que le compostage a besoin d'eau. Pendant toute la durée de l'opération, le compost doit être humidifié mais non mouillé étant entendu que l'eau puisse s'écouler. D'autre part, lorsque le compost est trop sec, on ajoute de l'eau afin d'obtenir un processus optimal. En cas d'utilisation de la paille de blé, il faudra être spécialement attentif à la quantité d'eau ajoutée en vue d'éviter la formation de masses compactes de compost qui empêcheraient la circulation de l'air dans la meule.

4.4- L'ensemencement

Lorsque la température est suffisamment descendue (de préférence en dessous de 30°C), le blanc est ajouté et mélangé au compost. Cette opération s'appelle l'ensemencement ou le lardage (**Figure 18**). Les producteurs de Champignons de Paris utilisent généralement environ 6-8 litres de blanc par 1.000 kg (1 tonne) de compost pasteurisé. Le blanc doit être mélangé d'une manière homogène à la couche de compost.

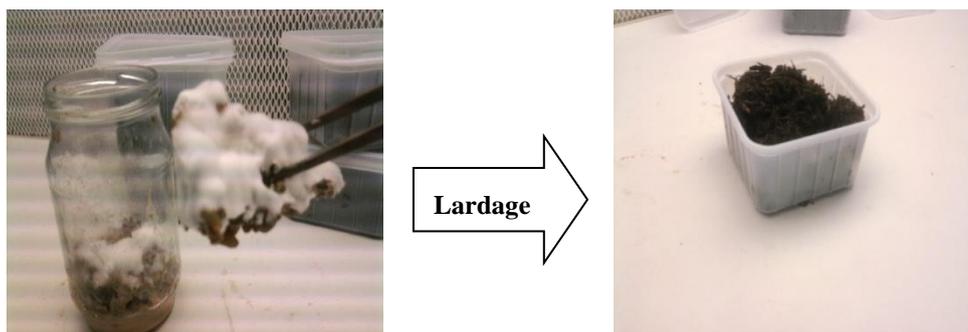


Figure 18: Ensemencement des bacs de substrats.

4.5- La croissance du mycélium pendant l'incubation

Après l'ensemencement, le mycélium commence à se développer. La température idéale de croissance se situe de préférence au-dessous de 30°C (voire l'**Annexe1**). Une humidité suffisante est un autre facteur important de production du mycélium. Par conséquent l'humidité relative (HR) doit être très élevée (HR 95% ou plus).

Pour atteindre une valeur de HR aussi élevée, quelques précautions seront prises :

Les substrats dans les bacs seront recouverts de feuilles de papier absorbant. Les feuilles de papier seront arrosées régulièrement, aussi bien les murs que le sol. En général il faut 2 semaines pour que la couche de substrat soit suffisamment colonisée par le mycélium.

4.6- Le gobetage

Maintenant que les bacs des substrats sont envahis par un mycélium arrivé à maturité, ils ne vont pas encore produire une bonne fructification.

Pour en arriver là, le champignon de couche a besoin d'une couche de terre de couverture :

Le gobetage procure les micro-organismes indispensables et le taux d'humidité nécessaire pour inciter le mycélium à produire une belle récolte. Le fait d'arroser directement le mycélium provoquerait sa pourriture et par conséquent aucun champignon n'apparaîtra. Cette couverture sert aussi de régulation de l'humidité.

Ratio : Tourbe : 4 parts, Calcaire : 1 part

La couverture est répandue en une couche de 1cm d'épaisseur sur le compost mature.

4.7- La chute de température et la fructification

Lorsque le mycélium acquiert une apparence blanche et duveteuse, et qu'il s'est bien développé dans la couverture, le moment est venu de provoquer une chute de température. Cette opération sert à déclencher le passage de la croissance végétative (le mycélium) vers la croissance générative (la fructification). Ce changement de climat peut être obtenu en augmentant la ventilation. Si c'est possible, la température devrait baisser de 5-6 °C pour avoisiner 20 °C en quelques jours.

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

I-L'obtention de tissu et des spores à partir d'un Kit

Le kit de culture se compose des ingrédients suivants : paille, fumier de volaille et crottin de cheval, gypse et beaucoup d'eau. Il est parfaitement exempt de produits chimiques. Lorsque tous ces éléments sont mélangés, il se produit un processus de fermentation. Ce processus résulte sur un produit appelé le compost de culture.

Nous avons constaté que le compost n'est pas inoculé avec les spores car la germination prendrait beaucoup trop de temps. C'est pourquoi il a été inoculé avec ce que l'on appelle le blanc de mère (Lucia *et al*, 2001). Le blanc de champignon est une matière qui se compose de mycélium et des grains de céréales.

1-Etalement de terre de gobetage

Dans le compost seul, l'*Agaricus bisporus* ne pourraient pas se former. C'est la raison pour laquelle le compost doit être recouvert d'une couche composée d'un mélange de différentes variétés de tourbe. Cette couche, nous l'appelons la terre de gobetage. Le gobetage doit être exempt de germes pathogènes (Flegg et Smith, 1982). Il doit présenter la structure appropriée, un degré d'acidité de pH de 7,5 et un pouvoir de retenir une grande quantité d'eau. Les bactéries qui vivent dans la terre de gobetage stimulent le mycélium en vue de la formation de champignons. Sans ces bactéries, les champignons ne se développeraient pas. Par conséquent, une bonne terre de gobetage est essentielle pour la culture de champignons (Fritsche, 1978).

2-Envahissement dans la terre de gobetage

Lorsque le compost inoculé a été recouvert de terre de gobetage, il convient d'asperger la terre de gobetage afin de la maintenir humide. En outre, l'humidité de l'air et la teneur en CO₂ dans une pièce fermée doivent être aussi élevées que possible (Shallachova et Marteniko, 1985). La température de l'air est maintenue entre 22°C-23°C et la température au cœur du compost se situe entre 25°C-27°C. La terre de gobetage est ainsi rapidement et bien envahie par le mycélium.

3-Formation des boutons

Après cet envahissement, le mycélium est capable de produire des fructifications ou des boutons (**Figure 19**). Les facteurs présidant à l'induction de la fructification sont les suivants (Nicholas et Ogame, 2006) :

- température entre 16⁰C et 18⁰C.
- forte humidité.
- concentration de CO₂ dans l'air.

Ces conditions stimulent le mycélium qui se trouve dans la terre de gobetage à former des amas blancs qui se présentent, dans un premier temps, sous la forme de petits boutons. Voici leur évolution en image.

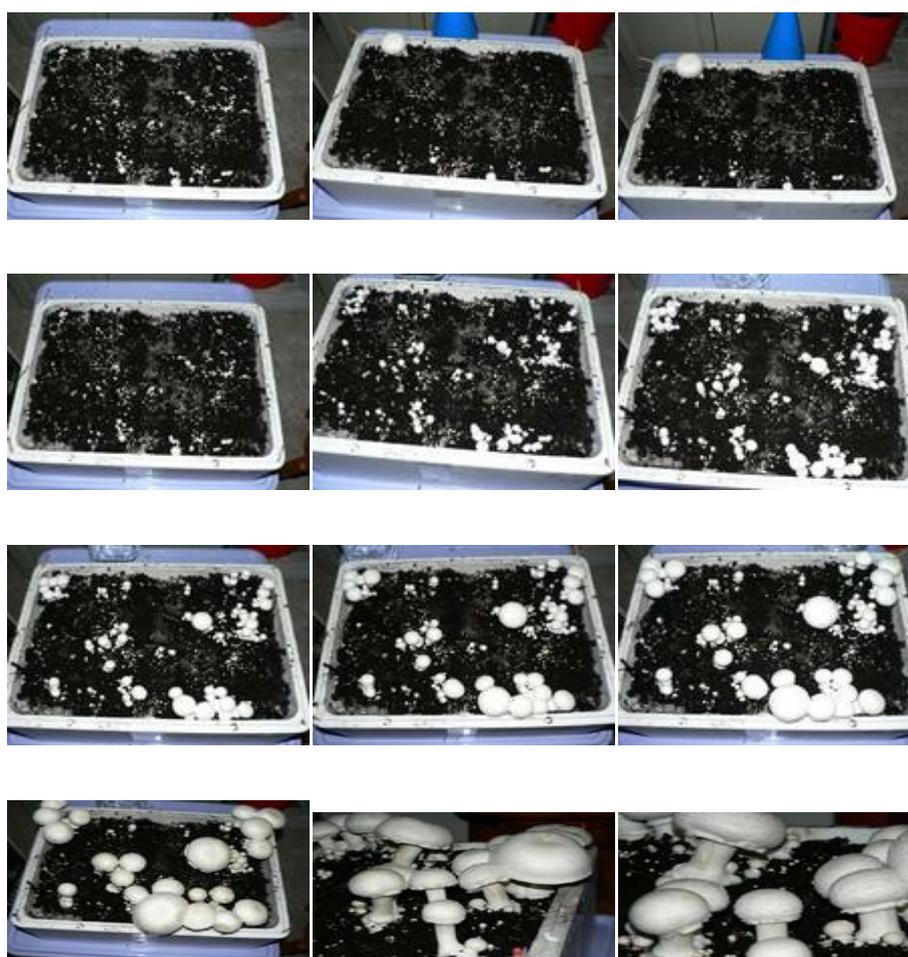


Figure 19: Evolution d'*Agaricus bisporus* sur le Kit.

4-Développement des boutons

Après 15 jours. Si l'on travaille plutôt avec une température de l'air et une humidité réduite, on a plus de boutons. Par contre, si la température de l'air et l'humidité sont supérieures, on a moins de champignon mais ceux-ci peuvent devenir plus gros. Il faut environ 5 jours aux petits boutons pour mûrir et devenir de beaux champignons (**Figure 20**).



Figure 20: Développement des boutons.

5- La Sporulation

La première observation remarquable est que l'émission de spores commence immédiatement après l'apparition des carpophores.

À la faveur de l'humidité, d'une certaine quantité de chaleur, le mycélium va donner naissance au fruit mature. C'est cette partie aérienne, visible, qui peut faire quelques dixièmes de millimètres. qui formera de nouvelles spores indispensables à la reproduction (**Figure 21**). Par exemple, un sporophore d'*Agaricus bisporus* est capable de produire 1 million de spores (Stamets et Chilton, 1983).



Figure 21: Récupération des spores libres.

5.1-Morphologie des spores

L'étude portée sur 23 spores (voire l'Annexe 3) avec un grossissement ($\times 63$).



Figure 22: Observation microscopique des spores d'*Agaricus bisporus* au microscope optique.

Après examination sur lamelles, les spores apparaissent comme des corpuscules ovoïdes de couleur noir ou brun pourpre. On a constaté que la morphologie des spores est sphérique (**Figure 22**). On n'a observé que les spores étaient proches avec une moyenne de $7,13069773 \mu\text{m}$ pour la distance polaire, et de $5,41331768 \mu\text{m}$ pour distance équatoriale. (**Tableau 8**).

Tableau 8: Les distances polaires et équatoriales des spores d'*Agaricusbisporus*.

SummaryStatistic	longueur	largeur
Le nombre	23	23
moyenne	7,13069773 μm	5,41331768 μm
Std. Dev.	0,29492074 μm	0,2497981 μm
Minimum	6,32977819 μm	4,84986067 μm
Maximum	7,7099781 μm	5,85086203 μm
Total	164,006042 μm	124,506302 μm

II-Colonisation du milieu de culture PDA

La première étape de la production du blanc s'effectue dans un milieu de culture artificiel. Il devra contenir suffisamment de substances nutritives pour la croissance du mycélium, notamment des saccharides et un agent gélifiant (Perrin, 1979).

Nous avons choisi le milieuPDA comme matériel d'étude en raison de sa haute teneur en amidon, le développement du mycélium dépendra également du degré de digestibilité de l'amidon par le germe ou par son amylase (Ellis, 1979).

Les spores et le tissu ont commencé leur développement après 3-7 jours pendant l'incubation à 25 °C-27 °C .Lorsque la croissance du mycélium est terminée sur le milieu PDA après 3 semaines. Il a été observé que la vitesse de croissance du mycélium est augmentée lors de l'abaissement de la température après la première semaine à 22 °C –23 ° C. (Verfaillie, 1998).

Les résultats ont montré une croissance du mycélium qui a dominé la surface du milieu PDA a un diamètre de 90 mm (**Figure 23**), avec la durée moyenne d'achèvement de 17jours de croissance, soit en termes de vitesse moyenne de 5,9 mm / jour.



Figure 23: Mesure de l'envahissement mycélien sur le milieu PDA.

Dodileva (1986), a étudié l'impact du milieu nutritifs PDA sur la croissance de mycélium d'*Agaricusbisporus* qui a cloné les spores sur ce milieu et a montré des résultats de croissance rapide en 14 jours.

Nous avons également étudié l'effet de la température d'incubation de (10 °C -20 °C -25 °C -30 °C) sur la vitesse de la croissance du mycélium et les résultats ont montré que la colonie était de 2,57 mm- 21,81 mm- 28,05 mm- 18,97 mm.(**Figure 24**).



Figure 24 : La colonisation totale sur le milieu PDA.

Kuck (1985) a noté que le mycélium dans son ensemble ralentit sa croissance a cause des signes du vieillissement (devient filamenteuse). Et cela est dû à des caractéristiques génétiques et physiologiques du type, la croissance naturelle du mycélium est filamenteuse, qui est la preuve de la force du mycélium (Stoller, 1962 ; Stamets et Chilton, 1983; Stamets, 2000).

1-Les infections primaires

L'étude microbiologique a été réalisée pour connaître le mode de colonisation sur milieu PDA par le mycélium, et pour suivre l'évolution des contaminants bactériens.

Les contaminations prennent l'aspect de taches d'un peu toutes les couleurs (rouge, vert, noir,...) mais le blanc. D'autre ressemblent à un liquide visqueux blanchâtre et émettent une odeur de moisi (infection bactérienne).

Cette infection bactérienne est moins facile à détecter à l'œil nu lorsqu'elle apparaît dans un boîte de Pétri, mais nous avons constaté que le mycélium s'arrête de pousser sans raison, il peut s'agir de cette infection.



Figure 25 :Les infections primaires a gauche : *Penicillium* (bleu) et *Cladosporium* (vert foncé).
A droite : *Aspergillus* (Breene, 1990).

III-La sélection d'un substrat de colonisation

Le principal avantage des céréales, est d'être très nourrissant pour l'*Agaricus bisporus* et qu'elles forment des grains faciles à semer dans le substrat (Ellis, 1979). On utilise différentes sortes de céréales comme du seigle, du blé, du riz ou du sorgho et du maïs.

La structure granulaire permet à un flux d'air humidifié de traverser la masse du produit pendant toute la durée de l'incubation, ce qui permet d'apporter l'oxygène nécessaire à la croissance du mycélium tout en évitant la dessiccation du produit (Sanantonio, 1979 et Smith, 1982) .

Au cours de l'incubation, les boucaux sont peu à peu envahi par le mycélium (**Figure 26, 27**). Celui-ci se développe aussi bien à l'intérieur qu'à la surface des grains qui se trouvent ainsi reliés entre eux. Ceci provoque une prise en masse du produit enrichi qui acquiert une consistance solide spongieuse et aérée.



Figure 26: Envahissement sur le sorgho **Figure 27:** Envahissement sur le et du seigle.

1-Influence de l'aération

Si le substrat est trop dense ou trop aéré, le mycélium le colonisera difficilement. S'il n'est pas assez tassé ou trop tassé, le mycélium ne peut pas respirer: il a besoin d'oxygène et dégagera du gaz carbonique. Une concentration trop faible en O₂ et trop forte en CO₂ ralentira son taux de croissance (Belitskiy et Krasnopolskaya, 2000).

La quantité d'oxygène mise à la disposition du mycélium est un facteur important de son développement. Cette quantité doit être suffisante pour ne pas limiter sa croissance.

Elle dépend de la vitesse de diffusion du flux gazeux dans la masse du produit, de la vitesse de transfert de l'oxygène dans le milieu et de la vitesse de consommation d'O₂ par le mycélium pour sa respiration (Stamets, 2000).

Les résultats sont exprimés sous forme d'histogramme :

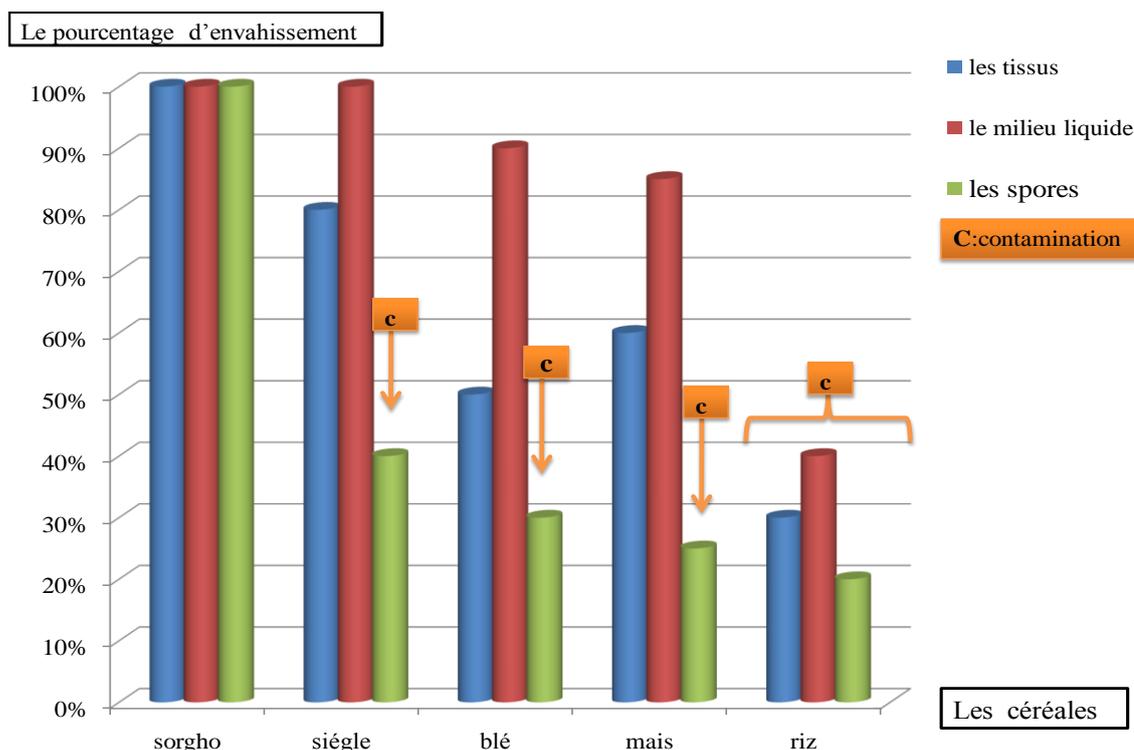


Figure 28: Croissance mycélienne sur les céréales (sorgho. seigle. blé. maïs.riz).

Les résultats démontrent que la croissance mycélienne est élevée dans le substrat de sorgho et du seigle. Le sorgho a une dominance au point de vue résistance pendant la période de stérilisation, les graines ne se brisent pas, ce qui encourage la croissance lombaire du mycélium, les résultats ont montré que la pousse du mycélium apparaît au 6^{ème} jour .pour certains céréale elle peut aller jusqu'aux 15 jours.

Pour les autres céréales (le riz, le blé, et le maïs) on a enregistré une efficacité faible et cela est dû à la rigidité de la croûte cellulosique de l'enveloppe du grain et non à la capacité du mycélium de pénétrer et à se nourrir du stock de protéines (Oie, 2003).

2-Contamination des céréales

L'inconvénient majeur des céréales est qu'elles fournissent un substrat idéal pour d'autres organismes. Les risques de contamination sont donc bien élevés (Zadrazil, 1976).

Le mycélium doit être blanc et s'étendre en dehors du tissu. Si on remarque l'apparition d'un mycélium jaune, bleu, vert ou gris à d'autres endroits de la surface (**Figure 29**), c'est un signe de contamination fongique. Une croissance crémeuse et brillante est souvent le signe d'une contamination bactérienne (Wayne, 2001).



Figure 29: Contamination des substrats de colonisation.

Les plus fréquentes baisses de rendement sont causées par les champignons parasites, les champignons antagonistes, les insectes, les animaux plus gros tels que limaces et rongeurs, les nématodes, les virus pathogènes, les bactéries pathogènes (Morozav, 2005).

Champignons parasites

De nombreux champignons sont des parasites de plusieurs sortes de champignons cultivés. On peut les distinguer par la forme et la couleur de leur mycélium, ou bien par l'observation des symptômes qu'ils occasionnent. La plupart attaquent le mycélium. Une attaque fongique importante aboutit à la perte totale de la récolte (Tanaschuk, 2000).

Champignons antagonistes

Ils concurrencent le mycélium en ce qui concerne les substances nutritives. Certains vont pousser plus vite et donc empêcher le mycélium de coloniser une partie du substrat (Stamets et Chilton, 1983).

3-Les exigences des supports de fructification

Le champignon de couche exige un substrat particulier, une matière première riche en cellulose et en hémicellulose, bien pourvue en azote minéral, en eau et en éléments minéraux. L'implantation de la culture commence donc par le compostage du substrat par d'une microflore très active, qui décomposera la cellulose et les protéines.

4-Envahissement sur les substrats

Le substrat estensemencé de « blanc », au préalable élevé sur grains de céréales. Les bacs sont ensuite installés en salle d'incubation à 25° C, sous un air saturé en humidité et avec une teneur élevée en gaz carbonique (ventilation réduite) pendant 14 jours pour un envahissement du substrat par le mycélium.

5-Etalement du gobetage

La couche de gobetage a 4 avantages différents :

1. Éviter le dessèchement du substrat colonisé.
2. Fournir un micro climat humide pour l'apparition des primordial.
3. Fournir un réservoir d'eau pour les champignons grandissants.
4. Soutenir la croissance des micro-organismes favorisant la pousse et la fructification des champignons.

Les champignons sont composés à 90% d'eau, et le gobetage fournit non seulement de l'eau, mais aide également à produire sa propre humidité en "scellant" les éléments. La couche de gobetage assure alors un échange optimum entre le substrat et le milieu extérieur. D'où l'importance a ce qu'elle ne contienne pas d'éléments nutritifs, la couche de gobetage perd sa fonction de régulateur d'humidité, et devient alors étanche, ce qui empêche les échanges d'air nécessaires à garder une humidité constante et saine, Dans ces conditions, la fructification intervient au terme de 14 jours.

IV-La fructification d'*Agaricusbisporus*

Après la colonisation de terre de gobetage. Nous n'avons pas obtenu de fruits, pour ce la nous avons émis des hypothèses qui sont la suivante :

L'influence du CO₂

L'influence du CO₂ sur la croissance des champignons est très variable d'une espèce à l'autre. En général, la concentration de CO₂ optimale pour la croissance des champignons est faible. Expérimentalement, 0% de CO₂ peut inhiber la croissance (Henked, 1998).

L'action du CO₂ sur la morphogenèse des champignons est soit inhibitrice soit stimulante. Elle dépend de la concentration du CO₂ présent dans l'atmosphère, pour chaque espèce il y a en effet une concentration optimale (Lambert, 2003).

La contamination des substrats de fructification

Pendant l'aération des boîtes. Nous avons remarqué la contamination du marc de café. Et une boîte de fumier de cheval probablement à cause de :

Maladies virales :

Les virus se multiplient en modifiant le système génétique de leur hôte et en ordonnant à celui-ci de produire de nouveaux virus. De nombreux champignons sont sensibles aux infections, elles sont difficilement contrôlables, parce qu'elles se répandent en infectant les spores du champignon, chaque spore peut donc véhiculer la contamination plus loin. Il est donc absolument impératif que le blanc ne soit pas infecté (Stamets, 2000 et Oie, 2003).

Les insectes :

Les mouches et les moucheron sont attirés par l'odeur du substrat, du mycélium lui-même. Une infestation en début de culture (pendant la croissance mycélienne) peut être très dommageable (Singer, 1961), une fois que le tissu est attaqué par les mouches, une contamination par des champignons pathogènes peut facilement se produire (Elliott, 1979).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que le Kit permet une bonne fructification en condition contrôlées, cette fructification permet l'obtention des spores et des tissus frais. Ces derniers peuvent être clonés dans un milieu PDA. En outre, la terre de gobetage a de bonnes performances dans le déroulement de l'expérience, elle permet d'éviter le dessèchement des substrats colonisés, et de fournir un micro climat humide pour l'apparition des primordiaux.

Pour un bon déclenchement des boutons, il faut prendre en considération les conditions suivantes :

Une température comprise entre 16°C et 18°C, une humidité qui avoisine 90% ainsi qu'une concentration en CO₂ élevé.

Pour le milieu PDA, le déclenchement et la vitesse de la culture mycélienne sont meilleures, avec une température de 28°C on a enregistré une colonisation totale dans une période de 17j, avec une moyenne de 5,9 mm / J.

Grace à la disponibilité des sucres dans le milieu liquide, le mycélium a montré une colonisation significative par rapport aux spores et les tissus.

Après la colonisation des spores, des tissus et du milieu liquide dans les céréales, le sorgho et le seigle affichent une croissance mycélienne plus élevée par rapport aux autres substrats de céréales.

Après transfert du blanc du champignon vers les substrats de fructifications, on a constaté que le terreau est le meilleur support d'envahissement, suivie par la vermiculite qui a des propriétés granuleuses permettant une bonne aération des substrats.

En ce qui concerne la purification, nous avons remarqué que le processus d'autoclavage est plus efficace que celui de la pasteurisation.

Dans le cadre d'un travail futur, il est envisageable de :

- Prendre en considération l'influence de la concentration du CO₂, qui peut être soit un stimulant ou un inhibiteur.
- Choisir des souches performantes pour éviter le vieillissement des souches.
- La contamination est considérée comme la première ennemie de la culture des champignons de paris, pour cela il faut éviter les contaminations à travers des infrastructures fiables bien aérées.

Références bibliographique

Références bibliographique

- Aaronson, S. (2000).**Fungi. Dans K.F. Kiple et K.C. Ornelas, eds. *The Cambridge world history of food*, pp 313–336. Cambridge, UK, Cambridge University Press. 1 958 pp.
- Adhikari, M.K., Durrieu, G. (1996).**EthnomycologieNepalaise. *Bulletin Societé Mycologique de France*, 112: 31–41.
- Alexander, S.1., Pilz, D., Weber, N.S., Brown, E., Rockwell, V. A. (2002).** Mushrooms, Trees and Money: Value Estimates of Commercial Mushrooms and Timber in the Pacific Norwest. *Environmental Management* 30 (1): 129-141.
- Amolds, E. (1991).**Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agriculture Ecosystems and Environment* 35: 209-244.
- Arora, D. (1999).** The way of the wild mushroom. *California Wild*, 52(4): 8–19.
- Belitskyi, I. V.,Krasnopolskaya, L. M. (2000).** The edible and medicinal xylothropie mushroom's spawn: growing technology and quality criterions. Scientific j . "Gavrish" 3: 11-15. (in Russian).
- Blinohvatov, A. F., Ivanov, A. E.,Statsenko, A. (2004).** Method of mushroom's spawn quick growing. *Potato and vegetables. J.* 6: 26-27.
- Bouchet, P.H., Guignard, J.L., Villard, J. (1999).**Les champignons, Mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson : Paris. 194 p.
- Breene, W.M. (1990)** Nutritional and médicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*, 53: 883-894.
- Byrne, A.R.,Slejkovec,Z., Stijve, T., Fay, L., Goessler, W., Gailer, J., Irgolic, K. J. (1995).**Arsenobetaine and other arsenic species in mushrooms. *Applied Organometallic Chemistry*, 9(4), 305–313.
- Chabasse, D., Bouchara, J.P., De gentile, L. (2002),** et les moisissures d'intérêt médical. boiforma 160p.
- Chabasse, D. (2001).**Classification des champignons d'intérêt médical. *Ecycl.Med.Chir. Maladies infectieuses*, 15P.
- Chang, R. (1996).**Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition reviews*. 54: 91-93.
- Chang, S.T., Miles, P.G. (2004).**The nutritional attributes of edible mushrooms. Dans: Chang, S.T. & Miles, P.G. (eds), *Mushrooms, Cultivation, Nutritional Value, Médicinal Effect, and Environmental Impact, Second édition*. CRC Press, New York: 27-37.

Chang, S.T. (1999).World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinusedodesin* China. *International Journal of MedicinalMushrooms*, 1: 291–300..

Dodileva, S. I. (1986). High quality spawn production of *Agaricusbisporus*. *J. Mushroom*. p. 45-46 .

Ellis, J. J. (1979). Preserving fungus strains in sterile water. *Mycologia*. 71: 1072-1075.

Esser, K. (1979).Genetic control of fruit body formation in higher basidiomycetes. *Mushroom science*. 1: 1-13.

FAO(2004). Food and Agriculture Organizations of the United Nations, *Wild Edible fungi a global overview of their use and importance to people*.

FAO(2007).Food and Agriculture Organizations of the United Nations, *What are nonwoodforest products*.

Feedrochinko, G. (2004). Mushroom Production. *Horticulture Journal*. 6: 15-19. (in Russian).

Flegg, P., J. Smith. (1982).Effect of spawn strain and available substrate on the relative yield of mushroom. *ScientiaHorticulturae*. 17: 217-222.

Florent, J. (1993).Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriels. Ed. Lavoisier Tec et Doc.612P.

Fries, E. (1821). *Systemamycologicum,sistensFungorumordines,genera et species,hucusquecognias,quas ad normammethodinaturalisdeterminavit, disposutatquediscrisit*.Vol.IGryphiswaldiae,E.Mayritiied ,520 p.

Fritsche, G. (1978). The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic press, New York, USA. p. 239-250.

Goessler, W., Pavkov, M. (2003). Accurate quantification and transformation of arsenic compounds during wet ashing with nitric acid and microwave assisted heating. *Analyst*, 128(6), 796–802.

Griffin, D.H. (1994).*Fungal Physiology, Second édition*. Wiley-Liss, New York.

Guinberteau, J.,Courtecuisse, R. (1997). Diversité des champignons (surtout mycorhiziens) dans les écosystèmes actuels.*Rev.Forest.Française* 49(n° spécial),P25-39.

Hacala, S. (1999). Nutritional and medical values of mushrooms. In: *Advances in horticulture* Malhotra publishing house, New Delhi, pp 537-551.

- Henked, O. (1998).** Procédé pour la culture de champignons de couche, i champignonnière pour la réalisation de ce procédé et installation de climatisation pour la champignonnière. Brevet d'invention N°78 16320. J Publication N°2 393 524.
- Kernaghan, G., Harper, K.A. (2001).** Community structure of fungi across alpine/subalpine ecotone. *Ecography* 24: 181-188.
- Kerrigan, R.W., Royer, J.C., Baller, L.M., Kholi, Y., Horgen, P.A., Anderson, J.B. (1993)** .Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricusbisporus*, *Genetics* 133 .225-236.
- Kuck, U., Osiewacz, H. D., Schmidt,U., Kappelhoff, B., E Schulte,Stahl,U.,Esser, k. (1985).** The onset senescence is affected byDAN rearrangements of discontinuous mitochondrial gene in*Podospora anserine*. *Current Genetic*. 9: 373-382.
- Lamberte, O. (2003).** Effect of excess carbon dioxide on growing mushrooms. *Journal of Agricultural Research* 47(8) : 599-608.
- Lecointre, O.,Le Guyader (2001).** Analyse écologique et patrimoniale des champignons supérieurs dans le tourbières des Alpes du Nord par p 35-336.
- Legendre, L. (1998).** Numerical Ecology. 2nd Ed. Elsevier Science BV, Amsterdam. 853p.
- Locquin, M. (1984).** Mycologie générale et structurale. Ed. Masson. 551P
- Lucia, R.,Victor, M.,Mikel, A.,Alberto, G .,Antonio, A. (2001).** Use of molecular marks to differentiate between commercial strains of the button mushroom *Agaricusbisporus*. *FEMS. Microbiology*. 198: 8-41.
- Mattila, P., Kônkô, K., Eurola, M., Pihlava, J.M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M., Piironen, V. (2001).** Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2343-2348.
- Morozav, A. I. (2005).** Mycelium production. *Fungus Encyclopedia*. 480 pp.
- Nicholas, L.G., Ogame, K. (2006).** Psilocybin Mushroom Handbook. Canada. 209 pp.78.
- Oei, P. (2003).** Mushroom cultivation, appropriate technology for mushroom growers. Netherlands. p. 10-84.
- Otten, N. (1998).** A Canadian perspective. *Value Health*, 1: 218-23.
- Pardo, A., Juan, J. A., Pardo, J. E. (2001).** The culture of mushroom, *Agaricusbisporus*(Lange) Imbach .*Vergel*, An. 20, N 234,p. 348-353, 356.

- Perrin, P. W. (1979).** Long term storage of cultures of wood inhabiting fungi under mineral oil. *Mycologia*. 71: 867.
- Peter, O. (2005).** La culture des champignons à petite échelle. AGRODOG 40.79P
- Philippe, C., Jeanne, G., Micheline, I., Jacques, G., Christophe, D., Jean-Marc, O. (2003).** Unité de recherche sur les champignons, INRA, BP 81,33883 Villenave d'Ornon cedex, France.331-346.
- Pomerleau R. (1980).** *La Flore des Champignons du Québec*. Éditions La Presse, Montréal.
- Ramirez C. (1982).** Manual and atlas of the penicillia. Amsterdam - New York -Oxford. Elsevier Biomédical press. 874p.
- Raper C.A, Raper J.R, Miller R.E. (1972),** Genetic analysis of the life cycle of *Agaricusbisporus*, *Mycologia* 64 .1088-1117.
- Safra A. I. (2000).** Mushroom spawn strains in Russia. *Mushrooming*. 1: 2- 4.
- Sanantonio, J. (1979).** Stability of spawn stock of the cultivated mushroom stored for nine years in liquid nitrogen. *Mushroom Science*. **1: 103-114.** (in French).
- Shallachova N. B., Marteniko L. E. (1985).** The practices questions about mushroom spawn production. *Mushroom Production Journal*. p. 40-41. (In Russian).
- Singer, R. (1961).** Mushrooms and Truffles: Botany, Cultivation and Utilization, Leonard Hill. [Books] Limited, London, UK. 272 pp.
- Stamets P. (2000).** Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3rd edition. Berkeley, California, Ten Speed Press. 574 pp.
- Stamets, P. (2000).** Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3rd edition. Ten speed press, Berkeley, Toronto, Canada. 574 pp.
- Stamets, P. (2005).** Mycelium running, How mushrooms can help save the world. Ten speed press, Berkeley, Toronto, Canada. 339 pp.
- Stamets, P., J. Chilton. (1983).** A practical Guide To Growing Mushroom at Home. Agarikn Press. Olympia, Washington, US. 415 pp.
- Stoller, B.B. (1962).** Some practical aspects of making mushroom spawn. *Mushroomscience*. 5: 170-184.
- Tachenon A. (1999).** La science du champignons. [ht://www.Tachenon.Com](http://www.Tachenon.Com).

Tanaschuk, T. N. (2000). The technical of mushroom (*Lentinula edodes*) production on wine grapes waste. Magazine, Russia and wine grapes. N° 1. P. 30- 32.

Valentão P, Lopes G, Valente M, Barbosa P, Andrade P.B., Silva B.M., Baptista P, Seabra R.M. (2005). Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 3626-3630.

Verfaillie, M. (1998). Safety device of breeding mycelium. Champignon. 401: 18-21. (in German).

Vertil, H. (2012). Illustration de la reproduction des Basidiomycètes [En ligne] <http://hortidact.over-blog.com/article-autres-types-de-reproduction86490630.html>, [consulté le 14/03/2012].

Wayne, R. R. (2001). Growing mushroom the easy way. Mushroom science. 1: 37.

Wittaker, R.H . (1969). Analyse écologique et patrimoniale des champignons supérieurs dans le tourbières des Alpes du Nord par p 34-336.

Wozniak, W., Muras, U., Korzeniewska, A., Gapinski, M. (2001). Growth of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing mycelium as influenced by production method Vegetable crops research bull. Skierniewice. V.54, N°. 2. P.83-86.

Zadrazil, F. (1976). The ecology and industrial production of *pleurotus ostreatus*, *p. florida*, *p. cornucopiae*, and *p. eryngii*. Mushroom science.1: 621-652.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Marges de températures nécessaires aux champignons cultivés(Olivier. 1991).

Espèce de champignon	T° cr. m.	T° cr. m. optimale	T° de fructification
<i>Agaricus bisporus</i>	10-32	20-28	10-20
<i>Agaricus bitorquis</i>	25-31	30	25-30
<i>Agaricus blazei</i>	n.d.	30	20-25
<i>Volvariella</i> <i>Volvacea</i>	20-40	30-35	30-32
<p>T° cr. m: température de viabilité du mycélium : la vitesse de croissance décline au-delà de cette marge.</p> <p>T° cr. m. optimale: la marge de température de croissance idéale pour l'incubation.</p> <p>T° de fructification: la marge de température requise pour la fructification.</p> <p>Techniques de préparation du substrat :</p> <p>1 : autoclavage et pasteurisation du substrat.</p> <p>2 : Pasteurisation du substrat.</p>			

Annexe2:Formules de milieu de culture PDA pour1 litre d'eau.

Ingrédients	quantité
pommes de terre	200g
l'agar poudre	20g
dextrose ou de sucre blanc ordinaire	20g
l'eau	1litre

Annexe 3 :Les distances polaires et équatoriales des spores d'*Agaricusbisporus*.

Les spores sélectionnées	longueur	largeur
Spore 1	7,32714748 µm	5,15190887 µm
Spore 2	5,15190887 µm	5,15190887 µm
Spore 3	5,15190887 µm	5,15190887 µm
Spore 4	5,15190887 µm	5,15190887 µm
Spore 5	5,15190887 µm	5,15190887 µm
Spore 6	7,30564976 µm	5,38442564 µm
Spore 7	6,8882556 µm	5,02281046 µm
Spore 8	6,90877533 µm	5,85086203 µm
Spore 9	7,70929861 µm	5,81016111 µm
Spore 10	6,82094669 µm	5,60068893 µm
Spore 11	6,55679893 µm	5,10491562 µm
Spore 12	6,97899342 µm	5,22016811 µm
Spore 13	7,3528614 µm	5,75516462 µm
Spore 14	7,12545061 µm	5,41865873 µm
Spore 15	6,65599966 µm	5,06368399 µm
Spore 16	6,86614704 µm	5,59897518 µm
Spore 17	6,32977819 µm	4,84986067 µm
Spore 18	6,88444853 µm	5,75419521 µm
Spore 19	7,19501162 µm	5,24817181 µm
Spore 20	7,19501162 µm	5,36622143 µm
Spore 21	7,48641348 µm	5,47579002 µm
Spore 22	7,43017673 µm	5,47579002 µm
Spore 23	7,41392994 µm	5,39275551 µm

Nom : KERFEZ Prénom : Khaoula
Nom : BRIK Prénom : Oussama
Mémoire pour l'obtention du diplôme de : master 2 en biotechnologie végétale
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Master Biologie et Génomique Végétale

Option : biologie et génomique végétale

Thème : la culture et clonage d'un tissu de champignon de paris (*Agaricusbisporus*)

Résumé :

La culture des champignons est très bien adaptée à l'agriculture durable et a plusieurs avantages : Elle réutilise les déchets agricoles, donne une production élevée par surface cultivée et le substrat utilisé après la récolte fournit un excellent amendement du sol. Les champignons constituent un apport supplémentaire de protéines, de vitamines indispensables et de minéraux, enfin, elle procure des revenus non négligeables. L'Algérie est très riche d'un grand nombre d'espèces de champignons, parmi lesquelles certains sont comestibles et sont d'excellentes qualités.

L'objectif de ce travail est de favoriser à partir de la culture d'*Agaricusbisporus*, le développement du mycélium sur un substrat adéquat et stérile à base de grains de sorgho, blé dur, maïs, seigle et du riz. Le produit obtenu à l'issue de cette opération est appelé « blanc-mère » ou « blanc de semis » qui sera utilisé ultérieurement pour ensemercer le substrat de fructification qui est à base de fumier de cheval, marc de café, terreau, et de vermiculite. A partir des Kits de cultures, on a réalisé des cultures pures de mycélium sur milieu gélosé (PDA), qu'on a ensuite inoculé dans différents substrats de semis dans des conditions de stricte asepsie. Nous avons pu conclure d'après les résultats obtenus, que le substrat constitué de grains de sorgho et de seigle, a permis une meilleure conservation du mycélium, et que le terreau représente le meilleur support d'envahissement par rapport aux autres supports de fructification.

Mots clé : champignon, mycélium, *Agaricusbisporus*, substrats de colonisation, supports de fructification

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. YKHLEF N.

Pr. Université F M Constantine

Rapporteur : Pr. DJEKOUN A.

Pr. Université F M Constantine.

Examineurs : Dr. MAOUGAL R.T.

M.C.B. INATAA. Université F M Constantine.

Année universitaire : 2014/2015

