

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Microbiologie



Mémoire présenté

En vue de l'obtention du diplôme de Master Biotechnologie des mycètes
Option: Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et Production de
Substance Fongique

Thème

Activités antifongiques des métabolites secondaires de *Trichoderma harzianum* vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes

Présenté par :

M'zahem Rayene & Mihoubi Romeissa

Devant le jury :

Président : Mr. DEHIMAT L. Pr. Université des Frères Mentouri Constantine 1

Examineur : Mr. OUFROUKH A. Directeur INRA, Constantine.

Encadreur: M^{elle} ALMI HIBA MAB. Université des Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire

2016-2017

Dédicaces



*Nous dédions ce modeste travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde : **nos parents**, que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.*



A nos frères et sœurs....



A nos amis...



*A toute la famille **Mihoubi et M'zahem***



Romeissa & Rayenne



Remerciements



*Nous tenons à exprimer toute notre gratitude, notre reconnaissance et nos sincères remerciements à M^{elle}: **Almi Hiba**, l'encadreur de notre mémoire, pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail et de nous avoir fait profiter de ses connaissances scientifiques.*

*Nos remerciements vont également aux membres du jury Mr. Le professeur. **Dehimat L.**, et **Mr. Oufroukh A.** (INRA -Constantine) qui nous font le grand honneur d'évaluer ce travail. Qu'ils trouvent, à travers ce travail, l'expression de notre profonde reconnaissance.*

Table de matières

- Dédicace
- Remerciements
- Liste des abréviations
- Liste des figures
- Liste des tableaux

I. Introduction	1
II. Revue bibliographique	3
II.1. Le règne de Fungi	3
II.2. Caractéristiques morphologiques.....	3
II.3. Mode de reproduction.....	4
II.3.1 Reproduction asexuée.....	4
II.3.2. Reproduction sexuée.....	5
II.4. Classification.....	5
II.5. Conditions de développement des mycètes.....	6
II.6. Maladies fongiques des légumes.....	6
II.6.1. Les légumes.....	7
II.6.2. Maladies fongiques des légumes.....	7
II.6.3. Cycle de vie des maladies cryptogamiques.....	7
II.6.4. Principaux maladies fongiques des légumes.....	8
II.6.4.1. Maladies fongiques de la tomate.....	8
II.6.4.2. Maladies fongiques de la carotte.....	10
II.6.4.3. Maladies fongiques de la courgette.....	11
II.7. Lutte biologique par utilisation de <i>Trichoderla harzianum</i>	12
II.7.1. La lutte biologique.....	12
II.7.2. <i>Trichoderma harzianum</i>	12

II.7.2.1. Généralités.....	12
II.7.2.2. Morphologie.....	12
II.7.2.3. Taxonomie.....	14
II.7.2.4. Reproduction.....	15
II.7.2.5. Mode d'action	15
➤ Mycoparasitisme.....	15
➤ Antibiose.....	15
➤ Compétition.....	15
II.7.3. Les métabolites de <i>Trichoderma harzianum</i>	16
III. Matériel et méthodes.....	19
III.1. Matériel	19
III.1.1. Matériel végétal	19
III.1.2. Matériel biologique	19
III.1.2.1. La souche antagoniste	19
III.1.2.2. Les souches pathogènes.....	19
III.1.3. Milieux de culture	20
III.2. Méthodologie.....	20
III.2.1. Méthode d'isolement.....	20
III.2.2. Méthode de purification	20
III.2.3. Méthodes d'identification.....	21
III.2.4. Réactivation de la souche antagoniste	21
III.2.5. Méthode de lutte par <i>Trichoderma harzianum</i>	21
III.2.5.1. Les tests d'antagonisme.....	21
➤ Méthode de confrontation directe.....	21
➤ Méthode de confrontation indirecte	22
➤ Test d'activité antifongique par des métabolites secondaire de T. harzianum	23

1. Choix de milieu de culture pour fermentation.....	23
2. La fermentation	24
3. Test d'activité antifongique	24
➤ Etude de l'activité enzymatique de la souche antagoniste	24
1. L'activité protéase.....	24
2. L'activité cellulase.....	24
3. L'activité lipase.....	25
IV. Résultats et discussion.....	26
IV.1. Aspect macroscopique des légumes contaminés.....	26
IV.2. Isolement et purification des souches fongiques à partir des légumes infectés.....	26
IV.3. Identification.....	26
IV.3.1. Etude macroscopique.....	26
IV.3.2. Etude microscopique des isolats	28
IV.4. Fermentation liquide.....	29
IV.4.1. Choix de milieu de culture.....	29
IV.5. Les tests d'antagonisme	30
IV.5.1. Test de confrontation directe.....	30
IV.5.2. Test de confrontation indirecte.....	34
IV.5.3. Test d'activité antifongique par les métabolites secondaire de <i>T. harzianum</i>	37
IV.6. Test de l'activité enzymatique de la souche antagoniste.....	38
IV.6.1. Test de l'activité protéase.....	38
IV.6.2. Test de l'activité cellulase.....	39
IV.6.3. Test de l'activité lipase.....	39
V. Conclusion.....	41
VI. Références bibliographiques.....	43
Résumé.....	52
Abstract.....	53

ملخص.....	54
Annexe.....	55

Liste des abréviations

% : pourcentage

C° : degré Celsius

al : Collaborateurs

sp : Espèce

N° : numéro

PDA : Potato Dextrose Agar

pH : Potentiel d'hydrogène

cm : Centimètre

mm : millimètre

ml : millilitre

min : Minute

v : volume

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de <i>Trichoderma harzianum</i>	14
Tableau 02 : Les principales substances bioactives de <i>Trichoderma harzianum</i>	17
Tableau 03 : Les différentes caractéristiques macroscopique des isolats.....	27
Tableau 04 : Les différentes caractéristiques microscopique des isolats pathogènes.....	28
Tableau 05 : L'effet inhibiteur de <i>T. harzianum</i> sur la croissance mycélienne des souches pathogènes (confrontation directe) après 7 jours d'incubation.....	31
Tableau 06 : L'effet inhibiteur de <i>T. harzianum</i> sur la croissance mycélienne des souches pathogènes (test indirect).....	35
Tableau 07 : L'effet inhibiteur des métabolites secondaires de <i>T. harzianum</i> sur la croissance mycélienne des souches pathogènes.....	37

Liste des figures

Figure 01 : Structure de l'hyphe chez les champignons filamenteux (Chabasse <i>et al.</i> , 2002).....	03
Figure 02 : Schématisation de la structure de la paroi fongique (Nwe et Stevens, 2008).....	04
Figure 03 . Représentation schématique de quelques types de spores (Prescott <i>et al.</i> , 2003).....	05
Figure 04 : Symptôme du mildiou sur le fruit de la tomate (A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B).....	08
Figure 05 : Symptôme d'Alternariose sur le fruit de la tomate (A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B).....	09
Figure 06 : Symptôme d'Oïdium sur la feuille de la tomate (A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B).....	09
Figure 07 : symptômes de la sclerotiniose chez la carotte(A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B).....	10
Figure 08 :(A) Pourriture noire sur carotte, (B) Aspect microscopique de l'agent causal <i>Alternaria radicina</i>	10
Figure 09 : Symptômes de L'oïdium chez la feuille de la courgette (A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B).....	11
Figure 10 : Pourriture grise sur la courgette (A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B).....	11
Figure 11 : Aspect microscopique (A) et macroscopique (B) de <i>Trichoderma harzianum</i>	13
Figure 12 : Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma harzianum</i> (Samuels <i>et al.</i> , 1994).....	14
Figure 13 : Présentation schématique de la confrontation directe.....	22
Figure 14 : Présentation schématique de la confrontation indirecte.....	23
Figure 15 : Aspect macroscopique des légumes contaminés, (A) Courgette, (B) Tomate, (C) Carotte.....	26
Figure 16 : Aspect macroscopique de <i>T. harzianum</i> sur différents milieux de cultures.....	29
Figure 17 : Courbes de croissance de <i>T. harzianum</i> sur différents milieux de culture.....	30
Figure 18 : Inhibition de la croissance de <i>Botrytis sp</i> en présence de <i>T.harzianum</i> (test direct).....	32
Figure 19 : Inhibition de la croissance de <i>Penicillium sp</i> en présence de <i>T.harzianum</i> (test direct).....	33
Figure 20 : Inhibition de la croissance d' <i>Alternaria sp</i> en présence de <i>T.harzianum</i> (test direct).....	33
Figure 21 : Inhibition de la croissance de <i>Fusarium sp</i> en présence de <i>T.harzianum</i> (test direct).....	34
Figure 22 : Inhibition de la croissance de <i>Botrytis sp</i> , <i>Alternaria sp</i> , <i>Penicillium sp</i> et <i>Fusarium sp</i> en présence et en absence de <i>T. harzianum</i> (test indirect).....	37
Figure 23 : Test de l'activité protéolytique de <i>T. harzianum</i>	38
Figure 24 : Test de l'activité cellulase de <i>T. harzianum</i>	39

Figure 25: Test de l'activité lipase de *T. harzianum*.....39

I. Introduction

Les légumes en Algérie et dans de très nombreux pays du monde, sont la base de l'alimentation humaine. Et donc des superficies intensifiées ont été réservées à leurs production, une telle intensification basée sur l'utilisation des variétés à haut rendement, exigeantes en fertilisation, en eau, et en d'autres opérations culturales, permet aux légumes d'avoir un bon développement végétatif, ombragé et humide, mais Malheureusement ces cultures sont souvent confrontées à diverses maladies. Parmi les ennemis de ces grandes cultures, les maladies fongiques qui sont vraisemblablement les plus graves. Leur installation et propagation entraînent des pertes, parfois très importantes, au niveau de la production tant quantitativement que qualitativement. La lutte contre ces maladies fongiques constitue par conséquent l'une des actions incontournables pour accroître la production des grandes cultures dans un contexte d'agriculture moderne. Mais, la recherche et la proposition de méthodes de lutte à utiliser passent, obligatoirement, par l'identification et la caractérisation des champignons responsables grâce à leur morphologie et biologie et par la reconnaissance des maladies grâce aux symptômes qu'elles provoquent chez le légume infecté.

Pour réduire de façon significative l'impact négatif d'utilisation des produits chimiques contre les champignons phytopathogènes sur l'environnement, des recherches sont menées dans ce domaine, qui tend à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte moins nuisibles pour l'environnement.

La lutte biologique, par l'utilisation de microorganismes producteurs de substances à effet antifongique. Se considère comme une alternative très prometteuse, à cause de l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes. Ces dernières se caractérisent par leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action ainsi leur persistance dans l'environnement (De Kouassi, 2001). De ce fait, pour entreprendre une Lutte biologique contre les maladies des plantes, le choix des microorganismes antagonistes des agents pathogènes est un critère très important.

Les *Trichoderma* sp. Sont parmi les champignons du sol qui ont un potentiel antagoniste significatif contre une large gamme de champignons phytopathogènes (Tondje *et al.*, 2007). Les *Trichoderma* sont déjà commercialisés pour le contrôle biologique de nombreux agents pathogènes des plantes. Ils sont caractérisés par une croissance rapide, une aptitude importante à la compétition et à la stimulation des systèmes de défense. Ils sont capables de persister dans le sol et de coloniser les racines des plantes (Verma *et al.*, 2007 ; Vinale *et al.*, 2008).

Dans cette optique, s'inscrit l'objectif de notre travail qui se dirige vers " la lutte biologique par l'utilisation de *Trichoderma harzianum* ". La première partie de notre travail est propre à la description de données bibliographiques relatives aux champignons d'une manière générale, présentation des agents pathogènes des maladies fongiques chez la tomate, carotte, et courgette. Et finalement porter une étude sur l'antagoniste *Trichoderma Harzianum* et sa production par voie de fermentation.

La seconde partie est consacrée au travail expérimental, réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'activité microbienne (Université des frères Mentouri Constantine). Cette partie a abordé les points suivants :

- L'isolement de l'agent pathogène, à partir des espèces végétales infectées (légumes).
- L'identification et caractérisation, macroscopique et microscopique des isolats pathogènes.
- Etude de croissance de *T. harzianum* sur divers milieux de cultures solides.
- production, par fermentation et extraction, des métabolites bioactif de la souche antagoniste.
- vérification des propriétés antagonistes, de *Trichoderma harzianum*

Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion générale et la projection des Perspectives de recherche.

II. Revue bibliographique

II.1. Le règne de Fungi

Les champignons présentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur Terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Ils forment un royaume à part: les FUNGI. Ce groupe extrêmement diversifié comprend sans doute plus de 120 000 espèces présentant des structures et des caractéristiques biologiques adaptés au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique (Senalet *et al.* 1993 ; Anonyme a, 2000 ; Anonyme b, 2000 ; Kirk *et al.* 2001).

Les mycètes sont des eucaryotes uni- ou pluricellulaires d'aspect filamenteux (Tabuc, 2007), immobiles, les uns microscopiques (micromycètes), d'autres sont visibles (macromycètes) lorsque leur développement soit assez important. Ils sont dépourvus de pigments assimilateurs de type chlorophylle et sont donc incapables de photosynthèse. Il s'agit d'organismes hétérotrophes ubiquistes dont la nutrition carbonée est dépendante de la présence de matière organique préformée. C'est le thalle ou le filament mycélien qui assure la nutrition, celle-ci se fait par absorption tout en libérant dans un premier temps des enzymes hydrolytiques dans le milieu extérieur.

II.2. Caractéristiques morphologiques

L'organisme vivant des champignons est un thalle formant le corps végétatif. Il est composé de filaments ou hyphes tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 10 μ m et sont plus ou moins ramifiés, et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium. Généralement, les hyphes sont divisés par des cloisons, ou Septa contenant un seule noyau, on les appelle des hyphes cloisonnés ou «septés» alors que chez d'autres, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, l'hyphe est alors dit coenocytique ou « siphonné » (Figure 1).



Figure 1 : Structure de l'hyphe chez les champignons filamenteux : (a) hyphe coenocytique, (b) hyphe cloisonnée

Les champignons filamenteux possèdent une paroi cellulaire, elle représente 20 à 30% du poids sec du mycélium, la composition peut varier en fonction des espèces et des conditions environnementales. Elle est majoritairement composée de microfibrilles de glucanes et de chitine, un polysaccharide très résistant. Chez certains chytridiomycètes, elle est remplacée par de la cellulose. La paroi est souvent recouverte de mannoprotéines, formant une matrice autour de la paroi. Des glycoprotéines peuvent aussi être présentes et assurent l'adhérence (Figure 2).

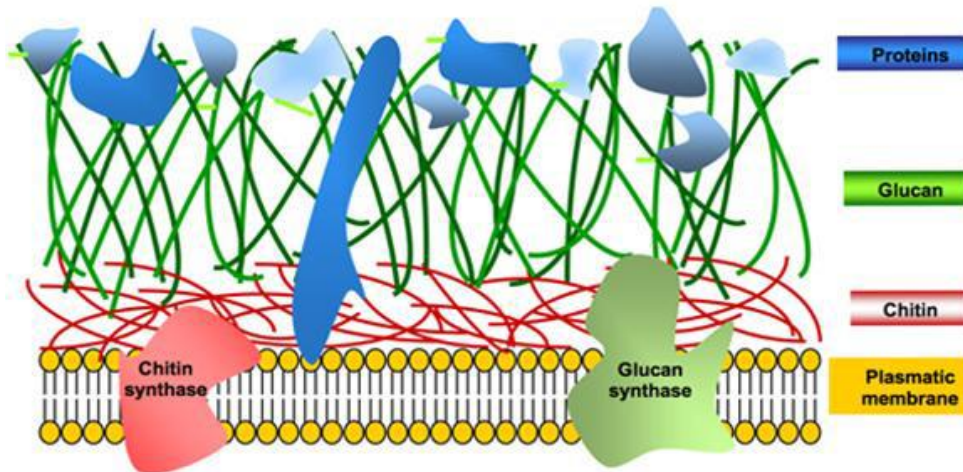


Figure 2 : Schématisation de la structure de la paroi fongique.

II.3. Modes de Reproduction

Les champignons produisent des organes de reproduction que l'on appelle de façon générale spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose que l'on appelle fréquemment conidies.

II.3.1. Reproduction asexuée

Le mode le plus commun de reproduction asexuée, est la production de spores (Figure 03). Les spores asexuées sont produites chez un mycète par une mitose suivie d'une division cellulaire (Prescott *et al.*, 2003). Trois mécanismes principaux peuvent être rencontrés (Leyral et Vierling, 2007) :

- Des spores sont produites par transformation des cellules du thalle: thallospores(Arthrospores).Un nouvel organisme se développe à partir d'un fragment parent de mycélium.
- Des cellules fongiques se multiplient et se différencient pour former le conidiophore, sur lequel se forment les conidies.
- Les sporangiospores sont des cellules flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.

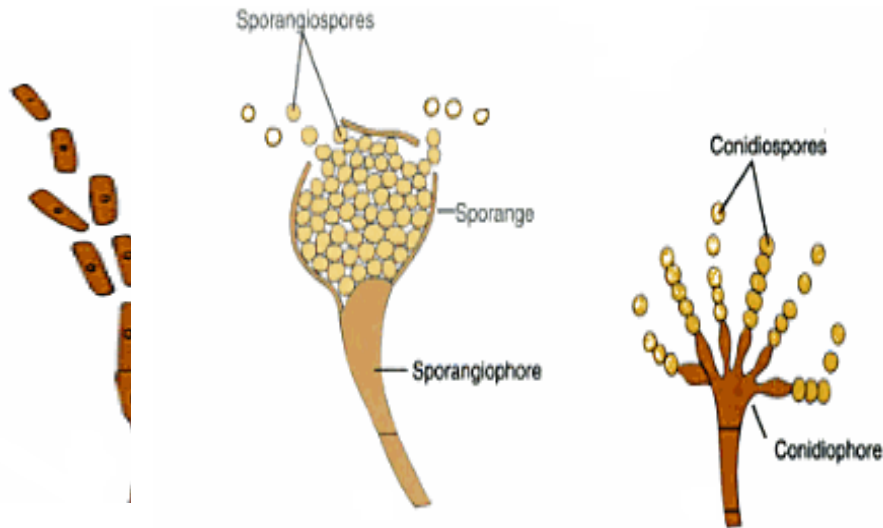


Figure 03. Représentation schématique de quelques types de spores (Prescott *et al.*, 2003).

II.3.2 Reproduction sexuée

La reproduction sexuée se déroule en trois étapes : plasmogamie, caryogamie et méiose (Jennings et Lysek, 1996). La plasmogamie correspond à la fusion cellulaire entre deux cellules haploïdes. La cellule résultante est appelée dicaryon car elle possède deux types de noyaux haploïdes. Les deux noyaux vont fusionner lors de la caryogamie puis la méiose va convertir une cellule diploïde en quatre cellules haploïdes (Carlile et Watkinson, 1994).

II.4. Classification

La classification des champignons est basée sur le mode de reproduction sexuée. Les champignons appartenant au règne des *Eumycota* sont des champignons pour lesquels le mode de reproduction sexuée est connu. On parle alors de champignons téléomorphes. Pour certains champignons appelés anamorphes, le mode de reproduction sexuée est inconnu et seule une multiplication asexuée ou végétative est observée. L'ensemble de ces

champignons sont regroupés au sein de la division des *Deuteromycota*, que l'on appelle aussi « champignons imparfaits » ou *Fungi imperfecti qui* sont divisés en trois classes : les *Blastomycètes*, les *Hyphomycètes* et les *Coelomycètes*. En ce qui concerne les *Eumycota*, ils regroupent les sous divisions : *Ascomycètes*, *Basidiomycètes*, *Chytridiomycètes*, *Zygomycètes* et *Gloméromycètes*.

II.5. Conditions de développement des mycètes

Bien qu'ils soient relativement peu exigeants, un certain nombre de facteurs nutritifs et environnementaux doivent être à leur disposition pour que les champignons se développent (Roquebert, 1998).

En effet, les mycètes se développent dans des zones de pH légèrement acide comprises entre 3 et 6 et à des températures optimales aux alentours de 20-25°C. Ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (Davet, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur leur développement non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (Bourgeois, 1989). La quantité d'oxygène mise à la disposition des mycètes est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeants vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur. Certains peuvent même supporter une anaérobiose très stricte.

Les éléments nutritifs les plus importants sont le carbone, l'azote minéral, azote organique (peptone) comme composés organiques. Les ions minéraux avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce comme le potassium, le phosphore, le magnésium.

Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc. (Boiron, 1996). Les acides aminés peuvent pénétrer dans la cellule sans Transformation, alors que des molécules complexes comme l'amidon, la cellulose ou les protéines nécessitent une digestion enzymatique préalable. Cette digestion s'effectue par production d'enzymes ou d'acides par le champignon.

II.6. Maladies fongiques des légumes

II.6.1. Les légumes

En terme de surfaces et de quantité produite, les légumes constituent la seconde famille de plante cultivées après les céréales (Gepts et *al.*, 2005). En botanique, « légume » désigne le fruit des légumineuses ou Fabaceae, les Légumes comptent plusieurs espèces qui sont caractérisées par des fleurs à cinq pétales et un ovaire supérieur qui forme une gousse remplie de graines riches en protéines. Par ailleurs, ces plantes ont la capacité de former des symbioses avec des espèces fongiques, et peuvent devenir des excellents hôtes pour ces champignons.

II.6.2. Maladies Cryptogamiques

Aussi appelées maladies cryptogamiques, les maladies fongiques des légumes sont causées par l'attaque d'un ou plusieurs champignons parasites microscopiques, d'une plante vivantes tout en s'alimentant du contenu de leurs cellules. Elle doit son nom à l'ancienne classification des champignons dans les plantes cryptogames et d'autres enfin s'attaquent aux plantes. Ce type de maladie représente près de 80 % des problèmes rencontrés au jardin ou sur les cultures d'intérieur.

II.6.3. Cycle de vie des maladies Cryptogamiques

La plante est susceptible d'être affectée par les parasites fongiques en deux phases successives :

- Contamination : Ces champignons se propagent sous formes de spores .Conservées dans le sol, ou présentes sur une plante infectée à proximité, ces spores sont dispersées par le vent, la pluie, les animaux, l'homme. Lorsque les conditions climatiques propres à chaque champignon sont réunies, elles germent et pénètrent les tissus, par voie naturelle ou en profitant des blessures causées par d'autres parasites, ou en passant par les orifices naturels

- Période d'incubation : durant la quelle le champignon se ramifie et envahit les cellules des tissus ou les espaces intercellulaires. A ce stade la plante est déjà contaminée même si elle ne présente encore aucun symptôme. Ceux-ci apparaissent dans un troisième temps qui coïncide souvent avec l'émission de nouvelles spores.

La plante attaquée peut dépérir : nécrose des feuilles et des tissus, détournement de la sève, obstruction des vaisseaux.

II.6.4. Principales maladies fongiques des Légumes

Malgré l'importance des Légumes, les rendements de ces cultures n'ont que très peu progressé. Les maladies fongiques en sont l'un des principaux facteurs limitants (Graham and Vance, 2003; Popelka et al., 2004; Dita et al., 2006).

II.6.4.1 Maladies fongiques de la tomate :

Les tomates sont sujettes à de nombreuses maladies fongiques, notamment lors d'été pluvieux, cependant ils peuvent en affecter leur croissance, voire détériorer complètement les plants, les plus fréquentes sont :

- Le mildiou : le mildiou est la maladie la plus redoutée pour les tomates. Causé principalement par *Phytophthora nicotianae*. Il peut anéantir une récolte ainsi que les plants en quelques jours. Il est susceptible de produire des lésions brunes sur les fruits de tomate (Figure 04).



Figure 04: Symptôme du mildiou sur le fruit de la tomate (A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B)

- L'alternariose : des températures douces et de l'humidité (pluies, condensation sous une serre) sont des facteurs favorisant pour cette maladie dont les spores et le

mycélium d'*Alternaria solani* engendrant chez la tomate des taches brun-noir, nécrotiques, d'environ 5mm de diamètre, (figure 05).



Figure 05 : Symptôme d'Alternariose sur le fruit de la tomate (A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B)

- L'oïdium : maladie bien connue des jardiniers, l'oïdium, ou maladie du blanc, n'épargne pas la tomate causée par la forme asexuée des champignons *Leveillula taurica*. C'est surtout au printemps, et à la fin de l'été, que ce champignon fait des ravages. Les taches d'oïdium sont jaunes sur la face supérieure et recouverte d'un feutrage blanc poudreux sur la face inférieure (Figure 06)

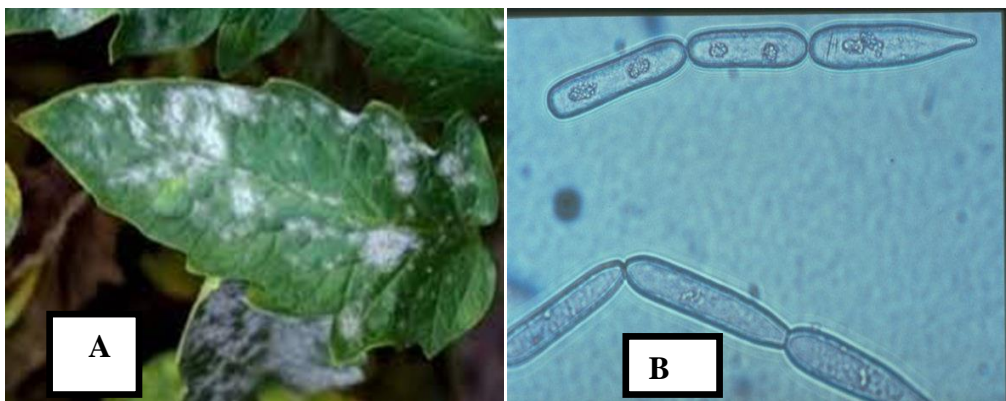


Figure 06 : Symptôme d'Oïdium sur la feuille de la tomate (A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B)

II.6.4.2. Maladies fongiques de la carotte

- La sclerotiniose : appelé également ‘pourriture blanche, elle se repère par la présence de taches noires, associées à une pourriture molle et blanche sur les racines (figure 07). Elle est due à *Sclerotinia sclerotiorum*, un champignon conservé dans le sol après développement sur une culture.

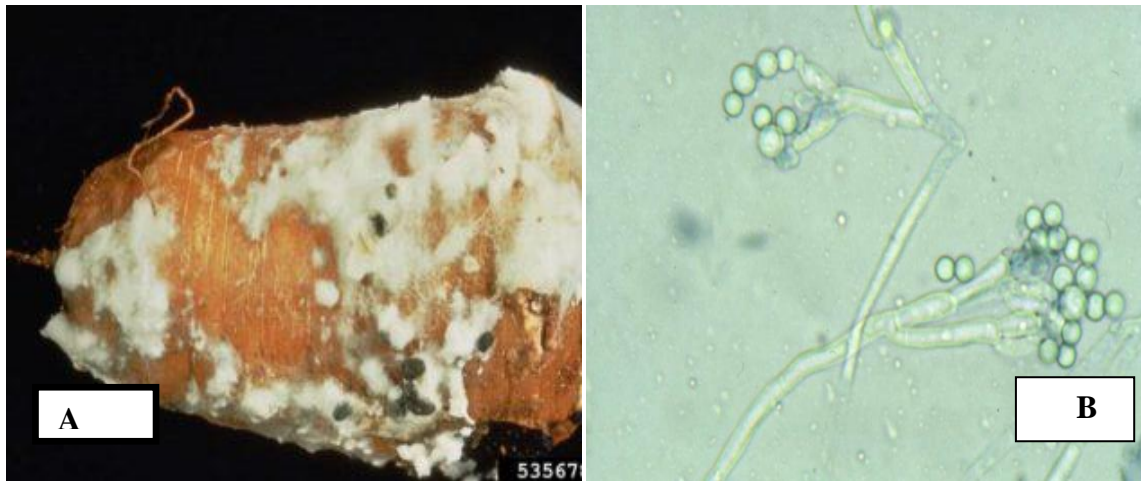


Figure 07 : symptômes de la sclerotiniose chez la carotte(A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B)

- **Maladie de la pourriture noire** : une maladie causée par les champignons *Alternaria radicina*. Elle se caractérise par une pourriture noire luisante dans la région du collet et une moisissure noir verdâtre sur la racine principale (figure 08).



Figure 08 :(A) Pourriture noire sur carotte, (B) Aspect microscopique de l'agent causal.

II.6.4.3. Maladies fongiques de la courgette

- L'oïdium : la principale maladie des courgettes c'est l'oïdium, fréquent en fin d'été et en automne, par temps humide. Est du à *Erysiphe cichoracearum*. Il se manifeste d'abord par l'apparition de taches circulaires blanches et poudreuses (figure 09).

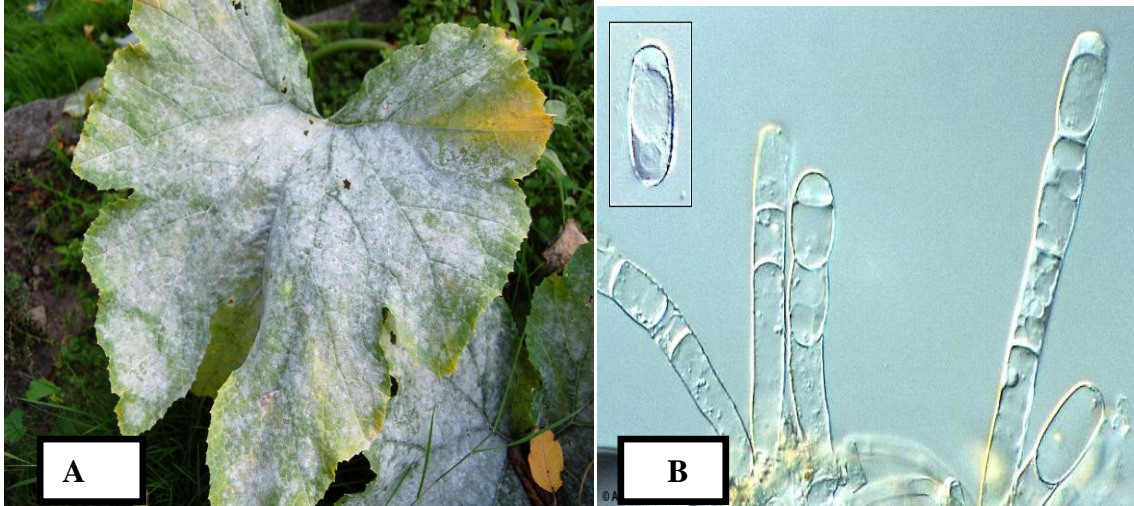


Figure 09 : Symptômes de L'oïdium chez la feuille de la courgette (A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B)

- La pourriture grise : elle est parfois appelée Moisissure grise ou Botrytis, causée par le champignon *Botrytis cinerea*. Des parties molles et déprimées apparaissent sur les courgettes, puis s'étendent et elles se couvrent alors de moisissure grise (figure 10).

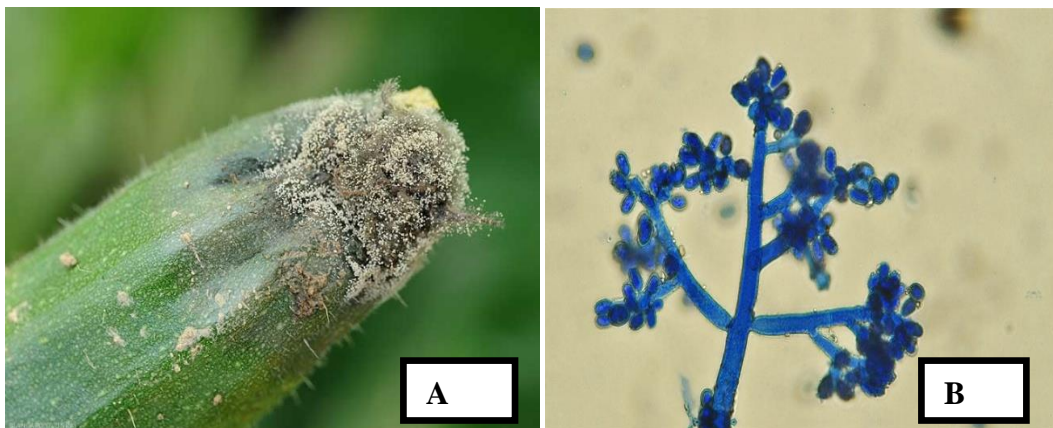


Figure 10 : Pourriture grise sur la courgette(A) et l'aspect microscopique de l'agent causal (B)

II.7. Lutte Biologique par utilisation de *Trichoderma harzianum*

II.7.1. La lutte biologique

Elle consiste à utiliser des organismes vivants, appelés auxiliaires, ou de leurs produits, pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les bio-agresseurs. Il s'agit d'utiliser la biodiversité et les ennemis naturels des espèces nuisibles (Fernandes, 2005). La réussite de la lutte biologique nécessite l'application d'un agent de bio contrôle efficace. L'efficacité est notamment liée à l'utilisation de plusieurs modes d'action (Cook, 1993 ; Benbrook *et al.*, 1996) et à la capacité de l'agent de lutte biologique à coloniser et à s'installer dans le milieu rhizosphérique des plantes (Singh *et al.*, 2003). Parmi les champignons, les *Trichoderma* forment un important groupe d'antagonistes.

II.7.2. *Trichoderma harzianum*

II.7.2.1. Généralités

Le terme «*Trichoderma*» a été utilisé pour la première fois par le mycologue sud-africain Christiaan Hendrik Persoon en 1794. C'est le premier qui a décrit le genre *Trichoderma* à partir des échantillons collectés en Allemagne.

En milieu terrestre, leur production de substances bioactives et leur développement rapide font des *Trichoderma* des agents potentiels en agroalimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (Prieto *et al.* 1997) ; utilisés comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (Roquebert, 1996 ; Cooney *et al.*, 1997 ; Prieto *et al.*, 1997 ; Grondona *et al.*, 1997 ; Verbist, 2000 ; Kubicek *et al.*, 2003)

II.7.2.2. Morphologie

Depuis la révision du genre *Trichoderma* par Rifai en 1969, les caractéristiques morphologiques sont utilisées pour caractériser et distinguer les espèces de *Trichoderma* (Gams et Bissett, 2002). En outre, Samuels *et al.* (2015) ont également fourni des observations détaillées sur les caractères morphologiques des espèces définies de *Trichoderma*.

L'aspect macroscopique des *Trichoderma* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes (figure 11). Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides.

T. harzianum peut être distingué des espèces morphologiquement similaires, tels que *T. aggressivum* et *T. atroviride* en les cultivant à 35 °C. Après 96 heures d'incubation à 35 °C, le diamètre des colonies de *T. aggressivum* et *T. atroviride* ne dépasse les 5 mm, tandis que celui de *T. harzianum* présente une bonne croissance et sporulation (Samuels, 2004).

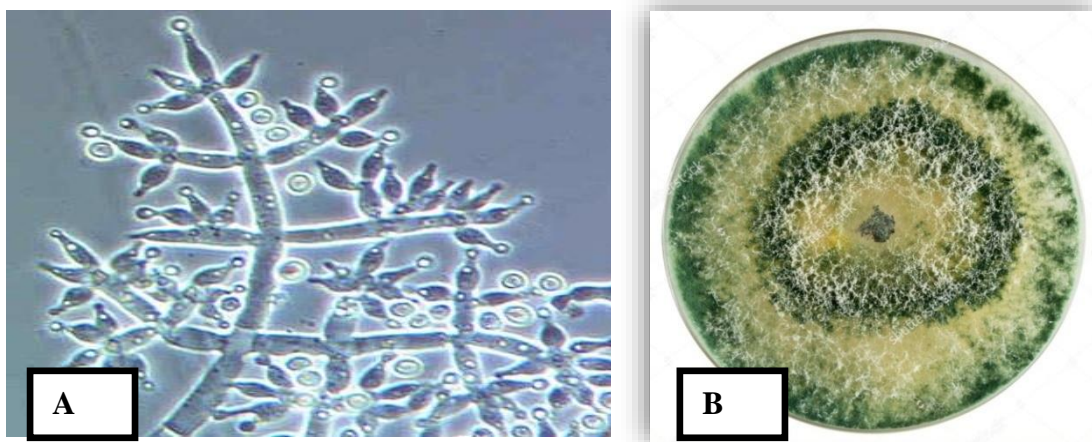


Figure 11 : Aspect microscopique (A) et macroscopique (B) de *Trichoderma harzianum*

Au microscope optique un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses a été observé. Les conidiophores (Figure 12) ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores

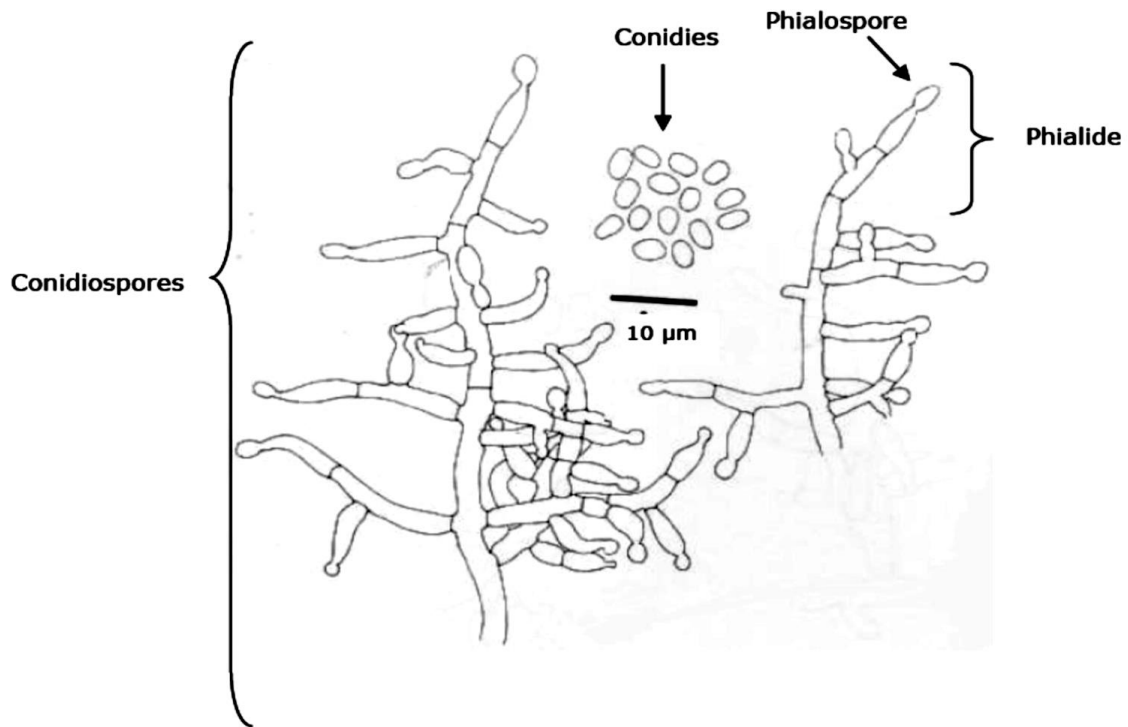


Figure 12: Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma harzianum* (Samuels et al., 1994).

II.7.2.3. Taxonomie

Les travaux de Rifai (1969) et les techniques de la biologie moléculaire, basées sur le polymorphisme des séquences de l'ADN ont pu révéler une classification phylogénique pour le genre de *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma harzianum* se présente comme suit (selon Bissett, 2004) :

Tableau 01 : Classification de *Trichoderma harzianum*.

Règne	Fungi
Embrenchement	Amastigomycota et/ou Eumycetes
Division	Ascomycota
Sous division	Pezizomycotina
Classe	Sordariomycetes
Sous classe	Hypocreomycetidae
Ordre	Hypocreales
Famille	Hypocraceae
Genre	Trichoderma

II.7.2.4. Reproduction

Trichoderma harzianum est un champignon asexué. Les conidiospores représente la phase dominante de la multiplication .Dans des conditions appropriées, les spores germent, donnent un mycélium, constitue des hyphes ramifiées, nouvelles conidiospores sont formées dans des phialides. (Rifai., 2004).

II.7.2.5. Mode d'action

Le *Trichoderma harzianum* a fait l'objet de nombreuses études dans le cadre de la protection Des plantes vis-à-vis des maladies parasitaires. Il 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). Ces mécanismes sont utilisés de manière complexe, indépendamment ou en synergie, suivant l'adversaire et les conditions du milieu (Suty, 2010).

- Mycoparasitisme : le parasitisme des champignons phytopathogènes par les *Trichoderma* est un phénomène complexe. Ce phénomène résulte d'un enroulement de *Trichoderma* autour du pathogène soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur et/ou en lui « injectant » des substances (enzymes) qui le détruisent.
- 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).
- Compétition : la compétition pour les éléments nutritifs et l'espace est un des mécanismes impliqués dans le contrôle biologique des agents phytopathogènes (Tronsmo et Hjeljord, 1998). Au niveau de la rhizosphère, la compétition pour l'espèce est intense et s'exprime par la colonisation de la surface racinaire (Sivan et Chet, 1989). 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. La pénétration de *Trichoderma* au niveau du

tissu racinaire est généralement limitée au niveau de la première couche ou bien la couche secondaire des cellules racinaires (Yedidia *et al.* 1999, 2000; Metcalf *et al.* 2001). La reconnaissance entre la plante et le *Trichoderma* aboutit à la synthèse des phytoalexines (molécules fongitoxiques) (Howell, 2003 ; Shores *et al.*, 2005). Yedidia *et al.*(2000) ont prouvé que l'association de *Trichoderma* avec les racines réduit les maladies des racines par l'activation de la réponse de la défense des plantes.

II.7.3. Les métabolites 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 peptaïboles (Ghisalberti et Sivasithamparam 1991). La littérature ne cite que les métabolites importants de *Trichoderma sp.*, qui sont principalement des enzymes et des molécules bioactives :

- 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 ; De Castro *et al.*, 2010). Elles sont Exploitées dans divers domaines biotechnologiques (Kubikrek *et al.*, 2003).
- 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 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).

Les *Trichoderma* peuvent aussi secréter des peptaïboles (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 (Vinale *et al.* 2006 ; Reino *et al.*, 2008 ; Andrabi *et al.* 2011). Les principales substances bioactives du genre *Trichoderma* sont illustrées dans le tableau 02 ci-dessous (Benkada, 2006).

Tableau 02 : Les principales substances bioactives de *Trichoderma harzianum*

Métabolites volatils	éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes (Vizcaino <i>et al.</i> , 2005)
Métabolites non volatils Diffusibles	Polyacétates (antifongiques, antibiotiques), Trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les Trichodermines (Blumenthal, 2004).
Métabolites polypeptidiques	Ciclosporines (immunosuppresseurs, anti inflammatoire) et les peptaïboles (Landreau, 2001)

- La biosynthèse des acides aminés : les champignons sont capables de synthétiser les 20 acides aminés, en partant de l'ammoniaque environnant, provenant soit de la dégradation enzymatique de composés azotés organiques ou inorganiques, ou bien suite à la fixation bactérienne de l'azote atmosphérique. Le rythme de croissance élevé des *Trichoderma sp* leur permet d'assimiler rapidement l'ammoniaque (Ahmed *et al.*, 1995 ; Voet, 1998).

Les métabolites secondaires peuvent :

- Retarder la germination des spores jusqu'à ce que les conditions environnementales soient favorables (Kawamura *et al.*, 1999)
- Protègent les spores en dormance contre des amibes (Trail *et al.*, 1994 ; Hapwood., 1988 ; Alspaugh *et al.*, 1997).
- Eliminer dans l'environnement immédiat des microorganismes concurrents pendant la germination (Demain and Fang., 2000).

III. Matériel et Méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'activité microbienne ; Biopole Compus Chaab El Rassas, Université des frères Mentouri 1 ; Constantine. Il a porté sur, l'isolement de quelques agents pathogènes fongiques à partir de quelques légumes. Le suivi du développement de *Trichoderma harzianum* sur de différents milieux solides, sa fermentation en milieu liquide et ses effets antagonistes.

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel végétal

Des échantillons de légumes frais : Tomate, Courgette et Carotte, ont été collectés au près de la ferme Massine. Ces légumes, ont présenté des symptômes de maladies fongiques, détectés visuellement.

III-1-2. Matériel Biologique

III-1-2-1. La souche antagoniste

La souche de *Trichoderma harzianum* utilisée dans nos tests, nous a été fournie par Mme ALMI H. Cette souche a été isolée à partir des sols agricoles (El Baàraouia relevant de la wilaya Constantine)

La souche nous a été fournie sous deux formes :

- Culture mycélienne sur milieu PDA en boîte pétri congelée.
- Poudre conservée (Spores).

III.1.2.2. Les souches pathogènes

Les souches fongiques utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de la Tomate, courgette, carotte, présentant des symptômes de flétrissement et de pourriture principalement.

III.1.3. Milieux de culture

Suivant les besoins expérimentaux, divers types de milieux de culture ont été utilisés. En effet, pour l'isolement des mycètes le milieu PDA a été utilisé. Ce milieu, est jugé comme milieu standard pour le développement des champignons. En outre, pour la purification des souches les milieux Czapek-Dox et le Sabouraud ont été employés. Ces milieux de culture ont été tous autoclavés pendant 20 minutes à 120°C avant leurs utilisations. La composition des milieux de culture utilisés est indiquée dans l'annexe.

En plus des milieux cités précédemment et le milieu M2 a été préparé pour l'évaluation de la croissance de *T. harzianum*.

III.2. Méthodologie

III.2.1. Méthode d'isolement

L'isolement des agents pathogènes, a été effectué par le trempage des fragments de 0.5 cm de chaque légume endommagé (Tomate, Carotte, et Courgette) dans de l'éthanol 90%, après, dans de l'eau de javel, et ce durant 30 seconde pour chacun. Ensuite, les échantillons ont été rincés dans de l'eau distillée stérile, afin d'éliminer les contaminants de l'air (Benhamou *et al.*, 1997).

Après séchage, les fragments sont mis aseptiquement dans des boîtes de Pétri stériles (3 pièces/boite) coulées préalablement par 15 ml du milieu PDA. L'incubation a été effectuée à 25 °C pendant six jours.

III.2.2. Méthode de purification

Les boites issues d'isolement comprennent plusieurs colonies d'aspects, de couleurs et de texture différentes. La purification des colonies a concerné les colonies dont les caractères cultureux correspondent à ceux des souches recherchées dans cette étude (souches pathogènes). La technique consiste à prélever quelques spores ou une petite bouture mycélienne à la marge du thalle à repiquer, à l'aide d'une Anse de platine stérile et transférer aseptiquement dans une boite de Pétri contenant l'un des milieux Sabouraud ou bien Czapek-Dox. Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boite (Botton *et al.* ,1990).

III.2.3. Méthodes d'identification

La détermination des genres d'isolats obtenus a été effectuée par deux méthodes :

- Identification macroscopique: l'identification macroscopique d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères culturels : la croissance et le développement du champignon, sa texture, la couleur du thalle, aspect des colonies, de leur revers, le diamètre de la colonie (Harrigan et Mc Cance, 1976 ; Rinaldi et al., 1998 ; Botton et al., 1990).
- Identification microscopique: l'examen microscopique d'une colonie fongique se fait par un examen direct d'un petit fragment de culture de champignon âgé de 4 à 7 jours. En réalisant un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants : la nature du mycélium, la présence ou l'absence du septum, les caractéristiques des fructifications et spores Rifai (1969).

III.2.4. Réactivation de la souche antagoniste

- A partir de culture mycélienne : dans des conditions aseptiques avec l'appoint d'un bec Bunsen, un fragment de la souche *Trichoderma harzianum* a été prélevé à partir de la boîte congelée, ensuite, le fragment est repiqué au centre des boîtes de Pétri coulées préalablement par 15 ml du milieu PDA.
- A partir de la poudre sporale : 1 mg de la poudre sporale de *Trichoderma harzianum*, a été mélangé avec 10 ml d'eau distillée stérile pour l'obtention d'une suspension sporale. La solution préparée, a été ajusté à 10^5 spores/ml. En suite, 0.1 ml de cette solution a été répartie sur la surface d'une boîte de pétri contenant 15 ml du milieu PDA.

III.2.5. Techniques de confrontation

III.2.5.1. Les Tests d'antagonisme

- Méthode de confrontation directe : appelée également technique des cultures opposées. Cette technique décrite par Sivan et Chet (1989), consiste à placer de façon diamétralement opposée sur des boîtes de Pétri contenant 15 ml de milieu PDA, deux explants de 5 mm de diamètre, à 4cm de distance l'un de l'autre. Ces explants provenant des cultures des

champignons, l'un portant la souche antagoniste à tester (*Trichoderma harzianum*) et l'autre l'agent pathogène impliqué. (Figure 13). Les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 25 °C pendant six jours (Hibaret *al.*, 2005). Le témoin est constitué uniquement du pathogène, repiqué au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA.

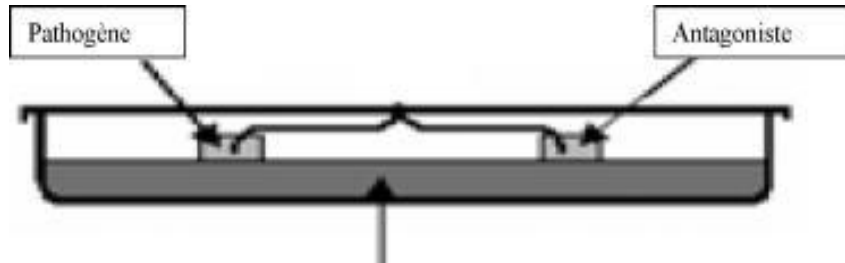


Figure 13 : Présentation schématique de la confrontation directe.

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance développée par le pathogène en direction de l'antagoniste au bout de 6 jours après l'inoculation et qui sera comparée à celle développée par le pathogène uniquement.

Le taux d'inhibition de *Trichoderma* testé est évaluée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon la formule proposée par Sy (1976) (Vincent, 1990) :

$$IC\% = (DT - DPA / DT) \times 100$$

Où :

DT : Croissance diamétrale du témoin ;

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

;

IC% : Inhibition de la croissance.

- Méthode de confrontation indirecte : cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées ; contenant chacune 15 ml du milieu PDA, par la suite, un assemblage des deux boîtes est réalisé par superposition des deux boîtes, l'antagoniste en bas et le pathogène en haut (Figure 14). La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001).

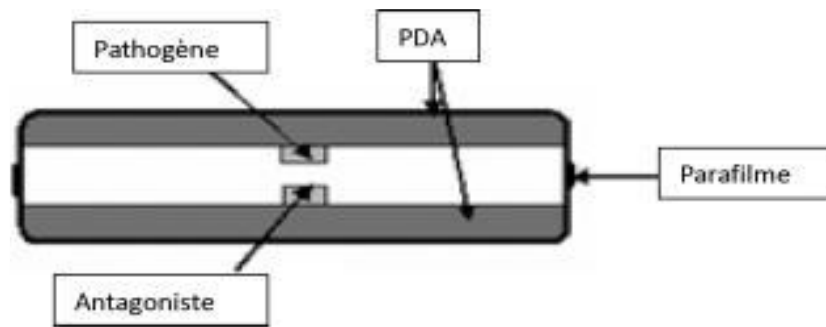


Figure 14 : Présentation schématique de la confrontation indirecte.

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

- Test d'activité antifongique par des métabolites secondaires de *Trichoderma harzianum* : ce test nécessite l'utilisation des métabolites secondaires qui sont obtenus suite à une fermentation. Les différentes étapes aboutissant à la réalisation de ce test sont les suivantes :

1. Choix de milieu de culture pour fermentation : pour la sélection d'un milieu de culture adéquat pour une bonne fermentation, cinq milieux cultureux ont été testés : le milieu PDA, le milieu M2, le milieu Czapek-DOX et le milieu Sabouraud (Annexe). La mise en culture de *T. harzianum*, se fait par repiquage d'un fragment de *Trichoderma harzianum* au centre des boîtes de Pétri coulées préalablement par l'un des milieux de culture choisi. Au cours de cette expérimentation, pour chaque milieu, deux boîtes sont utilisées, avec un seul repiquage par boîte. L'évolution de la croissance mycélienne est estimée par la mesure de la moyenne de deux diamètres perpendiculaires des colonies toutes les 24 heures, durant 7 jours (Botton *et al.* 1990).
2. La fermentation : les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu de fermentation M2. La stérilisation du milieu a été effectuée à 120°C pendant 20 min. Ensuite, les erlenmeyers ont été

inoculés par quatre disques de 5 mm de diamètre de *T. harzianum*. L'incubation a été effectuée à 25°C pendant 15 jours.

3. Tests d'activité antifongique : afin de tester l'activité antifongique du surnageant de la culture, le contenu des fioles de fermentation âgée de 15 jours, a été filtrées à travers du papier Whatman N°1, dans l'objectif de séparer le mycélium du milieu de culture contenant les métabolites bioactives. Par ailleurs, un volume égal de PDA fondu à 45°C est ajouté au filtrat de chaque souche, afin d'obtenir une concentration finale de 50% (v/v).

Le milieu de culture contenant le surnageant à tester, a été coulé dans des boîtes de Pétri et inoculé, après solidification, avec des disques de pathogènes de 4 mm de diamètre. Un suivi du développement de l'agent pathogène est effectué chaque 24 heures pendant 6 jours.

- Etude de l'activité enzymatique de la souche antagoniste : *Trichoderma harzianum* a été testée pour sa capacité et son potentiel de produire des enzymes comme la cellulase, la protéase et la lipase. La production de chaque enzyme a été détectée sur un milieu de culture solide contenant un substrat spécifique comme unique ou principale source de carbone.

1. L'activité protéase : l'activité protéolytique des souches antagonistes a été testée par la mise d'un disque *Trichoderma harzianum* sur un milieu à base de lait(Annexe), coulé sur des boîtes de Pétri. Après incubation à 25°C pendant 3 à 4 jours. L'apparition d'un halo transparent autour des colonies signifie la présence de l'enzyme protéase (Berg *et al.*, 2002).
2. L'activité cellulase : la technique la plus évidente serait de faire apparaître la capacité des moisissures à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé à base de cellulose (en poudre à 0.5%) comme seule source carbonée (Annexe). La production de l'enzyme cellulase se traduit par l'apparition d'une nette zone de lyse sur le milieu de culture (Kasnaet *al.*, 2008).

3. L'activité lipase : l'activité lipolytique des souches antagonistes, a été étudiée selon la méthode de Haliru et Bukola, 2012. La technique consiste à repiquer les souches antagonistes sur un milieu à base d'huile (Annexe). La production de l'enzyme lipase se traduit par l'apparition d'un halo blanc opaque au tour des colonies.

IV. Résultats et discussion

Le présent travail porte sur l'étude et l'évaluation de l'effet des métabolites secondaires de la souche *T. harzianum* vis-à-vis de quelques champignons pathogènes isolés à partir des légumes contaminés (Tomate, Courgette et carotte).

IV.1. Aspect macroscopique des légumes contaminés

Les légumes ci-dessous (figures 15) ont présenté des symptômes de maladies fongiques, qui se révèlent par des taches bruns sur les parties supérieures du légume ainsi qu'une pourriture qui se caractérise par des nécroses et des flétrissures sur des parties des légumes.

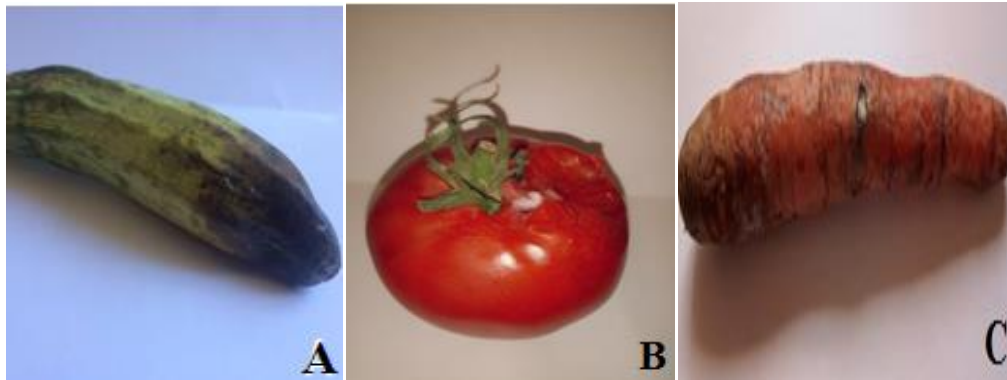


Figure 15 : Aspect macroscopique des légumes contaminés : Courgette (A), Tomate (B) et Carotte (C).

IV.2. Isolement et purification des souches fongiques à partir des légumes infectés

L'isolement des souches fongiques a été réalisé à partir de différents légumes infectés, en suite, les souches pures ont été sélectionnées pour servir aux différents tests menés avec antagoniste (*T. harzianum*).

IV.3. Identification


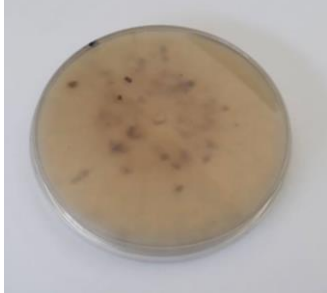



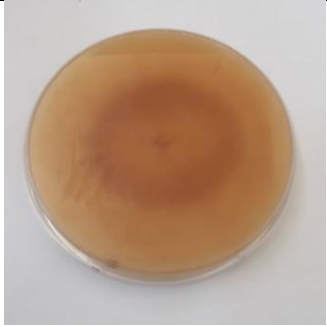
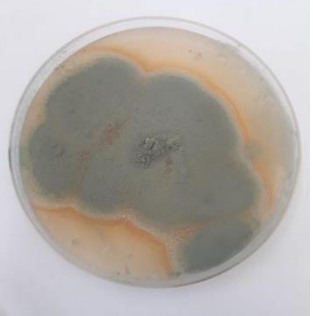
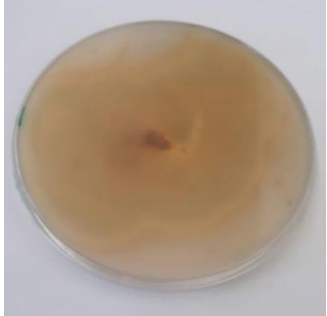
IV.3.1. Etude macroscopique

Les caractères morphologiques et culturaux sont déterminés après ensemencement des souches pures sur le milieu de culture PDA. L'identification se fait à l'œil nu, elle se base essentiellement sur les caractères suivants: la vitesse de croissance, l'aspect du mycélium

aérien, couleur de l'envers de la colonie, couleur des moisissures, et la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche

Les résultats de l'étude macroscopique des différents isolats, sont résumés dans le tableau (03) ci dessous.

Tableau 03 : Les différentes caractéristiques macroscopique des isolats.

Légumes contaminés	Caractères macroscopiques	Observation macroscopique	
		Recto	Verso
Tomate	<ul style="list-style-type: none"> - Nodule au centre de couleur sombre, formé des filaments mycéliens entrelacés. - Revers des points noir 		
Tomate	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie cotonneuse de couleur blanche - Revers incolore 		
Carotte	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie laineuse beige - Revers orange au centre, beige à la bordure 		
Courgette	<ul style="list-style-type: none"> - Colonie veloutée de couleur brun verdâtre - Revers orange 		



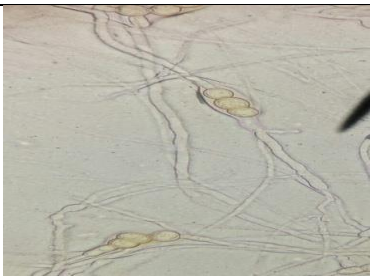
IV.3.2 Etude microscopique des isolats


L'étude microscopique repose sur l'observation des structures caractéristiques des quatre (04) isolats pathogènes sélectionnés (conidiophores, conidies, mycélium etc...).

Les résultats obtenus ont pu permettre l'identification des quatres genres fongiques : *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Penicillium* (Tableau 04).

Les caractères de ces genres correspondent parfaitement à ceux décrits par Samson et ses collaborateurs (1981), Botton (1990), Guiraud (1998), Leyral et ses collaborateurs (1998) ainsi que celles de Chabasse et ses collaborateurs (2002).

Tableau 04: Les différentes caractéristiques microscopique des isolats pathogènes.

Légumes contaminées	Observation microscopique	Caractéristiques microscopiques	Identification pénilaire
Tomate		- Filament non septé. - Conidie ronde	<i>Botrytis sp</i>
Tomate		- Des spores pluricellulaires fusiformes plus ou moins courbées -Microconidies dispersées parmi le mycélium.	<i>Fusarium sp</i>
Carotte		- Filaments septés, fin et régulier bruns, dictyospores en chaine.	<i>Alternaria sp</i>

Courgette		<ul style="list-style-type: none"> - Mycélium septé - Phialides à l'extrémité des ramifications - Conidies rondes ou ovoïdes, lisses, hyalines en longues chaînes. 	<i>Penicillium sp</i>
-----------	---	---	-----------------------

IV.4. Fermentation liquide

IV.4.1. Choix du milieu de culture

La sélection du meilleur milieu de culture pour la croissance rapide de *T. harzianum* a été effectuée dans des boîtes de pétri contenant différents milieux de culture conçus pour la croissance fongique. L'analyse des résultats après 7 jours d'incubation à 25C° a montré une importante croissance sur les milieux M2 et PDA et une croissance moins importante sur les milieux Sabouraud et Czapeck Dox (Figure 16).

En effet, une croissance maximale a été observée sur les milieux M2 et PDA où le diamètre des colonies de *T. harzianum* a été maximal environ 82 mm, contrairement à les autres milieux, on a observé une croissance minimale où le diamètre des colonies est environ 38mm.

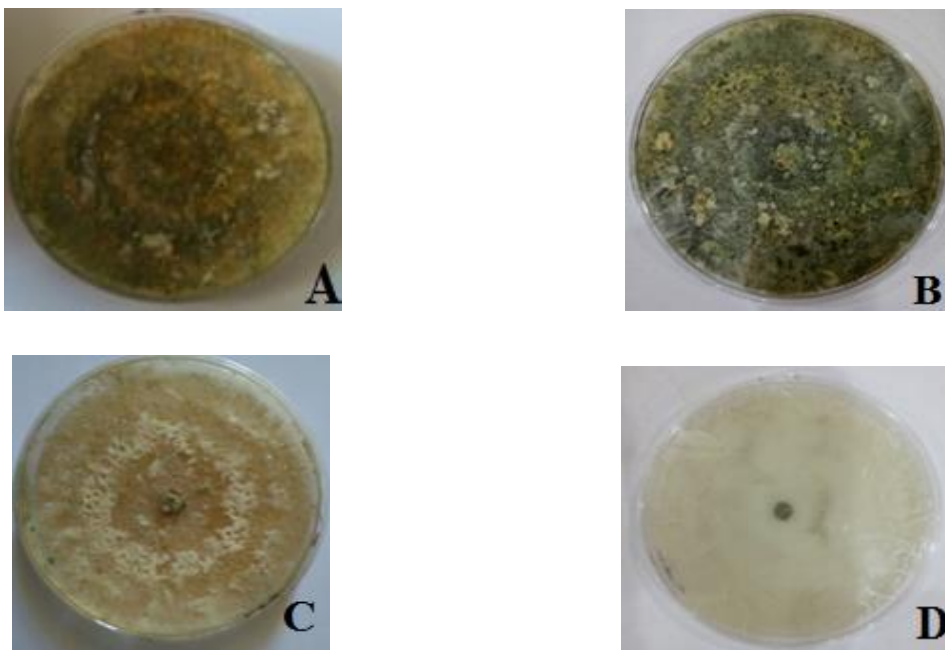


Figure 16: Aspect macroscopique de *T. harzianum* sur différent milieux à 25C° : (A) milieu PDA, (B) milieu M2, (C) milieu Sabouraud et (D) milieu Czapeck Dox)

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que le milieu M2 à base d'extrait de Malt est le meilleur pour la croissance de *T. harzianum*, son mycélium se caractérise par une couleur verte dans la partie aérienne correspondant à la conidiogénèse (Figure 17).

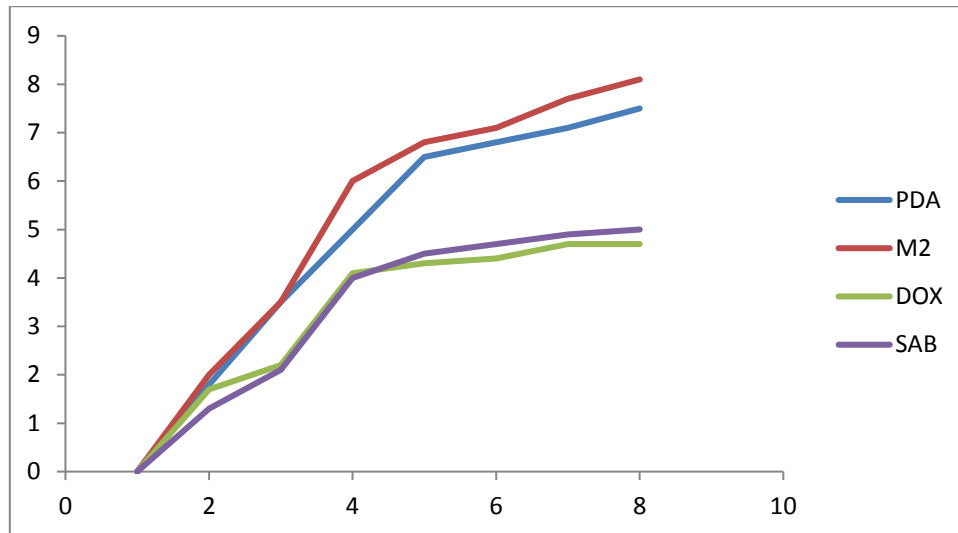


Figure 17: Courbes de croissance de *T. harzianum* sur les différents milieux testés à 28°C.

IV.5. Les tests d'antagonisme

Après isolement et identification des souches fongiques pathogènes obtenues à partir des légumes infectés. On a procédé à des tests d'antagonisme en moyennant une souche de *Trichoderma harzianum*.

Pour ce faire, quatre (04) souches pathogènes ont été choisies pour trois types de test ; la confrontation directe, la confrontation indirecte et test d'activité antifongique par les métabolites secondaires de *T. harzianum*. Ces souches sont : *Botrytis sp*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp*, et *Fusarium sp*.

IV5.1. Test de confrontation directe

Les résultats obtenus (Tableau 04) montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante en comparaison à ceux obtenus avec les différentes confrontations (Pathogène –Antagoniste).




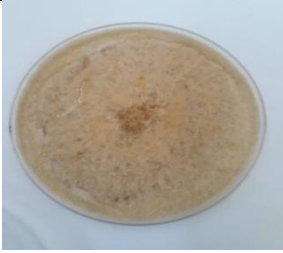

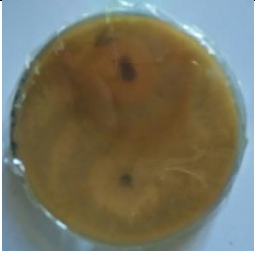



Après 7 jours d'incubation à 28C°, une action inhibitrice a été observée, cette action est exercée par *T. harzianum* vis-à-vis de la croissance mycélienne des isolats pathogènes testés. Le pourcentage d'inhibition a varié entre 23 et 62%.




La croissance de *Trichoderma* est plus rapide que celle du pathogène, de ce fait, elle colonise le milieu nutritif et assimile les éléments nutritifs, c'est le phénomène de compétition (Dubot, 1985. Davet, 1996).

Dans ce cas, la croissance de certaines souches est très lente, ceci est justifié par le fait que l'antagoniste qui montre une capacité d'arrêter à distance le développement du parasite avec formation d'une zone d'inhibition entre les colonies confrontées avec une largeur variable selon l'isolat.

En 1988 Zhihe et *al.*, ont prouvé que *Trichoderma* produit des substances agissant comme des antibiotiques et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène.

Tableau 05 : L'effet inhibiteur de *T. harzianum* sur la croissance mycélienne des souches pathogènes (confrontation directe) après 7 jours d'incubation

Isolats fongique	Témoin	Résultats de test d'antagonisme		Pourcentage d'inhibition
		Recto	Verso	
<i>Fusarium sp</i>				62%
<i>Alternaria sp</i>				48%
<i>Botrytis sp</i>				44%

<p><i>Penicillium</i> <i>sp</i></p>				<p>23%</p>
---	---	---	--	------------

La figure 18 montre l'évolution de la croissance mycélienne de *Botrytis sp* en présence et en absence de *T. harzianum* dans la confrontation directe. Ces résultats prouvent que la croissance de *Botrytis sp* est meilleure en absence de souche antagoniste. Ceci est expliqué par l'action inhibitrice exercée par *T. harzianum* vis-à-vis la croissance mycélienne de ce pathogène.

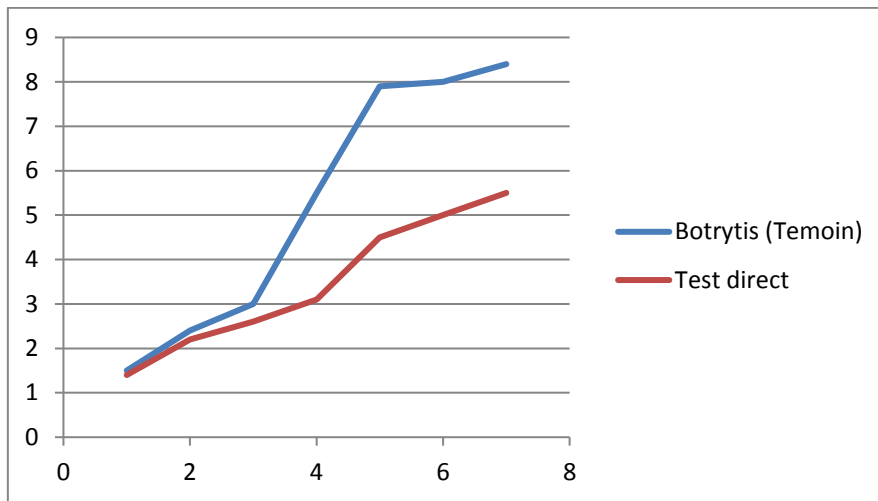


Figure 18 : Inhibition de la croissance de *Botrytis sp* en présence et en absence de *T.harzianum* (test direct).

Par ailleurs, l'action d'inhibition de *Trichoderma* est aussi observable sur la croissance mycélienne du *Penicillium sp* (Figure 19). Mais nous notons que l'inhibition ici est moins importante que dans le cas de *Botrytis sp*.

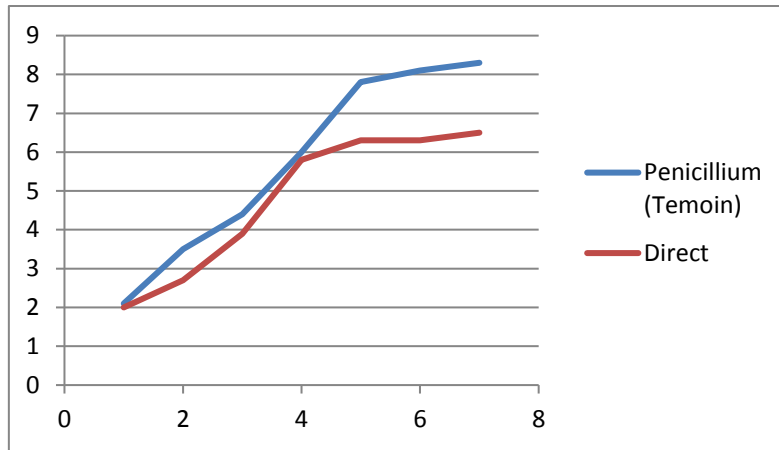


Figure 19 : Inhibition de la croissance de *Penicillium sp* en présence et en absence de *T.harzianum* (test direct).

Le graphe suivant, montre que la croissance mycélienne d'*Alternaria sp* (témoin) est plus importante en comparaison avec le résultat de la confrontation directe (*Alternaria – Trichoderma*). Le taux d'inhibition exercé par *Trichoderma* est si important.

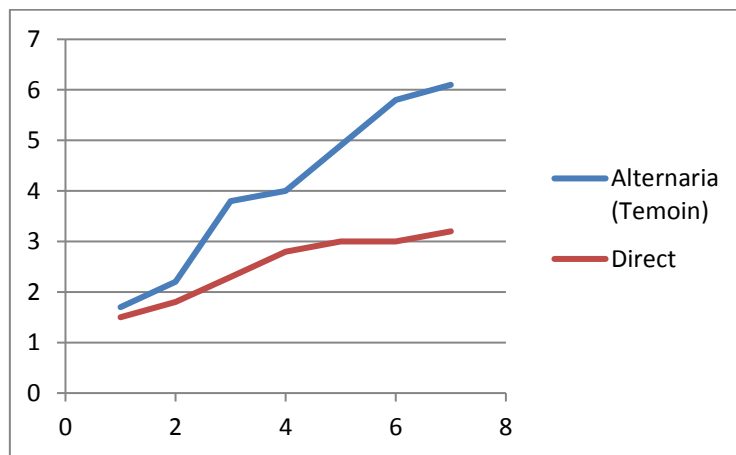


Figure 20 : Inhibition de la croissance d'*Alternaria sp* en présence et en absence de *T.harzianum* (test direct).

Dans le cas de confrontation *T. harzianum- Fusarium sp*, on observe après 168 heures d'incubation à 25C°, une action inhibitrice exercée par *T. harzianum* vis-à-vis la croissance mycélienne de la souche pathogène testée (*Fusarium sp*) (Figure 21).

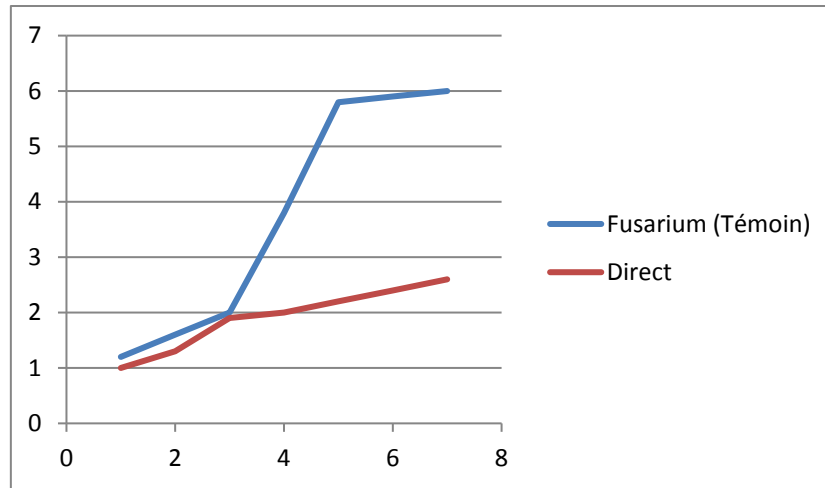


Figure 21 : Inhibition de la croissance de *Fusarium sp* en présence et en absence de *T. harzianum* (test direct).

IV.5.2. Test de confrontation indirecte

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance de *T. harzianum* sur différentes souches pathogènes.

Les résultats obtenus (Tableau 06) montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des souches pathogènes exercées par *T. harzianum* comparativement aux témoins.




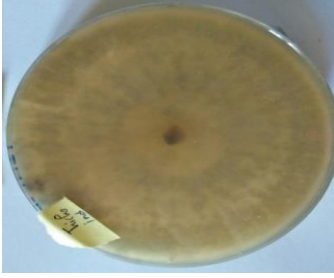


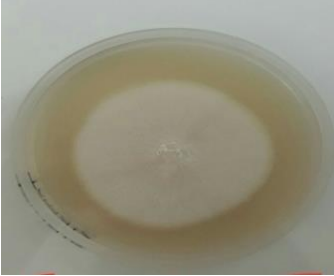

On a remarqué que la croissance mycélienne des isolats continue d'évaluer avec le temps contrairement au test d'antagonisme direct.

Malgré l'absence d'un contact direct entre l'agent pathogène et la souche antagoniste, il y'a un effet inhibiteur exercé par *T. harzianum* sur le développement des colonies des isolats.

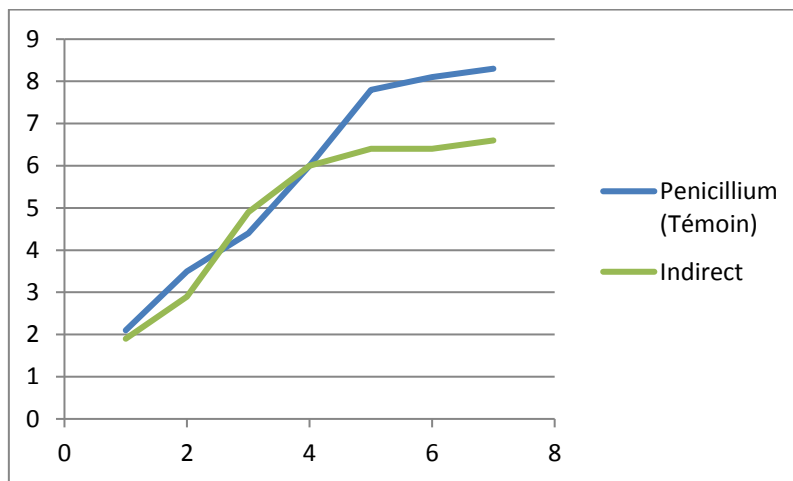
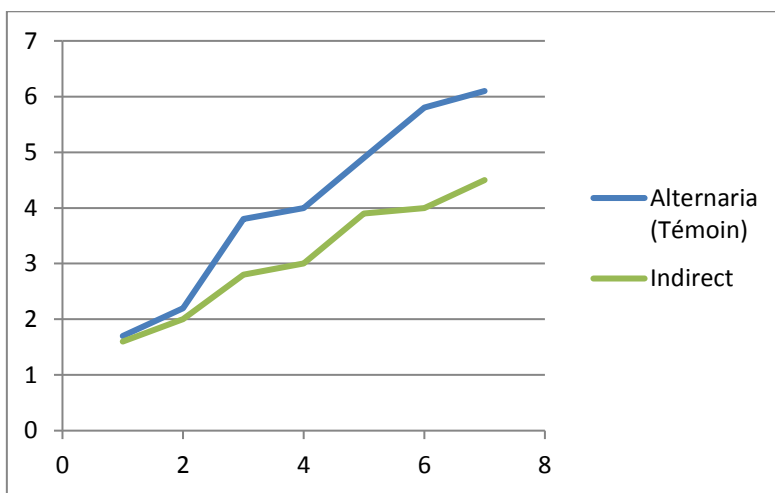
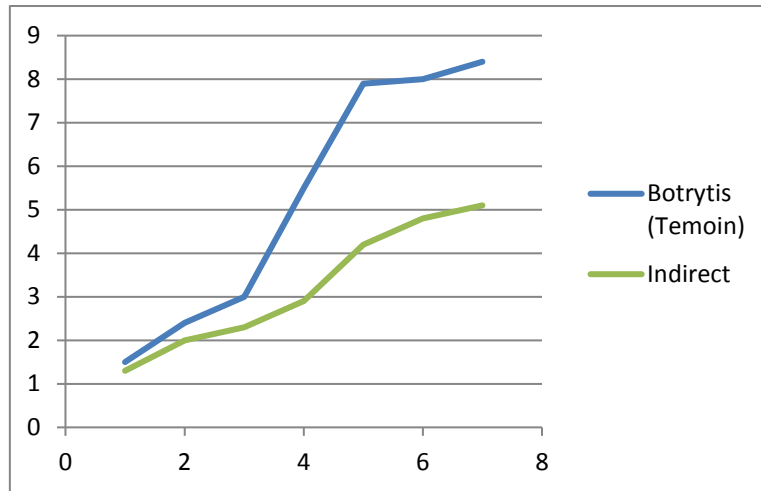
D'après ces résultats *T. harzianum* a la capacité de produire des substances volatiles qui sont capable de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène (Hibar et al., 2005). Cette action inhibitrice est due à des substances de nature chimique libérées par les souches de *Trichoderma*.

Dennis et Webstres (1971) ont montré que *Trichoderma* émette des substances chimiques toxiques qui sont des dérivés de l'hydrazine sous forme de substance volatiles importantes.

Tableau 06: L'effet inhibiteur de *T. harzianum* sur la croissance mycélienne des souches pathogènes (test indirect).

Souches fongique	Témoin	Résultat des tests d'antagonismes	Pourcentages d'inhibition
<i>Botrytis sp</i>			47%
<i>Alternaria sp</i>			44%
<i>Penicillium sp</i>			21%
<i>Fusarium sp</i>			16%

Le diamètre de croissance des différents isolats pathogènes (Figure 22) est largement plus important lorsqu'ils sont cultivés seuls que lorsqu'ils sont cultivés en présence de *Trichoderma sp*. Ces variations de diamètres sont dues à l'effet positif (inhibiteur) exercé par la souche antagoniste.



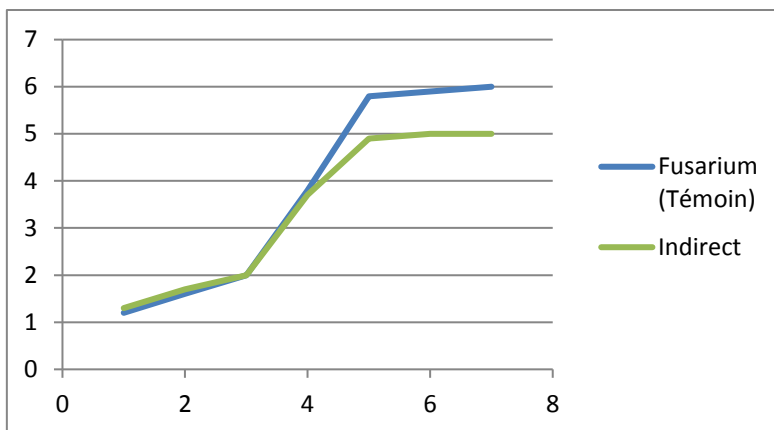
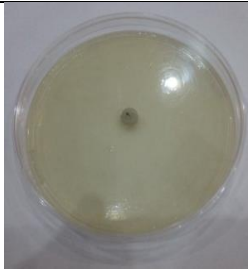

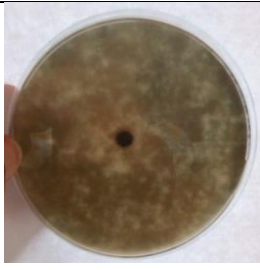
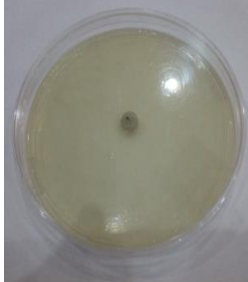





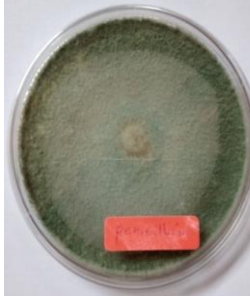

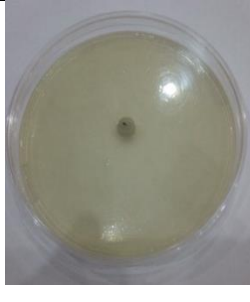


Figure 22 : Inhibition de la croissance de *Botrytis sp*, *Alternaria sp*, *Penicillium sp* et *Fusarium sp* en présence et en absence de *T. harzianum* (test indirect)

IV.5.3 Test d'activité antifongique par les métabolites secondaires de *T. harzianum*

Les métabolites secondaires issus de la fermentation de *Trichoderma sp*, ont été testé *In Vitro* pour évaluer leurs effets antifongique vis-à-vis des pathogènes en question. D'après le tableau 07, on remarque que l'effet inhibiteur des métabolites secondaires de *T. harzianum* est moins important que celui exercé par le mycélium. Ce taux d'inhibition varie de 1 à 3 cm

Tableau 07 : L'effet inhibiteur des métabolites secondaires de *T. harzianum* sur la croissance mycélienne des souches pathogènes.

Isolats	Avant incubation	Après incubation		Diamètre d'inhibition
		Recto	Verso	
<i>Alternaria sp</i>				2
<i>Botrytis sp</i>				3

<i>Penicillium sp</i>				1.5
<i>Fusarium sp</i>				1

IV.6. Test de l'activité enzymatique de la souche antagoniste

IV.6.1. Activité protéase

L'activité protéolytique de la souche antagoniste *T. harzianum* a été testée sur un milieu à base du lait. La production de l'enzyme protéase, a été traduite par l'apparition d'une zone transparente sur le milieu de culture.

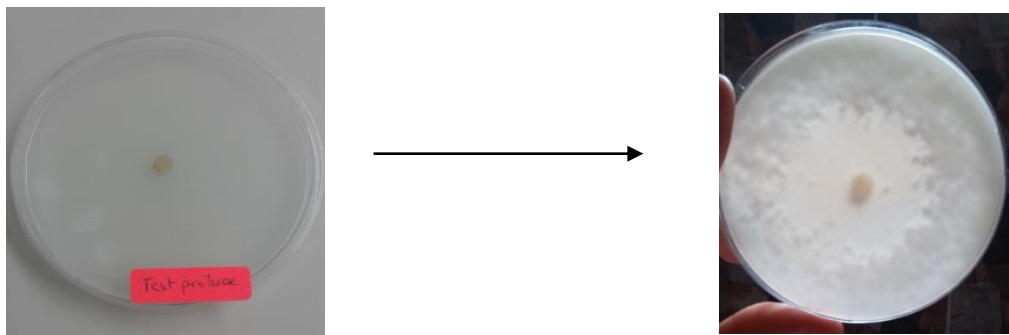


Figure 23 : Test de l'activité protéolytique de *T. harzianum*.

Les résultats de l'activité protéolytique montrent une transparence du milieu de culture ensemencé par *T. harzianum*. Ce résultat confirme la production de l'enzyme protéase par la souche antagoniste *T. harzianum*.

IV.6.2. Activité cellulase

L'activité cellulolytique de *T. harzianum* a été testée sur un milieu à base de cellulose comme seule source carbonée. Cette technique permet de montrer la capacité des moisissures à assimiler la cellulose.

La production de l'enzyme cellulase se traduit par l'apparition d'un halo transparent sur le milieu de culture (Figure 24).

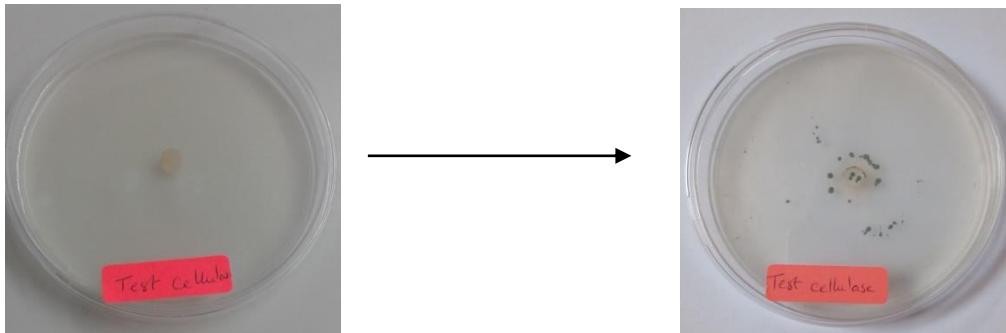


Figure 24: Test de l'activité cellulase de *T. harzianum*

Les résultats de ce test montrent une zone de lyse sur le milieu de culture qui signifie la production de la cellulase par *T. harzianum*.

IV.6.3. Activité lipase

Le test de l'activité lipolytique de *T. harzianum*, réalisé sur un milieu de culture à base d'huile Tributyrine, ce test montre que la souche antagoniste a la capacité de produire l'enzyme lipase. Cette production se traduit par l'apparition d'une zone de lyse (zone transparente).

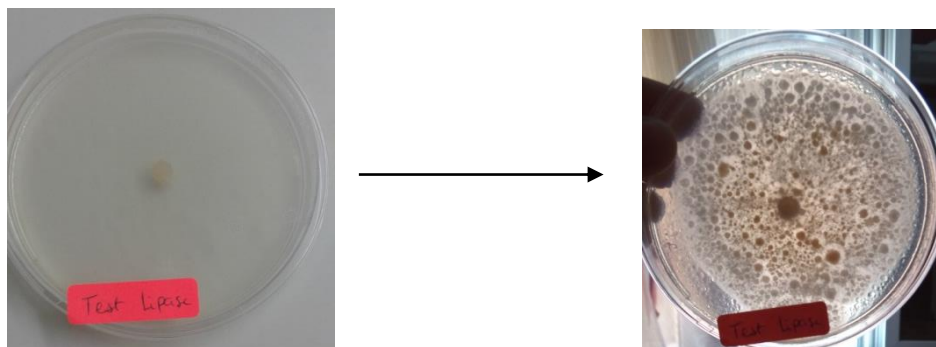


Figure 25: Test de l'activité lipase de *T. harzianum*.

Les résultats obtenus de ce test montrent une transparence sur le milieu de culture à base d'huile, ce résultat confirme la production de l'enzyme lipase par la souche antagoniste *T. harzianum*.

V. Conclusion

Le travail présenté dans cette étude consiste à évaluer l'effet bio protecteur de la souche *Trichoderma harzianum* sur quelques phytopathogènes, isolés à partir de la tomate, de la courgette et de la carotte jugés infectés.

L'isolement des mycètes à partir de trois différents échantillons de légumes, a permis d'obtenir quatre isolats fongiques. En effet, deux isolats fongiques ont été obtenus de la tomate, un isolat obtenu de la courgette et le reste des isolats (un seul) a été obtenu de la carotte. L'identification macroscopique et microscopique de l'ensemble des isolats a permis de les sérier en quatre genres fongiques : *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Botrytis*.

La lutte biologique contre ces phytopathogènes, est mise en évidence par des essais d'antagonismes *In Vitro* (confrontation directe et indirecte) montrant la sensibilité des pathogène à l'égard des différents mécanismes déployés par l'antagoniste.

Les essais de confrontation directe, sur milieu de culture, entre les quatres genres pathogènes testés : *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Botrytis sp* au moyen d'utilisation du champignon *Trichoderma harzianum*, ont révélé que ce dernier a pu inhiber la croissance mycélienne avec un pourcentage d'inhibition considérable qui varie de 23% à 62% selon les espèces pathogènes testées, et ce par rapport au témoin. Alors que les résultats de la confrontation indirecte montrent des pourcentages d'inhibition varient de 16% à 47%.

Par ailleurs, les tests de lutte menée avec les métabolites secondaires du même antagoniste, ont révélés des taux d'inhibition de l'ordre 16.5% en moyenne.

Les tests d'activités enzymatique de la souche antagoniste, prouve que la souche testée représente une source très importante d'enzymes lytiques à savoir la cellulase, la protéase et lipase.

Ces résultats suggèrent que l'antagoniste *Trichoderma harzianum* utilise une multitude de mécanismes d'action dans l'objectif de lutté contre les maladies cryptogamiques.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives parmi lesquelles :

- ✓ Approfondir l'étude sur les conditions de contaminations des légumes.
- ✓ Tester l'effet *in vivo* des souches *Trichoderma* sur la croissance des *phytopathogènes*.
- ✓ La confirmation de l'identification des souches isolées par voie moléculaire
- ✓ L'identification des métabolites bioactifs de *Trichoderma* par HPLC
- ✓ Production à l'échelle industrielle des spores de *Trichoderma harzianum* et leurs utilisation autant qu'un fongicide local (Algériens).

Il reste clair que les méthodes utilisées pour le contrôle des espèces phytopathogènes, ne permettent pas de résoudre définitivement le problème de ces maladies. Il est donc impératif de poursuivre la recherche en vue d'établir la meilleure combinaison des traitements susceptible de conférer une protection maximale de cultures contre les maladies cryptogamiques.

VI. Références Bibliographiques

Alabouvette C. 2004. Les méthodes de protections des plantes alternatives à la lutte chimique. INRA, UMR Microbiologie Géo chimie des Sols, BP 86510, 21065 Dijon Cedex.

Alabouvette, C ; Couteaudieur, Y et Lotjvert , J ,1983. Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes, pp 7-10. XXIV. Colloque de lasociété Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).

Altinok H. and Erdogan O., **2015**. Determination of the *In vitro* Effect of *Trichoderma harzianum* on Phytopathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. Not Bot Horti Agrobo, 43(2):494-500

Altomare C., Norvell W.A., Bjorkman T. and Harman G.E., **1999**. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl Environ Microbiol, 65: 292–293

Anonyme 01 <http://www.cliniquedesplantes.be/plantes-cultivees/4/18>

Anonyme 02 <http://www.cliniquedesplantes.be/plantes-cultivees/4/26>

Anonyme 03 <http://ephytia.inra.fr/fr/C/5194/Tomate-Phytophthora-spp>

Anonyme 04 <http://www.omafra.gov.on.ca/french/crops/facts/98-002.htm>

Anonyme 05 <https://www.rustica.fr/articles-jardin/maladies-parasites-courge,2784.html>

Anonyme 06 <http://www.fairesonjardin.fr/oidium-de-la-courgette.html>

Bailey B.A., Bae H., Strem M.D., Crozier J., Thomas S.E., Samuels G.J., Vinyard B.T., and Holmes K.A., **2008**. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biocontrol potential. Biol. Control, 46:24–35

Baker K.F., **1988**. *Trichoderma* spp as plant-growth stimulants - C. R. C. Crit. Rev. Biotechnol, 7(2): 97-106

Bélangier R.R., Dufour N., Caron J. et Benhamou N., **1995**. Chronological events associated with antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea* : Indirect evidence

Benhamou, N., Chet, L, 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultra structural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*, 86(4), 405-416.

Benhamou N. et Chet I.,1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*". *Appl. Environ. Microbiol*, 63: 295-297

Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C. and Codon A.C., 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbio*, 7: 249-260.

Besri M. et Diatta F., 1985. Résistance de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la tomate aux benzimidazoles, dicarboximides et sulfamides. *Bull. OEPP*, 15(3) : 379-380.

Besselat B., 1985. Résultats obtenus par le service de la protection des végétaux dans le cadre de la lutte contre la pourriture grise de la vigne avec utilisation du *Trichoderma*. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, 51-58. INRA, Paris (FR).

Bissett J., 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. nov. *Can.J. Bot*, 62:924-931

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

Blancard D.,1988. Maladie de la tomate. INRA Paris, PHM Limoges, 212 p.

Blancard D., Laterrot H., Marchoux G., Candresse T., 2009. Maladies de la tomate : identifier, connaître, maîtriser. Editions Quae : 679 pages

Boisson C. et Renard J.L., 1987. Les maladies cryptogamiques des plantes en Cote d'Ivoire. *Horticole*, 398: 36-40

Bouchet P., Guignard J.L. et Villard J., 2000. Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés. Edition Masson p77.

Bourguignon E., 2008. Ecology and diversity of indigenous *Trichoderma* species in vegetable cropping systems. Ph.D.Thesis. Lincoln University, Canterbury, New Zealand. pp, 235.

Calistru C., McLean M., Berjak P., 1997. In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, 137:115–124.

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

Cao R, Liu X, Gao K, Mendgen K, Kang Z, Gao J, Dai Y, Wang X. 2009 - Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes *in vitro*. *Current Microbiology* 59, 584–592.

Caron J.Décembre 2002. Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.

Caron J., Laverdière L., Thibodeau P.O. et Bélanger R.R., 2002. Utilisation d'une souche Indigène de *Trichoderma harzianum* contre cinq agents pathogènes chez la carotte et la tomate de serre au Québec. *Phytoprotection*, 83 : 73-87.

Carvalho D.D.C., Junior M.L., Martins I., Inglis P.W., Mello S.C.M., 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use of common bean Seed treatment. *Tropical Plant Pathology*, 39(5):384-391.

Champion, R.1997. Identifier les champignons transmis par les semences.[en ligne] éd : INRA. Chapitre 8, Les champignons transmis par les semences, 104p.

Chang, Y.C., R. Baker, O. Kleifeld et I. Chet. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma Harzianum*. *Plant Disease*, 70: 145-148

Chaverri P., Castlebury L.A., Samuels G.J., Geiser D.M., 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum* complex. *Mol Phylogenet Evol*, 27:302–313.

Chet I., 1984. Application of *Trichoderma* as a bio control agent, pp. 110-111 Proc. 6th cong.un. Phytopathol. Mediterr. , Cairo (Egypt)

Chet I., 1987. Innovative Approaches to Plant Disease Control. New York: Wiley and Sons; *Trichoderma* - Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi, pp, 137–160.

Claydon et al (1987). Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the british mycological society* 88: 505-513.

Comporata .1985. « Antagonisme in vitro de *Trichoderma spp* vis à vis de *Rhizoctinia solani*, pp. 613-620. INRA Paris (FR),.

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

Cournut, B. 1984. le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th.: Pharmacie: Marseille : p77.

Davet , P . 1983. Les *Trichoderma*, exemple de champignon antagoniste d'agents pathogènes. Faune et flore auxiliaire en agriculture, pp. 193-204. ACTA, INRA- ENSAM Montpellier (FR).

Davet, P. 1986. Activité parasitaire des *Trichoderma* vis-à-vis des champignons à sclérotés;

corrélation avec l'aptitude à la compétition dans un sol non stérile. *Agronomie* 6 (9):863-867.

Denis, C et Webster, I., 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* production of volatile antibiotic. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, 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.) pourzar (plombdes arbres fruitiers) et *Botritis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, 35-49. INRA, Paris (FR).

Elad , Y; Chet, I; BOYLE, P et al. parasitism of *Trichoderma spp.* on rhizoctonia solani and sclerotium rolfsii. scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *phytopathology* ,1983.73:85-88

Elad Y. and Kapat A., 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol*, 105: 177-180

Esposito, E. & Silva, M. 1998. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.*, N° 24 ,Vol,2 : 89-98

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

Gary ,J, et al . *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. *Mycological Progress* [en ligne]. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USD A, 2011
Disponible sur le web : <<http://mvcologv.umd.edu/Trichoderma.html>>.ISSN:400 -416

Hangavelu ,R., Palaniswami A., Velazhahan R., Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Volume 103, Issue 1, 2004, 259-263.

Haran, S., H. Schickler et I. Chet. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 232-233.

Harana , S. ; Scinckler, H. ; Chet, I. 1996. Molecular mechanism of lyticenzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Micrbiology*142 :2312-2331

Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology* 96 : 190-194.

Hayyan I. A., Mohammad B., Aidil A. H. and Wan M.2009. Optimizing of *Trichoderma viride* Cultivation in Submerged State Fermentation, School of BioSciences and BioTechnology, Faculty Science and Technology, University Kebangsaan Malaysia, UKM Bangi, Selangor, Malaysia -*American Journal of Applied Sciences* 6 (7): 1277-1281, ISSN 1546-9239© 2009 Science Publications

Khasanov, O -K, (1962) The antibiotic properties of fungiof the genus *Trichoderma* Pers, found in the swamp soil of Usbekistan. *Usbekshell Biologichesll Zhmnal, Tashkend* 6: 62-67

Kubicek et al , 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma sp.*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biology*, 38 (3) : 310-319

Lefort, F ,2010. Lutte biologique et lutte microbiologique : des concepts anciens pour des méthodes de lutte modernes. Institut Terre Nature Paysage et Filière Agronomie, Hepia HESSO//Genève.p :57.

Lillard-Roberts, S. 2004. *Trichoderma harzianum*. Mold-Help [en ligne].]. Disponible sur : <http://mold-help.org/content/view/431/>

Mapleston R.A., Stone H.G. and Williams P.H. 1992. The evolutionary rol of secondary metabolite.*A REVIEW.Gen.* **115**:151-152

Monte E., 2001. Editorial Paper: Understanding *Trichoderma*: Between Agricultural Biotechnology and Microbial Ecology. *Int Microbiol*, 4: 1-4.

Mouria B., Ouazzani-Touhami A. et Douira A., 2008. Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat. *Phytoprotection*, 88(3): 103-110

Papavizas, G.C. , 1985 *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol*, 23 : 23-54

Pavlovicova, R. , 1998 Secondary metabolites of the fungus *Trichoderma*. *Mycologia*, 53 267-275

Rifai, 2004. Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* .Paris. 55-56

Roquebert, M.-F. , 1996 Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. Dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. Comptendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, 13-15.

Roussos , Sevastianos. Croissance de *trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de doctorat. ORSTOM, Paris, France, 1985

Schuster A., Schmoll M., 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 87 (3): 789-799.

Stone M.J. and Williams D.H. (1992). On the evolution of functional secondary metabolites (Natural products). *Mol. Microbiol.* **6**: 29-34

SY (A.A.). 1976. Contribution à l'étude de *Pyricularia oryzae* Cav. Recherche In vitro d'antagonistes dans une perspective de lutte biologique Thèse Doct. Ingénieur INPToulouse, n°534, 236p. www.sist.sn/gsd/collect/publi/index/assoc/HASH8e42/a871ae70.dir/doc.pdf.

Thangavelu R., Palaniswami A., Velazhahan R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of tomato, Agriculture, Ecosystems and Environment, Volume 103, Issue 1, 259-263.

Tran N.H., 2010. Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Vietnam. Journal of ISSAAS, 16 (1):1721.

Tvoli ,B ;Gaubel ,G. les légumes alimentaires méditerranée. contrainte biotique et potentialité de développement. France :INRA,1997.collection88

Valentina Catalano, Sabrina Sarrocco, Mariarosaria Vergara et Giovanni Vannacci. 2007. Enzymatic functions and mycoparasitism versus *sclerotia* in *Trichoderma*. Journal of Plant Pathology 89 (3, Suppl.), 14-15.

Verma, M. 2007. Développement d'un processus d'obtention d'agents biologiques à base de *Trichoderma SPP* en utilisant des eaux usées ou des boues d'épuration comme substrats de fermentation. Thèse de doctorat, INRS-ETE, Université du Québec, Québec, QC, Canada, 424 p.

Verscheure M, Lognay G, Marlier M. Revue bibliographique: les méthodes d'identification et de classification des champignons. Biotechnol Agron Soc Environ.2002;6:131–142.

Vial , L (1989) Critères de qualité de la production d'un biopesticide à base de *Trichoderma harzianum* RIFAI. Mémoire, École Nationale d'Ingénieurs des travaux agricoles, Bordeaux, France

Vining, L.C. 1990. Fonctions of secondary metabolites. Annu. Rev. Microbiol.,44 : 395-400

Vizcaino, J.A.; Sanz , L. ; Cardoza , R.E. ; Monte , E. & Gutierrez , S. Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. FEMS Microb. Lett., 2005, 244 : 139–148

Yedida, I., A.K. Srivastva, Y. Kapulnik et I. Chet. 2001. effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant soil*, 23: 235-239

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

Zyska B. 1997. Fungi isolated from library materials: a review of the literature. *Int Biodeterand Biodegrad*36: 43-51

Résumé

La recherche des phytopathogènes dans des échantillons de légumes infectés ; la tomate, courgette, carotte. A révélé selon les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques, la présence de 04 souches appartenant à 04 genres (*Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Botrytis sp*)

L'approche de lutte biologique par essais d'antagonismes *in vitro* (confrontation direct indirect) ont donné des résultats positifs avec les 4 genres testés : *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Botrytis sp*, *Fusarium sp*. Au moyen d'utilisation du champignon *Trichoderma Harzianum*. Ce dernier a pu inhiber la croissance mycélienne des isolats pathogènes avec une moyenne considérable de 44% en confrontation directe et d'une moyenne de 32% en confrontation indirecte. Alors que Les tests de lutte menée avec les métabolites secondaires du *Trichoderma Harzianum*, ont montré des faibles pourcentages d'inhibition varient de 8% à 32%.

Le test de l'activité enzymatique de la cellulase, lipase, protéase de la souche antagoniste, prouve que la souche testée représente une usine très importante des enzymes lytiques.

Mots clés : Phytopathogènes, *Trichoderma Harzianum*, Lutte biologique, teste d'Antagonisme *in vitro*, métabolites secondaires.

Abstract

The research of the pathogenic fungi in infected vegetable: tomato, courgette, carrot. Has revealed according to macroscopic and microscopic morphological characters the presence of 04 apartments type strains descendant to 04 genera (, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Botrytis sp*)

The approach of biological control by tests of antagonisms in vitro (direct confrontation and indirect) has given positive results with the 4 genera tested: *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Botrytis sp*, *Fusarium sp* by means of use of the fungi *Trichoderma Harzianum*. The latter was able to inhibit the mycelial growth of pathogenic isolates with a considerable average of 44% in direct confrontation and an average of 32% in indirect confrontation. While control tests with secondary metabolites of *Trichoderma Harzianum*, showed low inhibition percentages range from 8% to 32%.

The test of the enzymatic activity of the cellulase, lipase, protease of the antagonist strain, proves that the strain tested represents a very important plant of the lytic enzymes.

Key words: Phytopathogens, *Trichoderma Harzianum*, Biological control, In vitro antagonism test, secondary metabolites.

الملخص

إن الأبحاث عن الفطريات المسببة للأمراض في عينات من الخضار المصابة الطماطم والكوسة والجزر قد كشفت وفقا للصفات المورفولوجية والعينية والمجهريّة، وجود 04 فطريات تنتمي إلى 04 اجناس مختلفة

Fusarium sp, Alternaria sp, Botrytis sp, Pénicillium sp

إن المكافحة البيولوجية تعتمد أساسا على استعمال طريقة المواجهة المباشرة وغير المباشرة و التي أعطت نتائج ايجابية

باستعمال فطر *Trichoderma Harzianum* مع أربعة أجناس

Fusarium sp, Alternaria sp, Botrytis sp, Pénicillium sp

هذا الأخير قد قام بمنع نمو فطر من السلالات الممرضة بمعدل كبير قدره 44 % في مواجهة مباشرة أما في مواجهة غير مباشرة معدل منع نمو للفطر قدر 32%.

في حين أن الاختبارات التي أجريت مع المركبات الثانوية، أظهرت نسب منخفضة من تثبيط تراوحت من 8% إلى 32%.

إن فحص النشاط الأنزيمي من السيلولوز، والليياز و البروتياز للفطر العدائي يدل على وجود إنزيمات التحليلية لدى هذا لفطر

الكلمات المفتاحية : المكافحة البيولوجية , الفطريات المسببة للأ أمراض في عينات من الخضار, فطر,

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 Czapek-Dox (Atrassi et *al.*, 2005) : pH 6.5

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

- ❖ Milieu M2 : pH 5.4

Composants	Quantités (g/l)
Extrait de levure	2
Extrait de Malt	30
Agar	15

- ❖ Milieu Sabouraud

Composants	Quantités (g/l)
Glucose	20
Peptone	10
Agar	20

- ❖ Milieu protéase

Composants	Quantités
Agar	13.5g dans 600 ml d'eau distillé
Lait en poudre	10.5g dans 350 ml d'eau distillé

❖ Milieu cellulase

Composants	Quantités (g/l)
Cellulose	5
Agar	20

❖ Milieu lipase (Haliru et Bukola, 2012)

Composants	Quantités (g/l)
Peptone	10
NaCl	5
Calcium chloride	0.1
Agar	20
Rouge Congo	0.5
Tributyrim	1(ml)

Nom : M'zahem Prénom : Rayene	Mihoubi Romeissa	Date de soutenance : 14/06/2017
Thème Activités antifongiques des métabolites secondaires de <i>Trichoderma harzianum</i> vis-à-vis de quelques champignons phytopathogènes		
<p>Résumé</p> <p>La recherche des phytopathogènes dans des échantillons de légumes infectés ; la tomate, courgette, carotte. A révélé selon les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques, la présence de 04 souches appartenant à 04 genres (<i>Penicillium sp</i>, <i>Fusarium sp</i>, <i>Alternaria sp</i>, <i>Botrytis sp</i>)</p> <p>L'approche de lutte biologique par essais d'antagonismes <i>in vitro</i> (confrontation direct indirect) ont donné des résultats positifs avec les 4 genres testés : <i>Alternaria sp</i>, <i>Penicillium sp</i>, <i>Botrytis sp</i>, <i>Fusarium sp</i>. Au moyen d'utilisation du champignon <i>Trichoderma Harzianum</i>. Ce dernier a pu inhiber la croissance mycélienne des isolats pathogènes avec une moyenne considérable de 44% en confrontation directe et d'une moyenne de 32% en confrontation indirecte. Alors que Les tests de lutte menée avec les métabolites secondaires du <i>Trichoderma Harzianum</i>, ont montré des faibles pourcentages d'inhibition varient de 8% à 32%.</p> <p>Le test de l'activité enzymatique de la cellulase, lipase, protéase de la souche antagoniste, prouve que la souche testée représente une usine très importante des enzymes lytiques</p>		
Mots clés : Phytopathogènes, <i>Trichoderma Harzianum</i> , Lutte biologique, teste d'Antagonisme <i>in vitro</i> , métabolites secondaires.		
Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et Activité Microbienne (LaMyBAM).		
Encadreur: M ^{elle} ALMI HIBA	MAB. Université Constantine 1	
Président : Mr. DEHIMAT L.	Pr. Université Constantine 1	
Examineur : Mr. OUFROUKH A.	Directeur INRA, Constantine.	

