



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا.

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

Intitulé :

Effet de *Trichoderma harzianum* 127a et *Mucor sp.* sur *Penicillium expansum* agent pathogène de la pomme.

Présenté et soutenu par : **-HAMLAOUI AHLEM.**

Le : 14/07/2019

-BENABDERRAHMANE HADIA.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Mme ABDELAZIZ.W* (Maitre de conférences B - UFM Constantine).

Rapporteur : *Mr DEHIMAT.L. Pr.* (Professeur - UCM Constantine).

Examineurs : *Mme BENKAHOUL.M* (Maitre de conférences B – UFM Constantine).

**Année universitaire
2019 - 2020**

Remerciement

Nous remercions, avant tout " ALLAH " tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail.

Nous voudrions aussi par ces lignes, exprimer nos vifs remerciements à Monsieur le Pr. DEHIMAT L. Doyen de la faculté des sciences de la nature et de la vie, pour nous avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions, Notre profonde reconnaissance s'adresse également à Dr. Arabet D. pour sa disponibilité, ses conseils, et leur conséquente aide apportée durant la réalisation de ce travail. Qu'ils en soient ici profondément remerciés. Nous remercions également à Dr. ALMI H. pour ses orientations éclairées. Nous voudrions également remercier l'ensemble des membres de jury, Mme BENKAHOUL.M et Mme ABDELAZIZ.W pour nous avoir fait l'honneur de leur présence.

Enfin nous adressons nos profonds remerciements à tous ceux qui de près ou de loin, nous ont aidés dans la concrétisation de ce travail

Dédicaces

_A ma très chère mère : **Boubidi Saida**. Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

_A mon très cher père : **Hamlaoui Saci**. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

_A mes frères et petite sœur **Ramzi, Mohamed et Aya**. En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent.

_A mon Fiancé **Djalil**, Pour Ton encouragement et ton soutien, Merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, par ton amour dévoué et ta tendresse.

_A mon binôme **Benabderrahmane Hadia** Je te souhaite une vie pleine de bonheur et de prospérités avec ton époux et ton future enfant.

_A tous mes amis de près ou de loin

AHLEM

Dédicaces

A mon très cher père «MUSTAPHA» : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis pour mon éducation et mon bien être.

A ma tendre mère «FATMA» : Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A mon cher mari «ZINE EDDINE» : Tes sacrifices, ton soutien moral m'ont permis de réussir mes études. Ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A ma belle-mère «ZAHIA» et mon beau père «ABDALLAH» vous m'avez accueilli à bras ouverts dans votre famille. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.

A tous les membres de ma famille, petits et grands veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A ma chère binôme «AHLEM » d'avoir eu le courage d'achever ce travail malgré tout ce qu'elle a enduré.

HADIA

Table des matières

- Remerciements
- Dédicaces
- Liste de figures
- Liste de tableaux
- Liste d'abréviations
- Résumés

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

Revue bibliographique

Chapitre 1 : L'hôte (<i>Malus domestica</i>)	3
---	---

1.1. Historique	3
-----------------------	---

1.1.1. Origine	3
----------------------	---

1.1.2. Étymologie	3
-------------------------	---

1.2. Description	3
------------------------	---

1.3. Classification botanique	4
-------------------------------------	---

1.4. Les maladies fongiques de la pomme.....	4
--	---

✓ La maladie de la suie	4
-------------------------------	---

✓ La maladie crotte de mouche sur pomme.....	5
--	---

✓ La pourriture humide verte.....	6
-----------------------------------	---

Chapitre 2 : <i>Penicillium expansum</i>	7
---	---

2.1. Classification du <i>Penicillium expansum</i>	7
--	---

2.2. Description des caractères de <i>Penicillium expansum</i>	7
--	---

2.2.1 Sur le fruit	7
--------------------------	---

2.2.2 Caractères macroscopique	8
--------------------------------------	---

2.2.3. Caractères microscopique	8
---------------------------------------	---

2.3. <i>Penicillium expansum</i> comme agent causal de maladie	9
--	---

2.4. Circuit de propagation et facteurs favorisants de <i>Penicillium expansum</i>	10
--	----

2.5 <i>Penicillium expansum</i> une source de danger	11
Chapitre 3 : La lutte Biologique	12
3.1. Moyens de lutte	12
3.1.1. La lutte chimique	12
3.1.2. La lutte biologique.....	12
3.2. Le phénomène d'antagonisme	13
3.3. La lutte Biologique par <i>Trichoderma</i>	13
3.3.1. Généralités sur le genre <i>Trichoderma</i>	14
➤ Morphologie	14
➤ Taxonomie	15
➤ Le pouvoir antagoniste et mode d'action de <i>Trichoderma harzianum</i> ...	16
3.4. La lutte biologique par <i>Mucor sp.</i>	16
3.4.1. Description	16
➤ Morphologie	17
➤ Taxonomie	17
➤ Le pouvoir antagoniste et mode d'action de <i>Mucor sp.</i>	18
Partie pratique	
Matériel et méthodes	19
1. Matériels utilisés.....	19
1.1. Matériels biologiques	19
1.1.1. Souches pathogènes	19
1.1.2. Souches antagonistes	19
1.2. Matériel végétal	20
1.3. Milieu de culture	20
1.3.1. Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar)	20
2. Méthodes	20
2.1. Réactivation des souches fongiques	20
2.2. Isolement et purification de la flore fongique	21
2.3. Repiquage des souches fongiques	21
2.4. Confirmation d'identification	22
2.4.1. Identification macroscopique	22

2.4.2. Identification microscopique	22
2.5. Essai <i>in vitro</i>	22
2.5.1. Confrontation par contact direct	23
2.5.2. Confrontation indirecte (à distance)	24
Résultats et discussion	26
1. Résultat	26
1.1.Réactivation des souches fongiques antagonistes	26
1.2.Isolement de la souche pathogène	27
1.3.Purification de la souche pathogène	27
1.4.Repiquage des souches antagonistes et pathogène	28
1.5.Identification macroscopique et microscopique des souches antagonistes	28
1.6.Confirmation d'identification macroscopique et microscopique de la souche pathogène	29
1.7.Test d'antagonisme <i>in vitro</i>	31
1.1.1.Test de confrontation directe	31
1.1.2.Test de confrontation indirecte	32
1.8.Dommages mycéliens causés par les agents antagonistes	35
2. Discussion	36
Conclusion et perspectives	38
Références bibliographiques	40
• Annexe	

Liste des tableaux

Tableau	Description	Page
Tableau 1.	Classification botanique de la pomme	4
Tableau 2.	Classification de <i>penicillium expansum</i>	7
Tableau 3.	Classification de <i>Trichoderma harzianum</i>	15
Tableau 4.	Classification de <i>Mucor sp</i>	17
Tableau 5.	Identification des souches fongiques.	29
Tableau 6.	Effet inhibiteur de <i>T. harzianum</i> et <i>Mucor sp.</i> sur la croissance mycélienne de <i>P.expansum</i> (confrontation indirecte) après 7jours d'incubation	32

Liste des figures

Figure	Description	Page
Figure 1.	Coupe transversale de la pomme	4
Figure 2.	Les symptômes de la maladie de suie sur une pomme	5
Figure 3.	Les symptômes de la maladie crotte de la mouche sur la pomme	5
Figure 4.	Aspect de <i>Penicillium expansum</i> sur une pomme	7
Figure 5.	Aspect des colonies de <i>Penicillium expansum</i> sur milieu CYA	8
Figure 6.	Structures morphologiques de <i>Penicillium expansum</i>	9
Figure 7.	Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de <i>Trichoderma harzianum</i>	14
Figure 8.	Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma harzianum</i>	15
Figure 9.	Aspect Microscopique (a) et macroscopique (b) de <i>Mucor sp.</i>	17
Figure 10.	Pomme locale avec pourriture verte	20
Figure 11.	Schéma de la réactivation des souches fongique	21
Figure 12.	Confrontation directe de <i>Penicillium expansum</i> et la souche antagoniste sur milieu PDA.	23
Figure 13.	Confrontation à distance entre <i>Penicillium expansum</i> et la souche antagoniste sur milieu PDA	24
Figure 14.	Souches fongiques réactivées sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°C.	25
Figure 15.	Souches fongiques isolées sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°C (R : Recto, V : Verso).	26
Figure 16.	Souches fongiques purifiée sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°C.	26
Figure 17.	Développement mycélien des souches fongiques sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°C (R : Recto, V : Verso).	27
Figure 18.	Test d'antagonisme par confrontation directe	30
Figure 19.	Le pourcentage d'inhibition par <i>T. harzianum</i> et <i>Mucor sp.</i> vis-à-vis de <i>P. expansum</i> du test de confrontation directe	31

Figure 20.	Suivi de l'inhibition de la croissance de <i>P. expansum</i> en présence de <i>T. harzianum</i> après sept jours d'incubation à 30°C. (d : test directe, i : test indirecte).	32
Figure 21.	Suivi de l'inhibition de la croissance de <i>P. expansum</i> en présence de <i>Mucore sp.</i> après six jours d'incubation à 30°C. (d : test directe, i : test indirecte).	33
Figure 22.	Le pourcentage d'inhibition par l'isolat <i>T. harzianum</i> et <i>Mucor sp.</i> vis-à-vis <i>P. expansum</i> du test de confrontation indirecte.	33
Figure 23.	a. Enroulement des hyphes de <i>T. harzianum</i> sur celui de <i>P. expansum</i> G X40. b. La lyse et présence de petites vésicules dans le mycélium du pathogène G X40	34
Figure 24.	Enroulement des hyphes de <i>Mucor sp.</i> sur celui de <i>P. expansum</i> G X100.	34

Liste des abréviations

°C : degré Celsius.

Cm: Centimètre.

IC%: Inhibition de la croissance.

DT : Croissance diamétrale du témoin.

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

L : litre.

mg : milligramme.

ml : millilitre.

min : Minute.

% : pourcentage.

mm : millimètre.

PDA : Potato Dextrose Agar.

UMC1 : Université Mentouri Constantine 1.

R : Recto.

SNV : Sciences de la Nature et de la Vie.

Sp: species.

Tr: *Trichoderma harzianum*.

V: Verso.

M:*Mucor sp.*

P:*Penicillium expansum*.

CYA: Czapek Yeast extract Agar.

MEA : gélose à l'extrait de malt.

ACTA : L'Association de coordination technique agricole

Résumé

L'action antagoniste de *Trichoderma harzianum* et *Mucor sp.* a été évaluée *in vitro* contre *P. expansum*. La confrontation directe sur milieu PDA entre l'isolat de *P. expansum* et *T.harzianum* conduit à une inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène testé, avec un pourcentage d'inhibition de 61% à 62 % et 21% avec *Mucor sp.*

En confrontation à distance par rapport aux témoins, *T. harzianum* conduit à une inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène testé, avec un pourcentage d'inhibition de 23,07%. Alors qu'un pourcentage de 17,30% a été observé avec *Mucor sp.* Cette étude a révélé l'aptitude de *T. harzianum* à agir par un phénomène de compétition. Ces résultats peuvent être aussi expliqués par le mécanisme d'antibiose contre le *P. expansum*. Par contre, l'action de *Mucor sp.* illustre le faible pouvoir myco-parasitaire qu'il possède envers *Penicillium expansum* donc son action n'a pas été efficace.

Mot clés : *Trichoderma harzianum*, *Penicillium expansum*, *Mucor sp.*, lutte biologique, compétition.

Abstract

The antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Mucor sp.* was evaluated *in vitro* against *P. expansum*. Direct comparison on PDA medium between the *P. expansum* isolate and *T. harzianum* leads to inhibition of mycelial growth of the pathogen tested, with a percentage inhibition of 61% to 62% and 21% with *Mucor sp.*

In remote comparison with *T. harzianum* controls leads to inhibition of mycelial growth of the pathogen tested, with a percentage inhibition of 23.07%. However, the same test reveals 17.30% with *Mucor sp.* This study revealed the ability of *T. harzianum* to act by a competition phenomenon. These results can also be explained by the antibiosis mechanism against *P. expansum*. On the other hand, the action of *Mucor sp.* illustrates the weak myco-parasitic power against *Penicillium expansum* then its action has not been effective.

Key words: *Trichoderma harzianum*, *Penicillium expansum*, *Mucor sp.*, Biological control, competition phenomenon.

ملخص

ان التأثير المضاد لـ *T. harzianum* و *Mucor sp.* تم تقييمه ضد العزله *P. Expansum* المواجهه المباشرة بين العزله *P. expansum* و *T. harzianum* على بيئة مستخلص البطاطس (PDA) أدت الى تثبيط النمو الميسليومي للعامل الممرض المختبر بنسبة تثبيط من 61 % إلى 62% وبلغت 21% مع العزله الفطرية. *Mucor sp.*

المواجهه غير المباشرة (عن بعد) و المقارنة بالعزلات الشاهده سمحت بأن *T.harzianum* تؤدي الى تثبيط النمو الميسليومي للعامل الممرض المختبر بنسبة تثبيط 23,07% في حين ان النسبة % 17,30 لوحظت مع *Mucor sp.* كشفت هذه الدراسات على ان قدرة *T. harzianum* تمثلت في مشكل ظاهرة التنافس.

هذه النتائج يمكن تفسيرها من خلال آلية التظاد الحيوي لـ *P. expansum* و على العكس فإن تأثير *Mucor sp.* بين القدرة الطفيلية الفطرية الضعيفة التي تشكلها ضد *P. expansum* , و لهذا فإن نشاطها يعتبر غير فعال .

الكلمات المفتاحية : *Trichoderma harzianum*, *Penicillium expansum*, *Mucor sp.* ,التظاد الحيوي ، ظاهرة التنافس.

Introduction

Pour rester en bonne santé, il suffit souvent de bien utiliser les produits qui nous entourent. Le proverbe anglais dit : « *Une pomme par jour nous garde loin du médecin pour toujours !* ». Ainsi, la pomme est connue pour être excellente pour la santé mais également pour la ligne.

Depuis la période historique, où l'homme a commencé à pratiquer l'agriculture et à stocker les pommes après récolte, la croissance fongique indésirable est devenue un ennemi inévitable. Elle est la conséquence d'un processus de détérioration ou d'une contamination due à une mauvaise manipulation.

Les maladies de conservation de pomme causent des pertes économiques importantes dans le monde entier. Ces pertes peuvent varier de 5 à 20% aux Etats-Unis et peuvent dépasser 50% dans les pays en voies de développement (**Janisiewicz et Korsten, 2002**).

Plusieurs espèces fongiques sont incriminées dans ce genre de contamination. Les microorganismes isolés à partir des pommes pourries sont souvent des champignons saprophytes. Le risque que présentent ces individus microscopiques ne réside pas uniquement en leur taille mais aussi en la présence de métabolites toxiques appelés « mycotoxines » qu'ils élaborent dans l'aliment envahi. Parmi les champignons les plus rencontrés dans ce genre de contamination l'espèce *Penicillium expansum*.

Cette situation dresse une problématique essentielle pour contrôler ces organismes fongiques. De ce fait, une série de stratégies a été proposée dans le cadre de lutte contre les moisissures pathogènes de la pomme dont la rotation des cultures et l'utilisation de variétés résistantes. Ces méthodes sont limitées par la grande variabilité pathologique notamment de *Penicillium expansum*.

Cependant, la lutte biologique par l'utilisation de champignons antagonistes peut être envisagée comme un autre moyen pour combattre la maladie dans le cadre d'un programme de lutte intégrée. Les *T. harzianum* et les *Mucor sp.* sont parmi les champignons qui ont un potentiel antagoniste significatif contre une large gamme de champignons phytopathogènes (**Tondje et al., 2007**).

De ce fait l'alternative que l'on peut définir ici ne réside pas dans la découverte de nouveaux agents de lutte biologique, mais plutôt dans la comparaison entre l'effet antagoniste le plus efficace des deux souches *T. harzianum* et *Mucor sp.* contre la souche pathogène *P. expansum* présente dans les pommes pourries et à laquelle on s'intéresse dans ce travail.

Le cadre bibliographique de cette problématique est présenté dans ce manuscrit qui est organisé en trois parties :

La première partie constitue une synthèse bibliographique comportant une présentation de l'hôte (la Pomme) qui nous permettra de mieux appréhender le développement de la pourriture verte. Ensuite, on expose l'agent pathogène responsable de cette maladie et les caractéristiques épidémiologiques et culturelles de *Penicillium expansum* associé aux stades physiologiques de la pomme. Cette synthèse bibliographique s'achèvera sur la nouvelle alternative de lutte biologique contre ce champignon.

Dans la deuxième partie les travaux expérimentaux détaillant les méthodes et les matériels utilisés dans notre étude, principalement les techniques utilisées dans :

1. L'évaluation *in vitro* de l'efficacité des espèces *Trichoderma harzianum* et *Mucor sp.* sur l'inhibition de la croissance mycélienne de l'isolat *Penicillium expansum*. Les deux évaluations sont réalisées selon deux techniques : confrontation directe et confrontation indirecte.
2. La comparaison entre l'efficacité de *Trichoderma harzianum* et *Mucor sp.* sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum*.

Une troisième partie de ce manuscrit expose les résultats obtenus ainsi que leur discussion. Le travail se termine par une conclusion.

Chapitre 1: L'hôte (*Malus domestica*)

1.1. Historique

1.1.1. Origine

La pomme que nous consommons aujourd'hui est une descendante de l'espèce *Malus sieversii* consommée par l'homme depuis le Néolithique sur les plateaux d'Asie centrale il y a 3 000 ans. Elle était déjà consommée par les Chinois. Elle arriva par la route de la soie chez les Arabes, les Grecs et les Romains. Pline l'Ancien en répertoria plus tard environ cent variétés. Aujourd'hui, il existerait plus de 20 000 variétés dont 7 000 sont cultivées à travers le monde (Proust, 2014).

1.1.2. Étymologie

Le mot pomme vient du latin *pomum*, singulier de *poma*, terme utilisé pour désigner tout fruit avec pépins ou noyau, tels la poire, la cerise ou la noix. De la même façon, le mot latin *pomus*, dérivé de *pomum* et le terme à l'origine de *pommier*, était utilisé pour indiquer tout arbre fruitier. Avec le temps, le sens du mot a donc changé de celui plus général de fruit à celui d'un seul fruit qui est « la pomme » (Proust, 2014).

1.2. Description

La pomme est un fruit des arbres du genre *Malus*. Son poids est très variable selon les variétés et les conditions de végétation. Ses couleurs à maturité, se déclinent du vert au rouge plus ou moins foncé en passant par une grande variété d'intermédiaires vert pâle, jaune, orangé ou de couleurs plus ou moins panachées (Proust, 2014).

C'est un fruit arrondi, de forme quasi sphérique, de 10 à 15 cm de diamètre environ, et de couleur différente selon les variétés et les conditions de végétation (Sébastien, 2009).

La pomme peut être divisée en trois zones : la peau, la chaire et le cœur. La chaire et la peau correspondent aux parties consommées du fruit tandis que le cœur contient les carpelles et les pépins.

Sur une coupe transversale, on peut observer au centre, les pépins (les graines) au nombre de deux dans chacune des cinq loges de l'ovaire initial,

entourée d'une enveloppe sclérifiée. L'ensemble étant lui-même entouré d'une pulpe mince (le cœur), qui correspond au développement de la paroi de l'ovaire. Puis une mince membrane fibreuse marque la séparation avec le réceptacle qui s'est considérablement épaissi pour former l'essentiel de la chair du fruit (Sébastien, 2009).

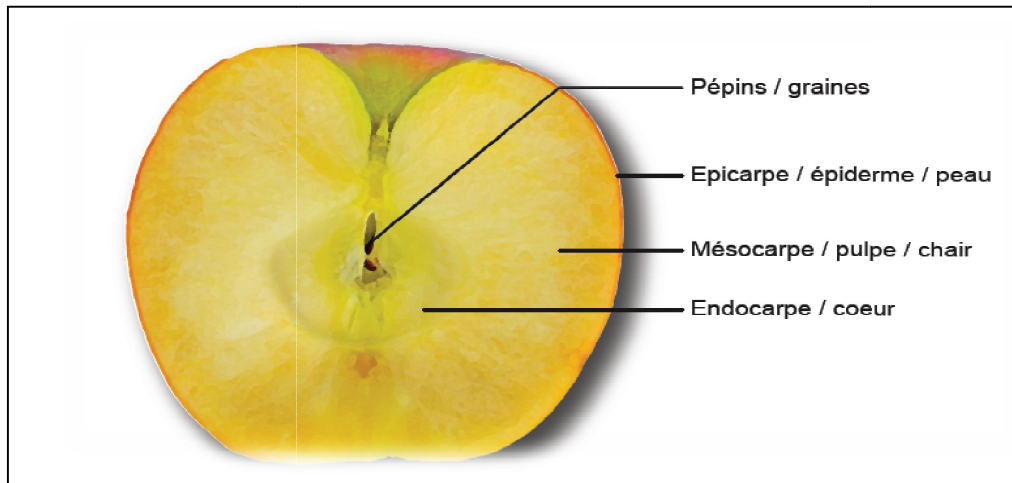


Figure 1. Coupe transversale de la pomme (Sébastien, 2009).

1.3. Classification botanique

Tableau 1. Classification botanique de la pomme

Nom scientifique	<i>Malum</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Rosales</i>
Famille	<i>Rosaceae</i>

1.4. Les maladies fongiques de la pomme

La plupart des maladies apparaissent pendant le stockage, mais les contaminations par des champignons peuvent se faire avant la récolte. Les principales maladies fongiques sont:

- ✓ **La maladie de la Suie:** c'est une maladie estivale qui apparaît dans les vergers bio. Elle a peu de traitements fongicides, elle peut provoquer 100% de perte commerciale de la production. Ce sont les gouttes de pluie qui disséminent les spores par éclaboussures du bois vers les

fruits. Après infection, le mycélium invisible se développe sur la surface du fruit. Ensuite après un certain temps à haute humidité, le mycélium change de couleur et devient gris-olive: les symptômes sont alors visibles (**Figure 2**). Les champignons responsables de cette maladie (un complexe de plusieurs espèces dont *Peltaster fruticola*) survivent sur des plantes des alentours ainsi que sur les branches et les fruits momifiés au sein du verger (**Gleason, 2011**).

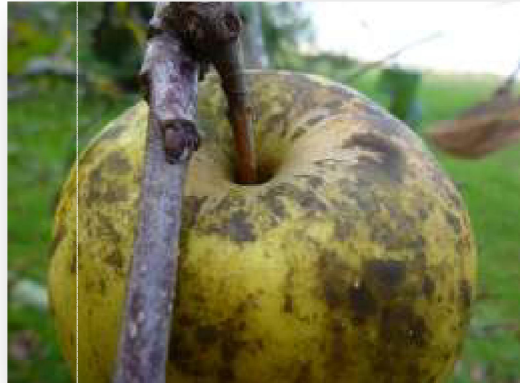


Figure 2. Les symptômes de la maladie de suie sur une pomme (**Gleason, 2011**).

- ✓ **La maladie crotte de mouche sur pomme :** c'est une maladie occasionnellement rencontrée dans les vergers peu traités, notamment en été. De faible importance économique, elle provoque une altération de l'épiderme sans induire de pourriture (Figure 3). Cette maladie est souvent associée à la maladie de la suie.



Figure 3. Les symptômes de la maladie crotte de la mouche sur la pomme (**Gleason, 2011**).

- ✓ **La pourriture humide verte** : causée par *Penicillium expansum*, cette maladie est la plus répandue des pommes en post-récolte (**Janisiewicz, 1999 ; Sholberg et Conway, 2004**). Dans ce travail on s'intéresse particulièrement à l'agent causal de cette pathologie.

Chapitre 2 : *Penicillium expansum*

2.1. Classification du *Penicillium expansum*

Tableau 2. : Classification de *Penicillium expansum* (Tannouset *al.* 2014).

Division	<i>Ascomycota,</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
sous-classe	<i>Eurotiomycetidae</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Trichocomaceae</i>
Genre	<i>Penicillium</i>
Espèce	<i>Penicillium expansum</i>

2.2 Description des caractères de *Penicillium expansum*

2.2.1 Sur le fruit

Le champignon apparaît sur le fruit comme une pourriture molle, humide, en dépression, de forme circulaire et à contour net. La couleur est brun claire à brun foncée, selon la couleur de fond des variétés, et selon l'espèce de *Penicillium*. Au stade final, des fructifications sous forme de coussinets se développent sur les nécroses.

Les symptômes apparaissent moins de sept jours après l'infection à température ambiante, dès le premier mois de stockage au froid. Les pourritures ne se multiplient pas par simple contact sauf si les fruits sont blessés (Giraud, 2016).



Figure 4. Aspect de *Penicillium expansum* sur une pomme (zerbita et Ferragji, 2017)

2.2.2 Caractères macroscopique

L'aspect macroscopique des myceliums de *P. expansum* variant selon le milieu de culture. A titre d'exemple :

Sur milieu Czapek Yeast extract Agar (CYA) les colonies apparaissent d'une taille de 30-40 mm de diamètre, avec un mycélium blanc légèrement plissé, avec des aires adjacentes floconneuses à veloutées, elles présentent une conidiogénèse modérée, des spores de couleur vert foncé, un exsudat clair à brun-orange pâle, elles produisent un pigment soluble de couleur caramel. Le revers des colonies est de couleur pâle à brun foncé, souvent avec des aires orange-brunâtre.

Tandis que sur milieu gélose à l'extrait de malt (MEA), les colonies sont de 20-40 mm de diamètre avec un mycélium généralement lisse, une conidiogénèse habituellement intense, des spores de même couleur que sur CYA ou légèrement plus grises. Cette fois-ci on observe un pigment soluble orange-brun et un revers des colonies de couleur pâle coloré par le pigment (Pitt et Hocking, 1999).

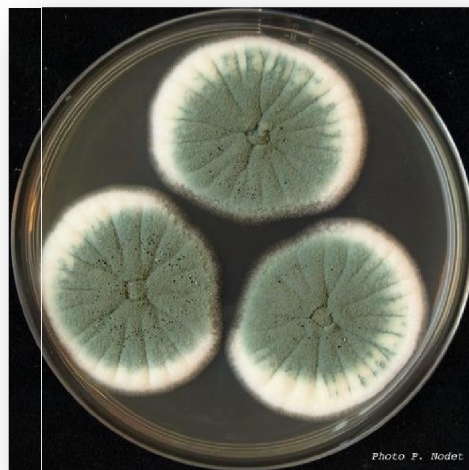


Figure 5. : Aspect des colonies de *Penicillium expansum* sur milieu CYA (Tannouset al. 2014).

2.2.3. Caractères microscopique

Sur le plan morphologique, cette espèce est caractérisée par des conidiophores terverticillés (présentant des phialides sur des métules portées par des rameaux),

regroupés généralement en corémies. Sous microscope, cette espèce est caractérisée par des stipes droits à paroi lisse (Figure 6a), des phialides allongées ampouliformes à cylindriques (Figure 6b) et des conidies à paroi lisse de couleur vert terne, présentant une forme ellipsoïdale (Figure 6c) (**Tannouset al. 2014**). *Penicillium expansum* comme la majorité des espèces appartenant au genre *Penicillium* ne présente pas de sclérotes (**Frisvad and Samson 2004**).

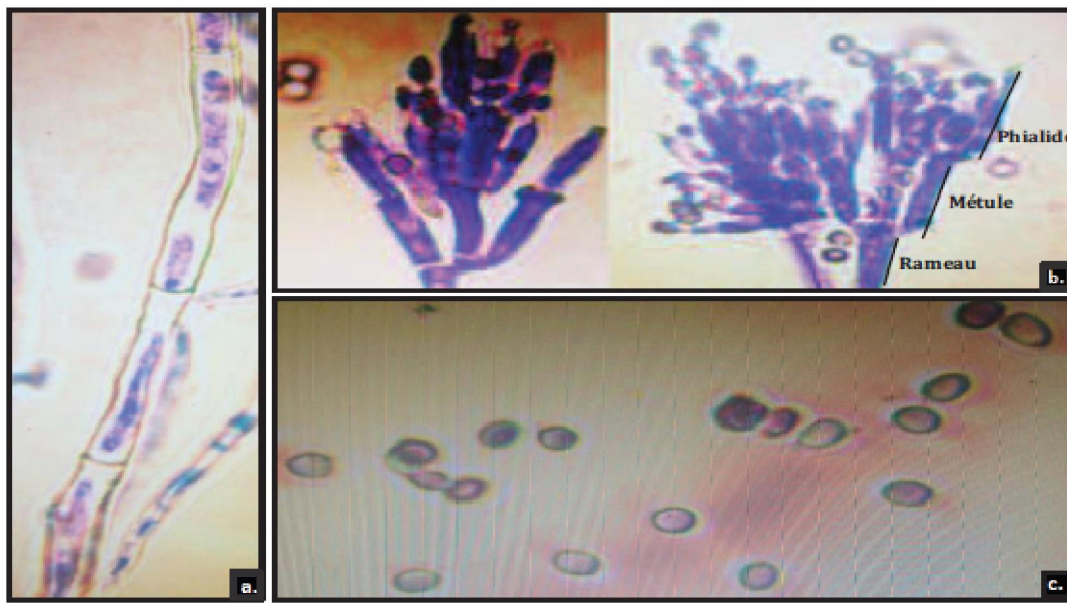


Figure6. : Structures morphologiques de *Penicillium expansum*(**Tannouset al. 2014**)

(a) Stipe de conidiophore, (b) Phialides ampouliformes, (c) Conidies

(Photos prises au microscope optique (x 1000))

2.3. *Penicillium expansum* comme agent causal de maladie

La pourriture verte causée par *Penicillium expansum* est la maladie la plus répandue des pommes en post-récolte (**Janisiewicz, 1999 ; Sholberg et Conway, 2004**).

Penicillium expansum est nécrotrophe et présente une phase saprophytique à la surface des fruits avant de développer une structure infectieuse. Cette phase est possible grâce à la présence de nutriments libérés par les fruits ou se trouvant à leur surface (**Blakeman et Brodie, 1977**).

Ainsi, l'infection primaire de la maladie commence par les blessures qui constituent la porte d'entrée du pathogène. Ces blessures sont causées principalement par des accidents lors de la cueillette ou par les piqûres d'insectes ou de rameaux. Parfois, l'infection peut se produire à travers les lenticelles, particulièrement quand elles sont éclatées par un hydrocraquage pendant une période humide qui suit directement une période sèche ou quand les fruits deviennent très mûrs (**Janisiewicz, 1999**).

2.4. Circuit de propagation et facteurs favorisant de *Penicillium expansum*

Le *Penicillium* se conserve sous forme de propagules sur les déchets de fruits (verger, palox, chambres froides, calibreuses, ...) et de spores dans l'air des locaux de stockage, ou sur les parois. Même si le champignon arrive par les fruits à la récolte, la principale source d'inoculum est dans les locaux de stockage. Les spores présentes sur les parois des chambres froides mal entretenues sont remises en suspension dans l'atmosphère par la ventilation des groupes frigorifiques et contaminent les fruits blessés.

La pourriture se développe rapidement et fructifie abondamment : les spores remises en circulation permettent le renouvellement de l'inoculum. Lors des opérations de calibreage, de précalibreage, de conditionnement, les spores sont reprises par les eaux de convoyage des fruits, et peuvent être responsables de dégâts dans les circuits de distribution, si la concentration est suffisante (au moins 100 spores / ml).

P. expansum libère dans la chaire saine des fruits atteints (la pourriture doit être déclarée) une mycotoxine, la patuline. Celle-ci se retrouve parfois dans les jus de fruits, les compotes, le pommeau, mais pas dans le cidre car elle est détruite par la fermentation (**Giraud, 2016**).

Les facteurs favorisants sont:

- Les blessures et chocs divers à la récolte, pendant le transport et le conditionnement.
- Microblessures formées par éclatement de l'épiderme dus à des stress hydriques (trempages prolongés, différences d'humidité pendant le stockage,...)

- Présence de déchets dans l'environnement de la station
- palox mal nettoyés. (**Giraud, 2016**)

2.5 *Penicillium expansum* une source de danger

Ce champignon ne cause pas seulement des pourritures mais peut également produire une mycotoxine « la patuline » qui est dangereuse pour la santé humaine (Immunotoxique, neurotoxique, néfaste sur l'appareil gastro-intestinal) (**Roussel et al., 2007**). Cette mycotoxine peut réduire considérablement la valeur des fruits attaqués et les rend inacceptables au commerce.

Dans le domaine agricole, divers moyens de lutte contre la maladie causée par *P. expansum* sont utilisées. Ils seront détaillés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 : La lutte Biologique

3.1.Moyens de lutte

De manière générale, la lutte contre les maladies fongiques dans le domaine agricole est basée sur différentes méthodes. La plupart de ces méthodes est orientée pour protéger les plantes saines des maladies plutôt que de guérir les plantes malades. Elles varient en fonction du pathogène, de la plante hôte et de leur interaction chacun avec l'autre dans l'environnement. Le but final de toutes les méthodes utilisées est de combattre les maladies des plantes et alors d'accroître la quantité et améliorer la qualité de la production agricole (**Nasraoui, 2006**).

3.1.1. La lutte chimique

La lutte chimique a pour but d'éviter la maladie (traitement préventif) ou de la stopper (traitement curatif), elle doit être raisonnée en tenant compte de la période de traitement, du produit utilisé, de la dose à appliquer, du spectre d'action de la matière active et de la période de couverture (rémanence).

La lutte chimique contre les agents phytopathogènes concerne essentiellement les champignons responsables des maladies fongiques des plantes et des fruits. La plupart des fongicides affectent directement des fonctions essentielles, comme par exemple la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire. Ce type de mode d'action peut entraîner d'une part, des risques pour l'homme et les organismes non ciblés et d'autre part, le développement de souches fongiques résistantes (**Ruel, 2006**). C'est pour toutes ces raisons que le monde s'oriente vers d'autres types de lutte notamment la lutte biologique.

3.1.2. La lutte biologique

L'Association de coordination technique agricole (ACTA) définit la lutte biologique comme étant « une méthode qui consiste à combattre un organisme nuisible par l'utilisation de mécanismes naturels appartenant soit au règne animal soit au règne végétal, ou qui en dérivent ».

Parmi les méthodes de lutte alternatives permettant de réduire les dégâts dus aux maladies de post-récolte et répondant à la fois aux enjeux environnementaux actuels, une attention considérable a été portée sur la lutte biologique depuis les vingt

dernières années (**Drosby et al., 2009**). Les résultats obtenus ont notamment montré que l'utilisation de micro-organismes antagonistes pouvait constituer une alternative intéressante à la lutte chimique. Leur utilisation contre *P. expansum* repose sur deux approches (**Janisiewicz et Korsten, 2002**) :

- une application juste avant la récolte pour que l'antagoniste puisse coloniser les blessures occasionnées par la récolte avant le pathogène.

- des applications tout au long du développement du fruit pour réduire les infections latentes, causes de l'apparition de pourritures après récolte lorsque les mécanismes de résistance naturels commencent à se dégrader (**Janisiewicz et Korsten, 2002**).

3.2. Le phénomène d'antagonisme

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition (pour éléments nutritifs, oxygène, espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (**Jijkli, 2003**).

3.3. La lutte Biologique par *Trichoderma*

La lutte biologique en utilisant des souches de *Trichoderma sp.* antagonistes contre les agents phytopathogènes telluriques est une alternative potentielle à la lutte chimique (**Harman et al., 2004**).

En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font des souches de *Trichoderma sp.* des agents potentiels en agroalimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (**Prieto et al., 1997**). Des trente cinq espèces recensées, certaines sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques et utilisées comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (**Roquebert, 1996**).

3.3.1. Généralités sur le genre *Trichoderma*

➤ Morphologie

Le genre *Trichoderma* est caractérisé par une vitesse de croissance rapide (5 jours) et une sporulation abondante sur milieu de culture (Gams et Bisset, 1998). Il est facilement reconnaissable en culture grâce à la couleur généralement verte de ses spores (Dubos, 1986). Les conidies de *Trichoderma sp.* donnent naissance à un mycélium floconneux d'abord blanc. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium (Chabasse *et al.*, 2002).

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

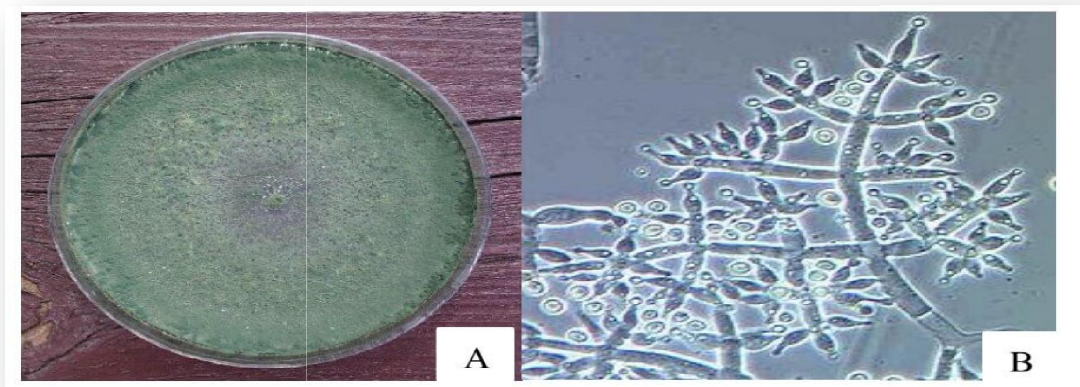


Figure 7.Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de *Trichoderma harzianum* (Mohamed, 2017).

Sur le plan microscopique, le mycélium est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores sont de forme conique ou pyramidale, ils sont ramifiés et portent des phialides en forme de flasque ou de quilles. A leurs tour, les phialides portent des spores (phialospores ou bien conidies) (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001 ; Kubicek *et al.*, 2003).

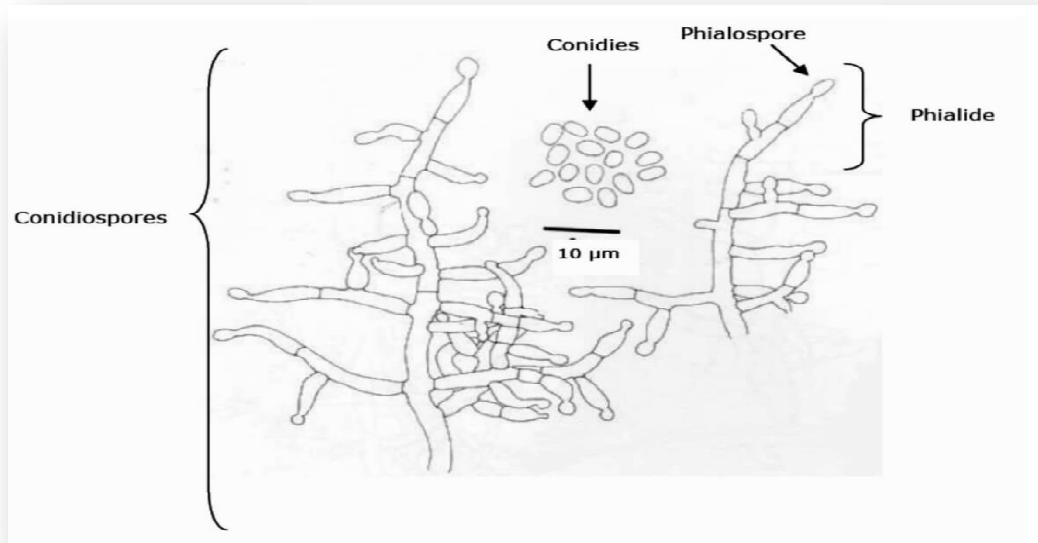


Figure 8. Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma harzianum* (Samuels *et al.*, 1994).

➤ **Taxonomie**

Les travaux de Rifai (1969) et les techniques de la biologie moléculaire, basées sur les polymorphismes des séquences d'ADN ont pu révéler une classification phylogénique pour le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle de *T. harzianum* se présente comme suit :

Tableau 3. Classification de *T. harzianum* (Bissett, 2004).

Règne	<i>Fungi</i>
Embranchement	<i>Amastigomycota et ou Eumycètes</i>
Sous Embranchement	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Sordariomycètes</i>
Sous classe	<i>Hypocreomyotidae</i>
Ordre	<i>Hypocréales</i>
Famille	<i>Hypocraceae</i>
Genre	<i>Trichoderma</i>
Espèce	<i>Trichoderma harzianum</i>

➤ Le pouvoir antagoniste et mode d'action de *Trichoderma harzianum*

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

- L'antibiose

L'antagonisme par antibiose est un mode d'action très répandu chez l'espèce *Trichoderma harzianum* 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).

- La compétition

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

- Mycoparasitisme

Le mycoparasitisme implique une reconnaissance de certaines structures de la paroi de l'hôte par *Trichoderma harzianum*. Ce dernier entoure sa proie par un mouvement d'enroulement des hyphes sur ceux de l'agent phytopathogène en sécrétant des enzymes de dégradation de la paroi de l'hôte. Ce phénomène est suivi par une lyse cellulaire du phytopathogène (Howell, 2003).

3.4. Lutte biologique par *Mucor sp.*

3.4.1. Description

Mucor sp. est un genre dont les filaments fructifères donnent naissance à des spores (anonyme 1, 2012). C'est une moisissure qui s'observe sur les excréments et les matières organiques en décomposition mais également dans la poussière et sur certains aliments tels que les fromages. Il peut être à l'origine de mycoses et d'infections, en particulier chez les personnes immunodéprimées (Pillou, 2015).

➤ Morphologie :

Il est de couleur blanche et d'aspect duveteux et caractérisé par une vitesse de croissance rapide sur milieu de culture. Le thalle filamenteux est dit coenocytique (ou siphonné) (Figure 9). Les cellules ne sont pas séparées par des cloisons transversales, souvent, la columelle ressemble à un bout d'hyphe gonflé (Pillou, 2015).

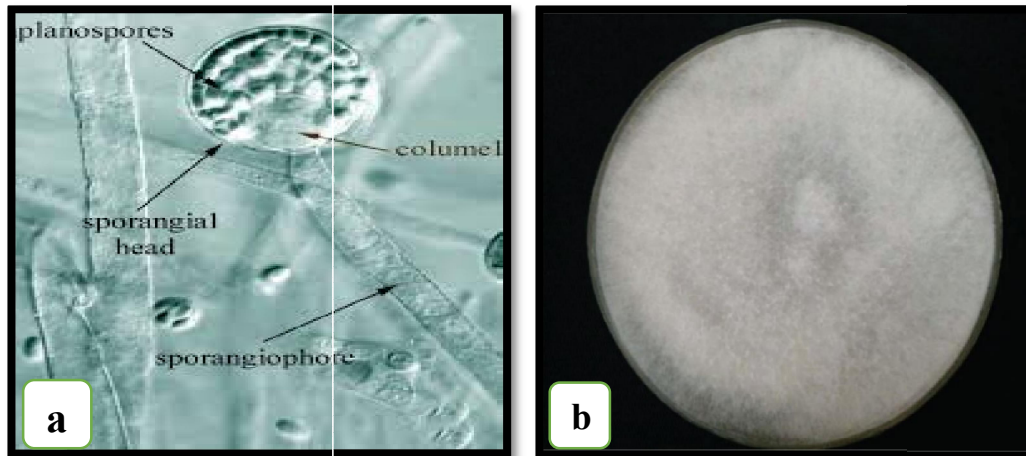


Figure 9. Aspect Microscopique (a) et macroscopique (b) de *Mucor sp.* (Anonyme 2, 2017).

➤ Taxonomie

La position taxonomique actuelle de *Mucor sp.* se présente comme suit :

Tableau 4. Classification de *Mucor sp.* (Bissett., 2004).

Règne	<i>Fungi</i>
Embranchement	<i>Zygomycota</i>
Sous Embranchement	<i>Mucoromycotina</i>
Classe	<i>Phycomycètes</i>
Sous classe	<i>Zygomycètes</i>
Ordre	<i>Mucorales</i>
Famille	<i>Mucoraceae</i>
Genre	<i>Mucor</i>

➤ Le pouvoir antagoniste et mode d'action de *Mucor sp.*

Mucor sp. fait partie des champignons ayant un pouvoir mycoparasitaire vis-à-vis d'un certain nombre de champignons. Le contrôle de ce champignons n'est pas aisé car lorsqu'il s'installe, il est difficile de le déloger (**Dedi et al., 2010**).

Matériels et méthodes

Le présent travail porte sur l'étude de *Penicillium expansum*, agent pathogène de la pomme et la mise en évidence de l'efficacité de *Trichoderma harzianum* et de *Mucor sp.*, pour remédier à la maladie. L'étude a été étalée sur plusieurs axes de recherche :

1. Evaluation *in vitro* de l'efficacité des espèces *Trichoderma harzianum* et *Mucor sp.* sur l'inhibition de la croissance mycélienne des isolats de *Penicillium expansum*.

Les deux évaluations sont réalisées selon 2 techniques : Confrontation directe et confrontation indirecte.

2. Comparaison entre l'efficacité de *Trichoderma harzianum* et *Mucor sp.* sur l'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum*.

Les deux essais ont été conduits en parallèle au Laboratoire de Zoologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Constantine 1.

1. Matériels utilisés

1.1. Matériels biologiques

1.1.1. Souches pathogènes

L'espèce de *Penicillium* utilisé dans cette étude est *Penicillium expansum* qui a été isolée d'une pomme locale, identifiée et purifiée au Laboratoire de Zoologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

1.1.2. Souches antagonistes

Les espèces utilisées pour évaluer l'activité antagoniste contre l'isolat de *Penicillium expansum* sont *Trichoderma harzianum* 127a et *Mucor sp.* Ces dernières ont été fournies et identifiées par le Laboratoire de mycologie et biotechnologie fongique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie sous forme liquide (conserver dans des tubes contenant le milieu Sabouraud et du glycérol à une température de (-20°C).

1.2. Matériel végétal

Une variété locale de pomme a été utilisée pour l'essai



Figure 10. Pomme locale avec pourriture verte.

1.3. Milieu de culture

1.3.1. Le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Le milieu PDA a été utilisé pour l'isolement, la purification, le repiquage, la réactivation des souches et les tests de confrontations.

Le PDA est le milieu usuel de culture pour la plupart des champignons. Sa composition figure en (**Annexe**). A chaque préparation, une dose de 0,4mg d'antibiotique (gentamicine) ont été ajoutés dans 1000ml de milieu pour limiter les contaminations bactériennes des milieux de culture.

Le milieu PDA est préparé comme suit:

- Peser la pomme de terre, lavée et découpée en petits cubes.
- Faire bouillir la pomme de terre dans l'eau distillée pendant 20min puis l'écraser pour obtenir une purée qui est filtrée à l'aide d'une mousseline.
- Répartir en flacons.
- Mettre l'agar agar dans chaque flacon.
- Faire dissoudre le glucose et l'agar-agar, en homogénéisant la solution.

- Ajuster le mélange obtenu en ajoutant de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 1000ml.
- Stériliser le mélange dans un autoclave à 125°C pendant 20min, en tenant compte que les récipients ne doivent pas être remplis à ras bord.

2. Méthodes

2.1. Réactivation des souches fongiques

La réactivation des souches de *T. harzianum* 127a et de *Mucor sp.a* été effectuée à partir des cultures pures sous forme liquide initialement congelées. Ces dernières sont décongelées dans l'étuve à une température de 30°C.

0,1ml de chaque suspension est prise puis étalée de manière uniforme sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. La manipulation est faite dans la zone d'asepsie du bec Bunsen. Les boîtes sont ensuite incubées au terme de 7 jours à 30°C.

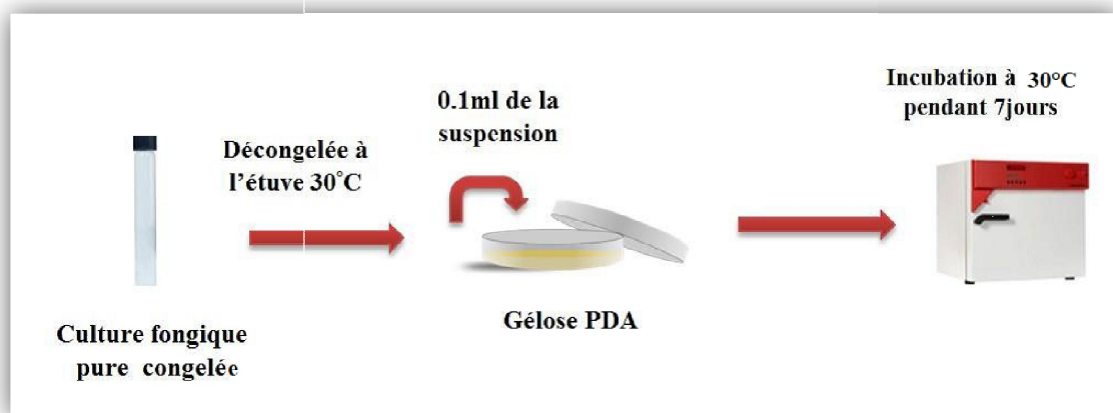


Figure 11. Schéma de la réactivation des souches fongiques.

2.2. Isolement et purification de la flore fongique

Les échantillons utilisés pour cet objectif, sont prélevés à partir de l'épicarpe d'une pomme locale pourrie.

Le travail consiste à l'isolement de la flore fongique des pommes commercialisées au niveau de la Wilaya de Constantine, Est Algérien, pour sélectionner une souche potentiellement phytopathogène.

Pour rappel, trois morceaux ont été prélevés, de chacun, l'épicarpe de la pomme avec tache verte est déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA additionné d'un antibiotique pour inhiber la croissance des bactéries.

Les boîtes sont incubées à 30°C et observées quotidiennement durant 7 jours. Les moisissures développées sont repiquées au centre sur le même milieu dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures.

2.3. Repiquage des souches fongiques

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

La manipulation se fait dans la zone d'asepsie du bec Bunsen. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

2.4. Confirmation d'identification

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

2.4.1. Identification macroscopique

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

2.4.2. Identification microscopique

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

Les caractères microscopiques observés sont ceux du mycélium, des conidiophores et des conidies. En se référant à des clés de détermination du genre

Trichoderma et *Mucor* ainsi que de *Penicillium expansum*, nos propres souches sont identifiées.

2.5.Essai *in vitro*

L'activité antagoniste *in vitro* de *T. harzianum* 127a et *Mucor* sp. a été étudiée selon deux méthodes :

2.5.1.Confrontation par contact direct

Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA, deux pastilles gélosées (6mm de diamètre), l'une portant le *Trichoderma harzianum* 127a ou *Mucor* sp.et l'autre l'agent pathogène.

Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 3cm et à équidistance du centre de la boîte (**Figure 12**). Les repiquages sont effectués en même temps (**Benhamou et Chet, 1996**). L'incubation est réalisée à 30°C pendant sept jours avec des notations concernant l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies de *Penicillium expansum* et leur envahissement par le mycélium du *T. harzianum* 127a ou *Mucor* sp.. Le témoin est constitué d'un repiquage du pathogène (*Penicillium expansum*) au centre de la boîte.

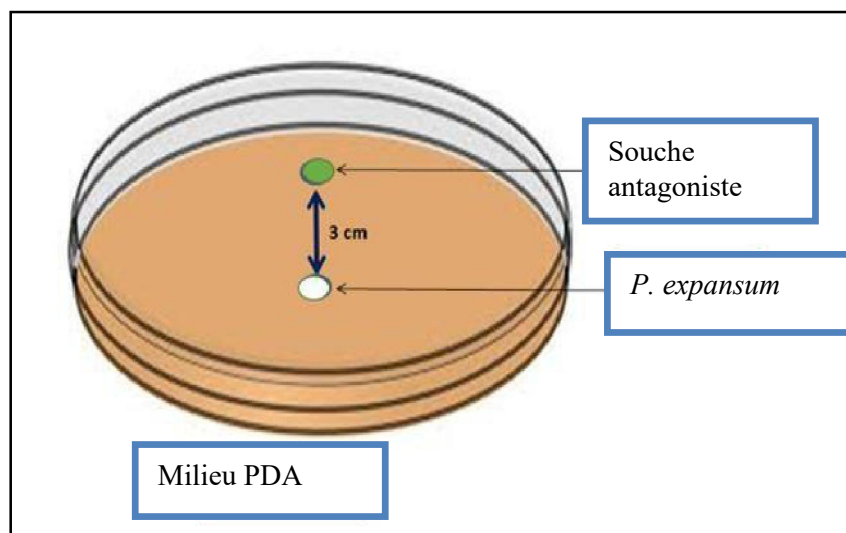


Figure 12.Confrontation directe de *Penicillium expansum* et la souche antagoniste sur milieu PDA.

2.5.2. Confrontation indirecte (à distance)

Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées, puis un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, de manière à ce que l'agent antagoniste (le *Trichoderma harzianum* 127a ou *Mucor sp.*) se trouve en bas et l'agent pathogène (*Penicillium expansum*) se trouve en haut (Figure 13).

La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de Parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (Daami-Remadi et El Mahjoub, 2001). Toute la manipulation se fait dans la zone d'asepsie du bec Bunsen.

Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture.

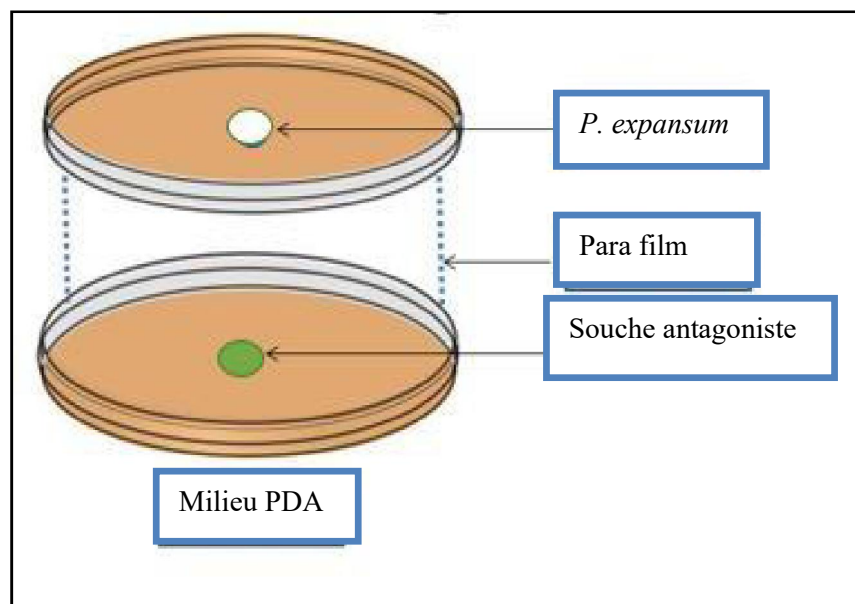


Figure 13. Confrontation à distance entre *Penicillium expansum* et la souche antagoniste sur milieu PDA.

La lecture des résultats consiste à mesurer la distance développée par le pathogène en direction de l'antagoniste après l'inoculation qui sera comparée à celle développée par le pathogène uniquement. L'inhibition de *Trichoderma harzianum* 127a et *Mucor sp.* testées et évaluées par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon la formule proposée par Sy (1976) :

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

Où :

- **DT** : Croissance diamétrale du témoin ;
- **DPA** : Croissance diamétrale mycélienne du pathogène en présence de l'antagoniste;
- **IC%** : Inhibition de la croissance.

Après 2 à 6 jours d'incubation la région d'interface a été observée sous microscope optique en vue d'étudier le mode d'action de *Trichoderma harzianum* 127a et de *Mucor sp.*

1. Résultat

Avant la mise en œuvre de la stratégie de lutte contre les champignons phytopathogènes, il est nécessaire de connaître le comportement des agents antagonistes et leurs interaction avec le pathogène (Larkin et Fravel, 1999). Sur cela des tests d'activités antagonistes *in vitro* ont été réalisés entre le champignon phytopathogène *Penicillium expansum* et les deux agents antagonistes *Trichoderma harzianum* 127a et *Mucor sp.*

1.1. Réactivation des souches fongiques antagonistes

La réactivation des souches sur gélose PDA, à partir d'une culture pure initialement congelée, a donné les résultats suivants (Figure 14)

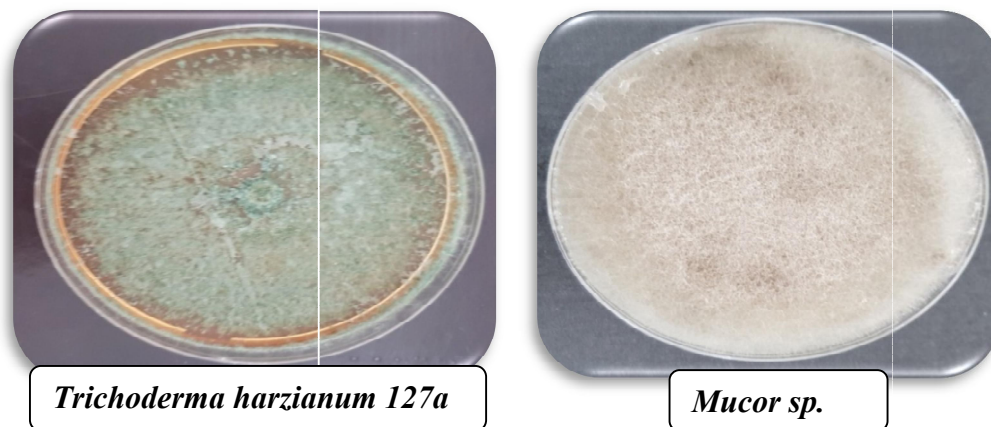


Figure 14. Souches fongiques réactivées sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°C.

1.2. Isolement de la souche pathogène

L'isolement de la souche pathogène est fait à partir des pommes pourries a donné les résultats suivants (Figure 15)

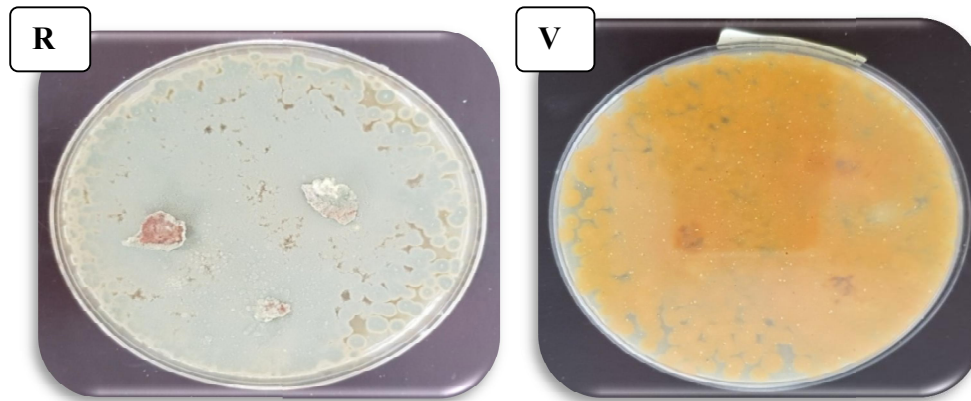


Figure 15. Souches fongiques isolées sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°C (R : Recto, V : Verso).

1.3. Purification de la souche pathogène

Une purification de la souche pathogène a été effectuée aussi sur milieu PDA

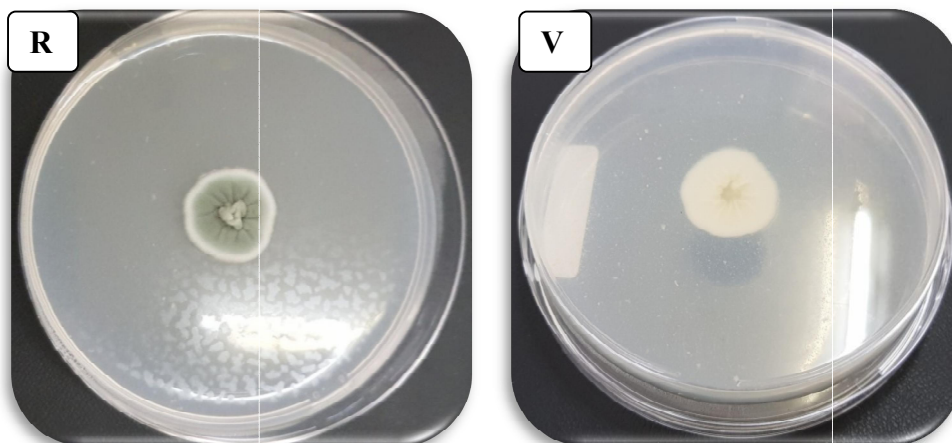


Figure16. Souches fongiques purifiée sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°C.

1.4.Repiquage des souches antagonistes et pathogène

Le repiquage des souches antagonistes est effectué à partir des boîtes de réactivation, si non le repiquage de la souche pathogène est effectué à partir de la boîte de purification. Les résultats sont présentés sur la (Figure 17)

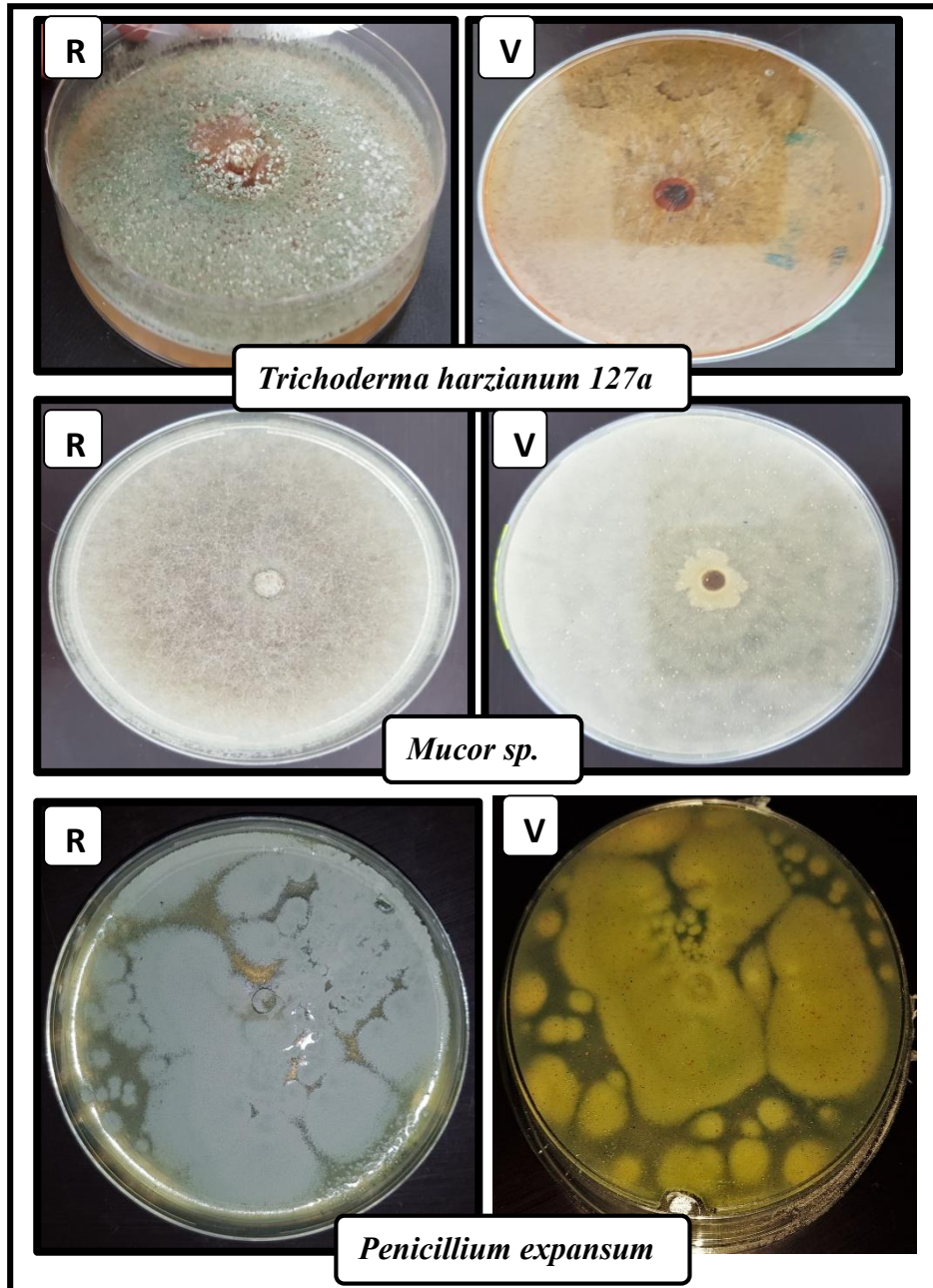


Figure 17.Développement mycélien des souches fongiques sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 30°C (R : Recto, V : Verso).

1.5. Identification macroscopique et microscopique des souches antagonistes

Les souches ont été testées et confirmées.

- *T. harzianum 127a*

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

- *Mucor sp.*

Les colonies antagonistes de *Mucor sp.* repiquées sur milieu PDA présentent un aspect cotonneux d'une couleur blanc-grise claire puis foncée, et un revers incolore.

Sous microscope optique les hyphes sont ni septé, ni rhizoïdes, ni stolons. Les sporangiophores de grande taille globuleux peu colorés naissant sur les hyphes, non ramifié, et sans apophyse (**Bureau, 2018**).

1.6. Confirmation d'identification macroscopique et microscopique de la souche pathogène

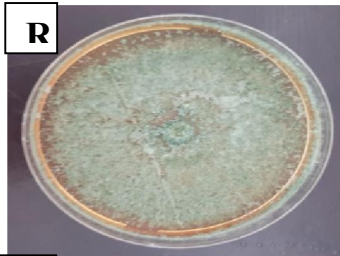
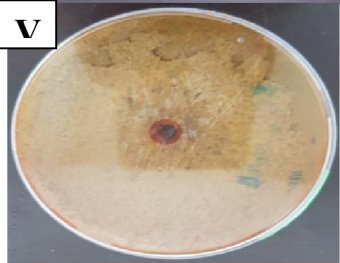
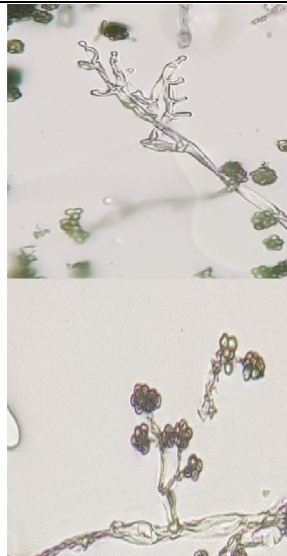


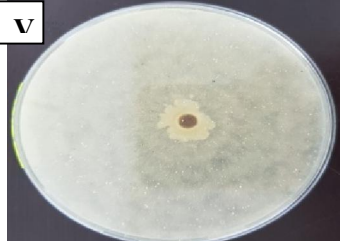

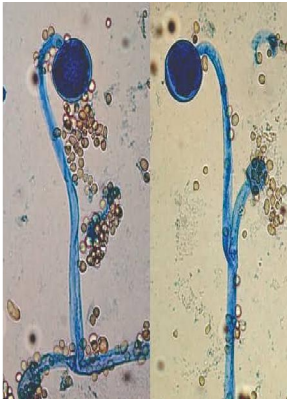



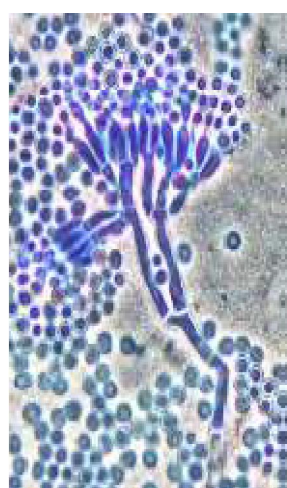
- *P. expansum*

La souche pathogène *P. expansum* repiquée sur milieu PDA a indiquée des colonies veloutée à poudreuse irrégulière, un mycélium blanc légèrement plissé, l'aérien de couleur verte quant au mycélium de substrat il est de couleur brun-verdâtre. La conidiogenèse est modérée et le revers de la boîte est pâle à brun foncé, souvent avec des aires orange-brunâtre.

L'observation microscopique du *P. expansum*, a révélée des filaments septés ramifiés, Des conidies produites par des phialides groupées en verticilles à l'extrémité non dilatée d'un conidiophore fin et cloisonné (disposition en pinceau). Les phialides sont à col peu développés disposées en pinceau serrés (**Chabasse, 2002**).

Les différents aspects macroscopiques et microscopiques des isolats sont récapitulés dans le (Tableau 5).

Tableau 5. Identification des souches fongiques.

Souches	Aspect Macroscopique (Recto Vs Verso)	Aspect Microscopique (GX 40)	Photos Références
<i>T.harzianum</i> 127a	<p>R</p>  <p>V</p> 		<p>b (x10)</p>  <p>(Chabasse, 2002).</p>
<i>Mucor sp</i>	<p>R</p>  <p>V</p> 		 <p>(Walther et al. 2012).</p>
<i>P.expansum</i>	<p>R</p>  <p>V</p> 		 <p>(Chabasse, 2002).</p>

1.7. Test d'antagonisme *in vitro*

1.7.1. Test de confrontation directe

Le repiquage de l'isolat *P. expansum* avec les deux souches antagonistes a montré une croissance plus rapide de *T. harzianum* 127a et de *Mucor sp.* que celle de l'isolat de *P. expansum* (**Figure 18**). Au bout de quatre jours d'incubation, les deux boîtes sont totalement envahies par les antagonistes, alors que l'isolat *P. expansum* n'occupe qu'une surface de 1,9cm avec *T. harzianum* 127a et une surface de 3cm avec *Mucor sp.* Le témoin de *P. expansum* cultivé seul occupe une surface d'environ 5,5cm (**Figure 20 et 21**).

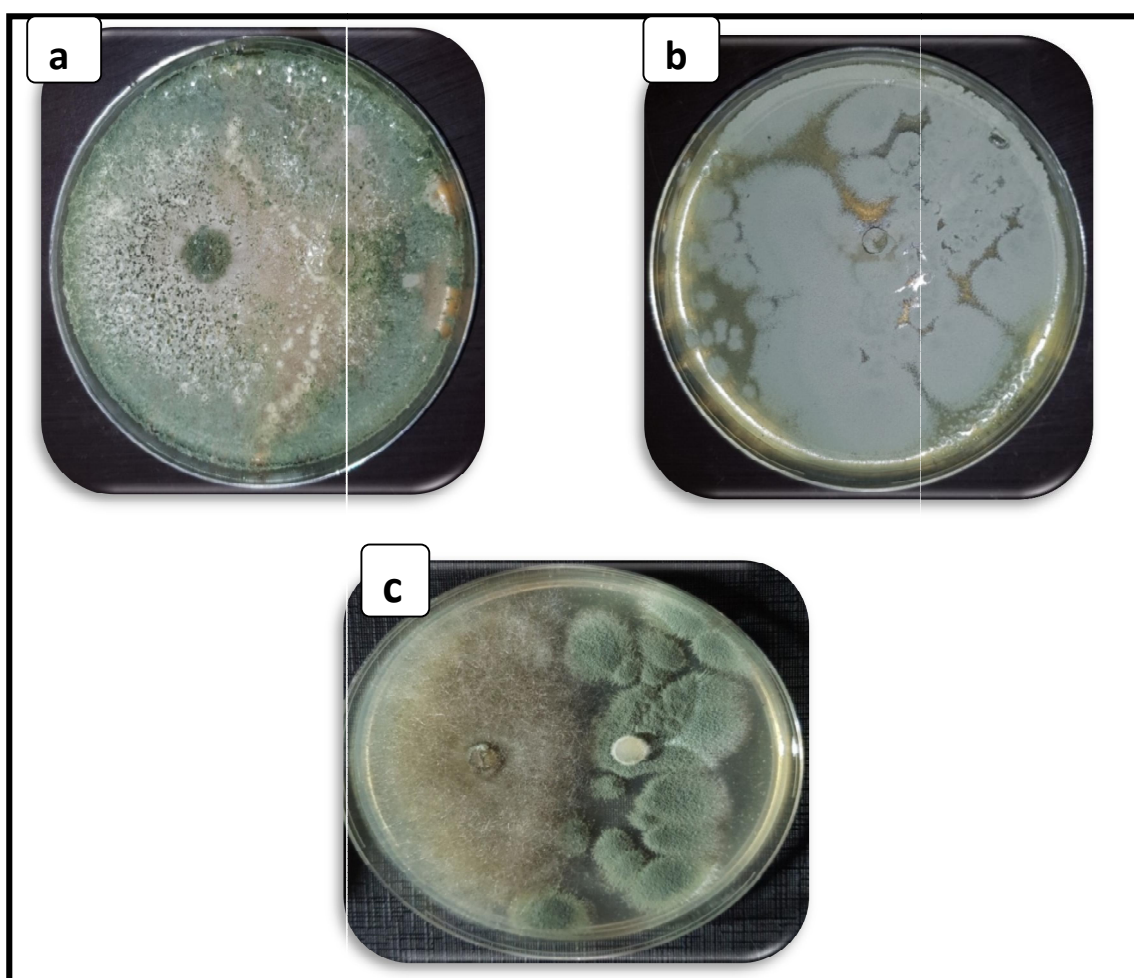


Figure 18. Test d'antagonisme par confrontation directe

- L'envahissement du mycélium de *P. expansum* par *T. harzianum* 127a après 7 jours d'incubation à 30°C.
- Croissance mycélienne de *P. expansum* (témoin) après 7 jours d'incubation à 30°C.
- L'envahissement du mycélium de *P. expansum* par *Mucor sp.* après 7 jours d'incubation à 30°C.

Le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon la formule proposée par Sy (1976), du test de confrontation directe a donné les résultats suivants (Figure 19).

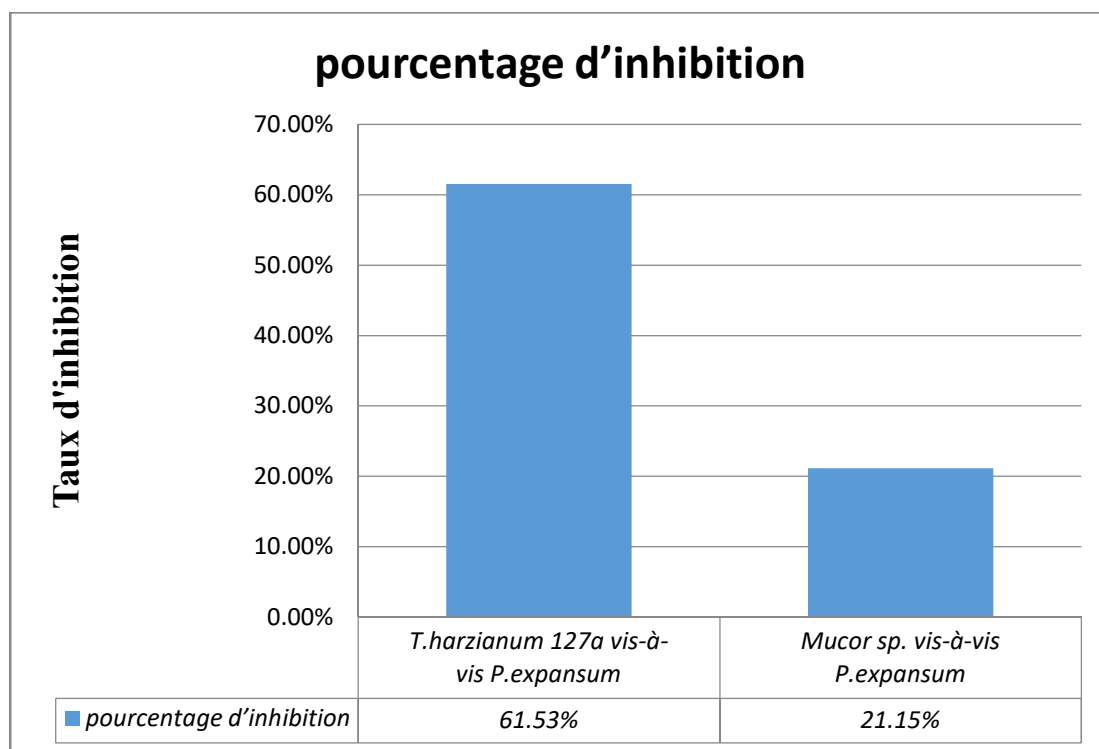


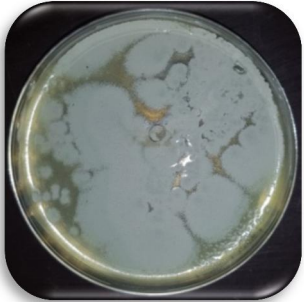
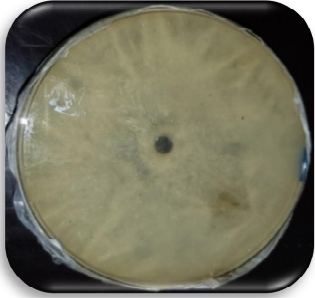

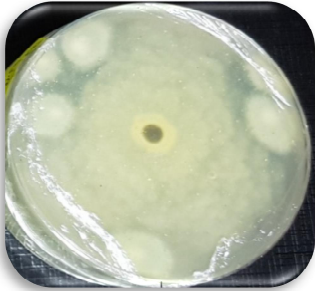
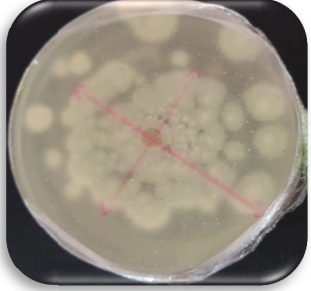
Figure 19. Le pourcentage d'inhibition par *T. harzianum 127a* et *Mucor sp.* vis-à-vis *P. expansum* du test de confrontation directe

1.7.2. Test de confrontation indirecte

La confrontation à distance entre (*T. harzianum 127a*, *P. expansum*) et (*Mucor sp.*, *P. expansum*) (Tableau 6), nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur même à distance du *T. harzianum 127a* et *Mucor sp.* exercé sur l'isolat de *P. expansum* par la mesure des diamètres des colonies.

Les résultats obtenus montrent une nette réduction du diamètre des colonies de *P. expansum* en présence de *T. harzianum 127a* et *Mucor sp.* par rapport au témoin non traité après sept jours d'incubation à 30°C. Cette réduction atteint 4cm pour l'isolat *P. expansum* avec *T. harzianum 127a* et 4,3cm avec *Mucor sp.* (Figure 20 et 21).

Tableau 6 : Effet inhibiteur de *T. harzianum 127a* et *Mucor sp.* sur la croissance mycélienne de *P. expansum* (confrontation indirecte) après 7 jours d'incubation.

Témoin (la souche pathogène <i>P. expansum</i>)	Résultat du test d'antagonisme (face de la souche antagoniste)	Résultat du test d'antagonisme (face de la souche pathogène)
	(face de <i>T. Harzianum 127a</i>) 	
	(face de <i>Mucor sp.</i>) 	

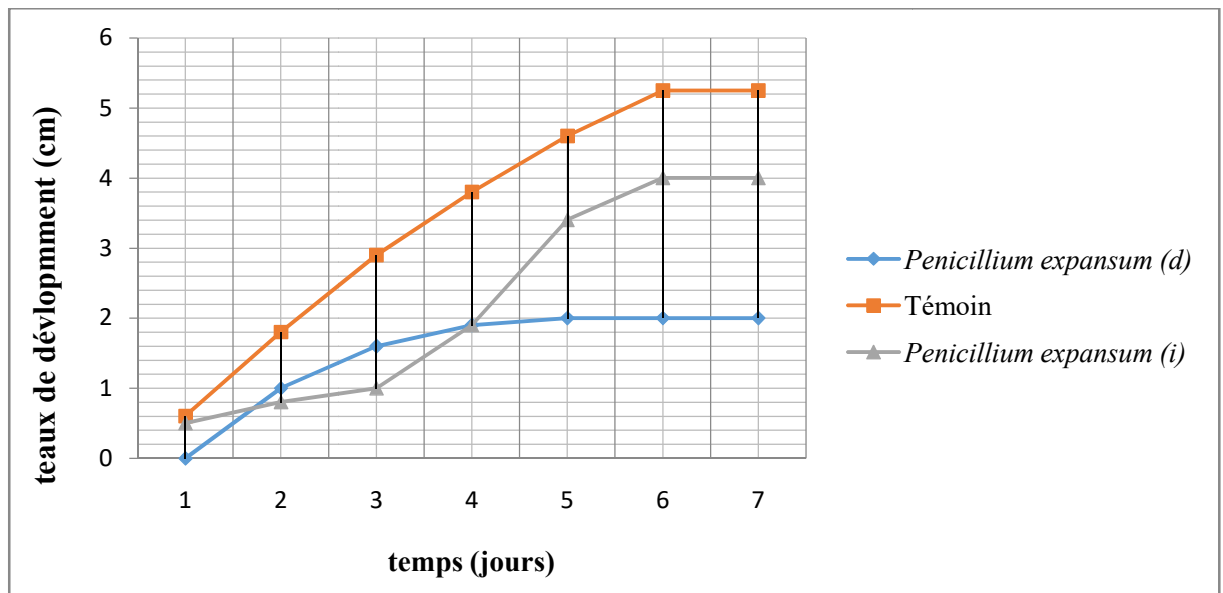


Figure 20. Suivi de l'inhibition de la croissance de *P. expansum* en présence de *T. harzianum 127a* après sept jours d'incubation à 30°C. (d : test directe, i : test indirecte).

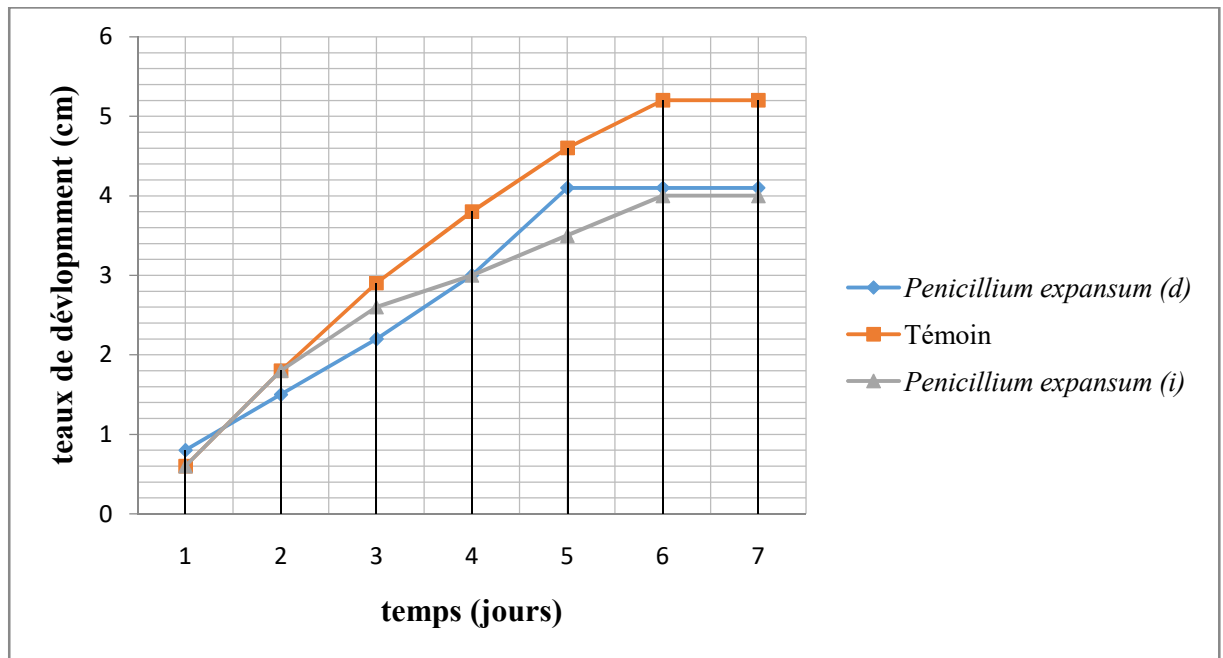


Figure 21. Suivi de l'inhibition de la croissance de *P. expansum* en présence de *Mucore* sp. après six jours d'incubation à 30°C. (d : test directe, i : test indirecte).

Le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon la formule proposée par Sy (1976), du test de confrontation indirecte a donné les résultats suivants (Figure 22).

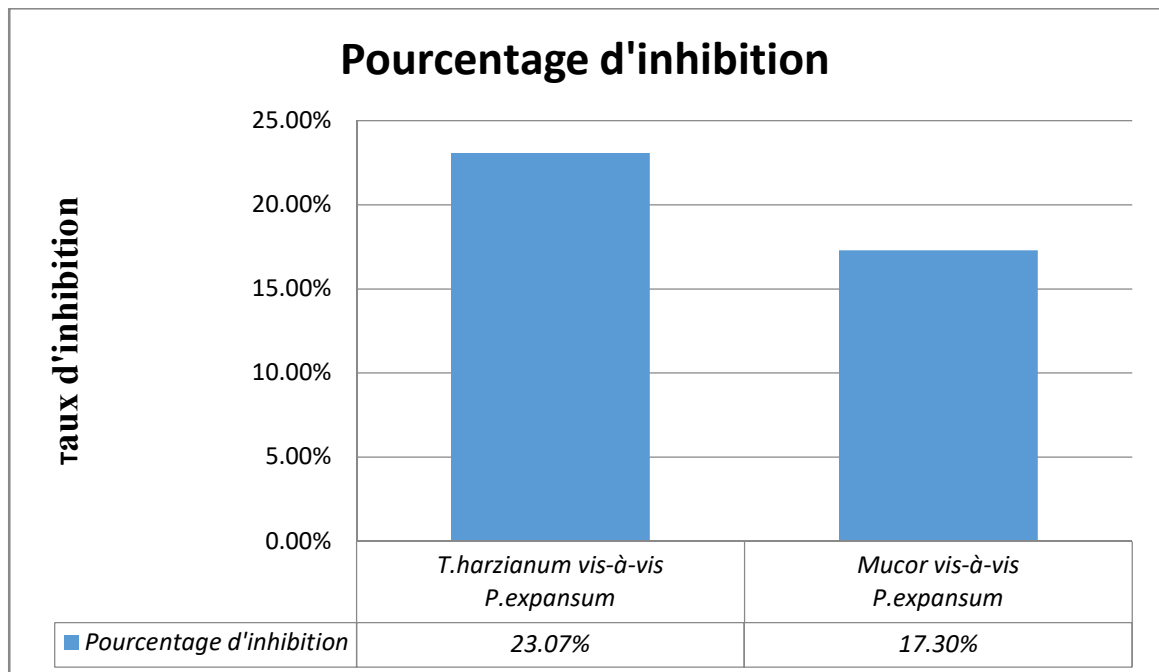


Figure 22. Le pourcentage d'inhibition par l'isolat *T. harzianum* 127a et *Mucor* sp. vis-à-vis *P. expansum* du test de confrontation indirecte.

1.8. Dommages mycéliens causés par les agents antagonistes

Des observations microscopiques réalisées au niveau de la zone de contact entre *P. expansum* et les souches antagonistes *T. harzianum* 127a, *Mucor* sp. montrent une modification profonde au niveau du mycélium du pathogène se marquant par une lyse importante, une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium de *T. harzianum* 127a et *Mucor* sp. sur celui du pathogène (Figure 23 et 24).

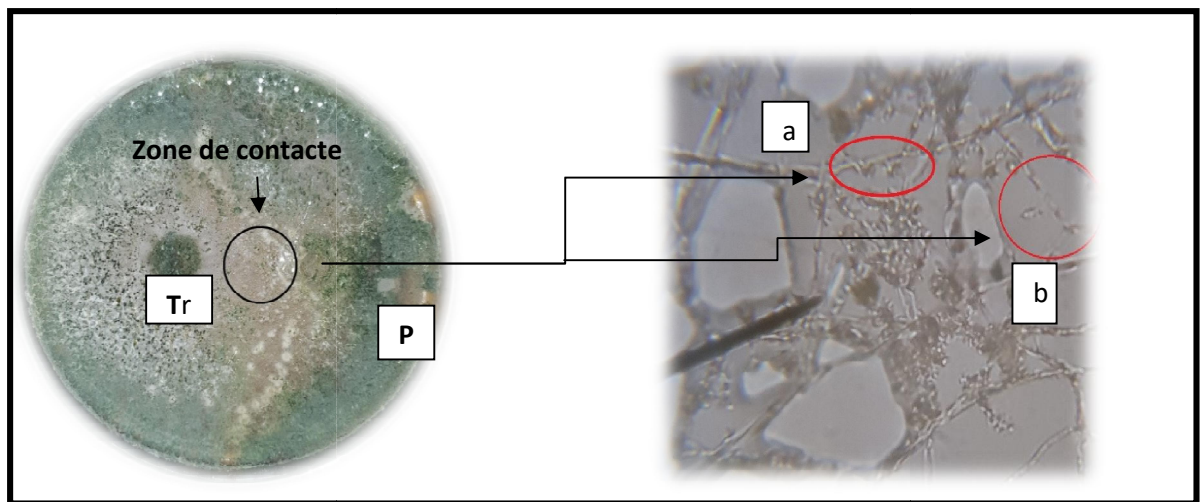


Figure 23. a. Enroulement des hyphes de *T. harzianum* 127a sur celui de *P. expansum* GX40.

b. La lyse et présence de petites vésicules dans le mycélium du pathogène G X40.

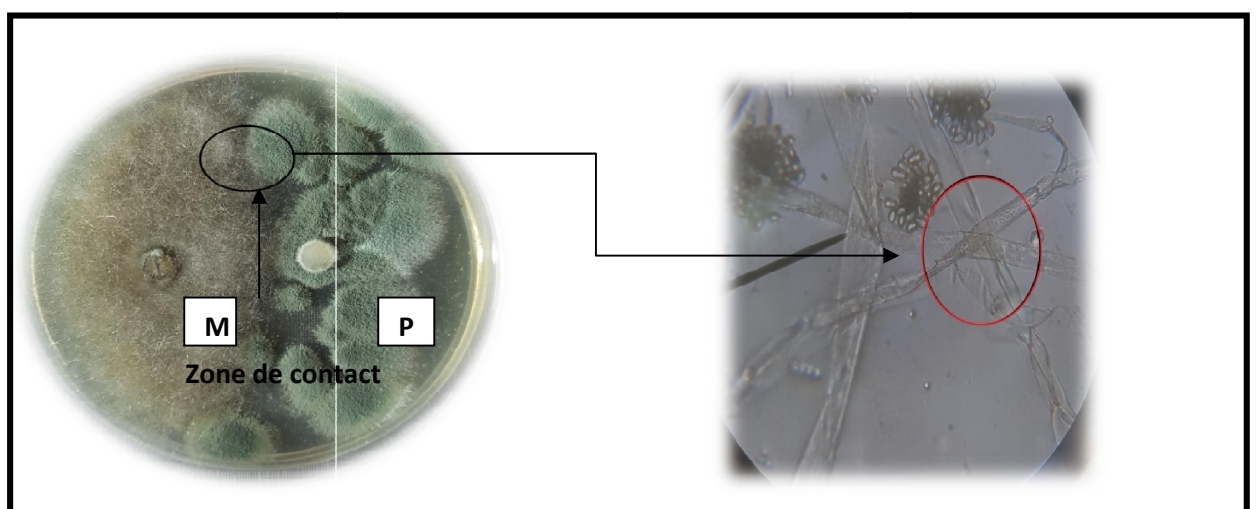


Figure 24. Enroulement des hyphes de *Mucor* sp. sur celui de *P. expansum* G X100.

2. Discussion

L'analyse des résultats nous révèle qu'une réponse positive a été observée d'après les essais *in vitro* de confrontations entre les deux agents antagonistes (*T. harzianum* 127a, *Mucor* sp.) et l'isolat *P. expansum*, que ce soit d'une façon directe sur milieu de culture ou bien à distance. Ces résultats ont révélé une inhibition importante de la croissance mycélienne de l'isolat testé avec *T. harzianum* 127a par contre un faible résultat est obtenu avec *Mucor* sp.

Les résultats de la confrontation directe entre les souches antagonistes (*Trichoderma harzianum* 127a, *Mucor* sp.) et l'isolat de *P. expansum* montrent que la croissance mycélienne de la souche témoins est plus importante en comparaison à ceux obtenus avec les deux différentes confrontations directes. Après 7 jours d'incubation, la première boîte est totalement envahie par l'antagoniste, alors que les isolats du pathogènes n'occupent qu'une surface de 2cm de diamètre, ce qui correspond à une inhibition de croissance mycélienne supérieure à 50% pour *T. harzianum* 127a. La deuxième boîte qui contient l'agent antagoniste *Mucor* sp. Dans laquelle l'isolat a pris une surface de 4,1cm donc l'inhibition de croissance mycélienne du pathogène est totalement inférieure à 50% pour *Mucor* sp.

Le témoin des souches pathogènes occupe une surface variant de 5,2 à 5,7cm de diamètre. En effet, le calcul de taux d'inhibition montre que la souche de pathogène est inhibée à plus de 50% avec l'agent *T. harzianum* 127a et au moins de 50% avec *Mucor* sp. (**Figure 19**)

La croissance de la souche *P. expansum* est très lente dans le cas de confrontation directe, ceci est justifié par le fait que l'antagoniste montre une capacité d'arrêter le développement du parasite avec formation d'une zone d'inhibition entre les colonies confrontées à une largeur variable selon l'isolat.

Ces résultats sont en parfaite conformité avec ceux obtenus par (**Albouvette et al., 1983 Dubot, 1985 et Davet, 1996**) qui ont montré que la croissance de *Trichoderma harzianum* est plus rapide que celle du pathogène, de ce fait, elle colonise le milieu nutritif et assimile les éléments nutritifs, c'est le phénomène appelé compétition. Ces résultats peuvent être aussi expliquée par le mécanisme d'antibiose, qui est dû à la sécrétion de substances agissant comme étant des antibiotiques et qui

inhibent aussi la croissance du pathogène. Ceci est d'autant plus justifié par l'observation qu'on a faite sur l'aspect microscopique des mycéliums qui apparaissent pratiquement détruits.

L'activité antagoniste de *Mucor sp.* contre une souche de *Penicillium sp.* a également été observée par **Dedi et al.** en **2010**, où au bout de quatre jours d'incubation, *Mucor sp.* n'empêche pas vraiment le développement de *Penicillium sp.* ce qui illustre le faible pouvoir mycoparasitaire que possède *Mucor sp.* envers *Penicillium sp.* et Ce qui correspond parfaitement à nos propres résultats.

Dans le cas de la confrontation à distance, malgré l'absence d'un contact direct entre les deux champignons dans les deux boîtes, les résultats obtenus montrent un ralentissement de la croissance mycélienne de l'isolat pathogène (*P. expansum*) exercé par les souches antagonistes (*T. harzianum 127a* et *Mucor sp.*) comparativement aux témoins. Il ressort de ces résultats que malgré l'absence d'un contact direct entre l'isolat pathogène et les antagonistes testés, ces derniers ont pu exercer un effet inhibiteur sur le développement des colonies pathogènes. Après sept jours d'incubation à 30°C, le diamètre moyen des colonies est de 4cm pour l'isolat de *P. expansum* vis-à-vis de *T. harzianum 127a* se qui présente une inhibition de l'ordre de 23,07%, et 4,3cm pour la même souche vis-à-vis de *Mucor sp.* avec un taux d'inhibition de l'ordre de 17,30% (**Figure 22**).

Il est clair que le test d'antagonisme réalisé par confrontation directe donne de meilleurs résultats. Ceci est complètement logique vu le contact cellules-cellules entre antagoniste et pathogène. Cette interaction donne plus de chance à l'antagoniste pour atteindre les zones sensibles et réaliser ainsi une attaque mieux ciblée.

Tandis que, dans la confrontation indirecte, c'est le passage des substances volatiles qui induit l'effet antagoniste. Ceci demande un temps de passage vers le compartiment du pathogène et ralentit ainsi l'effet.

Conclusion et perspectives

La recherche de nouvelles stratégies de lutte surtout biologiques, contre les champignons phytopathogènes est devenue un challenge principal d'un grand nombre de laboratoires dans le monde entier. L'objectif de ce challenge est de mettre sur le marché des produits biologiques efficaces au profit de l'agriculture.

Les travaux présentés dans ce mémoire visaient l'élaboration d'une stratégie de lutte biologique envers le *P. expansum* des pommes pourries en exploitant l'effet bénéfique de traitement par *T. harzianum* 127a et *Mucor sp.* Dans ce contexte, la lutte biologique contre l'agent pathogène des pommes à l'aide des champignons antagonistes semble être une alternative prometteuse par rapport l'emploi des fongicides.

En effet, les essais de confrontations entre *T. harzianum* 127a et *P. expansum*, que ce soit d'une façon directe sur milieu de culture ou bien à distance, ont révélés une inhibition de la croissance mycélienne du pathogène testé. S'il y a contact direct entre les deux champignons, *T. harzianum* 127a et *Mucor sp.* envahissent les colonies de *P. expansum* en provoquant une modification profonde au niveau du mycélium du pathogène (déformation du mycélium), une transformation en cordons des filaments mycéliens et un enroulement du mycélium de l'agent antagoniste sur le mycélium de pathogène.

Dans le cas de la confrontation à distance, malgré l'absence d'un contact direct entre les deux champignons (*T. harzianum* 127a et *P. expansum*), (*Mucor sp.* et *P. expansum*) les résultats révèlent qu'une réduction du diamètre des colonies de *P. expansum* est observée par rapport au témoin non traité. Cela prouve qu'en plus de leur pouvoir mycoparasitaire, *T. harzianum* 127a peut agir par la sécrétion de substances volatiles qui sont capables de stopper à distance le développement de l'agent pathogène, idem pour le *Mucor sp.* mais de façon moins efficace que par *T. harzianum* 127a.

Enfin cette étude qui a été mené et finalisée, n'est pas une fin en soi, mais une modeste approche à la connaissance de l'efficacité des agents antagonistes sur l'une des nombreux pathologies de la pomme. Aussi nous souhaiterions que ce travail soit un exemple pour d'autres études similaires, pour cela, plusieurs perspectives sont liées à ce travail, en l'occurrence

| Conclusion et Perspectives

- En terme génétique, il serait passionnant d'améliorer l'efficacité de *T. harzianum* 127a et *Mucor* sp. pour les caractéristiques souhaitables contre d'autres agents pathogènes des pommes.
- Identification plus approfondis des isolats de *Mucor* sp.
- Identification des substances bioactives issus de l'activité antagoniste des deux isolats *T. harzianum* 127a et *Mucor* sp.
- En plus, l'identification morphologique de ces espèces doit être confirmée par les outils moléculaires.
- La pourriture humide verte sur la pomme affecte le rendement surtout sur le plan qualitatif avant et après récolte par la production de mycotoxines nuisible pour la santé humaine et animale. Ainsi une analyse de la capacité toxigène des isolats serait très utile.

Références bibliographiques :

- **Anonyme 1, (2012) [en ligne].** Centre national de ressources textuelles et lexicales (page consultée le 27/06/2019). <https://www.cnrtl.fr/definition/mucor>
- **Anonyme 2, (2017) [en ligne].** Creative Commons Attribution 2.0 Generic (page consultée le 29/06/2019) <https://www.researchgate.net/figure/Mucor-spp>
- **Benhamou N., Chet I. (1996).** Parasitism of sclerotia by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86, p. 405–416.
- **Benhamou N., Chet I., (1996).** Parasitism of sclerotia by *Trichoderma harzianum*:
- **Bissett J. (2004)** . Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. *The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*, PhD Oscar Grillo, 303-320.
- **Blakeman J.P. and Brodie I.D.S. (1977).** Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. *Physiol. Plant Pathol.*, 10, 29 – 42.
- **Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990),** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris.
- **Botton B.; Bretton A.; Fever M.; Gautier S.; Guy Ph ., Larpent J.P.; Reymond**
- **Chabasse D., (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation N°25. Biologie médicale. Paris. Ed bioforma 230 bd Rspail 75014
- **Chabasse D., Bouchara J.P., de Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P., (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Cahier de Formation Bioforma, Edition Bioforma Paris, 25: 26 – 45
- **Cournut, B., (1984).** Le genre *Trichoderma* hyphomycètes. Th : Pharmacie: Marseille : 77 p.
- **Daami- Remadi M., El Mahjoub M. (2001).** Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann.l'INRAT* 74, p. 167–186.
- **Daami- Remadi M., El Mahjoub M. (2001).** Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann.l'INRAT* 74, p. 167–186.

- **Drosby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., Wilson, C. (2009).** Twenty years of postharvest biocontrol research : is it time for a new paradigm ? Post harvest Biology and Technology, 2009, Vol.52, pp. 137-145.
- **Dubos, B. (1986).** L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens : *Chondrostereum purpureum* (Pers. ex Fr.) Pouzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* Pers. (pourriture grise de la vigne). Pp 35- 49. In : L'emploi d'ennemis naturels dans la production des cultures. Versailles, 10 janvier 1985. Ed. INRA (Les colloques de l'INRA, n° 34).
- **Gams, W. and Bissett, J. ,(1998).** Morphology and identification of *Trichoderma*.In:Harman G. E., Kubicek C. P. (eds) *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol 1, Basic biology, taxonomy and genetic, pp 1-33. Taylor and Francis Ltd, London, UK.
- **Giraud, M (2016)** .ephytia [en ligne] .(page consultée le 17/06/2019).
<http://ephytia.inra.fr/fr/C/22132/Di-gno-Pom-Principaux-symptomes>
- **Gleason , C (2011).** LUCIANA PARISI INRA-Pathologie végétale. Centre PACA, site d'Avignon Les articles de Luciana Parisi dans Jardins de France : Pommier : réémergence des maladies de la suie et des crottes de mouches
- **Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M.(2004).** *Trichoderma* species oportunistic,avirulent plant symbionts. Nature Reviews of Microbiology, 2:43- 58.
- **Howell C.R.(2003).** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Diseases, 87: 4–10.
- **Janisiewicz, W. (1999).** Blue mold. *Penicillium Spp.* Fruit Disease Focus [en ligne]. Disponible sur Word Wide Web : . Consulté le 25 Mai 2019.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503003805>
- **Janisiewicz, W.J., Korsten, L., (2002).** Biological control of postharvest diseases of fruits. AnnualReview of Phytopathology, 2002, Vol 40, pp. 411–441.
- **Jean-François Pillou, (2015) [en ligne]**Journal des Femmes Santé (page consultée le 27/06/2019). <https://sante-medecine.journaldesfemmes.fr/faq/51689-mucor-definition>

- **Jijakly M.H. (2003).** La lutte biologique en phytopathologie, In : Phytopathology. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles. D'antagonistes dans une perspective de lutte biologique Thèse Doct. Ingénieur INP Toulouse, N°534. P : 236.
- **Johanne Caron (5 décembre 2002).**, phytopathologiste Horti-Protection inc. Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.
- **Juliette DEDI, Atcho Otchoumouet Kouassi Allou. (2010).** Effet de l'interaction in vitro et in vivo entre *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. et *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phoma* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. Afrique Science (page consultée le 27/06/2019) <http://www.afriquescience.info/>
- **Kubicek, C.P ; Bissett, J. ; Druzhinina, I., Kullinig-Gradinger, C. et Szakacs, G., (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.; a case study on south-eastasian isolates. *Fungal Genet. Biol.*, , 38 (3): 310-319.
- **Landreau, A., (2001).** Métabolites d'une souche de *Trichoderma Koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, Biologie et risques pour les coquillages en culture. Th. : Pharmacie : Nantes :, 201p
- **Larkin RP., Fravel DR., (1999).** Mechanisms of action and Dose-Response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of Tomato by non pathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* **89**, p. 1152–1161.
- **Bedrane M. (février 2, 2017)** Aspect macroscopique (a) et microscopique (b) de *trichoderma harzianum*. (page consultée le 27/06/2019) <http://agronomie.info/fr/trichoderma-harzianum/>
- **Mouria B. Ouazzani-Touhami A. et Douira A., 2013** - Effet du compost de *Trichoderma harzianum* sur la suppression de la verticilliose de la tomate. *Journal of Applied Biosciences*, 70 : 5531–5543.
- **Nasraoui B. (2006)** . Les Champignons Parasites Des Plantes Cultivées, Biologie, Systématique, Pathologie, Maladies. Chapitre 1. p : 141-151. Chapitre 3 et 4. p : 320-447.
- **Pitt J.I., Hocking A.D. (1999).** *Fungi and Food Spoilage*. (2nd edn.) ed., Blackie Academic and Professional, London ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86, p. 405–416.
- **Prieto, A, leal, J.A, Poeda, A., Jiménez-Barbero, J., Gomez-Miranda, B., Domenech, J, Ahrazem, O., & Berabé, M., (1997).** Structure of complex cell wall

polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *hypocrea* species. *Carbohydrate Research* 1997, 304 (3-4) : 281-29

- **Proust, C(2014)**. La pomme dans l’histoire [en ligne]. (page consultée le 13/05/2019).
<http://blog.univ-angers.fr/pommepommepidou/category/le-fruit/la-pomme-et-sa-description/>
- **Roquebert M-F.,(1996)**. Interactions antagonistes des *Trichoderma sp.* Dans les systèmes telluriques : systématique biologie et écologie des organismes. Comptendu des 4 emes rencontres en toxicologie, paris, 13-15.
- **Roussel M., Lemarchand M., Benard M., Dreyfus J. (2007)**. La patuline. Fiche technique du service régional de la protection des végétaux de Haute-Normandie.
- **Samuels, G. J. ;Petrini, O. et Mangui, S.,(1994)**. Morphological and macromolecular characterization of *Hypocreasch weinitzii* and its *Trichodermaanamorph*. *Mycologia* , 86: 421-435.
- **Sébastien gillard (2009)**. les dihydrochalcones de la pomme : extraction, séparation et intérêt médical : mémoire de diplôme d’état de docteur en pharmacie. l’université louis pasteur de strasbourg, 140p .
- **Sholberg, P.L., Conway, W.S., (2004)**. Postharvest Pathology. In Gross, K.C., Wang, C.Y., Saltveit, M., (Eds). Agriculture Handbook Number 66: The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks.
- **Sy A.A. (1976)**. Contribution à l’étude de *PyriculariaoryzaeCav.* Recherche In Vitro D’antagonistes dans une perspective de lutte biologique Thèse Doct. Ingénieur INP Toulouse, N°534. P : 236.
- **Sylvaine B, (2018)**.Mycologie Études macroscopique et microscopique des champignons microscopiques de l’environnement et des aliments 1. [en ligne].(site consulté le 28/05/2019) SlidePlayer.fr.Inc. <https://slideplayer.fr/slide/474747/>
- **Tannous, J., R. El Khoury, S. P. Snini, Y. Lippi, A. El Khoury, A. Atoui, R. Lteif, I. P. Oswald and O. Puel (2014)**. "Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*." *International Journal of Food Microbiology* 189: 51-60.
- **Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widner, T., Samuels, G.L., Ismaiel, A.,Begoude, A.D., M., Bateman, R., Fontem, D. and Hebbar, K.P.(2007)** Isolation

and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol. Control*, 43: 202–212.

- **Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti L.E., Marra R., Woo L.S. and Lorito M., (2007).** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil. Biol. Biochem*, 40: 1-10.
- **Walther .schipper .domsch .(1980).** Mycology online [en ligne]. (site consulté le 28/05/2019) <https://mycology.adelaide.edu.au>
- **Yedidia I., Benhamou N., Chet I., (1999).** Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*, 65:1061-1070.

Annexe

Composition des milieux de culture

PDA : milieu d'extrait de pomme de terre, de dextrose et d'agar

-pomme de terre 200g

-Eau distillée 500ml

Après chauffage, récupérer le filtrat et ajouter

-Glucose 20g

-Agar 20g

-Eau distillée 1000ml

pH = 6

Effet de *Trichoderma harzianum* 127a et *Mucor sp.* Sur *Penicillium expansum* agent pathogène de la pomme.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et biotechnologie fongique.

Résumé

L'action antagoniste de *Trichoderma harzianum* et *Mucor sp.* a été évaluée *in vitro* contre *P. expansum*. La confrontation directe sur milieu PDA entre l'isolat de *P. expansum* et *T.harzianum* conduit à une inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène testé, avec un pourcentage d'inhibition de 61% à 62 % et 21% avec *Mucor sp.*

En confrontation à distance par rapport aux témoins, *T. harzianum* conduit à une inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène testé, avec un pourcentage d'inhibition de 23,07%. Alors qu'un pourcentage de 17,30% a été observé avec *Mucor sp.* Cette étude a révélé l'aptitude de *T. harzianum* à agir par un phénomène de compétition. Ces résultats peuvent être aussi expliqués par le mécanisme d'antibiose contre le *P. expansum*. Par contre, l'action de *Mucor sp.* illustre le faible pouvoir myco-parasitaire qu'il possède envers *Penicillium expansum* donc son action n'a pas été efficace.

Mots clés : *Trichoderma harzianum*, *Penicillium expansum*, *Mucor sp.*, lutte biologique, compétition.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Zoologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme ABDELAZIZ.W (Maitre de conférences B - UFM Constantine).

Rapporteur : Mr DEHIMAT.L. Pr. (Professeur- UCM Constantine).

Examineur : Mme BENKAHOUL.M (Maitre de conférences B - UFM Constantine).

Date de soutenance : 14/07/2019