



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 :

---

**La production de métabolites secondaires bioactifs  
par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*  
cultivée sur son de blé.**

---

Présenté et soutenu par : Mouzaoui Sabrina

Le : 09/2020

Bencheikhelhocine Nada

Djellout Sara

**Jury d'évaluation :**

**Président :** Melle ABDELAZIZ Ouided (Maitre de Conférences B- UFM Constantine).

**Rapporteur :** Mme LEGHLIMI Hind (Maître de Conférences A - UFM Constantine).

**Examineur :** Melle BELMESSIKH Aicha (Maître Assistante A-UFM Constantine).

*Année universitaire 2019- 2020*

## **Remerciements**

*Notre premier remerciement va au bon **Dieu** le tout puissant qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements et notre respect à notre encadrante **Mme LEGHLIMI Hind** Maître de Conférences A à UFM Constantine, nous la remercions pour son encadrement, sa patience, son aide et ses judicieux conseils.*

*Nous adressons nos remerciements à **Melle ABDELAZIZ Ouided** Maître de conférences B à UFM Constantine. D'avoir accepté de présider le jury d'évaluation de ce mémoire.*

*Nous remercions également **Melle BELMESSIKH Aicha** Maître assistante A à UFM Constantine. D'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.*

# Dédicace

*Je dédie cet événement marquant de ma vie à la mémoire de mon oncle **djamel**. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !*

*A toi **papa** rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être ; j'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondé en moi, que Dieu tout puissant te garde santé, bonheur et longue vie pour que tu demeureras le flambeau illuminant mon chemin*

*A la personne la plus chère à mon cœur à ma **maman**, qui a le droit de recevoir mes chaleureux remerciements pour tous les sacrifices qu'elle a consenti pour me permettre de suivre mes études dans les meilleurs conditions possibles et n'avoir jamais cessé de m'encourager tout au long de mes années d'études en lui souhaitant une longue vie pleine de joie et de santé*

*A ma sœur **Imen** et mes frères **Slimane** et **Noufel** les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous*

*A ma grande mère **Yamina**, mes oncles **Mouloud** et **Belkacem**, mes tantes **Soumia**, **Malika** et **Salih**a qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur*

*A mes cousines **Roumaissa**, **Rym**, **Ghaida**, **Sara** et **Rania** vous êtes les meilleurs .*

*A mes petits anges **Ammar**, **Youcef**, **Ghilas**, **Firas**, **Hiba** et **Darine***

*A toute ma jolie famille*

*A mon collègue et mon ami **Aymen**, qui m'a toujours soutenu et encouragé et à qui je souhaite plus de succès.*

*A mes amis **Aicha**, **Safa**, **Fatima**, **lilia** et **Anis** Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.*

*A mes binômes **Nada** et **Sara** on a passé des bons moments ensemble*

*A tous ceux qui sont proche de mon cœur de dont je n'ai pas cité le nom*

**Mouzaoui Sabrina**

## ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.*

*A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père **Ahmed chafik***

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère **Hadjer***

*A toi ma grand-mère **Daouia**, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce mémoire soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir,*

*A mes chères sœurs **Roumeissa, Noussaiba et Maimouna** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,*

*A mon cher frère, **Mohamed Saleh**, pour son appui et son encouragement,*

*Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.*

*A toute ma grande famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*

*A mes adorables amies, **Bouchra et khadidja***

*A mes binômes **Sara et Sabrina***

*Merci !*

**Bencheikh elhocine Nada**

# ***Dédicace***

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,*

*J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma source d'encouragement ma mère **Nassira Ghidem** qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*A la source de ma volonté à mon chère père **Khaled** qui m'a appris le sens de la Persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice et ses conseils*

*Je ne cesserais jamais de remercier mon dieu pour m'avoir donnée une mère et un père comme vous.*

*Puisse dieu vous protéger inshallah.*

*A mes petites anges mes sœurs **OUMEIMA ET BOUTHEINA***

*A mon frère **Oussama***

*A tous mes enseignants de l'université des frères Mentouri Constantine 1*

*A mes binômes **Nada et Sabrina***

*A tous Mes amis*

***Djellout Sara***



*Table des matières*

# Table des matières

Résumés

Résumé

Abstract

ملخص

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

## INTRODUCTION GENERALE

### CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

#### Partie1 : le genre *Trichoderma*

|  |    |
|--|----|
| 1. Généralités sur les mycètes.....  | 1  |
| 2. Le genre <i>Trichoderma</i> .....   | 2  |
| 2.1. Historique de taxonomie.....  | 2  |
| 2.2. Ecologie des <i>Trichoderma sp</i> .....                                | 5  |
| 2.2.1. Présence et distribution .....  | 5  |
| 2.2.2. Croissance in vitro du genre <i>Trichoderma</i> .....                 | 6  |
| 2.3. Morphologie.....  | 7  |
| 2.4. Pouvoir antagoniste de <i>Trichoderma</i> .....                         | 7  |
| 2.5. Utilisation du genre <i>Trichoderma</i> dans la lutte biologique.....   | 8  |
| 2.5.1. La lutte biologique.....  | 8  |
| 2.5.2. Utilisation du genre <i>Trichoderma</i> dans la lutte biologique..... | 10 |
| 2.6. Mode d'action de <i>Trichoderma</i> .....                               | 10 |
| 2.6.1. L'antibiose.....  | 10 |
| 2.6.2. La compétition.....   | 11 |
| 2.6.3. Le parasitisme.....   | 11 |
| 2.7. Production de métabolites secondaires.....                              | 11 |
| 2.7.1. Définition.....   | 11 |
| 2.7.2. Production de métabolites secondaires par <i>Trichoderma sp</i> ..... | 12 |
| 2.7.2.1. Production de substances bioactives.....                            | 12 |
| 2.8. <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....                                | 13 |

## Partie 2 : La fermentation en milieu solide

|   |    |
|---|----|
| 1. Définition.....  | 17 |
| 2. Avantages et inconvénients.....  | 17 |
| 2.1. Avantages .....  | 18 |
| 2.2. Inconvénients.....   | 19 |
| 3. La différence entre la fermentation en milieu solide et la fermentation en milieu liquide..... | 19 |
| 4. Applications.....  | 20 |
| 4.1. Production des aliments.....   | 21 |
| 4.2. Production des enzymes.....  | 21 |
| 4.3. Production des métabolites secondaires.....  | 21 |
| 4.3.1. L'acide gibbérellique.....   | 22 |
| 4.3.2. Les pigments.....  | 22 |
| 4.3.3. Les alcaloïdes de l'ergot.....   | 22 |
| 4.3.4. Les antibiotiques.....   | 23 |
| 5. Les diverses étapes suivies en fermentations solides.....                                      | 25 |
| 5.1. La préparation du substrat carboné.....  | 25 |
| 5.2. L'inoculation du milieu de culture.....  | 25 |
| 6. Facteurs influençant le procédé FMS.....   | 25 |
| 6.1. Paramètres biologiques.....  | 25 |
| 6.1.1. Type de microorganisme et inoculum.....  | 25 |
| 6.1.2. Substrat solide.....   | 26 |
| 6.2. Paramètres physicochimiques.....   | 27 |
| 6.2.1. La taille des particules.....  | 27 |
| 6.2.2. L'humidité et l'activité de l'eau.....   | 27 |
| 6.2.3. La température.....  | 28 |
| 6.2.4. Le pH.....   | 28 |
| 6.2.5. L'aération.....  | 29 |
| 6.2.6. L'agitation.....   | 29 |
| 6.2.7. L'apport de sources exogènes de carbone et d'azote.....                                    | 29 |
| 7. Le son de blé .....  | 30 |
| 7.1. Généralités.....   | 30 |
| 7.2. Composition chimique.....  | 30 |
| 7.3. Propriétés.....  | 31 |
| 7.4. L'intérêt du son de blé.....   | 32 |



## CHAPITRE II : Matériel et Méthodes

|   |           |
|---|-----------|
| 1. Matériel biologique.....   | 33        |
| 1.1. Origine et entretien de la souche.....   | 33        |
| 1.2. Réactivation et sporulation de la souche.....  | 33        |
| 1.3. Préparation de l'inoculum.....   | 34        |
| 1.3.1. Préparation de la suspension de spores.....  | 34        |
| 1.3.2. Dénombrement des spores.....   | 34        |
| 1.3.3. Conservation de la souche.....   | 34        |
| 2. Production de métabolites secondaires par la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> ..... | 35        |
| 2.1. Milieu de production.....  | 35        |
| 2.2. Conduite des FMS en erlenmeyers.....   | 35        |
| 3. Extraction et mesures effectuées après fermentation.....                                     | 35        |
| 3.1. Extraction des métabolites secondaires.....  | 35        |
| 3.2. Mesure du taux d'humidité.....   | 37        |
| 4. Test d'activité antifongique des extraits obtenus.....                                       | 38        |
| - Méthode de diffusion sur disques.....   | 38        |
| 5. La séparation des métabolites secondaires par CCM.....                                       | 38        |
| <br>  |           |
| <b>DISCUSSION GENERALE.....</b>   | <b>39</b> |
| <br>  |           |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>  | <b>42</b> |
| <br>  |           |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>   | <b>43</b> |
| <br>  |           |
| <b>ANNEXES.....</b>   | <b>56</b> |

## Résumé

Les déchets agro-industriels, riches en matières organiques, peuvent être recyclés et transformés par les procédés biotechnologiques. Parmi ces derniers, les fermentations en milieu solide (FMS) connaissent un regain d'intérêt à travers le monde, puisque elles permettent une production importante de diverses substances. Le but de ce travail est de produire des métabolites secondaires bioactifs par la souche *Trichoderma longibrachiatum*, par culture sur substrat solide. La fermentation est effectuée sur son de blé humidifié à 75% avec une solution de saccharose ou de l'eau distillée. Les cultures sont incubées à 28°C pendant 14 jours avec des prélèvements effectués à intervalles de temps régulier (5, 7, 10 et 14 jours). Les métabolites secondaires recherchés, libérés par cette souche, sont récupérés par l'utilisation de deux solvants organiques : le chloroforme et l'acétate d'éthyle. La détection de ces métabolites, récupérés dans les extraits obtenus, est prévue par chromatographie sur couche mince (CCM). Le test d'antagonisme de ces extraits contre certains champignons phytopathogènes est aussi prévu pour confirmer leur efficacité. Les résultats des études précédentes, prouvent que les métabolites secondaires bioactifs du genre *Trichoderma* présentent une activité antifongique importante.

**Mots clés :** *Trichoderma longibrachiatum*, métabolites secondaires bioactifs, antagonisme, FMS.

## **Abstract**

Agro-industrial wastes, rich on organic matters, can be recycled and transformed by biotechnological processes. Among the latter, solid state fermentation (SSF) is experiencing renewed a resurgence of interest around the world, since it allows a significant production of various substances. The aim of this work is to produce bioactive secondary metabolites, from the strain *Trichoderma longibrachiatum* by cultivation on solid substrat. Fermentation is carried out on wheat bran moistened at 75% with a solution of sucrose or distilled water. The cultures are incubated at 28 ° C for 14 days with samples taken out at regular interval times (5, 7, 10 and 14 days). The desired secondary metabolites released by this strain, are recovered by the use of two organic solvents : chloroform and ethyl acetate. The detection of these metabolites, recovered in the extracts obtained, is provided by thin layer chromatography (TLC). The antagonism test of these extracts against certain phytopathogenic fungi is also planned to confirm their effectiveness. The results of previous studies prove that the bioactive secondary metabolites of the genus *Trichoderma* exhibit significant antifungal activity.

**Keywords:** *Trichoderma longibrachiatum*, bioactive secondary metabolites, antagonism, SSF.

## المخلص

يمكن إعادة تدوير نفايات الصناعات الزراعية الغنية بالمواد العضوية وتحويلها بواسطة عمليات التكنولوجيا الحيوية. من بين هذه الأخيرة، يشهد التخمر في الوسط الصلب (FMS) تجدد الاهتمام في جميع أنحاء العالم ، لأنه يسمح بإنتاج عدد كبير من المواد المختلفة. الهدف من هذا العمل هو إنتاج مستقلبات ثانوية نشطة بيولوجيا باستعمال سلالة *Trichoderma longibrachiatum* عن طريق الزراعة على المادة الصلبة. يتم التخمر على نخالة القمح المبللة بنسبة 75% بمحلول السكر أو الماء المقطر ، ويتم تحضين حوجلات الزراعة عند 28 درجة مئوية لمدة 14 يوماً مع أخذ العينات على فترات زمنية منتظمة (5 ، 7 ، 10 ، و 14 يوماً). يتم استرجاع المستقلبات الثانوية المرغوبة الناتجة عن هذه السلالة باستخدام مذيبين عضويين: الكلوروفورم و خلات الإيثيل. يتم توفير الكشف عن هذه المستقلبات ، المسترجعة في المستخلصات التي تم الحصول عليها ، بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM). من المخطط أيضاً اختبار العداوة لهذه المستخلصات ضد بعض الفطريات الممرضة للنبات لتأكيد فعاليتها. تثبت نتائج الدراسات السابقة أن المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجياً من جنس *Trichoderma* تظهر نشاطاً مضاداً للفطريات الممرضة للنبات

**الكلمات المفتاحية :** *Trichoderma longibrachiatum* ، المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا ، العداة ، FMS.

# *Abréviations*

***A<sub>w</sub>*** : Activité de l'eau.

***C°*** : Degré Celsius.

***DMSO*** : Dimethyl-sulfoxide.

***DSMZ*** : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH / DSMZ-  
German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

***FML*** : Fermentation en milieu liquide.

***FMS*** : Fermentation en milieu solide.

***GMSI*** : Gramme de matière sèche initiale.

***ISR*** : Induced Systemic Resistance /Résistance systémique induite.

***PDA*** : *Potato Dextrose Agar*.

***pH*** : Potentiel hydrogène.

***R*** : *Rhizoctonia*.

***SDA*** : *Sabouraud Dextrose Agar*.

***SMF*** : *Submerged fermentation*.

***SSF*** : *Solid state fermentation*.

***T*** : *Trichoderma*.

***UI*** : Unité internationale.

## Liste des figures

- Figure 01** : Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium :  
(A), hyphe coenocytique ; (B), hyphe cloisonné .....1
- Figure 02** : Les 5 sections systématiques de *Trichoderma sp.* et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bisset (1991 a et b). \* Les espèces agrégées de Rifai (1969).....4
- Figure 03** : Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma*.....7
- Figure 04** : (a), (b), *T. longibrachiatum* sur PDA après 5 jours à 25° C. (b) revers jaune pigment diffusible produites par *T. longibrachiatum* après 5 jours à 25° C.....14
- Figure 05** : Longue branche principale de *T. longibrachiatum* produisant des branches latérales plus courtes se terminant par des phialides. Grossissement, × 320.....14
- Figure 06** : les phialoconidies de *T. longibrachiatum* Grossissement × 920. (Richter *et al.*, 1999); **a** : Branches latérales, phialides et phialoconidies. **b** : Phialides terminales.....15
- Figure 07** : Phialoconidies de *T. longibrachiatum*. Grossissement × 2,300.....15
- Figure 08** : Chlamydoconidies lisse, à parois épaisses de *T. longibrachiatum*. Grossissement ×2,300.....16
- Figure 09** : Les différentes couches cellulaires constitutives du son de blé.....31
- Figure 10** : L'aspect macroscopique de la souche après une bonne sporulation.....33
- Figure 11** : Préparation de la suspension de spores ; **a** : grattage de la croissance fongique, **b** : suspension sporale obtenue.....34
- Figure 12** : Filtration du mout de fermentation.....36
- Figure 13** : Traitement du mout de fermentation aux solvants ; **a** : le mélange filtrat -solvant, **b** : la plaque d'agitation.....36
- Figure 14** : Décantation du mélange (phase organique et phase aqueuse).....37
- Figure 15** : Principe de la chromatographie sur couche mince.....38

## *Liste des tableaux*

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : Les différents microorganismes utilisés dans la lutte biologique.....                       | 9  |
| <b>Tableau 2</b> : Différences entre la fermentation à l'état solide et la fermentation liquide submergée..... | 20 |
| <b>Tableau 3</b> : Les métabolites secondaires produits par fermentation solide.....                           | 24 |
| <b>Tableau 4</b> : La composition chimique de son de blé de différentes origines.....                          | 31 |



*Introduction  
générale*



Les champignons filamenteux représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre, jouant un rôle majeur à la fois dans le fonctionnement des écosystèmes et également dans les applications biotechnologiques qu'ils peuvent potentiellement, les diriger. En effet, c'est la capacité des champignons filamenteux à produire des métabolites secondaires qui a favorisé en particulier leur utilisation biotechnologique (Thomas, 2009).

Parmi ces champignons microscopiques, le genre *Trichoderma* renferme des espèces les plus utilisées en tant qu'agents de lutte biologique contre les phytopathogènes et comme source d'enzymes et de métabolites secondaires d'intérêts biotechnologique (Kubicek et Penttilä, 1998 ; Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998). En effet, la lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits, pour empêcher ou réduire la croissance d'un autre organisme phytopathogène (Sforza et Sheppard, 2004). Elle est utilisée de plus en plus en agriculture pour remplacer les pesticides chimiques. En comparaison à ces derniers qui ont des effets nocifs sur la santé humaine et les écosystèmes, la lutte biologique est beaucoup plus avantageuse pour l'environnement (Lambert, 2010).

Par ailleurs, l'efficacité écologique de *Trichoderma* est dû à la combinaison de ses divers mécanismes d'action à savoir ; l'antibiose, la sécrétion des enzymes hydrolytiques, la compétition pour l'espace et les nutriments, ainsi que leur capacité à stimuler la croissance végétale après une colonisation racinaire rapide (Alabouvette *et al.*, 1983).

Bien que la culture de ces microorganismes pour la production de métabolites, par l'utilisation des deux technologies de fermentation en milieu submergé et de fermentation en milieu solide, ait fait l'objet de nombreux travaux, la fermentation solide connaît un regain d'intérêt depuis quelques années. Ce processus permet, le développement de produits alimentaires, la production d'enzymes, d'antibiotiques mais aussi d'autres métabolites secondaires.

Depuis le XXème siècle, les recherches s'orientent vers le développement de la technique de fermentation solide afin de produire ces métabolites. Parallèlement à ceci, l'objectif des recherches est aussi de valoriser les coproduits agricoles qui peuvent servir de substrat dans les fermentations solides. L'importance de ces coproduits agricoles réside dans leur abondance, leur faible cout ainsi que dans le fait qu'ils représentent une source organique naturelle disponible partout sur la planète.

Notre étude s'insère dans cette préoccupation et porte sur la production de métabolites secondaires bioactifs par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé, selon le mode de fermentation sur substrat solide.

La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle, sont abordés des détails sur la moisissure *Trichoderma* sp, ainsi que le mode de fermentation en milieu solide.

La seconde partie est consacrée au travail expérimental :

- Le développement de la souche *Trichoderma longibrachiatum* sur milieu PDA ;
- La production des métabolites secondaires par fermentation solide sur son de blé ;
- L'extraction des métabolites secondaires par deux solvants organiques : le chloroforme et l'acétate d'éthyle ;
- Le test de l'activité antifongique des extraits obtenus ;
- La séparation des métabolites secondaires récupérés dans les extraits de fermentation, par la chromatographie sur couche mince (CCM).



***Chapitre I : SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE***

## Partie 1 : Le genre *Trichoderma*

### 1. Généralités sur les mycètes

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes, aérobies strictes et rarement anaérobies, ayant un métabolisme hétérotrophe car ils tirent leur énergie de la respiration et de la fermentation des matières organiques solubles disponibles dans leur environnement ; Ils peuvent être uni- ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques et d'autres microscopiques, d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ce sont des organismes à mode de reproduction sexuée ou asexuée (Mathew, 1995 ; Leveau et Bouix, 1993 ; Tortora *et al.*, 2003 ; Tabuc, 2007).

Ce groupe d'organismes ubiquistes comprend environ 120000 espèces, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées (Senal *et al.*, 1993 ; Kirk *et al.*, 2001).

D'un point de vue morphologique, un mycète est constitué d'un thalle formant l'appareil végétatif (Hawksworth *et al.*, 1994). L'appareil végétatif se compose d'une structure de base appelé hyphe qui forme un réseau de filaments ramifiés : le mycélium (Mathew, 1995). Chez la plupart des champignons les hyphes sont divisés par des cloisons (Figure 1) ou Septa contenant un seul noyau, on les appelle des hyphes segmentés ou septés. Chez certaines classes de mycètes, les hyphes sont dépourvus des cloisons et ont l'aspect d'une longue cellule continue à noyaux multiples ; ils sont donc appelés coenocytes (Tortora *et al.*, 2003).



**Figure 01** : Structure d'une hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium : (A), hyphe coenocytique ; (B), hyphe cloisonnée (Chabasse *et al.*, 2002).

Les champignons sont majoritairement mésophiles, leur température optimale est de 15 à 30°C. Il existe des champignons qui se développent dans des conditions extrêmes. C'est le cas par exemple des champignons dits thermorésistants pouvant se développer jusqu'à 80°C (Conner et Beuchat, 1987). La majorité des moisissures se développe à une activité d'eau  $A_w$  située entre 0,85 et 0,99 (Pitt et Hocking, 1997).

## 2. Le genre *Trichoderma*

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Bissett, 1991). Il désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des «Gastéromycètes» (une sous-classe des champignons basidiomycètes unie par certains caractéristiques) .Ces organismes cosmopolites appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Vining, 1990 ; Genilloud *et al.*, 1994 ; Roquebert, 1996). En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font des *Trichoderma sp.* des agents potentiels en agroalimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (Prieto *et al.*, 1997). Quelques-unes des quelques 35 espèces établies à ce jour sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques et leur utilisation comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (antibiose, mycoparasitisme, compétition, lyse, promotion de la plante hôte) ( Roquebert, 1996 ; Cooney *et al.*, 1997 ; Prieto *et al.*, 1997 ; Grondona *et al.*, 1997 ; Verbist, 2000 ; Kubicek *et al.*, 2003).

### 2.1. Historique de taxonomie

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de polémiques. Dans le règne vivant les limites de «l'espèce» reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Or, les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, en tant que tels, n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique. On se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996) ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaires (Gams et Bissett, 1998). Si on répertorie succinctement les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma* , on se rend vite compte que leur positionnement taxonomique n'a pas été chose facile.

\* En 1794, Persoon décrit le premier *Trichoderma sp.* et établit 4 espèces.

\* En 1821, Fries classa les *Trichoderma sp.* Parmi les Gastéromycètes.

\* En 1860, débutent les controverses sur cette systématique, Tulasne contredit

Fries puisqu'il ne trouve pas de forme téléomorphes (sexuées) à ce genre.

\* En 1871, devant le nombre croissant d'espèces rencontrées, Harz insiste sur l'importance des caractères morphologiques sous microscopie optique (surtout les phialides).

\* En 1916, Waksman décrit ce qu'il trouve être 6 nouvelles souches de *Trichoderma sp.* En utilisant des critères macroscopiques, différents de ceux préconisés par Harz.

\* En 1926, Abbot identifie 4 espèces de *Trichoderma* selon des critères une fois de plus différents des précédents. Jusqu'à 1939 le raisonnement d'Abbot reste en vigueur, mais aussi à côté d'identifications totalement indépendantes.

\* En 1939, Bisby tente de mettre de l'ordre dans ces systèmes en proposant une unique espèce : *Trichoderma viridae*. Durant 24 ans, toute espèce fongique à spores vertes était considérée comme étant un *Trichoderma sp.*

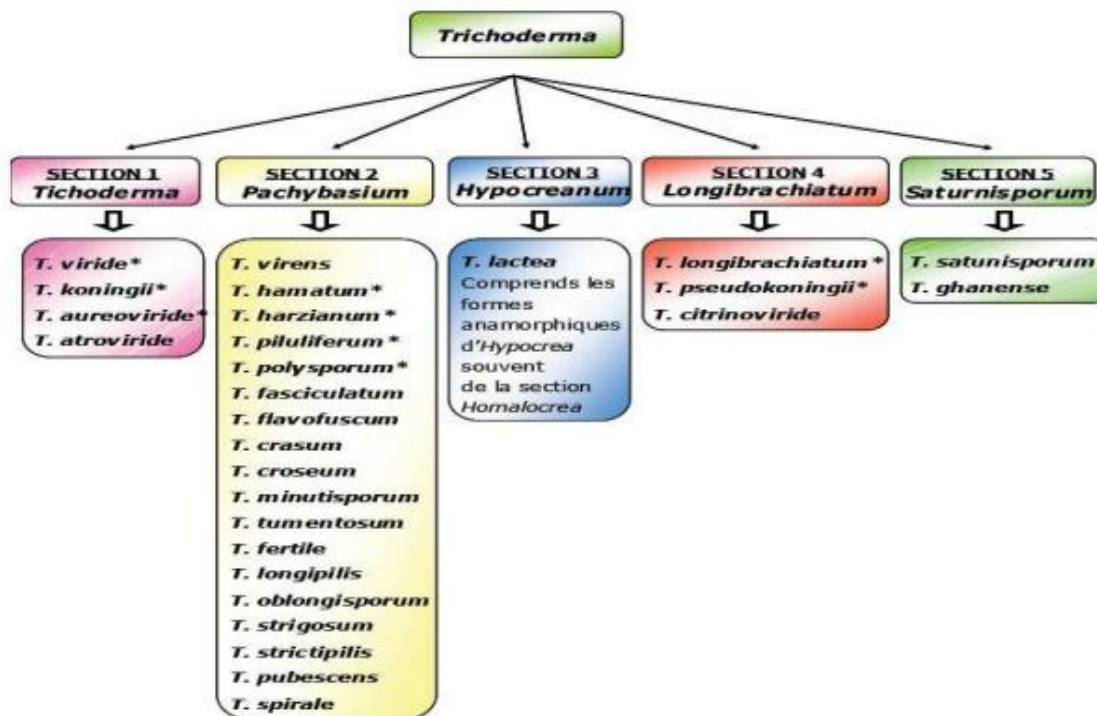
\* En 1963, les travaux de Gutter et Monbasher mettent fin au système précédent, en démontrant la variabilité des espèces de *Trichoderma* en fonction des conditions environnementales.

\* En 1969, conscient de toute cette polémique, Rifai propose une classification «utilisable avec le concept d'« espèces agrégées »», basé sur les caractères microscopiques. « Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer ». Neuf espèces agrégées sont créés (*T. aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (Rifai, 1969).

\* En comparaison avec les nombreux précédents, ce système semble le plus facilement utilisable pour la communauté scientifique, d'autant plus qu'il a été amélioré récemment par Bissett (1984, 1991a et b).

\* En 1991, Bissett propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma sp.*, sans rapport avec les espèces agrégées.

Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (Figure 2) (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Leuchtmann, 1996).



**Figure 02** : Les 5 sections systématiques de *Trichoderma sp.* et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bisset (1991 a et b). \* Les espèces agrégées de Rifai, (1969).

Le système taxonomique de Bissett est aussi appuyé, entre autres, par des approches de biologie moléculaire (PCR), pour répondre au positionnement de nouvelles espèces de *Trichoderma* identifiées (dont les formes téléomorphes sont souvent non identifiées) et reste le plus fiable actuellement (Lillard-Roberts, 2004 )

Les espèces de *Trichoderma* ainsi que leurs rares formes téléomorphes observées sont classées parmi les Ascomycètes .

Plus de 200 espèces du genre *Hypocrea* ont été identifiées, mais sont rarement cultivables, et de ce fait peu décrites en termes modernes (Gams and Bisset, 1998). Sous certaines conditions, méconnues, les *Hypocrea sp.* (téléomorphes) se transforment définitivement en *Trichoderma sp.* (anamorphes). On pense alors que l'évolution a conduit à la disparition du mode sexué pour l'établissement d'un genre à reproduction exclusivement asexuée (Roquebert, 1996).

La biologie moléculaire nous révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se

chevauchent ce qui, d'une part explique la longue controverse connue par ce genre auparavant et d'une autre part, montre que les seuls critères morphologiques ne suffisent plus pour une classification incontestable et rigoureuse des formes anamorphe de *Trichoderma sp.* (Cournut, 1984 ; Sugiyama, 1987).

La taxonomie moderne des champignons a aboli l'embranchement des Deuteromycotina, auquel appartenait le genre *Trichoderma*. La position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp.* se présente comme suit (Bissett, 2004) :

|                      |                                       |
|----------------------|---------------------------------------|
| _ Embranchement      | <i>Amastigomycota et/ou Eumycètes</i> |
| _ Sous embranchement | <i>Ascomycotina</i>                   |
| _ Classe             | <i>Sordariomycètes</i>                |
| _ Ordre              | <i>Hypocréales</i>                    |
| _ Famille            | <i>Hypocraceae</i>                    |
| _ Genre              | <i>Trichoderma</i>                    |

## 2.2. Ecologie des *Trichoderma sp.*

### 2.2.1. Présence et distribution

Les *Trichoderma sp.*, sont ubiquitaires dans l'environnement et sont surtout retrouvés dans les sols forestiers. Ce sont des contaminants fréquents dans les cultures industrielles de champignons, ils peuvent également se développer sur le compost et parasiter les champignons cultivés mais aussi les sclérotés ou les propagules d'autre champignons microscopiques (Pivkin, 2000). Ils ont été rarement isolés de végétaux ou peu décrits comme endophytes bien qu'ils soient retrouvés à la surface des racines de certaines plantes. Un des substrats de choix du genre *Trichoderma* est le bois, ce qui pose notamment des problèmes de détérioration de constructions et donc entraînent des désagréments et des pertes économiques importantes. Il est cependant possible de les rencontrer chez l'homme et plus particulièrement chez les immunodéprimés ainsi que dans les zones de stockage de papier ou les bibliothèques, posant le problème de la conservation des manuscrits (Papavizas, 1985).

Les *Trichoderma sp.* sont en général considérées comme des composantes cosmopolites dans différents écosystèmes dans une large gamme de zones climatiques. Cependant, certaines espèces sont



omniprésentes tandis que d'autres sont limitées à des zones géographiques spécifiques (Kubicek *et al.*, 2008).

Les membres de ce genre sont fréquemment parasités sur d'autres champignons, sur du bois et de l'écorce morts, dans le sol et la rhizosphère qui expriment leur capacité pour occuper diverses niches écologiques (Gal-Hemed *et al.*, 2011).

Le *Trichoderma sp.* se développe à la surface des racines, il peut améliorer la croissance des racines par leur protection contre les agressions parasitaires et efforts physiques. En effet *Trichoderma sp.* solubilise le phosphate et les microéléments qui sont impliqués dans la simulation de la croissance végétale. *Trichoderma sp.* a un autre mécanisme antagoniste qui est l'induction de la résistance chez la plante hôte (Ghorri, 2015).

La répartition des champignons du genre *Trichoderma* est à peu près comparable en milieu terrestre (6% des espèces et en milieu marin (6 à 10%) (Mohamed-Benkada, 2006). Il est donc possible de soumettre l'idée que *Trichoderma* est ubiquiste et non marin stricte (Landreau, 2001).

Les *Trichoderma sp.* sont des saprophytes omniprésents dans le sol. Ils sporulent abondamment, ont peu de besoins nutritionnels, peuvent croître rapidement et produire des gammes diversifiées de métabolites secondaires. En outre, ils ont la capacité de transformer une variété extrêmement large de matériaux organiques naturels. Ils sont bien connus comme hyper-producteurs d'enzymes de dégradation comme les chitinases et les cellulases (Benouza, 2012). Ils ont été promus indirectement comme agents de lutte biologique et stimulateurs de croissance des plantes (Papavizas, 1985). Le développement de certaines espèces de *Trichoderma sp.* dépend également du pH du sol mais aussi de sa composition en sels, de la présence ou non de dioxyde de carbone ou de bicarbonates ainsi que de la nature et la proportion des microorganismes présents (Reculeau-arnoud, 2003).

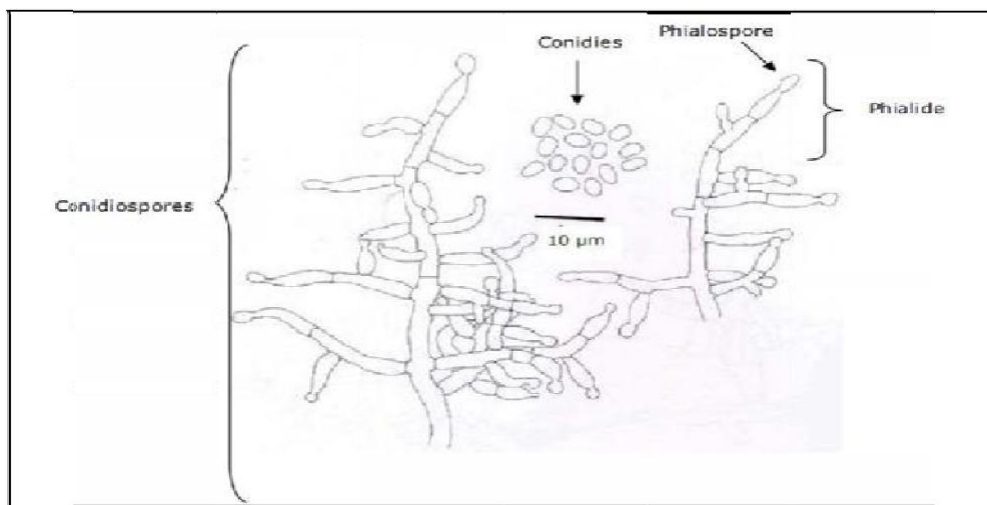
### 2.2.2. Croissance in vitro du genre *Trichoderma*

Les *Trichoderma sp.*, font partie des champignons saprophytes et utilisent principalement pour se développer: une source de carbone et une source d'azote, ce dernier à partir des composés d'ammonium et de protéines, les acides aminés ainsi que les acides gras à longue chaîne, les nitrates et éventuellement de nitrites, l'assimilation du nitrate est rare et dépend de l'espèce ; Les substrats carbonés très diversifiés comprennent une large gamme de sucres; certaines espèces peuvent utiliser l'inuline, raffinose, saccharose, acides tannique et gallique. Il est aussi nécessaire de ne pas négliger l'impact que peut avoir le dioxyde de carbone et le pH du milieu. En effet, la croissance des champignons du genre *Trichoderma* devient très rapide lorsque l'on atteint un taux de CO<sub>2</sub> supérieur à 10% et un milieu

alcalin, ce qui explique la relative abondance de ce genre dans des habitats humides et légèrement alcalins (Reculeau-arnoud, 2003).

### 2.3. Morphologie

L'aspect macroscopique des *Trichoderma sp.* 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. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour un feutrage épais se superpose à la culture. Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (Figure 3) 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. (Cournut, 1984 ; Landreau, 2001 ; Kubicek *et al*, 2003) .



**Figure 03** : Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma* (Samuels *et al.*, 1994).

### 2.4. Pouvoir antagoniste de *Trichoderma*

Les propriétés antagonistes des *Trichoderma* sont connues depuis longtemps puisque la première publication qui en fait mention date de 1887 par VUILLEMIN. Cependant, l'étude approfondie du phénomène d'antagonisme et de son application comme moyen de lutte à l'égard des parasites des plantes cultivées n'a débuté qu'entre les deux guerres mondiales (Johanne, 2002).

Les *Trichoderma* sont très efficaces pour la lutte contre les maladies des plantes reliées aux sols, les souches de *Trichoderma* peuvent influencer la croissance de la plante, augmenter la disponibilité des nutriments, améliorer la production au champ et augmenter la résistance vis à vis de la maladie, aussi bien que pour la dégradation de composés toxiques présents dans les sols. Les sols inoculés protègent les cultures et garantissent un milieu sain pour un développement normal de la végétation (Harman *et al.*, 2000).

En effet, ce champignon secrète de multiples enzymes, antibiotiques, hormones qui sont utiles pour la croissance des plantes et leur confèrent une protection contre les pathogènes. Il en résulte aussi une amélioration du contenu du sol en nutriments. La présence de *Trichoderma* dans le sol joue à la fois un rôle préventif et curatif (Harman *et al.*, 2004).

## 2.5. Utilisation du genre *Trichoderma* dans la lutte biologique

### 2.5.1. La lutte biologique

La lutte biologique est née après un sérieux échec de la lutte chimique, le moyen le plus efficace et rapide depuis la seconde guerre mondiale (Semal, 1989), principalement dû à de nombreux problèmes directement ou indirectement sur le plan agro-écologique (Dunphy et Tibelius, 1992).

La lutte biologique contre les agents pathogènes peut se pratiquer en détruisant le pathogène, l'inactivant ou en réduisant sa virulence durant la phase de conservation et/ou en interférence avec le processus d'infection de la plante (Semal, 1989). Elle repose sur l'utilisation des agents microbiens antagonistes. Ces derniers peuvent être isolés de différents biotopes et au sein de la microflore tellurique. De nombreux travaux ont signalé l'efficacité particulière d'agents microbiens d'origine rhizosphérique (Verma *et al.*, 2007). Le biotope rhizosphère est considéré comme milieu riche en activités microbiennes conditionnée par les activités métaboliques et de croissance des racines des plantes (Adams, 1990 ; Caron, 2002).

L'utilisation de ces microorganismes bénéfiques non pathogènes, en tant que biopesticides, est une technologie émergente et écologiquement compatible considérée comme alternative prometteuse aux pesticides de synthèse (Tableau 1). Globalement, l'effet protecteur conféré par ces agents de lutte biologique est basé sur la compétition, l'activité antagoniste rhizosphérique vis-à-vis de la croissance des pathogènes via la production d'antibiotiques ou d'enzymes et/ou leur capacité à stimuler la croissance et les systèmes de défense chez l'hôte végétal, phénomène dénommé « Induced Systemic Resistance » (*ISR*) (Saharan et Nehra, 2011).

La réussite de la lutte biologique repose sur le mode d'application qui va permettre à l'agent de lutte d'être positionné au bon endroit et au bon moment pour qu'il exprime sa capacité antagoniste. Pour une meilleure efficacité, il faut qu'il soit capable de coloniser bien la rhizosphère de la plante hôte (Alabouvette, 2001).

**Tableau 1** : Microorganismes utilisés dans la lutte biologique.

| Agents de lutte   | Mode d'action   | Références  |
|---|---|---|
| <i>Aspergillus niger</i>                                    | Production de phenylethanol, acide phenylacetique, et acide phynoxycetic                            | (Mujeeber et Shahana, 2002).                                  |
| <i>Penicillium digitatum</i><br><i>Penicillium oxalicum</i> | Libération des enzymes lytiques   | (Mujeeber et Shahana, 2002).                                  |
| <i>Trichoderma harzianum</i><br><i>Trichoderma viridae</i>  | Compétition pour nutriments, colonisation de racines, induction de résistance systémique, antibiose | (Michelina <i>et al.</i> , 2011)                              |
| <i>Pseudomonas sp</i>                                       | Production de sidérophores (pyoverdine et pyochiline) et l'antibiotique                             | (Dmitri <i>et al.</i> , 2006)                                 |
| <i>Bacillus subtilis</i>                                    | Production de phenylethanol, acide phenylacetique, et acide phynoxycetic                            | (Shanmugam et kanoujia, 2011)                                 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> non pathogène (Fo47)              | Compétition pour nutriments, colonisation de racines, induction de résistance systémique            | (Alabouvette <i>et al.</i> , 2008; Kaur <i>et al.</i> , 2010) |

### 2.5.2. Utilisation du genre *Trichoderma* dans la lutte biologique

Le potentiel des espèces de *Trichoderma* comme agents de lutte biologique avait été observé pour la première fois par Weinding (1932) in Howell (2003). Ce dernier auteur a rapporté l'action mycoparasitaire de *T. lignorum* contre *Rhizoctonia solani* Kühn. Il avait décrit avec détail l'enroulement des hyphes de l'agent antagoniste contre celles de l'agent pathogène, la pénétration, ainsi que la dissolution du cytoplasme de l'hôte. Deux années plus tard Weinding (1934) in Howell (2003) avait rapporté que la souche de *T. lignorum* produisait une substance toxique contre *R. solani* et *Sclerotinia americana*, et la nomma gliotoxine. Plus tard il avait été démontré que l'espèce qui produisait la gliotoxine n'était pas *T. lignorum* mais plutôt *Gliocladium virens* (Webster et Lomas, 1964). Cette dernière espèce est récemment renommée comme *Trichoderma virens* (Miller, Gidden et Foster) (Rehner et Samuels, 1994).

Dans les années qui suivent ces travaux, plusieurs exemples de succès de la lutte biologique ont été attribués aux mécanismes de mycoparasitisme et où l'antibiose, à la rhizosphère compétente, aux enzymes lytiques qui dégradent les polysaccharides, la chitine et le  $\beta$ -glucane telles que les chitinases et glucanases et l'induction des mécanismes de résistance de la plante (Chet, 1987 ; Howell *et al.*, 1993 ; Lo *et al.*, 1998). Le renforcement des activités antifongiques a été montré chez les plantes et les microorganismes. Des plantes de tabac et de tomate exprimant des chitinases recombinantes à partir de *T. harzianum* (P1) qui ont exprimé une grande résistance à l'égard d'un grand nombre d'agents phytopathogènes (Lorito, 1998). Selon Migheli *et al.*, (1998) la souche *T. longibrachiatum* (CECT2606) transformée par un gène codant pour la  $\beta$ -1,4 endoglucanase (*overexpression*) est plus efficace que la souche sauvage.

### 2.6. Mode d'action de *Trichoderma*

Généralement, *Trichoderma* inhibe ou dégrade la pectinase et d'autres enzymes qui sont essentiels pour les phytopathogènes. En plus de son effet inhibiteur des phytopathogènes, *Trichoderma* est aussi capable d'induire une résistance localisée et systématique. L'amélioration de la croissance des plantes par *Trichoderma* peut prendre lieu soit au niveau de la plante, soit au niveau du sol (Yedida *et al.*, 2001).

*Trichoderma* a la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action. Il peut utiliser :

### 2.6.1. L'antibiose

L'antibiose repose sur la production par un antagoniste, de substances métaboliques ayant un effet toxique sur un agent pathogène (antibiotique). C'est un mode d'action utilisé par les souches de *Trichoderma* pour inhiber la croissance des champignons phytopathogènes. La production des antibiotiques (trichodermine, harziamine, trichodermal, etc.) dépend des conditions physico-chimiques du milieu. Etant donné que *Trichoderma* peut produire des centaines de métabolites secondaires (Sivasithamparam et Ghisalbert, 1998).

### 2.6.2. La compétition

Qui se manifeste par l'aptitude de *Trichoderma sp.* à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes mais *Trichoderma sp.* emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables. *Trichoderma sp.* a une forte capacité à utiliser et métaboliser les nutriments du sol, qui le rend plus compétitif à de nombreux micro-organismes du sol (Benitez *et al.*, 2004).

### 2.6.3. Le parasitisme

Qui se manifeste par la destruction de l'agent pathogène lorsque *Trichoderma sp.* s'enroule autour de celui-ci soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur et/ou en lui « injectant » des substances (enzymes) qui le détruisent (Johanne, 2002).

Un système multi-enzymatique important a été décrit chez des espèces de *Trichoderma sp.* les cellulases, les chitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases,  $\beta$ -1,6 glucanases,  $\beta$ -1,3 glucanases et des protéases (Howell, 2003).

## 2.7. Production de métabolites secondaires

### 2.7.1. Définition

Beaucoup de mycètes peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires qui se caractérisent par le fait que, leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même et ils sont de structure et d'activité biologique très diverses. Habituellement, ils sont secrétés sous forme de mélange qui représente une structure chimique unique (Boiron, 1996).

Les métabolites secondaires sont des composés non essentiels au métabolisme basique des champignons. Ces composés sont généralement produits au cours de l'idiophase et sont très diversifiés au niveau de leurs structures chimiques. Quelques métabolites sont spécifiques à une ou deux espèces

alors que d'autres peuvent être produits par différents genres, ces métabolites, sont des dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques. Les enzymes responsables de la synthèse des métabolites secondaires sont très diversifiées suite à l'évolution de gènes impliquées, à l'origine, dans les fonctions métaboliques fondamentales (Adams, 2002).

Des conditions environnementales spécifiques peuvent affecter la production des métabolites secondaires, telles que la composition du milieu de culture, l'activité de l'eau, la valeur du pH, la température, la teneur en oxygène, et la présence d'organismes compétitifs (Johanning *et al.*, 2002).

### **2.7.2. Production de métabolites secondaires par *Trichoderma sp***

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma sp.* a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934), concernant un antifongique (Papavizas, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino *et al.*, 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990). La littérature ne cite que les métabolites importants de *Trichoderma sp.* sont principalement des molécules bioactives. Le travail de thèse de Landreau (2001) ayant présenté une synthèse bibliographique sur ces groupes de produits, nous ne les citons ici que très succinctement :

#### **2.7.2.1. Production de substances bioactives**

- Les métabolites volatils (6-pentyl- $\alpha$  pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes) (Vizscaino *et al.*, 2005) ;
- Les métabolites non volatils diffusibles polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines. (Blumenthal, 2004) ;
- Les métabolites polypeptidiques ciclosporines immunosuppresseurs anti- inflammatoire (Landreau, 2001).

## 2.8. *Trichoderma longibrachiatum*

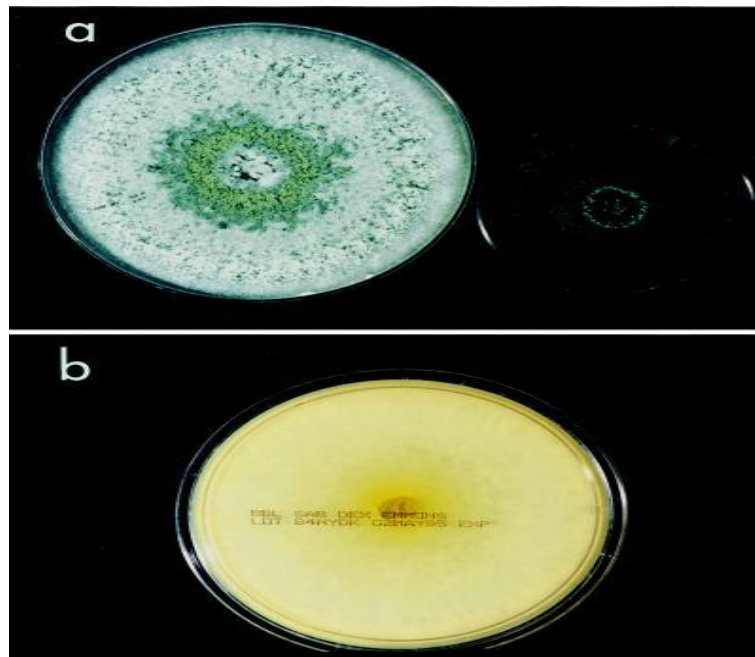
*Trichoderma longibrachiatum* est un champignon filamenteux saprophyte (Alanio *et al.*, 2008 ; Gangneux, 2008).

Dans les années 1980 et le début des années 1990, (Bissett, 1984 ; Bissett, 1991) Bissett a proposé une classification infragénérique de *Trichoderma* par laquelle le genre a été divisé en sections : section *Trichoderma pachybasium*, section *Trichoderma saturnisporum*, section *Trichoderma longibrachiatum* et section *Trichoderma hypocreanum*. Les caractéristiques principales de la section *longibrachiatum* inclus ce qui suit :

- ✓ Des colonies se développent rapidement et sont de 6 à 9 cm après 4 jours à 20°C
- ✓ l'inverse des isolats frais est visiblement jaune-vert
- ✓ les chlamydospores sont présents ou absents
- ✓ les conidiophores sont ramifiés, rameaux primaires est longue et les branches secondaires sont généralement courtes
- ✓ Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet
- ✓ Les conidies sont unicellulaire, verte, lisse fortifiée et ellipsoïde à ovoïde.

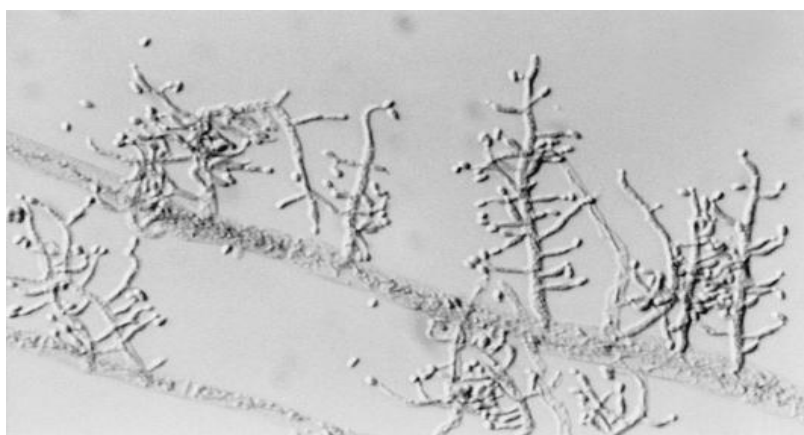
Récente caractérisation moléculaire des espèces précédemment identifiés comme *T. pseudokoningii* trouvées en fait être *T. longibrachiatum* sur la base de l'analyse des séquences interne transcrit l'ADN ribosomal (Kuhls *et al.*, 1997 ). Les Caractéristiques macroscopiques utiles comprennent sa croissance rapide et une évolution rapide du blanc au vert, sa présence fréquente dans les zones en concentrique (Figure 4a), et son jaune citron diffusant le pigment sur PDA, bien que toutes les souches peuvent ne pas être si intense (Figure 4b).





**Figure 04 :**(a), (b), *T. longibrachiatum* sur PDA après 5 jours à 25° C. (b) revers jaune pigment diffusible produit par *T. longibrachiatum* après 5 jours à 25° C. (Richter *et al.*, 1999).

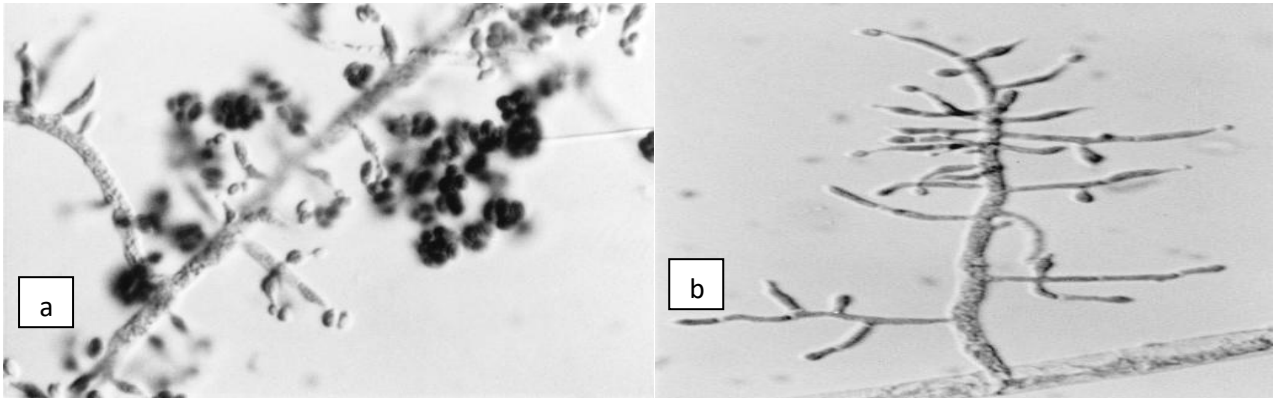
Au microscope, les hyphes sont lisses, cloisonnés et ramifiés et portent des conidiophores avec des principales longues branches (Figure 5), chacune se terminant dans une phialide. Les phialides en forme de bouteille, pour la plupart solitaire, souvent un peu gonflé au milieu et plié à l'apex et légèrement resserrée à la base et mesurée principalement de 5 à 11 sur 2 à 3  $\mu\text{m}$ . Phialides terminales plus allongées, n'étaient pas resserrées à la base et ont été jusqu'à 14  $\mu\text{m}$  de longueur (Figure 5).



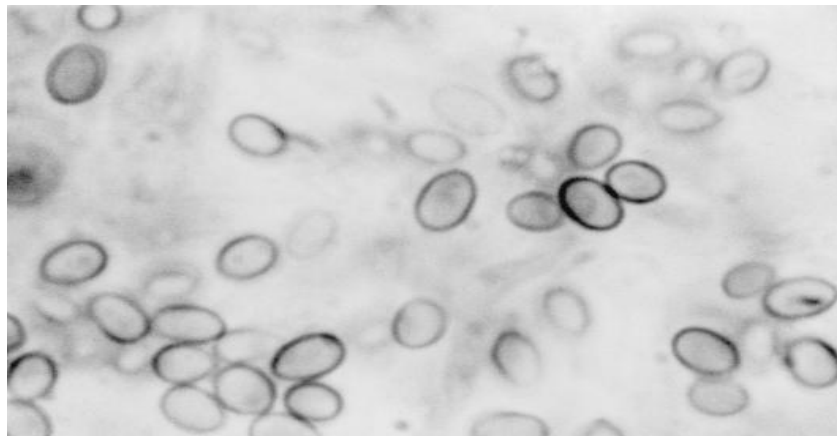
**Figure 05 :** Longue branche principale de *T. longibrachiatum* produisant des branches latérales plus courtes se terminant par des phialides. Grossissement  $\times 320$ . (Richter *et al.*, 1999).

Les Phialoconidies sont lisses fortifiée, ellipsoïdales à cylindriques et vert et mesurent 3.4 à 6.4 sur 2,4 à 3,0  $\mu\text{m}$  (Figure 6 a). Lisse, à parois épaisses, subglobuleux à chlamydoconidie ellipsoïde qui

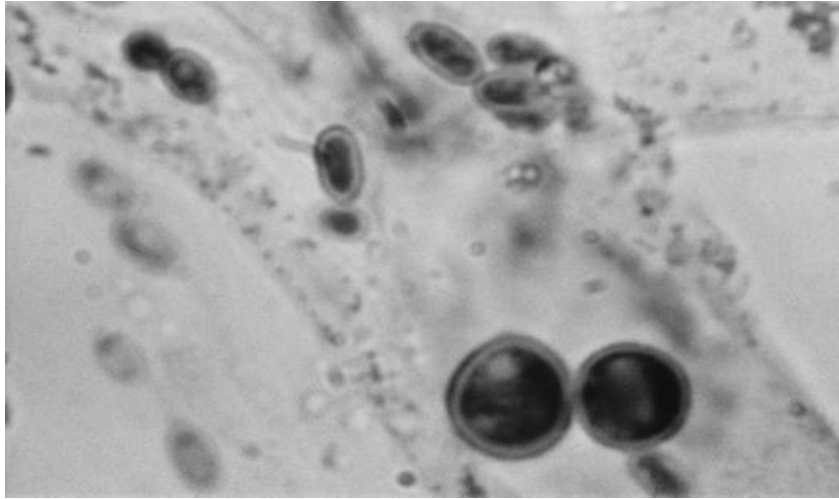
mesurait de 5 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre ont été également observés (Figure 6 b ). Sur la base des caractéristiques décrites ci-dessus, cet organisme a été placé dans la section *longibrachiatum* et a été identifié comme *T. longibrachiatum*. (Pfaller *et al.*, 1998) (Figure 7 et 8 ).



**Figure 06** : les phialoconidies de *T. longibrachiatum* Grossissement  $\times 920$ . (Richter *et al.*, 1999); **a** :Branches latérales, phialides et phialoconidies. **b** : Phialides terminales



**Figure 07** : Phialoconidies de *T. longibrachiatum*. Grossissement  $\times 2,300$ . (Richter *et al.*, 1999).



**Figure 08 :** Chlamydoconidies lisse, à parois épaisses de *T. longibrachiatum*. Grossissement  $\times 2,300$ . (Richter *et al.*, 1999).

## **Partie 2 : La fermentation en milieu solide**

### **1. Définition**

La fermentation selon Louis Pasteur est définie par « la vie sans air », cette première définition est élaborée à la suite de ses travaux sur la bière et convient très bien à toutes les fermentations liquides traditionnelles. Par la suite, cette définition a été précisée et les fermentations au sens scientifique sont, des métabolismes énergétiques anaérobies intracellulaires à base de molécules organiques, et s'opposent aux respirations (Duchiron et Copinet, 2019).

La fermentation en milieu solide c'est le processus qui assure la culture des microorganismes sur un support ou un substrat solide qui est la matrice, en absence ou presque d'eau libre (Pandey, 2003). La matrice peut être naturelle servant directement de source de nutriments, ou inerte imprégnée par un milieu liquide contenant les nutriments nécessaires à la croissance de la souche utilisée (Krishna, 2005).

Le développement des microorganismes dans la FMS se fait dans un système constitué de trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celle-ci, ce qui expliquent la diffusion des moisissures filamenteuses dans le substrat solide humide (Assamoi *et al.*, 2009). La capacité de rétention en eau des supports solides est variable et peut aller de 12 à 90%, soit une activité de l'eau  $A_w$  comprise entre 0,65 à 0,98. Ils doivent posséder une humidité relative, ou plutôt une activité de l'eau pour permettre la croissance et l'expression du métabolisme des souches ; les champignons filamenteux sont particulièrement bien adaptés à ces cultures du fait de leur résistance à une faible  $A_w$  et une pression osmotique élevée (Azzouz, 2015).

### **2. Avantages et inconvénients**

La production industrielle des métabolites fait appel aux deux procédés de fermentation (fermentation en milieu solide et fermentation liquide). La décision de choisir l'un ou l'autre est probablement basée sur le coût et l'efficacité du processus. Il est donc important de connaître les avantages et les inconvénients de la fermentation en milieu solide par rapport à la fermentation liquide.

## 2.1 Avantages

- L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes. Le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide (Assamoi, 2009).
- Les faibles volumes d'eau à traiter posent moins de problèmes d'effluents et une récupération simplifiée car le produit est purifié à partir du milieu usé plutôt que de la biomasse hôte (Wang et Yang, 2007; Duchiron et Copinet, 2019).
- Une productivité élevée (Krishna, 2005).
- Des rendements élevés en enzymes (Ustok *et al.*, 2007).
- Les enzymes produites lors d'une fermentation solide sont moins sensibles aux répressions cataboliques et aux inductions (Singhania *et al.*, 2009).
- La valorisation des co-produits solides agro-industriels est importante au niveau environnemental et économique (Restino, 2012).
- Les faibles coûts : de production, de traitement des effluents liquides et de besoins en énergie (Krishna, 2005 ; Couto, 2006 ;Ustok *et al.*, 2007).
- La durée d'extraction et de récupération des produits est diminuée (Boutera et Saddalahe, 2017).
- Technologie simple (Givry, 2006).
- Ressemble avec l'habitat naturel des champignons filamenteux (Ustok *et al.*, 2007).
- Absence de contrainte d'oxygénation (Sutter, 2017).
- Milieux de fermentations plus simples (utilisation des déchets agro-industriels bon marché) (Krishna, 2005).
- Le risque de contamination bactérienne est moindre (Lonsane, 1985).
- L'élimination des problèmes de mousse et une distribution avec un contrôle rigoureux de quelques paramètres (Lonsane, 1985).
- Une meilleure récupération du produit (Lonsane, 1985).

▸ Le *SSF* peut réduire considérablement l'investissement en capital et augmenter la rentabilité, ce qui en fait une technologie idéale dans plusieurs secteurs industriels (Krishna, 2005).

## 2.2. Inconvénients :

- La difficulté d'agitation du lit de substrat (Krishna, 2005).
- Difficulté dans le contrôle de la fermentation, principalement dans l'accumulation de chaleur, du niveau d'humidité du substrat et de l'aération (Lonsane, 1985 ; Krishna, 2005).
- Groupes limités de micro-organismes qui peuvent se développer à de faibles niveaux d'humidité (Krishna, 2005 ; Assamoi *et al.*, 2009).
- Les problèmes de transfert d'oxygène et de chaleur rendent difficile l'augmentation d'échelle des procédés (Lonsane, 1985 ; Assamoi, 2009).
- Les connaissances physiologiques et technologiques de la croissance des microorganismes sur milieux solides sont faibles (Assamoi, 2009).
- Les microorganismes étant inséparables du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate (Assamoi, 2009).
- Étant donné la forte concentration des métabolites obtenus, des produits inhibiteurs générés par les microorganismes peuvent s'accumuler en concentration élevée dans le milieu de culture (Assamoi, 2009).

## 3. La différence entre la fermentation en milieu solide et la fermentation en milieu liquide

La production de métabolites secondaires est principalement réalisée par fermentation en milieu liquide, cependant, les recherches s'orientent vers la production de ces métabolites par la technique de fermentation en milieu solide (Krishna, 2005). Il est donc nécessaire de connaître la différence entre ces deux procédés. (tableau 2)

**Tableau 2** : Différences entre la fermentation à l'état solide et la fermentation liquide submergée (Manpeert, 2005).

| Fermentation à l'état solide (FMS)   | Fermentation liquide submergée (FML)  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les organismes nécessitant moins d'eau pour leur croissance sont préférés, comme les champignons filamenteux.</li> <li>• Support inerte (naturel ou artificiel), contenant tous les composants pour la croissance sous forme de solution.</li> <li>• Moins de risques de contamination en raison de la faible disponibilité de l'eau.</li> <li>• Des bioréacteurs de petite taille peuvent être utilisés.</li> <li>• Moins de consommation d'énergie pour l'aération et le transfert de gaz.</li> <li>• Le facteur limitant de la croissance est la diffusion des nutriments.</li> <li>• Beaucoup de difficultés pour mesurer la quantité de biomasse présente et d'autres processus en ligne.</li> <li>• Le traitement en aval est facile, moins cher et prend moins de temps.</li> <li>• Aucun déchet liquide n'est produit.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• La concentration des milieux est très inférieure à celle de l'eau.</li> <li>• Les ingrédients transformés requis sont chers.</li> <li>• Une activité plus élevée de l'eau devient la principale cause de contamination des FML.</li> <li>• Des bioréacteurs à grande échelle sont nécessaires car le milieu est très dilué.</li> <li>• Une pression d'air élevée consomme plus d'énergie et le transfert de gaz dans le FML est médiocre.</li> <li>• Un mélange vigoureux facilite la diffusion des nutriments.</li> <li>• Des capteurs en ligne sont disponibles et l'échantillonnage est facile pour la mesure de la biomasse.</li> <li>• L'eau rend le processus en aval difficile et très coûteux.</li> <li>• Une grande quantité de déchets liquides est produite, ce qui entraîne des difficultés de rejet.</li> </ul> |

#### 4. Applications

Les fermentations en milieu solide (FMS) sont traditionnellement utilisées pour la fabrication d'aliments comme le *Miso*, le *Tempeh*, le *Sufu* et le *Saké*, ensuite pour la

production des enzymes amylases (Duchiron et Copinet, 2019). A partir de ces fermentations traditionnelles, de nouvelles versions de FMS ont vu le jour, qui ont abouti à de nouvelles applications pour le développement de bioprocédés tels que la biorestauration et la biodégradation de composés dangereux, la détoxification biologique des résidus agro-industriels, la biotransformation des cultures et des résidus de cultures pour l'enrichissement nutritionnel des animaux (Sutter, 2017), la biopulpage (dégradation de la lignine par des champignons de la pourriture blanche pour défaire la structure des parois cellulaires du bois) (Pandey, 2003), la bio-filtration des gaz malodorants (Manpreet *et al.*, 2005), et la production de produits à valeur ajoutée tels que les métabolites secondaires biologiquement actifs (Pandey, 2003).

#### 4.1. Production des aliments

Selon Duchiron et Copinet, 2019 certains aliments sont obtenus par FMS comme le pain, le fromage. Ainsi des produits alimentaires fermentés tels que le *Miso*, le *Shoyu*, le *Koji*, la choucroute, le *Ang-kak*, le *Banku*, le *Burukutu*, le *Hamanatto* et le *Lao-chao* (Panda *et al.*, 2010). Les graines de café, les fèves de cacao et les feuilles de thé sont fermentées après récolte sur lesquelles les bactéries et les levures développent les arômes caractéristiques et influencent ainsi la qualité et le goût du produit fini (Rose, 1981 ; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992).

#### 4.2. Production des enzymes

Les enzymes sont des protéines qui, en raison de leurs propriétés spécifiques, participent à la synthèse de molécules. Elles peuvent accélérer certaines réactions chimiques par des facteurs de cent millions. Dans des conditions particulières, elles rendent possible de nombreux processus. Elles sont utilisées comme produits finaux, mais aussi comme agents de fabrication industrielle (Assamoi, 2009), il existe un intérêt significatif à utiliser des techniques FMS pour la production d'une large gamme d'enzymes industrielles (Krishna, 2005).

Parmi les enzymes d'origine fongique produites par FMS on cite : l'enzyme amylase (alpha amylase (Kolli et Zatout, 2015), protéase (Boukhalfa-lezzar, 2015), xylanase (Azzouz, 2015), la cellulase (Leghlimi *et al.*, 2017), lipase, galactosidase et pectinase etc... (Krishna, 2005).



### 4.3. Production de métabolites secondaires

La production de métabolites secondaires est principalement réalisée par fermentation en milieu liquide, cependant, les recherches s'orientent vers la production de ces métabolites par la technique de fermentation en milieu solide (Krishna, 2005).

Les métabolites secondaires sont utilisés en tant qu'anti-inflammatoire, hypotenseur, anti-tumoral, anti-cholestrolémique, mais aussi insecticides, régulateurs de croissance des plantes, herbicides et pesticides respectueux de l'environnement (Barrios-Gonzalez et Mejia, 2008).

Parmi ces métabolites nous trouvons l'acide gibbérellique, les alcaloïdes de l'ergot qui sont largement utilisés dans le traitement des maladies comme l'angine de poitrine, la migraine, l'hypertension ou encore le glaucome. Les antibiotiques, les mycotoxines, telles que l'aflatoxine et l'ochratoxine, peuvent être produits par fermentation en milieu solide (Restino, 2012).(tableau 3).

#### 4.3.1. L'acide gibbérellique

Les gibbérellines (AG) sont des métabolites secondaires qui fonctionnent comme des régulateurs de croissance des plantes, parmi ceux l'acide gibbérellique (GA3) est la molécule la plus importante (Machado et Soccol, 2008).

L'acide gibbérellique est produit par fermentation solide en utilisant les souches *Gibberella fujikuroi* ou *Fusarium moniliforme* (Machado *et al.*, 2002).

#### 4.3.2. Les pigments

Les champignons sont les micro-organismes les plus adéquats pour la production de pigments dans la FMS. Il existe une énorme quantité de métabolites fongiques pigmentés. Ils présentent également fréquemment une activité pharmacologique, ce qui réduit les possibilités d'utilisation des aliments (Carvalho *et al.*, 2008).

Selon Carvalho *et al.*, (2008), les principaux pigments d'origine fongique sont : les caroténoïdes produites par l'espèce *Mucor azygosporus*, le pigment rouge produit par *Monascus.sp*, la riboflavine produite par *Eremothecium ashbyii* et *Acremonium diospyri*, et les beta-carotènes produites par *Blakeslea trispora*.

#### 4.3.3. Les alcaloïdes de l'ergot

Ils sont utilisés pour la première fois pour induire une contraction utérine lors de l'accouchement. Ils sont produits par *Claviceps spp.*, et certaines souches de *Penicillium*,

*Aspergillus* et *Rhizopus spp.* La demande d'alcaloïdes de l'ergot et de ses dérivés est en augmentation car ils sont utilisés pour traiter des maladies telles que l'angine de poitrine (douleur thoracique résultant d'un manque d'apport d'oxygène au myocarde), l'hypertonie (contraction pathologique du couple musculaire agoniste-antagoniste), les entériques (des maladies intestinales), les migraines (maux de tête violents), les troubles circulatoires cérébraux (troubles aigus liés à la mauvaise circulation du sang), la contraction utérine, l'hypertension (une pathologie cardiovasculaire définie par une pression artérielle trop élevée), pour réduire les saignements après l'accouchement (hémorragies postnatales). Ils sont également utilisés pour le traitement du glaucome (maladie dégénérative du nerf optique) et de l'herpès zoster (le Zona). Parmi leurs activités physiologiques figurent l'inhibition des activités de l'adrénaline et de la noradrénaline et de la sérotonine, et la contraction des muscles lisses de l'utérus. Certains alcaloïdes de l'ergot possèdent une activité antibiotique (Krishna, 2005).

#### **4.3.4. Antibiotiques**

Ce sont des molécules chimiques produites par certains micro-organismes en tant que produits de fermentation pendant la phase stationnaire. Ils peuvent être définis comme des produits naturels organiques de faible poids moléculaire, qui sont actifs contre d'autres micro-organismes. La production d'antibiotiques par FMS a révélé un plus grand potentiel, car des rendements plus élevés sont atteints en des temps plus courts par rapport à FML (Krishna, 2005).

**Tableau 3** : Les métabolites secondaires produits par fermentation solide (Hernandez *et al.*, 1993 ; Balakrishnan et Pandey 1996 ; Sekar et Balaraman 1998 ; Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000 ; Barrios-González et Mejía, 2008).

| Métabolite secondaire       | Microorganismes  | Activité biologique  | Substrat de culture                 |
|-----------------------------|--|--|-------------------------------------|
| Lovastatine ou Monacoline K | <i>Aspergillus terreus</i><br><i>A. flavipes</i><br><i>Monascus.sp</i> | Hypocholestérolémique<br>Anti tumorale.  | Support inerte<br>Son de blé<br>Riz |
| Cyclosporine A              | <i>Tolyocladium inflatum</i>   | Immunodépresseur (administré après transplantation d'organe),<br>anti-inflammatoire,<br>antifongique et antiparasite.<br>Immunodépresseur. | Son de blé                          |
| Acide mycophénolique        | <i>Penicillium brevicompactum</i><br><i>Penicillium. Sp.</i>           |  | Son de blé                          |
| Nigerloxine                 | <i>Aspergillus niger</i>   | Antioxydant par inhibition de lipoxigénases, anti-inflammatoire, anti allergique, anticancéreux.   | Son de blé                          |
| Penicilline                 | <i>Penicillium chrysogenum</i>   | Antibiotique.  | Bagasse de canne à sucre.           |
| Zéaralénone                 | <i>Fusarium moniliforme</i>  | Promoteur de croissance.   | maïs                                |
| Céphalosporine              | <i>Cephalosporium acremonium</i>                                       | Antibiotique.  | Orge                                |
| Bio-pigments                | <i>Monascus.sp</i>   | Additifs colorants pour aliments et produits pharmaceutiques.  | /                                   |
| Les alcaloïdes de l'ergot   | <i>Cleviceps purpurea, C. fusiformis</i>                               | traitement de la migraine.   | bagasse de canne à sucre.           |
| 6-pentyl-a-pyrone           | <i>Trichoderma harzianum</i>   | Antifongique.  | bagasse de canne à sucre.           |

## 5. Les diverses étapes suivies en fermentations solides

Les différentes étapes suivies au cours d'une fermentation solide sont : la préparation du substrat ou du milieu de culture, la stérilisation facultative du milieu (généralement à 121 °C pendant 21 minutes) suivie par le refroidissement de celui-ci, l'inoculation du milieu de culture, l'incubation du milieu inoculé en maintenant dans la mesure du possible les conditions environnementales optimales (température, pH, teneur en eau) (Assamoi *et al.*, 2009).

### 5.1. La préparation du substrat carboné

La préparation du substrat carboné vise à lui faire subir divers traitements physique, chimique ou biologique (enzymes) afin de favoriser une grande accessibilité des constituants aux microorganismes. Le traitement physique peut se faire soit mécaniquement (broyage, concassage, hachage, aplatissage), soit thermiquement (chauffage, autoclavage, traitement à la vapeur), soit par irradiation ou par ultrasonication. Le traitement chimique se fait par la voie des alcalis, acides, oxydants, gaz et solvants (Assamoi *et al.*, 2009).

### 5.2. L'inoculation du milieu de culture

L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores. Celles-ci restent viables plus longtemps que du mycélium, sont moins sensibles aux conditions externes et se conservent plus facilement. La quantité optimale de spores à inoculer diffère selon les cas. Un excès de spores peut parfois inhiber la germination. Les spores sont cependant métaboliquement dormantes, impliquant que la dégradation du substrat ne peut s'installer qu'après la germination. Pour minimiser cet inconvénient, une pré-germination des spores est parfois envisagée. Des inocula spores + mycélium + substrat de production peuvent être utilisés également (Assamoi *et al.*, 2009).

## 6. Facteurs influençant le procédé FMS

### 6.1. Paramètres biologiques

#### 6.1.1. Type de microorganisme et inoculum

Les champignons filamenteux sont les microorganismes les mieux adaptés à la fermentation en milieu solide. Mais le choix du type de microorganisme dépend surtout du milieu à valoriser et du produit final à obtenir (Mitchell *et al.*, 2011). L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores qui se conserve mieux par rapport au mycélium. La quantité optimale de spores diffère selon le cas. Une quantité trop importante d'inoculum peut également inhiber la synthèse des métabolites en raison de

l'épuisement rapide des nutriments après germination. Il a également été démontré que l'âge et donc l'état physiologique des spores a un impact conséquent sur le développement des souches (Shivanna et Venkateswaran ,2014).

### 6.1.2. Substrat solide

Généralement, le substrat utilisé en fermentation solide est une matière première naturelle peu onéreuse issue de résidus agricoles (son de blé, pulpe de betterave, tourteaux, etc.) (Sutter 2017). Les résidus agro-industriels sont des ressources renouvelables naturelles et abondantes donc largement disponibles pour la fermentation en milieu solide et dont le coût est peu élevé. Les cultures réalisées en FMS sur substrats naturels sont mentionnées comme « *cultivation on natural substrate* » (Krishna, 2005).

Les substrats sont classés en deux catégories, les supports inertes et organiques, et se présentent sous trois formes (Manpeert, 2005 ; Krishna, 2005): forme de matériaux organiques naturels amylicés ou lignocellulosiques. Ce sont généralement des sources de polymères insolubles, complexes et hétérogènes tel que bagasses, pulpes de betterave, son de blé, tourteaux, les pulpes de café, les peaux d'agrumes, etc, (Durand, 1998). Ils servent à la fois de support et de source de nutriments (Krishna, 2005), c'est le cas de tous les substrats solides issus de l'industrie agricole, composés essentiellement d'amidon, de cellulose, de lignocellulose, de pectine et d'autres polymères. La deuxième comprend les matériaux minéraux tels que les granules d'argile, la perlite, la pouzzolane, etc. Enfin, les matériaux synthétiques de type mousses de polyuréthane constituent la troisième catégorie de matrice solide utilisable par la FMS (Durand, 1998, Thomas *et al.*, 2013). Dans ces cas, les matériaux nécessitent généralement un prétraitement pour rendre leurs constituants chimiques plus accessibles et leur structure physique plus sensible à la pénétration mycélienne (Manpeert, 2005) , ceci comprend une imprégnation de solutions nutritives (Durand, 1998), un broyage, une hydrolyse physique, chimique ou enzymatique afin d'augmenter la disponibilité du substrat, l'apport de nutriments, le réglage du pH et de l'humidité ainsi qu'un traitement thermique afin de pré-dégrader la structure moléculaire et d'éliminer les contaminants (Krishna, 2005).

Le support solide doit se caractériser par une bonne capacité d'absorption et doit contenir les nutriments nécessaires au développement du microorganisme (source d'azote, de carbone et de sels minéraux), sa disponibilité et son faible coût (Krishna,2005), ne doit pas contenir de

composés inhibant la croissance et les activités microbiennes, poreux (Duchiron et Copinet, 2019), insoluble dans l'eau (Manpeert, 2005).

## **6.2. Paramètres physicochimiques**

### **6.2.1. La taille des particules**

En FMS, la surface des particules joue un rôle important pour l'adhésion des microorganismes, les transferts des nutriments et la circulation de l'oxygène ce qui affecte directement la croissance de la souche considérée et la formation des produits. La surface disponible dépend de la taille des particules et de leur porosité (Couto et Sanromán, 2006). Il est donc nécessaire d'avoir une taille de particules convenable, ni trop petite ni trop grosse. En effet, des particules trop petites entraînent une agglomération du substrat diminuant la respiration microbienne et donc le développement. Au contraire, le substrat n'est pas suffisamment accessible si les particules sont trop grosses (Krishna 2005). Ainsi une porosité bien étudiée facilite le passage de l'air qui entre facilement en contact avec les moisissures installées en surface des particules (Couto et Sanromán, 2006).

### **6.2.2. L'humidité et l'activité de l'eau**

La teneur en humidité du substrat solide est un facteur clé pour le développement du microorganisme. Les champignons sont bien connus pour favoriser un environnement humide pour leur croissance. Un niveau d'humidité optimal doit être maintenu, car une humidité plus faible tend à réduire les diffusions, croissance microbienne, stabilité enzymatique et gonflement du substrat. Des niveaux d'humidité plus élevés conduisent à agglomération de particules, limitation du transfert de gaz et compétition de bactéries. L'existence d'un optimum teneur en humidité du milieu a des effets profonds sur la cinétique de croissance et sur les propriétés physico-chimiques de substrats solides, ce qui, à son tour, affecte les productivités. L'humidité du la matrice solide doit être supérieure à 70% dans le cas des champignons filamenteux. (Krishna, 2005).

L'eau est impliquée dans la croissance cellulaire, les réactions métaboliques, les activités enzymatiques, les transports des éléments nutritifs, des métabolites extracellulaires et des gaz au cours de la fermentation solide. Les besoins en eau des microorganismes sont reflétés par l'activité de l'eau ( $A_w$ ) qui représente la disponibilité en eau pour une réaction dans un substrat solide (Krishna, 2005). Il a démontré qu'au cours de la croissance fongique dans les FMS, les activités plus élevées de l'eau favorisent la sporulation tandis que les activités d'eau basses favorisent la génération de spores ou la croissance des mycéliums. Les champignons

filamenteux et certaines levures peuvent se développer à une valeur  $A_w$  faible (0,6-0,7). Les micro-organismes, qui peuvent grandissent et sont capables de mener à bien leurs activités métaboliques à des valeurs  $A_w$  inférieures, sont bonnes pour les processus FMS. L' $A_w$  optimale dépend également de facteurs tels que la vitesse d'agitation et la température de culture. (Manpeert,2005)

### 6.2.3. La Température

La température est probablement l'un des paramètres les plus importants, elle est intimement liée aux activités métaboliques du micro-organisme qui se développe dans le milieu. Plus le champignon filamenteux envahit le support, plus il génère de la chaleur, *via* son métabolisme respiratoire. Cette augmentation de température, pouvant aller jusqu'à 20 °C au-dessus de la température d'incubation, peut entraîner une dégradation des produits sécrétés dans le milieu et stopper la phase végétative de croissance et de nutrition (Duchiron et Copinet, 2019).

La chaleur s'accumule facilement dans ces cultures, car les échanges thermiques sont difficiles dans un milieu peu hydraté. Ceci peut avoir des effets importants tels que la dénaturation des protéines, l'inhibition des enzymes, l'augmentation ou l'inhibition de la production des métabolites et la mort des cellules (Krishna, 2005).

Ce critère critique dans la FMS, le contrôle de la température, est assez difficile à réaliser car les dispositifs conventionnels de convection ou de refroidissement conducteur sont inadéquats pour dissiper la chaleur métabolique en raison de la mauvaise conductivité thermique de la plupart des substrats solides, ainsi que de la nature principalement statique de la FMS. De plus, le taux de génération de chaleur est directement proportionnel au niveau d'activité métabolique dans le système (Krishna, 2005).

Différentes méthodes sont utilisées pour la dissipation de la chaleur, telles que le refroidissement des plateaux métalliques en utilisant du liquide de refroidissement en circulation et une agitation intermittente. D'autres méthodes comprennent l'aération forcée, la circulation de l'eau à travers une chemise entourant le fermenteur, l'agitation des solides et la couverture de la surface externe du fermenteur avec des jutes imbibées d'eau. Cependant, l'aération forcée est généralement la technique de choix pour l'évacuation de la chaleur. Il a été signalé que la majeure partie de la chaleur générée (jusqu'à 80%) dans le processus *SSF* est éliminée en utilisant une aération forcée. Les taux de génération de chaleur indiquent que le transfert de chaleur par conduction était le mécanisme le moins efficace (8,65%) par rapport au mécanisme convectif (26,65%) et évaporatif (64,7%) (Manpeert, 2005).

#### 6.2.4. Le pH

Le pH est l'un des paramètres les plus difficiles à contrôler dans la FMS. Des variations de valeur du pH résultent d'une consommation en substrat (exemple de l'hydrolyse des protéines) et/ou des synthèses métaboliques (exemple des acides organiques). Les variations de pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques (Assamoi, 2009). En fermentation solide, il n'existe pas d'électrode pouvant enregistrer le pH des milieux solides à cause de l'absence d'eau libre. Certains auteurs utilisent des électrodes potentiométriques ou une électrode à pH standard, après avoir une suspension de l'échantillon dans de l'eau distillée. Il est ainsi difficile de contrôler le pH efficacement en fermentation solide. Lorsque cela est nécessaire, la méthode standard est de tamponner le milieu de culture avec un mélange adéquat de composés azotés (urée, sels ammoniacaux), des sels de  $\text{Ca}^{2+}$  ou des solutions alcalines. Pendant la fermentation, le pH peut être régulé par l'addition d'acides ou de bases à l'eau de refroidissement de la masse fermentable (Assamoi, 2009). Ainsi, il est souhaitable d'utiliser des micro-organismes qui peuvent se développer sur une large gamme de pH et qui ont de larges optima de pH (Manpeert, 2005).

#### 6.2.5. L'aération

L'aération de la masse en fermentation dans la plupart des fermenteurs de laboratoire et à grande échelle est réalisée en forçant de l'air stérile sous pression. Les taux d'aération sont régis par la nature du microorganisme utilisé, le degré d'exigence  $\text{O}_2$  pour la synthèse du produit, la quantité de chaleur métabolique à dissiper de la masse, l'épaisseur de la couche de substrat utilisée, le degré auquel  $\text{CO}_2$  et les autres métabolites volatils doivent être éliminés et le degré d'espaces d'air disponibles dans le substrat (Lonsane, 1985). La circulation de l'air peut se faire de manière active par injection d'air humidifié ou passive par passage de l'air à la surface des particules (Mitchell et al 2006).

#### 6.2.6. L'agitation

L'agitation de la masse en fermentation a des effets bénéfiques, elle assure l'homogénéité tout au long de la période de fermentation, l'amélioration de la croissance sur les particules individuelles du substrat, la prévention de la formation d'agrégats, l'exposition des particules individuelles du substrat à l'atmosphère du fermenteur, l'amélioration du transfert de gaz, l'échange de chaleur est facile, prévention des changements localisés et distribution efficace des spores de l'inoculum. La vitesse d'agitation ou de rotation est dictée par les mêmes facteurs que ceux qui régissent la vitesse d'aération. (Lonsane, 1985).



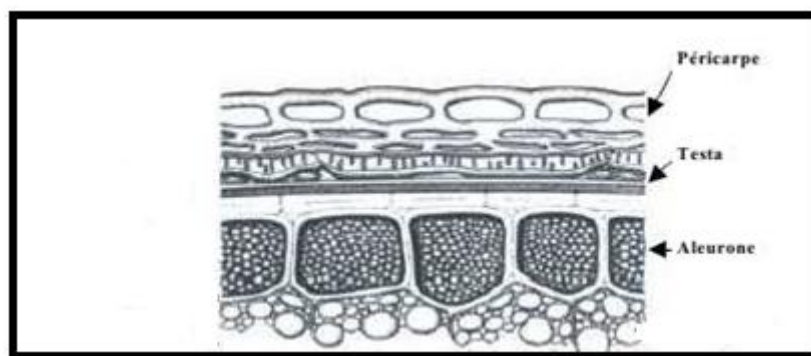
### 6.2.7. L'apport de sources exogènes de carbone et d'azote

Parmi les paramètres de culture, le ratio carbone/azote est un des facteurs les plus importants pour la croissance du microorganisme et pour orienter la production de biomasse et de produit d'intérêt. Un excès ou un manque d'azote dans le milieu de culture peut être le facteur limitant. Les coproduits agricoles et agroindustriels présentent des contenus en azote très variables. Un ratio supérieur à 20 est généralement favorable pour la plupart des champignons. Le type et la nature de ces composés peuvent également affecter le procédé de fermentation (Junior *et al.*, 2010). Le rapport C/N est crucial pour la production des métabolites non associés et partiellement associés à la croissance. Lors de la réalisation des cultures fongiques, il est important de connaître le rapport C/N qui pourrait inciter ou retarder la sporulation (Rodriguez-Leon *et al.*, 2008). La supplémentation en azote et/ou en carbone n'est pas toujours nécessaire et dépend du contenu en azote du substrat de base ainsi que des besoins du microorganisme (Pandya et Gupte, 2012).

## 7. Le son de blé

### 7.1. Généralités

Le son de blé regroupe les couches les plus extérieures du blé. Il est constitué de plusieurs couches fines : le péricarpe extérieur et intérieur, le tégument, la couche hyaline et la couche d'aleurone. Le péricarpe est riche en fibres insolubles comme la cellulose, en lignine et acide férulique. Le tégument contient principalement des alkylrésorcinols (lipide phénolique). La couche d'aleurone est riche en minéraux et en vitamine B. Elle représente 7% de la masse sèche du grain de blé (Antoine *et al.* 2002). (figure 09).



**Figure 09:** Les différentes couches cellulaires constitutives du son de blé (Barron *et al.*, 2012).

### 7.2. Composition chimique

Le son de blé se compose principalement d'amidon (10 à 20%), de polysaccharides non amyliques (41 à 60%) et de protéines (15 à 20%) (Biswas *et al.*, 2019).

Sa composition varie en fonction de ses variabilités génétiques et éco-physiologiques ainsi qu'en fonction du mode de fractionnement et de mouture (Benkerrou, 2012). Sa composition est illustrée dans le tableau 4, qui présente une forte hétérogénéité.

**Tableau 4** : La composition chimique de son de blé de différentes origines.

| % de la matière sèche | (Raynal-Ioualalen, 1996) |                 | (Bataillon <i>et al.</i> , 1998) |                 | (Maréchal, 2001) |
|-----------------------|--------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------|------------------|
|                       | Son brut                 | Son désamidonné | Son brut                         | Son désamidonné | Son désamidonné  |
| Cellulose             | 9,2                      | 15,5            | 11,0                             | 25,0            | 18,7             |
| Hémicelluloses        | 37,0                     | 60,0            | 19,0                             | 45,0            | 62,3             |
| Lignine               | 6,7                      | 8,0             | 6,0                              | 3,0             | 3,8              |
| Amidon                | 20,0                     | n.d             | 29,0.                            | 1,0             | n.d.             |
| Protéines             | 14,8                     | 15,2            | 14,0                             | 9,0             | 15,6             |
| Lipides               | n.d                      | n.d             | 6,0                              | 6,0             | n.d              |
| Matières minérales    | 5,3                      | 1,0             | 4,0                              | 1,0             | 1,5              |

nd : non déterminé

### 7.3. Propriétés

Le son de blé a pour avantage de permettre une bonne circulation de l'air, de ne pas présenter d'agglomération des particules entre elles, de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et d'être bon marché, ainsi il a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (Abdullah *et al.* 1985), il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons (Restino, 2012)

#### 7.4. L'intérêt du son de blé

Aujourd'hui, le son de blé est employé dans certains domaines industriels. Il est utilisé en fermentation en milieu solide pour la production de divers métabolites intéressants les enzymes, les métabolites secondaires et autres produits d'intérêt biotechnologiques. Il assure une bonne production des enzymes cellulases, amylases, et xylanases à raison de sa composition en cellulose, amidon et en xylène, ainsi sa teneur élevée en azote le rend approprié pour la production d'autres enzymes telles que la protéase, la glucoamylase. (Javed *et al.*, 2012).

Il intervient dans la production de biocarburants comme par exemple l'éthanol et le biobutanol.

Un autre intérêt de son de blé dans la biorémediation, de l'employer pour éliminer les ions de métaux lourds des sites industriels abandonné qui est un défi majeur pour la décontamination et la réhabilitation des eaux usées industrielles. Il peut être utilisé comme filtre naturel pour décontaminer les effluents industriels contenant des métaux lourds (Javed *et al.*, 2012).

Le son de blé a également un rôle dans le domaine médical. Les antioxydants contenus dans ce coproduit peuvent réduire les risques de maladies telles que : le cancer du côlon, la maladie de Parkinson, les maladies cardio-vasculaires. Les fibres du son de blé sont connues pour diminuer le taux de cholestérol (Javed *et al.*, 2012).

Il est aussi utilisé comme additif dans l'alimentation humaine pour l'apport de vitamine B. Le son de blé peut aussi être utilisé dans l'alimentation animale. Il a été montré que l'ajout quotidien de son de blé dans l'alimentation des vaches permet d'augmenter la production de lait de 14,65 litres par jour (Javed *et al.*, 2012).



***CHAPITRE II : Matériel et  
Méthodes***

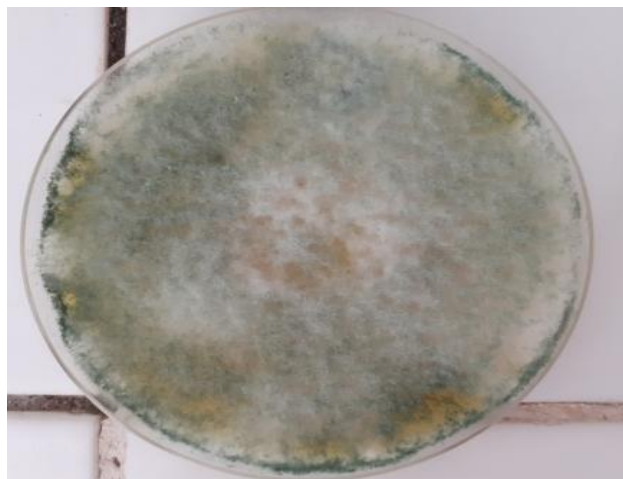
## 1. Matériel biologique

### 1.1. Origine et entretien de la souche

La souche utilisée dans ce travail est la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). Elle est isolée par notre encadrante Mme LEGHLIMI. H, au niveau du laboratoire de génie enzymatique Université Constantine 1 Algérie, à partir d'échantillon de sol collecté proche de la source thermale (Hammam Debbagh Guelma) (février 2007). La souche est identifiée comme *Trichoderma longibrachiatum* (laboratoire DSMZ. Allemagne) (Leghlimi, 2013).

### 1.2. Réactivation et sporulation de la souche

A partir d'une suspension de spore de la souche *Trichoderma longibrachiatum*, conservée dans de l'eau tweenée glycérol 20%, sous forme de cryotubes (Leghlimi, 2013), quelques gouttes sont prélevées et étalées à l'aide de pipettes Pasteur à la surface du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe 1) coulé en boîtes de Pétri. Par la suite, les boîtes sont incubées dans une étuve à 30°C jusqu'à une bonne sporulation (7 jours) (figure10). Les repiquages successifs sont effectués, à partir de boîtes bien sporulées, sur le même milieu (PDA) selon la méthode de la touche centrale (Botton *et al.*, 1990) .



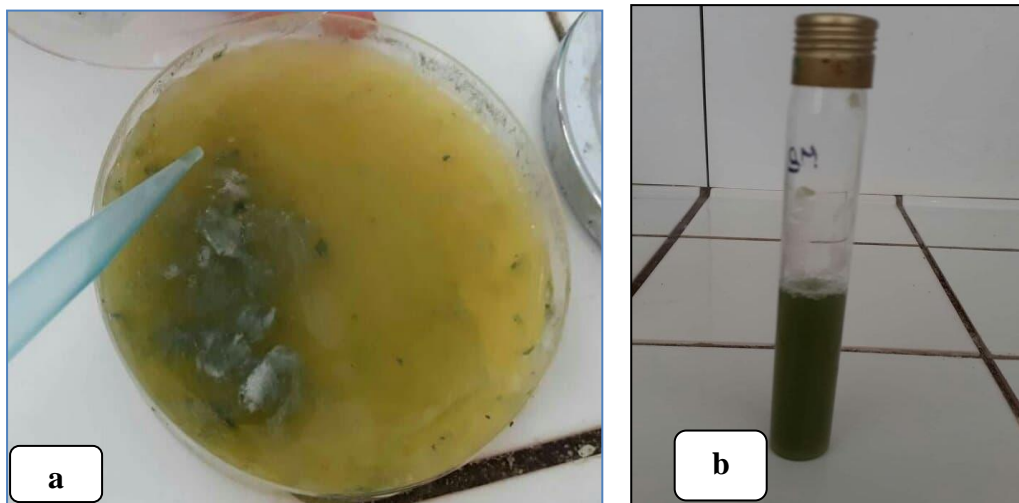
**Figure 10** : Aspect macroscopique de la souche après une bonne sporulation.

### 1.3. Préparation de l'inoculum

#### 1.3.1. Préparation de la suspension de spores

Les spores sont récupérées par addition d'un volume de 10ml d'eau physiologique stérile dans une boîte de Pétri bien sporulée. La surface de la croissance fongique est grattée et les

spores sont récupérées sous forme de suspensions dans des tubes stériles, qui vont servir par la suite, d'inoculum pour les cultures en erlen-meyers (figure 11 a et b).



**Figure 11** : Préparation de la suspension de spores ; **a** : mycelium gratté,  
**b** : suspension sporale obtenue.

### 1. 3.2. Dénombrement des spores

Une dilution de 1/100 est réalisée à partir d'une solution mère de spores. Le nombre de spore de cette dilution est déterminé par une technique de dénombrement à l'aide d'une cellule de comptage (la cellule de Thoma) (Guiraud, 1998) par examen microscopique objectif (x40) qui nous permettra, ensuite de calculer le volume de la suspension de spores nécessaire pour l'inoculation des erlens-meyers (le volume est calculé en fonction du nombre de spores trouvé et du taux d'inoculum utilisé).

### 1.3.3. Conservation de la souche

Les suspensions de spores sont ensuite stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990). Pour une conservation à -20°C, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée avec le glycérol à 20% (agent cryoprotecteur). Ces suspensions de spores sont ensuite stockées au congélateur, afin de garder leur viabilité et de limiter les possibilités de variation, jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990).

## 2. Production des métabolites secondaires par la souche *Trichoderma longibrachiatum*

### 2.1. Milieu de production

Un milieu de culture est utilisé pour la production des métabolites secondaires en mode de fermentation solide : le son de blé issu de la Coopérative des céréales et légumes secs (El

khroub. Constantine. Algérie). C'est un sous-produit de la mouture sèche du blé tendre, utilisé comme un substrat naturel sans aucun traitement.

## **2.2. Conduite de la fermentation en erlen-meyers**

La production des métabolites secondaires est réalisée dans des erlens-meyers de 250 ml à raison de 10 g de son de blé par erlen, dont le taux d'humidité initiale est de 75% (Sarhy-Bagnon, 2000).

Seize erlens sont employés, dont 8 erlens d'entre eux sont humidifiés avec de l'eau distillée, le reste avec une solution de saccharose (Annexe 2), le son de blé et l'agent humidifiant sont homogénéisés à l'aide d'une tige en verre puis les erlens-meyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

Après refroidissement, les erlens sont inoculés par une suspension sporale de la souche *T.longibrachiatum* dont le taux d'inoculum est de  $2.10^9$  spores/ gramme de substrat solide. Les milieux sont bien homogénéisés avec une tige en verre stérile. L'incubation des erlens est effectuée à 28°C pendant différentes périodes à savoir 5, 7 10 et 14 jours.

## **3. Extraction et mesures effectuées après fermentation**

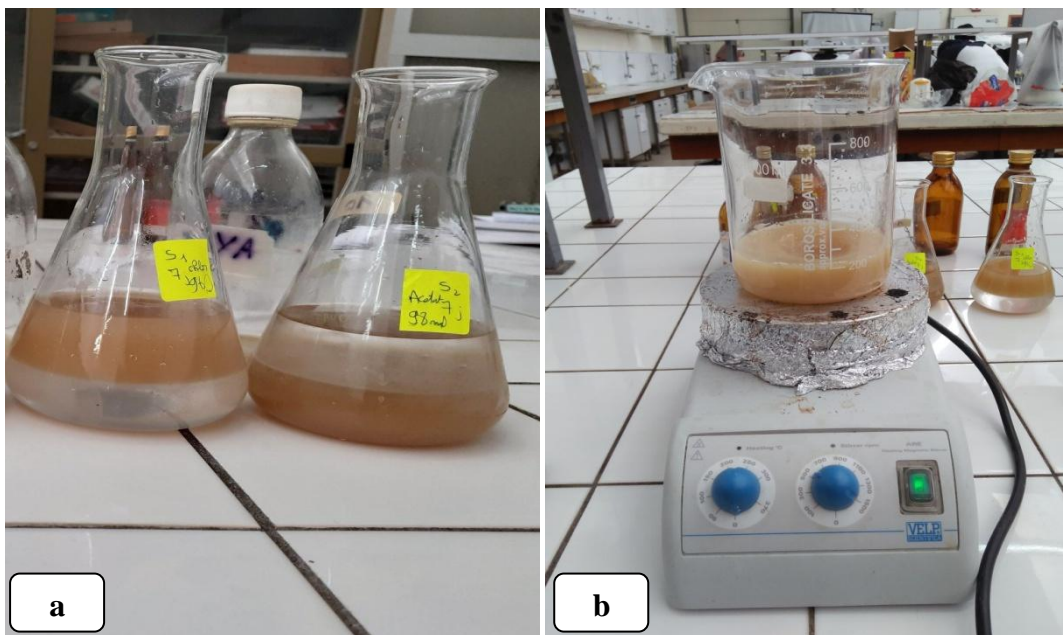
### **3.1. Extraction des métabolites secondaires**

A la fin d'incubation, 5g du substrat fermenté sont mixés avec 100 ml d'eau distillée dans un blender ménager pendant 1 à 2 minutes, ensuite le mélange est filtré à l'aide d'une compresse de gaze (figure 12). Après filtration, un volume des filtrats obtenus (90 ml) est mélangé avec un volume équivalant des solvants chloroforme ou d'acétate d'éthyle. Le mélange obtenu est placé sur une plaque d'agitation (figure 13 a et b), pendant 5 minutes. Ensuite, le mélange est versé dans une ampoule à décantation de 250 ml (figure 14), pour faire séparer la phase organique de la phase aqueuse (on s'intéresse à la phase organique qui contient les métabolites recherchés). A l'aide d'un Rota vapeur à 45°C avec une légère rotation, la phase organique est évaporée à sec.

Chaque extrait fongique est dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de façon à obtenir une concentration de 100 mg/ml.

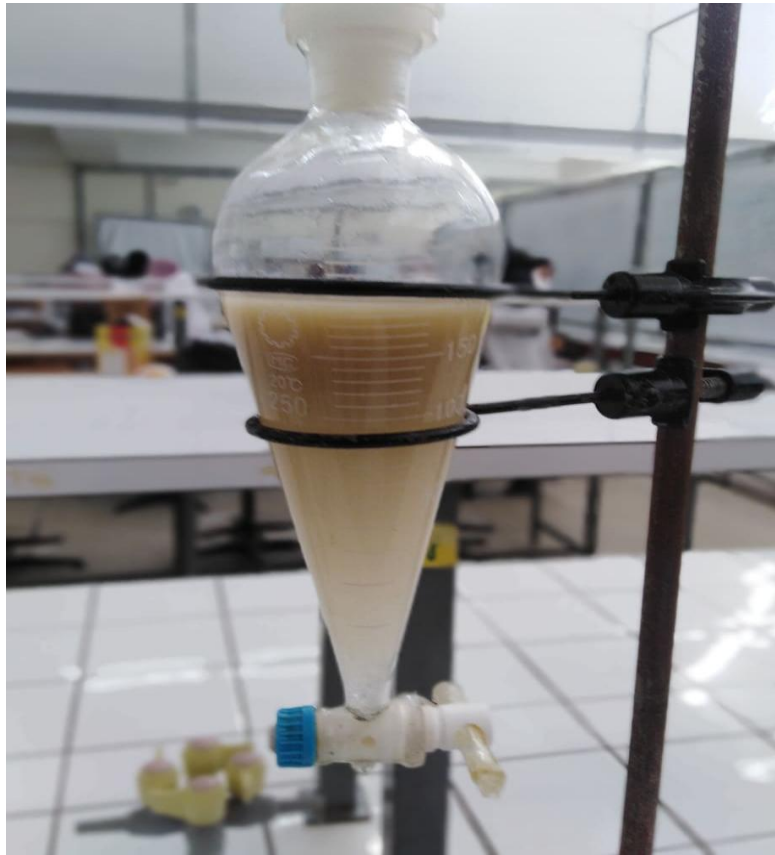


**Figure 12 :** Filtration du mout de fermentation



**Figure 13 :** Traitement du mout de fermentation aux solvants ; **a** : le mélange filtrat -solvant, **b** : agitation sur la plaque agitatrice.





**Figure 14** : Décantation du mélange (phase organique et phase aqueuse).

### 3.2. Mesure du taux d'humidité

L'humidité est un paramètre qui renseigne sur le développement du champignon au cours de la culture. En effet, au cours de sa croissance, le champignon produit six molécules d'eau pour une molécule de glucose consommée (Restino,2012), la mesure du taux d'humidité permet de déterminer la matière sèche, nécessaire pour le calcul de la production du métabolite recherché.

L'humidité des substrats fermentés (le son de blé) est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec, qui consiste à sécher des échantillons de 5 g dans une étuve à une température de 105 °C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Audigie *et al.*, 1984).

Le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$H\% = [(PH-PS)/PH] \times 100$$

PH: poids humid

PS: poids sec

#### 4. Test d'activité antifongique des extraits obtenus

##### - Méthode de diffusion sur disques

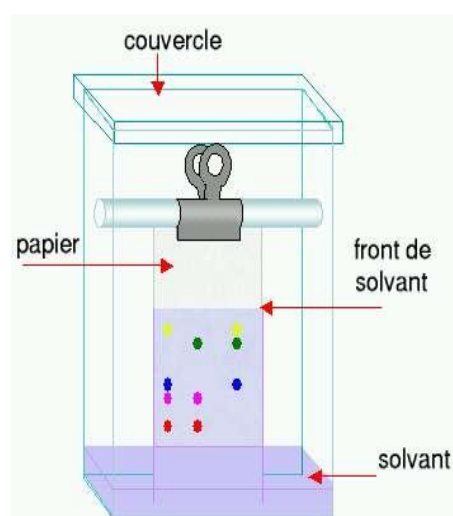
Afin de déterminer l'activité antifongique des extraits, la méthode de diffusion sur disques est utilisée (Hazalin *et al.*, 2009). 10  $\mu$ l de chaque extrait sont déposés à l'aide d'une pipette sur les disques stériles (6 mm de diamètre) placés à la surface du Sabouraud dextrose agar (SDA) (Annexe1) préalablement inoculés avec 100  $\mu$ l des suspensions des champignons pathogènes (Hazalin *et al.*, 2009).

Les boîtes ainsi terminées sont mises pendant 2 heures à 4°C afin que les métabolites puissent diffuser ensuite elles sont mises à incuber à 30°C pendant 72 heures.

#### 5. Séparation des métabolites secondaires par CCM

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des métabolites secondaires et leur identification. Elle se fait sur une plaque de silicagel (gel de silice 60 F254) sur laquelle est déposé un spot de chaque extrait chloroformique ou d'acétate d'éthyle concentré selon le cas. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'éluant constitué de toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (5 : 4 : 1), respectivement (Multon, 1982) (Figure 15).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance de 15 cm à partir du point de dépôt. Après élimination du solvant, les chromatogrammes sont observés sous lumière UV ( $\lambda = 254$  et 365 nm) (Kahlouche et Meziane, 2017).



**Figure15 :** Principe de la chromatographie sur couche mince (Kahlouche et Meziane, 2017).



*Discussion  
générale*

A l'époque, la production de métabolites secondaires est principalement réalisée par fermentation en milieu liquide. Cependant, les études actuelles s'orientent vers la production de ces métabolites par la technique de fermentation en milieu solide à raison de sa simplicité, de son faible coût, sa productivité et son rendement élevé. La production des métabolites secondaires bioactifs par des micro-organismes antagonistes aux phytopathogènes, comme le genre *Trichoderma* (agent de lutte biologique contre plusieurs ravageurs) (Zachow *et al.*, 2016) est destinée comme une alternative prometteuse aux pesticides chimiques qui ont des effets nuisibles (Abo-Elyousr *et al.*, 2014).

Afin de tester l'activité antagoniste de la souche *Trichoderma longibrachatum* vis-à-vis les champignons phytopathogènes en se basant sur la production des métabolites secondaires bioactifs ; une fermentation est effectuée en erlenmeyers de 250 ml sur un substrat solide qui est le son de blé humidifié avec une solution de saccharose ou de l'eau distillée à 75 % , (on n'a pas testé une gamme de taux d'humidité pour ce milieu, c'est pour ça on a utilisé un taux d'humidité de 75% selon Sarhy-bagnon *et al.*,2000). Le milieu de fermentation est inoculé par une suspension de spore à raison de  $2.10^9$  spores par gramme de substrat. L'incubation est effectuée sur différentes périodes (5, 7, 10 et 14 jours) à 28°C. Mais malheureusement notre travail a été interrompu à cause de la pandémie de « Covid-19 », ce qui nous a empêchées de poursuivre les manipulations prévues et avoir des résultats. Notre sujet de recherche est d'actualité, et fait partie des études visant la recherche de métabolites secondaires d'origine fongique, ayant un effet antagoniste vis-à-vis les champignons phytopathogènes, ce qui ouvre la porte de la lutte biologique, devenue la solution de choix par rapport aux traitements chimiques, responsables de nombreux effets secondaires indésirables.

Dans ce contexte, de nombreuses études ont été effectuées avec différentes souches fongiques, sur des substrats différents que ce soit en mode liquide agité ou en mode solide statique. Nous citons ici, quelques travaux et les résultats obtenus :

Selon Hamrouni *et al.*,(2019), la production à l'échelle industrielle de la molécule 6 pentyl-alpha-pyrone « 6-PP » (un métabolite secondaire a une activité antagoniste contre les bactéries et les champignons), est réalisée par fermentation en milieu solide dans des flacons de 250 ml et dans une colonne de verre Raimbault remplie de 20 g à 5 kg de substrat solide. La colonne utilisée est un nouveau bioréacteur en plastique à usage unique. Le substrat utilisé constitue un mélange de sarments de vigne, de tourteau de jatropha, de grignons d'olive, de farine de pommes de terre et d'huile d'olive. Le substrat de fermentation est humidifié avec de

l'eau distillée dont le taux d'humidité initiale est de 50%, et inoculé avec une suspension sporale à une concentration de  $2 \times 10^7$  conidies de la souche *Trichoderma asperellum*, les cultures sont incubées à 29°C pendant 7 jours. La fermentation est contrôlée par l'application d'air humide forcé pendant tout le processus, mais les flacons ne sont pas hermétiquement fermés pour que de l'oxygène puisse s'écouler par diffusion. Ils ont abouti à la production optimale de 6-PP ( $7,36 \pm 0,37$  mg par gramme de matière sèche). Cette valeur est la plus élevée dans le bioréacteur à usage unique par rapport aux autres systèmes testés en raison d'un meilleur contrôle des paramètres de la culture.

En 2006, l'équipe de Vinale a étudiée les principaux métabolites secondaires produits par deux souches commerciales de *Trichoderma harzianum* (T22 et T39) actives contre différents phytopathogènes par une fermentation liquide sur milieu dextrose de pomme de terre (PDB) pendant 31 jours à 25°C. L'étude est concentrée sur l'identification de ces métabolites, leur activité antifongique et leur implication lors des interactions antagonistes. La production a également été contrôlée par chromatographie liquide / spectrométrie de masse lors d'une interaction in vitro avec *Rhizoctonia solani*. Bien que leur données aient confirmé que les souches T22 et T39 ne produisent pas de 6-n-pentyl-6H-pyran-2-one, le plus caractérisé et le plus important des antibiotiques de *Trichoderma* (Ghisalberti *et al.*, 1990), d'autres composés ont été détectés, dont deux nouveaux métabolites secondaires. Une nouvelle azaphilone produite par T22 présente une inhibition in vitro marquée de *Rhizoctonia solani*, *Pythiummultimum* et *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, et un nouveau buténolide produit par T39.

Par ailleurs, différents essais biologiques sont testés par Tarus *et al.*, (2003), sur l'effet antagoniste des métabolites secondaires issus de la fermentation de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma longibrachiatum* dans différents milieux de culture, contre certaines bactéries Gram positives et Gram négatives sélectionnées, des champignons comprenant *Armillaria mellea* (agent responsable de la pourriture des racines du théier *Camellia sinensis*), une levure et un *Mucor*. Les composés obtenus sont : Le phényl éthanol, le tyrosol, la 6-n-pentyl- $\alpha$ -pyrone (qui a montré l'activité antifongique et antibactérienne la plus élevée) et la sorbicilline (qui a présenté une activité antifongique modérée).

De même, Sarhy-Bagnon *et al.*, (2000) ont étudiés la production de 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone par comparaison entre la production en FML et en FMS avec le champignon filamenteux

*Trichoderma harzianum*. Le même milieu de biotransformation qu'en FML est utilisé pour imbiber la matrice solide (bagasse de canne à sucre) en FMS. Le rendement de 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone est beaucoup plus important en FMS qu'en FML (17 fois plus élevé qu'en FML).

Au paravent, Dennis et Webster (1971), ont pu démontrer que certaines espèces de *Trichoderma* pouvaient produire des composés volatiles et non volatiles capables d'inhiber la croissance d'une grande variété de champignons, et que la production de ces substances antifongiques variait en fonction de l'isolat. Lors de la même étude, les chercheurs ont pu démontrer que tous les isolats actifs étaient associés à une forte odeur de "noix de coco". La substance responsable de cette odeur est le 6-n-penthyl-2H-pyran-2-one (6PP).

A la lumière de tous cela, la fermentation en milieu solide semble une alternative d'intérêt pour la production de métabolites secondaires à effet antagoniste, par les champignons filamenteux. Cette méthode de fermentation exige beaucoup d'extensions, que ce soit la variété des substrats utilisés qui, sont souvent des coproduits naturels, ce qui aboutit à une dépollution de l'environnement d'une part et de l'autre part, à l'élaboration de métabolites d'intérêt, avec le minimum de coût possible (production à moindre coût). Aussi, la panoplie de souches fongiques qui sont les plus compatibles à ce mode de fermentation, répertoriées ou isolées de milieux naturels. Ces dernières peuvent être une source précieuse de métabolites à caractéristiques technologiques et industrielles importantes.



*Conclusion  
générale*

L'objectif principal visé par notre travail consiste en la production de métabolites secondaires bioactifs, par fermentation de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* sur substrat solide constitué de son de blé, humidifié à 75% avec de l'eau distillée ou une solution de saccharose, et ceci dans le but de choisir l'agent humidifiant permettant d'obtenir la meilleure production en métabolites secondaires. A la fin de chaque durée d'incubation, nous envisageons une extraction des métabolites recherchés par l'emploi de deux solvants organiques, à savoir le chloroforme et l'acétate d'éthyle dans le sens d'extraire et de récupérer tous les métabolites libérés par cette souche. La détection de ces métabolites est prévue par chromatographie sur couche mince (CCM). Malheureusement, notre travail n'a pas abouti à des résultats, et s'est interrompu en pleines manipulations. Mais ça n'empêche pas de juger utile notre investigation, qui semble une nouvelle démarche pour la production de métabolites secondaires, car jusqu'à maintenant très peu de travaux qui adoptent la FMS pour ce type de production.

Des résultats de certaines études ont prouvées que le genre *Trichoderma* possède une capacité de produire une large gamme de métabolites secondaires bioactifs, d'intérêt biotechnologique et économique, par le procédé de fermentation solide connue par sa productivité élevée.

A travers les résultats des recherches actuelles, il est encourageant de poursuivre les investigations des champignons microscopiques, à usage industriel pour la production de métabolites, tout en valorisant les déchets agro-industriels comme substrat pour leur culture.

Au terme de cette étude, il serait peut être intéressant de procéder en perspectives à :

- L'optimisation des conditions et la composition du milieu de production.
- La purification et l'identification des métabolites secondaires par les méthodes chromatographiques.
- La comparaison de la production de ces métabolites par les deux procédés de fermentation (FML et FMS).
- La valorisation d'autres déchets industriels pour la production, en remplaçant les céréales (son de blé) et tester d'autres agents humidifiants, afin de trouver un procédé économique d'intérêt industriel.
- Le test de l'antagonisme de la souche *Trichoderma longibrachiatum* et de ces métabolites sur la croissance des plantes in vitro et in vivo.





*Références  
bibliographiques*

A

- Abdullah A. L., Tengerdy R P., Murphy V P.** (1985). "Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw." *Biotechnology and Bioengineering* 27(1): 20-27.
- Abo-Elyousr K.A.M., Abdel-Hafez S.I.I., Abdel-Rahim I.R.** (2014). Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*. *J. Phytopathol.* 162, 567–574.
- Adams P.B.** (1990). The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. agents de lutte biologique; INRA, UMR Microbiologie Géochimie des sols.* 28 : 59-72.
- Adams R.Z.** (2002). Indoor Environment Connections Featured Public Library Closes Down for Mold Investigation [www.ieconnections.com/archive/jan\\_01/jan-01.html](http://www.ieconnections.com/archive/jan_01/jan-01.html).
- Alabouvette C.** (2001). La lutte biologique contre les parasites du sol. Possibilités, spécificités et pour l’instant rareté. *Phytoma. La défense des végétaux*, 35-37.
- Alabouvette C., Aimè S., Cordier C., Olivain C.** (2008). « Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47”, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 73, Issues 1-3, Pages 9-15.
- Alabouvette C., Couteaudier Y., Louvet J.** (1983). Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l’antagonisme entre microorganismes, 7-16. In «Les antagonismes microbiens. Modes d’action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes». 24e Coll. soc. Fr. Phytopathol., Bordeaux.
- Alanio A., Brethon B., Feuilhade de Chauvin M., Kervile E., Leblanc T., Lacroix C., Baruchel A., Menotti J.** (2008). Invasive Pulmonary Infection Due to *Trichoderma longibrachiatum* Mimicking Invasive Aspergillosis in a Neutropenic Patient Successfully Treated with Voriconazole Combined with Caspofungin, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 46, Issue 10, Pages 116–118.
- Antoine C., Lullien-Pellerin V., Abecassis J., Rouau X.** (2002). "Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer." *Sciences des Aliments* 22: 545-556.
- Assamoi A.A., Destain J., Thonart P.** (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. [Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement](#). 13(2), 281-294.
- Audigie C L., Fagerella J., Zonszain F.** (1984). Manipulation d’analyse biochimique. Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris. p270.

**Azzouz Z.** (2015). Production de cellulases et de xylanases fongiques par fermentation solide et liquide à base de paille et de son de blé. Mémoire Magister : Microbiologie. BEJAIA : Université A. MIRA- BEJAIA.1-122p.

## B

**Balakrishnan K., Pandey A.** (1996). A production of biologically active secondary metabolites in solidstate fermentation. *Journal of Scientific and IndustrialResearch*. 55: 365-372.

**Barrios-González J., Mejía A.** (2008). Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. In : Pandey A., Soccol C.R. and C. Larroche (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.Pp 302-336.

**Barron C., Abécassis J., Chaurand M., Lullien-Pellerin V., Mabille F., Rouau X., Sadoudi A., Samson M.F.** (2012). Accès à des molécules d'intérêt par fractionnement par voie sèche. Innovations Agronomiques. INRA, UMR1208 Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes (INRA-CIRAD-SupAgro Montpellier-Université Montpellier2), F-34000 Montpellier, France 19, 51-62.

**Bataillon M., P Mathaly., A. P Nunes Cardinali ., Duchiron F.** (1998)."Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale." *Industrial Crops and Products*, 8(1) :37-43.

**Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C., Codon A.C.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol*7, 249-260.

**Benkerrou F., Hamaili K.** (2012). Etude de la croissance et la production des cellulases par *Bjerkandera sp* sur le son et la paille de blé. Mémoire de master : Génie Biologique. Université Abderrahmane MIRA de Bejaia.68p.

**Benouza S.** (2012). Inventaire de la mycoflore de la rhizosphère de l'olivier et étude de ses potentialités antagonistes vis-à-vis de *Verticillium dahliae* Kleb: agent de la verticilliose de l'olivier. Mémoire de MAGISTER en Biotechnologie. Université d'Oran Es-Senia. Algérie.150 p.

**Bisset J.** (1991). Revision of the genus *Trichoderma*. La section *Pachybasium*. (a) *can.J. Bot.* 69: 2373-2417.

**Bissett J.** (1984). Revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Can J Bot.*62 :924–931

**Bissett J.** (1991). Revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can J Bot.* 69: 2418–2420.

**Bissett J.** (2004). Commentaires de l'adresse internet suivante :

[http://www.Medicalglossary.org/fungi\\_mitosporic\\_fungi\\_definitions.html](http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html).

**Biswas P., Bharti A. K., Kadam A., Dutt D.** (2019). "Wheat bran as substrate for enzyme production and its application in the bio-deinking of mixed office waste (MOW) paper," *BioRes.* 14(3), 5788-5806.

**Blumenthal C.Z.** (2004). Production of peptide metabolites in *Aspergillus niger*, *A. oryzae* and *Trichoderma reesei* : justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi ;*Regul. Toxicol .pharmacol.* 39 (2) :214-228.

**Boiron P.** (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris.128p.

**Boukhalfa-lezzar H.** (2015). Etude de la production de la protéase par *Aspergillus oryzae* sur milieu solide en fermenteur fujiwara. Utilisation des déchets de tomate comme substrat de fermentation. Thèse de doctorat : biochimie et microbiologie appliquées. Université des frères Mentouri- CONSTANTINE.156p.

**Boutera Z., Saddalahe S.** (2017). Optimisation de production de protéase acide par l'*Aspergillus niger* sur milieu solide. Mémoire de Master : Biochimie Appliquée. *Université Echahid Hamma Lakhdar-El OUED*.1-82p.

**Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P H., Larpent J P., Reymond P., Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P.** (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P : 34-428.

## C

**Carvalho J.C., Soccol C.R., Babitha S., Pandey A., Woiciechowski A.L.** (2008). Production of pigments. In: Pandey A., Soccol C.R., C. Larroche (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India. Pp. 337-355.

**Chabasse D., Bouchara J-P., De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P.** (2002). Les moisissures à intérêt médical. Cahier de formation N° 25, Bioforma 230 bd raspail 75014, Paris.

**Chet I.** (1987). *Trichoderma* : application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soil born pathogenic fungi. In: Chet I. (eds). *Innovative approaches to plant disease control*, Wiley, New york .pp137-160.

**Conner D.E., Beuchat L.R.** (1987). Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. *International Journal of Food Microbiology* 4,303-312.

**Cooney J.M. ., Lauren D.R. ., Perry-meyerL.J.** (1997). A novel tubular bioassay for measuring the production of antagonistic chemicals produced at the fungal/pathogen interface. *Letters in Applied Microbiology.*, 24 (6) : 460-462.

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

**Couto S. R., Sanromán Á. M.** (2006). Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of food Engineering.*, 76(68), 291-302.

## D

**Dennis C., Webster J.** (1971). Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma* : II. Production of Volatile Antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 363-369.

**Dmitri V., Mavrodi. Wulf Blankenfeldt ., Linda S., Thomashow.** (2006). “Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation”, *Phytopathology* Vol. 44: 417-445 p.

**Duchiron F ., Copinet E.** (2019). Fermentation en milieu solide (FMS).Techniques de l’Ingénieur – BIO620 v2.

**Dumphy G. B., Tibelius K.H.** (1992). Les progrès biotechnologiques augmentent l’efficacité de *Bacillus Thuringiensis* et de *Bacillus Sphaericus* en tant qu’insecticide microbien, chap. 15 : 303-321pp. In : la lutte biologique. Ch, Vincent, D. coderre. Edit gaëtan, Morin. 650p

**Durand P.A.** (1998). La fermentation en milieu solide. *Biofutur*, 1998(181), 41–43.

## G

**Gal-hemed I., Atanasova L., Komon-zelazowska M., Druzhinin I.S., Viterbo A., Yarden O.** (2011). Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological Control for Arid-Zone Agriculture .*Applied and environmental microbiology*, 77(15) : 5100-5109.

**Gams W. and Bissett J.** (1998). Morphology and identification of *Trichoderma* sp. *Trichoderma & Gliocladium*, Volume1 : Basic Biology, Taxonomy and Genetics.

[:http://nt.ars.grin.gov/taxadescriptions/keys/Genusoverview.cfm](http://nt.ars.grin.gov/taxadescriptions/keys/Genusoverview.cfm)

**Gangneux J. P., Drogoul A. S.** (2008). Infections fongiques invasives : nouvelles données épidémiologiques et écologiques. *Hématologie*, 14, n° spécial 4: 9.

**Genilloud O., Pelaez F., Genzalez i ., Diez M.T.** (1994). Diversity on actinomycètes and seaweeds from the iberian coasts. *Microbiologia*, 10: 413-422.

**Gervais P., Molin P.**(2003). The Role of Water in Solid State Fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**, 85–101.

**Ghisalberti E.L., Narbey M.J., Dewan M.M ., Sivasithamparam K.** (1990). Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant Soil* 121, 287–291.

**Ghorri S.** (2015). Isolement des microorganismes possédant une activité anti- *Fusarium*. Thèse de Doctorat, Université frères Mentouri constantine. Algérie. 154p.

**Givry S.** (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifermantans*. Thèse de doctorat : Microbiologie Industrielle. Université de Reims Champagne-Ardenne.1-245p.

**Grondona I ., Hermosa R., Tejada M., Gomis M.D., Mateos P.S., Bridge P.D., Monte E., Garcia-AchaI.** (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma Harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *App. Environ. Microb.*, 63 (8): 3189-3198.

**Guiraud J.** (1998). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris. P: 8-101.

## H

**Hamrouni R., Molinet J., Mitropoulou G., Kourkoutas Y., Dupuy N., Masmoudi A., Roussos S.** (2019).From flasks to single used bioreactor: Scale-up of solid state fermentationprocess for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*.*Journal of Environmental Management*. 252 .109496.p9 .

**Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., & Lorito M.** (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1): 43.

**Harman J. S., Childs G. E., & Kelleher K. J.**(2000). Mental health care utilization and expenditures by children in foster care. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 154(11) :1114-1117

**Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N.** (1994). Ainsworth and Bysby'sdictionary of the fungi, 8 thed .International Mycological Institute, Egham. Unitted. Kingdom.632.

**Hernandez M.R.T., Lonsane B.K., Raimbault M. and RoussosS.** (1993). Spectra of ergot alkaloids produced by *Claviceps purpurea* 1029C in solid state fermentation system influence

of composition of liquid medium used for impregnating sugarcane pith bagasse. *Process Biochemistry* 28(1): 23-27.

**Howell C. R.** (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.

**Howell C. R., Stipanovic R. D., Lumsden R. D.**(1993). Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science and Technology* 3: 435-441.

**Hazalin N. A., Ramasamy K., Lim S. M., Wahab I. A., Cole A. L., Abdul Majeed A. B.** (2009). Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9: 46.

## J

**Javed M.** (2012). "wheat bran as a brown gold: nutritious value and its biotechnological applications." *african journal of microbiology research*. 6(4), P: 724-733.

**Johanne C.** (2002). Phytopathologiste Horti-Protection inc .Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.

**Johanning E., Gareis M., Nielsen K., Dietrich R., Martlbauer E.**(2002). Airborne Mycotoxin Sampling and Screening Analysis. <http://www.ibt.dtu.dk/mycology/staff/kfn/papers/Airborne-mycotoxin2002.pdf>

**Junior Z., Luiz L., Linde G. A., Colauto N. B.** (2010). Carbon-to-nitrogen ratios for *Agaricus brasiliensis* on the axenic method. *Acta Sci. Agron*. 32, 55–60.

## K

**Kahlouche L ., Meziane L.**(2017). Etude de quelques métabolites secondaires des souches du genre *Aspergillus* ayant une activité biologique. Mémoire de master : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production de substances fongiques. Université des Frères Mentouri Constantine.78p.

**Kaur R., Kaur J., Singh S.** (2010). Non pathogenic *Fusarium* as a biological control agent. *Plant Pathol. J.*, 9: 79-91.

**Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C ., Stalpers J.A.** (2001). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th Edition. CABI Publishing.655p.

**Kolli N ., Zatout R.**(2015). Production de l'alpha amylase par certaines souches fongiques sur différents substrats. Mémoir master : Biotechnologie des mycètes /fermentation et production de substances fongiques. Université des frères Mentouri Canstantine.64.

**Krishna C.** (2005). "Solid-State Fermentation Systems-An Overview." *Critical Reviews in Biotechnology* 25 : 1-30.

**Kubicek C.P., Komon-zelazowska M., Druzhinina I.S.** (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from Kullnig-Gradinger C., March R. L., Lorito M., Kubiecek C.P., 2000 : Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma* ech 42 gene expression before mycoparasitic contact. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2232-2234.

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

**Kubicek C.P., Penttilä M.E.** (1998). Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzyme by *Trichoderma*. In *Trichoderma and Glicoladium*. Vol 2 Enzymes, biological control and commercial applications, pp. 49-71. Taylor and Francis Ltd, London

**Kunamneni A., Kugen P., Suren S.**(2005). Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, pp: 100,168-171.

**Kwak M Y., Rhee J S.** (1992). Cultivation characteriscs of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. *Biotechnol Bioeng.* 39: 903-906.

## L

**Lambert N.** (2010).Lutte biologique aux ravageurs, applicabilité au Québec .Thèse :l'obtention du grade de maître en environnement.Université de Sherbrooke.87p.

**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. 201.

**Larpent-Gourgaud M., Sanglier J.J.** (1992). *Biotechnologies. Principes et méthodes.* Paris : Doin Editions.668p . – (biosciences et techniques).

**Leghlimi H., Djeddar Mihoubi I., Boukhalfa Lezzar H., Dakhmouche S., Bennamoun L., Meraihi Z.**(2017). Improvement of Fungal Cellulase Production by Solid State Fermentation. *International Journal of Sciences* vol. 6(10), pages 46-51.

**Leghlimi H.** (2013). Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Doctorat en Sciences Microbiologie. Option : Biotechnologie et Génie Microbiologique. Université Constantine 1. Doctorat de l'université de Reims Champagne



Ardenne. Discipline Microbiologie-Biotechnologie. Ecole Doctorale Sciences, Technologie, Santé. Section CNU 64-Biochimie et Biologie Moléculaire. 150 p.

**Leuchtman A., Petrini O., Samuels G.** (1996). Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia*, 88 (3) : 384-394

**Leveau J.Y., Bouix M.** (1993). Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industrielle. Paris : [Technique et documentation](#)- Lavoisier.612p.

**Lillard-Roberts S.** (2004).*Trichoderma harzianum*. Mold-Help [en ligne]. [consulté le 21 octobre 2004]. Disponible sur : <http://mold-help.org/content/view/431/>

**Lo C.T., Nelson E. B., Hayes C. K., Harman G. E.** (1998). Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology* 88 (2): 129-136.

**Lopez-bucioa J., Pelagio-floresa R., Herrera-estrellab A.** (2015).*Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae* 196, 109–123.

**Lorito M.** (1998). Chitinolytic enzymes and their genes. In *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2, eds. G.E. Harman and C.P. Kubicek. Taylor and Francis, London pp. 73-99.

**Lonsane B.K., Ghildyal N.P., Budiartman S., Ramakrishna S.V.** (1985) Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 7 : 258-265.

## M

**Machado C.M.M., Socol C.R.** (2008). Gibberellic acid production. In : Pandey A., Socol C.R., C. Larroche (Eds), Current developments in solid-state fermentation. Asiatech Publishers, INC. SPRINGER, New Delhi, India. Pp. 279-301.

**Machado C.M.M., Socol C.R., Pandey A.** (2002). Gibberellic acid production by solid state fermentation in coffee husk, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102, 179-192.

**Manpreet S., Sawraj S., Sachin D., Pankaj S., Banerjee U. C.** (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 1 (2), 1-9.

**Maréchal P.** (2001). Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de son de blé en extrudeur bivis: obtention d'agromatériaux. PhD thesis, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR 1010 INRA / INP ENSIACET, Université de Toulouse. Pp. 350.

**Mathew R.** (1995). Biologie Campbell, (edn) ISBN Canada.

- Michelina R., Massimo G., Oscar A., Bernard., Jurgen K., Philippe N.** (2011). « Lutte biologique N°2 : tomate » Food Quality and Safety 6TH FRAMEWORK PROGRAMME, p 5
- Migheli Q., Gonzalez-Candelas L., Dealessi L., Camponogara A., Ramonvidal D.** (1998). Transformants of *Trichoderma longibrachiatum* overexpressing the #-1,4- endoglucanas gene egll show enhanced biocontrol of *Pythium ultimum* on cucumber. *Phytopathology* 88: 673-677
- Mitchell D. A., Berovic M. & Krieger N.** (2006). *Solid-State Fermentation Bioreactors - Fundamentals of Design and Operation*.
- Mitchell D. A., de Lima Luz L. F., Krieger N., Berovič M.** (2011). 2.25-Bioreactors for Solid-State Fermentation. in *Comprehensive Biotechnology, Second ed 2*, 347 – 360.
- Mohamed-Benkada M.** (2006). Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles: substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Thèse de doctorat : Sciences pharmaceutiques. France : Université de Nantes .137.
- Mujeebur R.K., Shahana M.K .** (2002). Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato. *Bioresource technology* 85: 213-215.
- Multon J.L.** (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique et Documentation, Paris Apria.p: 576.
- P**
- Panda B.P., Javed S., M. Ali.** (2010). Production of angkak through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 757-764.
- Pandey A.** (2003). "Solid-state fermentation. " *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3) : 81-84.
- Pandya J. J., Gupte A.** (2012). Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35**, 769–779
- Papavizas G.C.** (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol* 23, 23-54
- Pitt J.I., Hocking A.D.** (1997). *Fungi and food spoilage*. Springer US.632p.
- Pivkin M.V.** (2000). Filamentous fungi associated with holoturians from the Sea of Japan, off the Primorye coast of Russia. *Biol. Bull.* 198(1), 101-109.
- Prescott L ., J Harley.**(2003). *Microbiologie*. 2eme édition P: 1164.

**Prieto A., leal J.A., Poeda A., Jiménez-Barbero J., Gomez-Miranda B., Domenech J., Ahrazem O., Berabé.** (1997). Structures of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *hypocrea* species. *Carbohydrate Research*, 304 (3-4) : 281-291.

## R

**Raynal-Ioualalen R.** (1996). Procédé de fractionnement des sons de blé. Extraction et étude des propriétés fonctionnelles des arabinoxyanes. PhD thesis, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR 1010 INRA / INP ENSIACET, Université de Toulouse. Pp. 324.

**Reculeau-arnoud X.** (2003). Production et étude de toxicité des Peptaïbols d'une souche marine de *Trichoderma koningii*. Thèse de docteur en pharmacie. Université de Nantes faculté de pharmacie.p 80.

**Rehner S. A., Samuels G. J.** (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625-634.

**Restino C.** (2012). Production d'acide itaconique par des souches d'*Aspergillus* par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat : Microbiologie Industrielle. Reims : l'Université de Reims Champagne-Ardenne, 1-174p.

**Richter S., Cormican M. G., Pfaller M. A., Lee C. K., Gingrich R., Rinaldi M. G., Sutton D. A.** (1999). Fatal Disseminated *Trichoderma longibrachiatum* Infection in an Adult Bone Marrow Transplant Patient: Species Identification and Review of the Literature. *Journal of clinical microbiology* 37,1154-1160.

**Rifai M.A.M.** (1969) .A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycologia.Papers*, 116 :1-56 .

**Rodriguez-Leon J., Soccol C.R., Pandey A., Rodriguez D.E.** (2008). Factors affecting solid-state fermentation. *In* : Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (Eds), *Current developments in solid-state fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, 26-47.

**Roquebert M.F.** (1996). Intéractions antagonistes des *Trichoderma* sp. Dans les systèmes telluriques : systématique biologie et écologie des organismes. Compte-rendu des 4 èmes rencontres en toxicologie, paris, 13-15.

**Rose A.** (1981). La production des aliments et des boissons. *Pour la Science*. P.120-130.

## S

**Saharan B.S., Nahra V.** (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, Volume 2011: LSMR-21.P.

**Sforza R ., Sheppard A.** (2004) .La lutte biologique : introduction, espèces envahissantes ,une méthode de lutte respectueuse de l'environnement .Le courrier de l'Environnement de l'INRA ,n°19.

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

**Sarhy-Bagnon V., Lozano P., Saucedo-Castaneda., Roussos S.**(2000). Production of 6-pentyl-a-pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochemistry* 36 (2000) 103–109.

**Sekar C., Balaraman K.** (1998). Optimization studies on the production of cyclosporine A by solid state fermentation. *Bioprocess Engineering* 18: 293- 296.

**Semal I.** (1989). Traité de pathologie végétale. Presses Agronomique de Gembloux.sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology* 5 : 41 53.621p.

**Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevéken J., Viseur J.** (1993). Traité de pathologie végétale. Gembloux (Belgique) : les Presses agronomiques de Gembloux.621 p.

**Shanmugam V., Kanoujia N.** (2011). “Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture ‘‘Biological Control’’ Volume 57, Issue 2, Pages 85-93.

**Shivanna G. B., Venkateswaran G**(2014). Phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through submerged and solid-state fermentation. *Sci. World J.*

**Singhania R.R., Patel K., Soccol C.L., Pandey A.**(2009).Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 44:13-18.

**Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L.** (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Basic biology taxonomy and genetics*, 1:139191.

**Sutter S.** (2017). Valorisation du tourteau de colza par fermentation en milieu solide pour une application en alimentation animale. Thèse de doctorat : Plateforme de pré-développement en biotechnologie, Welience. UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques. Université de Bourgogne.1-210p.

## T

**Tabuc C.** (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines.Thèse de Doctorat : pathologie, mycologie, genetique et nutrition .Toulouse : Institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest.190 p.

**Tarus P.K., Lang'at-Thoruwa C.C., Wanyonyi A.W., Chhabra S.C.** (2003). Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*. Chemistry Department, Kenyatta University, P.O. Box 43844, Nairobi, Kenya. Bull. Chem. Soc. Ethiop. 17(2), 185-190.

**Thomas L. C.** (2009). Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. Thèse : Sciences de la Vie et de l'Environnement. L'université de Rennes 1, 225p.

**Thomas L., Larroche C., Pandey A.** (2013). Current developments in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>.

**Tortora J., Funk B.F., Case Ch.I.** (2003). Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN.Canada. 968p.

## U

**Ustok F.I., Tari C., Gogus N.** (2007). Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. J. Biotechnol. 127: 322-334.

## V

**Verbist j.-f.** (2000). Marine fungal substances in: studies in natural products chemistry. Londres : Elsevier Sciences B.V., 24: 979-1092.

**Verma., Brar., Tyagi., Surampalli., Valéro.** (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: Panoply of biological control .volume 40 numéro1 p 118.

**Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalberti EL, Lorito M, Sivasithamparam K.** (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters in Applied Microbiology, 43, 143-148.

**Vining I.c.** (1990). Fonctions of secondary metabolites, Annu.Rev.Microbiol., 44: 395-427.

**Vizcaino J.A., Sanz L., Cardoza R.E., Monte E., Gutierrez S.** (2005). 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 244, 139–148.

## W

**Wang L., Yang S.-T.** (2007). Solid-state fermentation and its applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources.*, 5(4), 465- 489.

**Webster J., Lomas N.** (1964). Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridine Transactions of the British Mycological Society 47: 535-540.

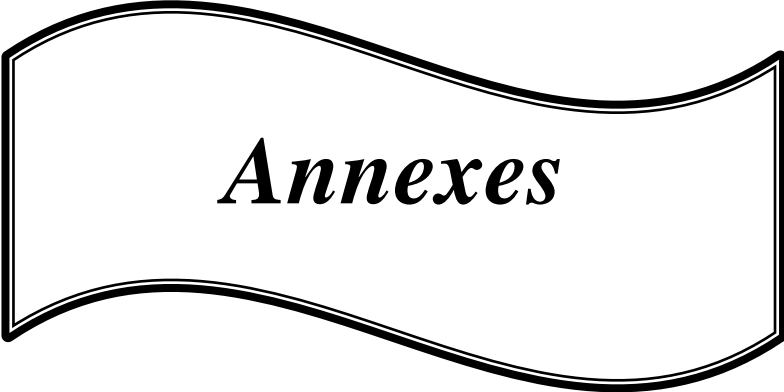
**Y**

**Yedidia J. S., Freeman W. T., Weiss Y.** (2001). Generalized belief propagation. In *Advances in neural information processing systems* pp. 689-695.

**Z**

**Zachow C., Berg C., Müller H., Monk J., Berg G.** (2016). Endemic plants harbour specific *Trichoderma* communities with an exceptional potential for biocontrol of phytopathogens. *J. Biotechnol.* 235, 162-170.

**Zerroug A.** (2011). Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk.). Mémoire de magister : génie microbiologique. UNIVERSITE FERHAT ABBAS –SETIF.89p.



*Annexes*

**Annexe 1 : milieux de culture**1/ milieu Potato Dextrose Agar « PDA » :

Extrait de pomme de terre

Glucose.....20 g

Agar.....20 g

\*Préparation de l'extrait de pomme de terre :

200 g de pommes de terre non pelées et vieilles, sont lavés et coupés en petits dés ensuite, mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1 heure. Ils sont enfin écrasés, filtrés..

\*Préparation du milieu :

L'agar et le glucose sont dissous à chaud dans l'extrait. Compléter à un litre d'eau distillée et stériliser à 110°C pendant 30 minutes (Botton *et al.*, 1990).

2/ milieu Sabouraud dextrose agar (SDA) :

Dextrose.....40g

Peptone.....10g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000 ml

pH 5,6.

La stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

**Annexe 2 : Agent humidifiant**

• Saccharose .....1g

• Sulfate d'ammonium.....0.046g

• Tartrate double Na,K.....0.046g

• Eau distillée.....100ml

\*Préparation de l'agent humidifiant :

Dissoudre 1 g de glucose, 0.046g de sulfate d'ammonium et 0.046 g de tartrate double Na, K Dans un petit volume d'eau distillée, puis compléter jusqu'à 100ml avec l'eau distillée et bien mélanger jusqu'à l'homogénéisation complète.



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

**Filière : Biotechnologie**

**Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique**

**Titre : La production de métabolites secondaires bioactifs par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé.**

**Résumé**

Les déchets agro-industriels, riches en matières organiques, peuvent être recyclés et transformés par les procédés biotechnologiques. Parmi ces derniers, les fermentations en milieu solide (FMS) connaissent un regain d'intérêt à travers le monde, puisque elles permettent une production importante de diverses substances. Le but de ce travail est de produire des métabolites secondaires bioactifs par la souche *Trichoderma longibrachiatum* par culture sur substrat solide. La fermentation est effectuée sur son de blé humidifié à 75% avec une solution de saccharose ou de l'eau distillée. Les cultures sont incubées à 28°C pendant 14 jours avec des prélèvements effectués à intervalles de temps régulier (5, 7, 10 et 14 jours). Les métabolites secondaires recherchés, libérés par cette souche, sont récupérés par l'utilisation de deux solvants organiques : le chloroforme et l'acétate d'éthyle. La détection de ces métabolites, récupérés dans les extraits obtenus, est prévue par chromatographie sur couche mince (CCM). Le test d'antagonisme de ces extraits contre certains champignons phytopathogènes est aussi prévu pour confirmer leur efficacité. Les résultats des études précédentes, prouvent que les métabolites secondaires bioactifs du genre *Trichoderma* présentent une activité antifongique importante.

**Mots clés :** *Trichoderma longibrachiatum*, métabolites secondaires bioactifs, antagonisme, FMS.

**Membre du jury :**

**Président :** Melle ABDELAZIZ Ouided (Maitre de Conférences B- UFM Constantine).

**Rapporteur :** Mme LEGHLIMI Hind (Maître de Conférences A- UFM Constantine).

**Examineur :** Melle BELMESSIKH Aicha (Maître Assistante A-UFM Constantine).

**Présentée par :**

Mouzaoui Sabrina

Bencheikhelhocine Nada

Djellout Sara

**Année universitaire : 2019 -2020**