



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث 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 و الحياة

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 :

Extraction des métabolites secondaires bioactifs de la moisissure
Trichoderma longibrachiatum cultivée sur son de blé.

Préparé par :

Le : 22/09/2021

- BENYERBAH Asma
- ALIGUECHI Amel

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme LABBANI Fatima Zohra Kenza (MCB. Ecole Normale Supérieure Assia Djebar de Constantine).

Rapporteur : Mme LEGHLIMI Hind (MCA-UFM Constantine 1).

Examinatrice : Mme GHORRI Sana (MCB -UFM Constantine 1).

Année universitaire
2020- 2021

Remerciements

Une telle expérience n'est réalisable que par le soutien physique et moral de personnes qu'on tenait à remercier.

Tout d'abord nous remercions **ALLAH** le tout puissant, de nous avoir donné la force, la patience, le courage et la volonté pour réaliser ce travail de recherche.

Nous remercions notre encadrante de mémoire Mme. LEGHLIMI Hind, Maître de Conférences A à l'université Mentouri Constantine 1, qui nous a fait découvrir la fermentation solide même si la production s'est avérée plus difficile que prévue. Nous lui adressons toute notre reconnaissance pour ses précieux conseils et ses connaissances scientifiques, sa patience, son énergie, ses orientations et sa disponibilité malgré ses multiples occupations.

Nous remercions sincèrement Mme BOUTAGHANE Naima, Maître de Conférences A à l'université Mentouri Constantine 1, pour son aide précieuse concernant la CCM, sa gentillesse, sa sympathie et ses encouragements.

Nous remercions Mme LABBANI Fatima Zohra Kenza, Maître de Conférences B à l'Ecole Normale Supérieure Assia Djébar de Constantine, pour avoir accepté de présider le jury.

Nous adressons nos remerciements également à Mme. GHORRI Sana, Maître de Conférence B à l'université Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

On voudrait remercier également Dr. BOUDARSA Nabil pour ses conseils très judicieux concernant les méthodes de recherche et l'utilisation des appareils de Soxhlet, rotavapor et d'autres matériaux et de nous avoir ainsi permis de travailler dans des conditions idéales. Il est en effet rassurant d'avoir des conseils avisés quand on connaît le prix de ce type de matériel !

Nos remerciements s'adressent à tous les membres des Laboratoire de Zoologie, de Microbiologie et de Biochimie.

On remercie toutes les personnes qui, à leur manière, ont contribué à ce travail. Merci à Mr. BOULAHROUF Khaled, Maître de Conférences B- UFM Constantine 1, pour sa gentillesse et pour avoir partagé ses connaissances scientifiques avec nous, spécifiquement celles concernant les méthodes d'extraction.

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans remercier nos familles, nos parents, qui nous ont soutenu et encouragé au cours de ces années d'études. On vous suit infiniment reconnaissantes de l'éducation et des valeurs que vous nous avez transmises.

On aimerait exprimer nos sincères remerciements à A.BOU qui nous a aidé concernant la révision de ce mémoire.

Une pensée à ma grand-mère qui aurait voulu voir l'aboutissement de toutes ces années.

Amel & Asma

Résumé

La production de nouvelles molécules antimicrobiennes par des procédés fermentaires économiques, nécessite une attention particulière pour faire face la résistance des microorganismes pathogènes. Notre étude a pour objectif, l'extraction des métabolites secondaires de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*, puis tester leurs effet sur certaines bactéries testes et exploiter le potentiel antagoniste de cette souche contre certains champignons pathogènes du citronnier, par une confrontation à distance et une confrontation directe. La fermentation est effectuée sur son de blé humidifié à 70% avec une solution de glucose et de sels minéraux. Après inoculation et incubation à 30°C, avec des prélèvements effectués à intervalles de temps régulier. Les métabolites secondaires sont extraits selon une technique solide liquide en utilisant l'appareil de Soxhlet, suivi d'une évaporation par rotavapor. La séparation des métabolites contenus dans les extraits est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM). Les résultats montrent que le meilleur rendement (6,2%) est obtenu dans l'extrait butanolique de 7jours. La séparation des métabolites par CCM confirme la richesse des extraits en quantités importantes de molécules. Cependant, l'étude des activités biologiques des spots de la CCM, confirme leur pouvoir antibactérien contre *Bacillus subtilis*, et une forte activité antifongique de *T.longibrachiatum*, dans la confrontation directe contre les isolats pathogènes du citronnier (inhibition à 100%). Par contre, la confrontation à distance est variable, une faible inhibition (3.5%) contre *Penicillium roquefortii*, et une très bonne inhibition (81.48%) contre *Aspergillus fumigatus*. A la lumière de ces résultats, la moisissure *T.longibrachiatum* semble intéressante pour la production de métabolites secondaires et constitue un agent potentiel de lutte biologique, qui nécessite d'éventuelle application industrielle.

Mots clés : Métabolites secondaires bioactifs, *Trichoderma longibrachiatum*, son de blé, Soxhlet, CCM, FMS, antagonisme.

Abstract

The production of new antimicrobial molecules by economic fermentation processes, requires special attention to deal with the resistance of pathogenic microorganisms. The objective of this study is to extract the secondary metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* and then test their effect on certain test bacteria and exploit the antagonistic potential of this strain against various fungi pathogenic lemon trees, through a distance confrontation and a direct confrontation. Fermentation is carried out on 70% moistened wheat bran with a solution of glucose and mineral salts. After inoculation and incubation at 30°C, with samples taken at regular intervals. Secondary metabolites are extracted using a liquid solid technique by the Soxhlet apparatus, followed by evaporation by rotavapor. The separation of the metabolites contained in the extracts is carried out by thin-layer chromatography (CCM) using two different eluent systems. The results show that the best yield (6,2%) is obtained in 7 days butanolic extract. The separation of metabolites by CCM confirms the richness of extracts in significant amounts of molecules. However, the study of the biological activities of the spots of the CCM, confirms their antibacterial power against *Bacillus subtilis*, and strong antifungal activity of *T.longibrachiatum*, in direct confrontation with the pathogenic isolates of lemon (inhibition at 100%), in contrast, distance confrontaion is variable, a low inhibition (3,5%) against *Penicillium roquefortii*, and a very good inhibition (81,48%) against *Aspergillus fumigatus* . In the light of these results, *T.longibrachiatum* appears to be of interest for the production of secondary metabolites and is a potential biological control agent, which requires potential industrial application.

Keywords: Bioactive secondary metabolites, *Trichoderma longibrachiatum*, Wheat bran, soxhlet, CCM, FMS, antagonism.

ملخص

يتطلب إنتاج جزيئات جديدة مضادة للميكروبات عن طريق عمليات التخمير الاقتصادي اهتماما خاصا للتعامل مع مقاومة الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض. الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص المركبات الأيضية الثانوية للفطر *Trichoderma longibrachiatum* ثم اختبار تأثيرها على انواع بكتيريا معينة واستغلال الإمكانيات العدائية لهذا الفطر ضد مختلف الفطريات المسببة للأمراض على أشجار الليمون، من خلال مواجهة عن بعد ومواجهة مباشرة. تتم عملية التخمير على وسط من نخالة القمح مبللة بنسبة 70% بمحلول من الجلوكوز والأملاح المعدنية. بعد التلقيح والاحتضان في 30 درجة مئوية، مع أخذ العينات على فترات منتظمة. يتم استخراج المركبات الأيضية الثانوية باستخدام تقنية صلبة-سائلة باستخدام جهاز التبخير، ثم تبخر باستخدام جهاز التبخير. كما تدل النتائج على أن أفضل مردود يتم الحصول عليه عن طريق الاستخراج هو المستخلص البوتانولي لمدة 7 أيام بمعدل 6,2%. ومع ذلك، فإن دراسة الأنشطة البيولوجية للبقع التي تحتويها الكروماتوغرافيا ذات الطبقات الرقيقة تؤكد قوة الفطر *T.longibrachiatum* ضد البكتيريا من نوع *Bacillus subtilis* و كذلك نشاطها القوي ضد الفطريات السامة لأشجار الليمون , في حالة المواجهة المباشرة (تثبيط كلي 100%) اما في حالة المواجهة عن بعد فالتثبيط معتبر (3,5%) ضد *Penicillium roqueforti* و تثبيط جيد (81,48%) ضد *Aspergillus fumigatus* و على ضوء هذه النتائج ، يظهر أن الفطر من نوع *T.longibrachiatum* مهم لإنتاج المركبات الأيضية الثانوية وهو عامل محتمل للتحكم البيولوجي، مما يتطلب إمكانية التطبيق الصناعي.

الكلمات المفتاحية: المركبات الأيضية الثانوية , الفطر *Trichoderma longibrachiatum*, نخالة القمح ,جهاز التبخير , الكروماتوغرافيا ذات الطبقات الرقيقة ,التخمير على الاوساط الصلبة , عدائي .

Liste des abréviations

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

PDA : Potato Dextrose Agar

6PP : 6-pentyl- α pyrone

IC% : Inhibition coefficient

R% : Rendement

Rf : Rapport frontal

KD : Kilo Dalton

ACB : Agents de contrôle biologique

T : *Trichoderma*

A : *Aspergillus*

P : *Penicillium*

F : *Fusarium*

C : *Cladosporium*

B : *Bacillus*

S : *Staphylococcus*

FMS : Fermentation en milieu solide

FML : fermentation en milieu liquide

HR : humidité relative

MS : Matière sèche

Liste des figures

Figure 01 : Acides hydroxycinnamiques (C6-C3).....	7
Figure 02 : Acides hydroxy benzoïques (C6-C1).....	8
Figure 03 : Noyau flavone.	8
Figure 04 : Structure des coumarines.	8
Figure 05 : Structure des tanins.....	9
Figure 06 : Structure de base des anthocyanidines.....	10
Figure 07 : Molécule isoprène.....	10
Figure 08 : La salicyline (exemple des hétérosides).....	11
Figure 09 : Squelettes des génines stéroïdiques des saponosides.	11
Figure 10 : Structure des quelques alcaloïdes.	12
Figure 11 : Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	14
Figure 12 : Schéma des principales étapes du cycle de vie des <i>Trichoderma</i> en fonction de l'aspect morphologique de son développement sur substrat solide dans des conditions optimales.	16
Figure 13 : Préparation de la suspension sporale ; A : Mycélium gratté, B : Suspension sporale obtenue.....	36
Figure 14 : Dénombrement des spores. A : Série de dilution (SM, 1/10 et 1/100) ; B : Comptage sur la cellule Thoma.....	37
Figure 15 : Préparation des erlens pour la fermentation en milieu solide.	38
Figure 16 : Schéma de l'extracteur Soxhlet	39
Figure 17 : description d'un évaporateur rotatif	40
Figure 18 : Etapes d'extraction des métabolites secondaires par Soxhlet (C) et par rotavapor (D).....	41
Figure 19 : Spots (S1, S2 et S3) de la plaque CCM des extraits de 8 jours. La plaque CCM après révélation chimique (a) ; la plaque CCM avec les spots grattés (b).....	44
Figure 20 : Confrontation à distance entre l'antagoniste <i>Trichoderma longibrachiatum</i> et l'isolat pathogène	45
Figure 21 : Confrontation directe de l'antagoniste <i>Trichoderma longibrachiatum</i> et l'isolat pathogène par contact directe sur milieu PDA	45
Figure 22 : Aspect macroscopique de la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> sur milieu PDA âgée de 7jours.	48

Figure 23 : Développement de la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> sur le son de blé après différentes durée d'incubation.	49
Figure 24 : les extraits obtenus par extraction de métabolites secondaires de la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	49
Figure 25 : Le rendement (R%) des extraits bruts.....	50
Figure 26 : Chromatographie sur couche mince ; 1 : Dépôt des extraits sur la plaque CCM ; 2 : Migration des molécules sur la plaque CCM, dans les deux systèmes solvants utilisé.	51
Figure 27 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des substances actives produites par <i>T. longibrachiatum</i> . Après 7, 8 et 10 jours. 1 : Plaque chromatographique observé par lumière visible ; 2 : Plaque chromatographique observé sous la lampe UV à 254 nm ; 3 : Plaque chromatographique révélée par un révélateur chimique	52
Figure 28 : : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des substances actives produites par <i>T. longibrachiatum</i> , après 7,8 et 10jours.1 : Plaque chromatographique observé par lumière visible ; 2 : Plaque chromatographique observé sous la lumière UV à 254 nm ; 3 : Plaque chromatographique révélée par un révélateur chimique.	52
Figure 29 : Pourcentages d'inhibition des isolats fongiques par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , selon la confrontation à distance.....	62

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différentes classes des composés phénoliques	7
Tableau 02 : Certains métabolites volatiles et non volatiles secrétés par <i>Trichoderma</i>	17
Tableau 03 : Exemple de microorganismes utilisés en FMS et leurs applications.....	24
Tableau 04 : Différentes caractéristiques de la FMS et de la FML	32
Tableau 05 : Les différents systèmes éluant utilisés pour la CCM.....	42
Tableau 06 : Rapports frontaux des spots obtenus pour chaque extrait brut.....	54
Tableau 07 : Activité antibactérienne des extraits fongique selon la technique de grattage des spots, après 24 heures d'incubation à 30°C.....	56
Tableau 08 : Activité antibactérienne des extraits fongique selon la technique de grattage des spots, contre <i>Bacillus subtilis</i> , après 48 heures d'incubation à 30°C.....	57
Tableau 09 : Activité antifongique de la souche antagoniste <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (boite en haut), à l'égard des isolats pathogènes (boite en bas), selon la confrontation à distance.....	59
Tableau 10 :Activité antifongique de la souche antagoniste <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , à l'égard des isolats pathogènes, selon la confrontation directe (DT : disque <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , DIF : disque de l'isolat fongique).....	63
Tableau 11 : Examen microscopique de la confrontation directe.....	65

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale	1
Partie1 : Revue bibliographique	4
Chapitre 1 : Les métabolites d'origine fongique	5
1. Les métabolites d'origine fongique	6
1.1. Les métabolites primaires.....	6
1.2. Les métabolites secondaires	6
2. Classification des métabolites secondaires	6
2.1. Les composés phénoliques	6
2.1.1. Les acides phénoliques	7
2.1.2. Les flavonoïdes.....	8
2.1.3. Les coumarines	8
2.1.4. Les tanins	9
2.1.5. Les anthocyanes.....	9
2.1.6. Les lignanes.....	10
2.2. Les terpénoïdes	10
2.3. Les hétérosides	10
2.4. Les saponosides	11
2.5. Les alcaloïdes	12
3. Importances des métabolites secondaires fongiques	12
4. Principaux groupes fongiques producteurs de métabolites secondaires	13
5. Le genre <i>Trichoderma</i>	13
5.1. Morphologie	14
5.2. Croissance et cycle de vie	15
5.3. Métabolites secondaires de <i>Trichoderma</i>	16
5.4. La souche <i>Trichoderma longibrahiautum</i>	18
6. Utilisation du genre <i>Trichoderma</i> dans la lutte biologique.....	19

6.1.	La lutte biologique	19
6.2.	Quelques espèces utilisées dans la lutte biologique	19
6.2.1.	<i>Trichoderma viride</i>	20
6.2.2.	<i>Trichoderma harzianum</i>	20
6.3.	Mode d'action de <i>Trichoderma</i>	20
6.3.1.	Antibiose	20
6.3.2.	Compétition.....	21
6.3.3.	Mycoparasitisme.....	21
Chapitre 2 : La fermentation en milieu solide		22
1.	Définition de la fermentation solide (FMS)	23
2.	Les organismes utilisés en fermentation solide (FMS).....	23
3.	Facteurs influençant la fermentation en milieu solide	25
3.1.	Le type d'inoculum	25
3.2.	L'humidité	25
3.3.	La température.....	26
3.4.	Le pH.....	27
3.5.	L'oxygène et le dioxyde de carbone	27
3.6.	Les facteurs nutritionnels	27
3.6.1.	La taille des particules	28
3.6.2.	Les substrats	28
3.6.2.1.	Le son de blé	28
4.	Applications de la fermentation solide (FMS)	30
4.1.	La production d'enzymes	30
4.2.	La production de métabolites secondaires	30
4.3.	La biorémediation.....	31
5.	Comparaison des fermentations liquides et solides	31
Partie 2 : Partie expérimentale		34
1.	Matériel biologique.....	35
1.1.	Origine et entretien de la souche	35
1.2.	Réactivation et sporulation de la souche	35
1.3.	Préparation de l'inoculum	35
1.3.1.	Préparation de la suspension de spores	35
1.3.2.	Dénombrement des spores	36

1.3.3.	Conservation de la souche.....	37
2.	Production des métabolites secondaires par la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	37
2.1.	Milieu de production.....	37
2.2.	Préparation de la fermentation en milieu solide	37
2.3.	Inoculation des erlens de culture	38
3.	Extraction et mesures effectuées après fermentation.....	38
3.1.	L'extracteur Soxhlet.....	38
3.1.1.	Principe	38
3.1.2.	Mode opératoire.....	39
3.2.	Le rotavapor	39
3.2.1.	Principe	40
3.2.2.	Mode opératoire.....	40
3.3.	Détermination du rendement	41
3.4.	Chromatographie sur couche mince	41
3.4.1.	Protocole expérimentale	42
3.4.2.	Détermination du rapport frontal R _f	43
4.	Etude de l'activité biologique.....	43
4.1.	Activité antibactérienne	43
4.2.	Activité antifongique	44
4.2.1.	Confrontation à distance	44
4.2.2.	Confrontation directe	45
4.2.3.	Mesure de l'inhibition de la croissance mycélienne.....	46
4.2.4.	Examen microscopique de la confrontation directe.....	46
	Résultats et discussion	47
5.	Résultats et discussion	48
5.1.	Réactivation de la souche fongique	48
5.2.	Fermentation et extraction des métabolites secondaires	48
5.3.	Extraction des substances actives de <i>T.longibrachiatum</i>	49
5.4.	Détermination de rendement	50
5.5.	Séparation des métabolites secondaires par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	51
5.5.1.	Détermination des rapport frontaux R _f	53
5.6.	Etude de l'activité biologique.....	55
5.6.1.	Activité antibactérienne	55

5.6.2. Activité antifongique	58
5.6.2.1. Confrontation à distance	58
5.6.2.2. Confrontation directe.....	62
5.7. Examen microscopique de la confrontation directe.....	65
Conclusion et perspectives	70
Références bibliographiques	72
Annexes	

Introduction générale

Aujourd'hui, l'une des plus graves menaces affectant la santé mondiale est la résistance des bactéries aux antibiotiques. De jour en jour, de nouveaux processus de résistance voient le jour et s'étendent de par le monde, ce qui affaiblit la capacité de traiter les maladies infectieuses les plus courantes (Azoun, 2016). Également, au vu de la diffusion de ce phénomène et du nombre limité d'antibiotiques actuellement en cours de progression, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être inventif et contourner les processus de résistance bactérienne, les antibiotiques à venir devront cibler de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries.

Cependant, l'alternative à long terme pour affronter les résistances microbiennes est d'innover et de chercher de nouvelles molécules antimicrobiennes, que ce soit par : l'extraction de nouveaux sous-produits chez des mutants de souches répertoriées, la réalisation de nouvelles molécules semi-synthétiques à partir de structure déjà connue, la synthèse de nouveaux sous-produits ou l'obtention de nouvelles substances produites par de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques (Kitouni, 2007).

Les champignons représentent une vaste et large source de substance bioactives avec des propriétés boostant l'humanité qui en font des compléments naturels très rigoureux dans les traitements. De ce fait, les activités de diverses espèces de champignons méritent d'être étudiées en faveur d'établir d'autres substances fongiques plus puissantes qui peuvent être des thérapies fiables pour les humains (Hu *et al.*, 2002).

En effet, les moisissures sont extrêmement répandues, elles contaminent divers denrées alimentaires, ce qui leur confère un intérêt économique et environnemental (Martins *et al.*, 2011). Certaines d'entre elles, sont connues par leur grande capacité à produire des métabolites secondaires à haute valeur ajoutée, comme les genres *Trichoderma*, *Aspergillus*, et *Penicillium*. Ces métabolites peuvent présenter des activités biologiques multiples : anticancéreuses, antibactériennes, antiradicalaires, antioxydantes et antifongiques (Carboué *et al.*, 2017 ; Quiroz *et al.*, 2015).

Par ailleurs, ces microorganismes sont aussi appelées « Bio » étant donné que leurs actions sont basées sur des molécules actives issues d'organismes vivants, de champignons de bactéries ou d'insectes. Leurs métabolites influent sur la compétition naturelle entre les espèces. Ils constituent donc un moyen de lutte biologique. Selon ces produits, utilisés de manière intensive, il serait possible de contrôler un ravageur. Même si l'objectif visé n'est pas de détruire

complètement la cible, mais de la stabiliser à un niveau économiquement acceptable par le producteur, l'utilisation de ces organismes permettrait de limiter les intrants chimiques et donc de préserver la santé de l'homme et de l'environnement tout en autorisant des bénéfices économiques pour les sociétés productrices (Quiroz *et al.*, 2015).

Les champignons filamenteux du genre *Trichoderma* sont considérés aujourd'hui comme des agents actifs de lutte biologique à l'égard de plusieurs organismes nuisibles. En raison de leur divers mécanismes d'action, ils représentent un exemplaire à étudier. Parmi ceux, le mycoparasitisme qui résulte d'un enroulement de la souche autour du pathogène. La destruction peut se faire par la suite soit par étranglement soit par pénétration en lui injectant des enzymes qui le détruit. Un deuxième mécanisme, l'antibiose qui repose sur la production de métabolites secondaires agissant par effet inhibiteur voir létal sur l'agent pathogène (Junaid *et al.*, 2013; Zachow *et al.*, 2016).

Les procédés de culture des champignons filamenteux basés sur l'utilisation de supports solides, ont prouvé d'excellents rendements pour la production des conidies et des métabolites fongiques (Thomas *et al.*, 2013 ; Mascarin et Jaronski., 2016). Depuis le XXème siècle, les scientifiques cherchent à s'orienter vers de nouvelles techniques de fermentation solide afin de produire de nouveaux métabolites. Parallèlement à ceci, l'objectif des recherches est aussi de valoriser les co-produits agricoles qui peuvent servir de substrat dans les fermentations solides. D'autre part, ce procédé assure une meilleure production des produits à haute valeur ajoutée comme les antibiotiques, les pigments, les arômes et les enzymes d'intérêt industriel tel que les cellulases, les lipases, les amylases, etc. (Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000 ; Pandey, 2003 ; Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2013). Le blé est la céréale la plus cultivée à travers le monde. Ceci entraîne une quantité importante de co-produits pour l'industrie qui peuvent, cependant, être valorisés par voie fermentaire.

Dans ce cadre, s'inscrit notre travail, qui se base sur plusieurs points pour répondre à l'objectif en l'occurrence. Dans une première partie une analyse bibliographique portant sur les différents types de métabolites d'origine fongiques, ainsi que leurs caractéristiques et potentialités biotechnologiques de la FMS et les champignons du genre *Trichoderma sp.*

À la deuxième partie un travail expérimental, réalisé au sein des laboratoires de Zoologie et de Biochimie (Faculté SNV. Université des frères Mentouri Constantine 1). La première étape porte sur la réactivation et la production de métabolites secondaires bioactifs par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé, selon le mode de la fermentation sur

Introduction générale

substrat solide. La deuxième étape consiste à l'extraction des métabolites secondaires par deux solvants organiques dissemblables.

Ensuite, la séparation des métabolites secondaires récupérés dans les extraits de fermentation, par la chromatographie sur couche mince (CCM).

Partie1 : Revue bibliographique

*Chapitre 1 : Les métabolites
d'origine fongique*

1. Les métabolites d'origine fongique

1.1. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires sont des composés associés ou liés à la synthèse des cellules microbiennes, donc de type associé à la croissance. Ils sont synthétisés pendant la phase exponentielle (trophophase). Les voies de biosynthèse sont, en général, simples. Parmi ces métabolites on trouve : les acides aminés, les acides organiques, les enzymes, l'alcool, les vitamines, les polysaccharides, les solvants, les carburants, les lipides (Leghlimi, 2020).

1.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules non essentielles au métabolisme basique des champignons. Ces composés sont synthétisés dans des conditions particulières, et s'accumulent pendant la phase suivant la phase exponentielle de croissance ou en idiophase (phase de ralentissement ou en phase stationnaire). Ces produits n'ont pas de relation directe avec la synthèse des matières cellulaires et la croissance normale, ils sont donc, de type non associé à la croissance. On trouve dans ce groupe : les antibiotiques, les toxines, les vaccins, les insecticides, les arômes, les colorants (Leghlimi, 2020).

2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont classés selon leur structure chimique en quatre groupes majeurs :

- 1) Les composés phénoliques ou aromatiques.
- 2) Les terpénoïdes.
- 3) Les hétérosides.
- 4) Les alcaloïdes.

2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une grande classe de substances organiques cycliques très variées (**Tableau01**) d'origine secondaire qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent aussi sous forme de polymères naturels (tanins) (Walton et Brown, 1999).

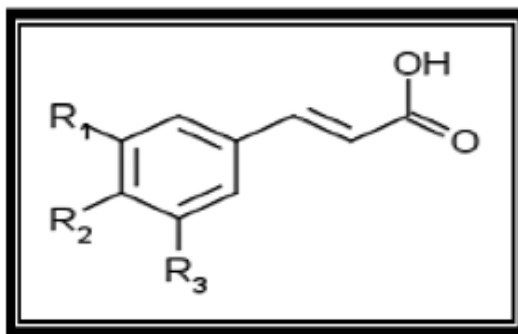
Le groupe le plus vaste et le plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes (Walton et Brown, 1999).

Tableau 01 : Les différentes classes des composés phénoliques (Daayf et Lattanzid, 2008)

Squelette carbonée	Classes de composés phénoliques
C6	Phénols simples et benzoquinones
C6-C1	Acides phénoliques
C6-C2	Acétophénonnes et les acides phenylacétiques
C6-C3	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes, chromons
C6-C4	Naphthoquinones
C6-C1-C6	Xanthonnes
C6-C2-C6	Stilbènes et anthraquinones
C6-C3-C6	Flavonoïdes et isoflavonoïdes
(C6-C1) ₂	Tannins hydrolysables
(C6-C3) ₂	Lignanes et néolignanes
(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoïdes
(C6-C3) n	Lignines
(C6) n	Catéchols
(C6-C3-C6) n	Tannins condensés

2.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxycinnamiques (C6-C3) (**Figure 01**) et les acides hydroxy benzoïques (C6-C1) (**Figure 02**) (Arimboor *et al.*, 2008).

**Figure 01** : Acides hydroxycinnamiques (C6-C3)(Bramki et Neki, 2016).

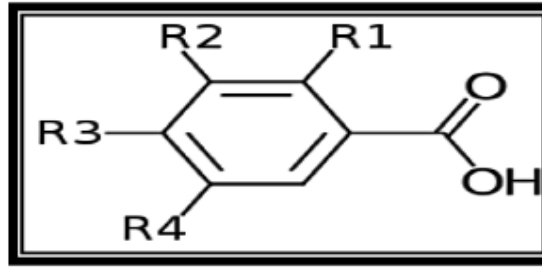


Figure 02 : Acides hydroxy benzoïques (C6-C1) (Bramki et Nekia, 2016).

2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes à structure polyphénolique. Ils sont synthétisés par la voie polypropanoïde et le composant de démarrage est la molécule de phénylalanine. Les effets biologiques de ces composés varient. Tous les flavonoïdes partagent le squelette de base C6-C3-C6 (**Figure 03**), composé de deux cycles aromatiques C6 et d'un cycle hétérocyclique contenant un atome d'oxygène (Ghasemzede et Ghasemzadeh, 2011).

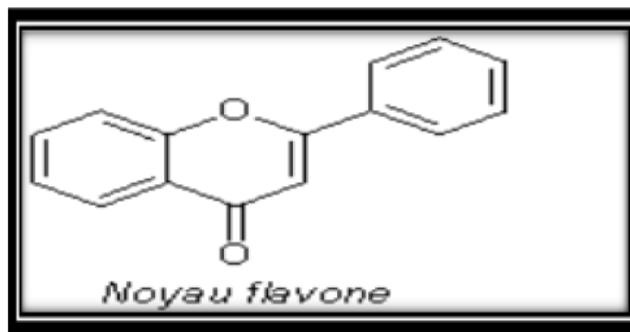


Figure 03 : Noyau flavone (Bramki et Nekia, 2016).

2.1.3. Les coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques végétaux, portant un noyau benzopyrone (**Figure 04**) dans leur structure (Alignan, 2006).

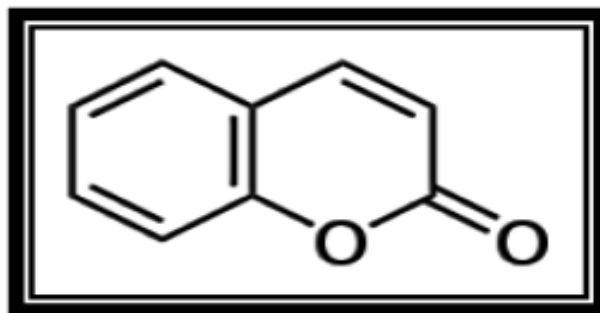


Figure 04: Structure des coumarines (Bramki et Nekia, 2016).

2.1.4. Les tanins

Ils sont définis comme étant des composés poly-phénoliques, hydrosolubles de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 KD (polymères) ayant la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de la rendre imputrescible (l'empêche de pourrir), propriété liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines), à précipiter les alcaloïdes et la gélatine (Harrar, 2012).

Selon la structure (**Figure 05**) on distingue deux groupes différents de tanins ; les tanins hydrolysables et les tanins condensés, dits aussi : proanthocyanidines (Boudjouref, 2011).

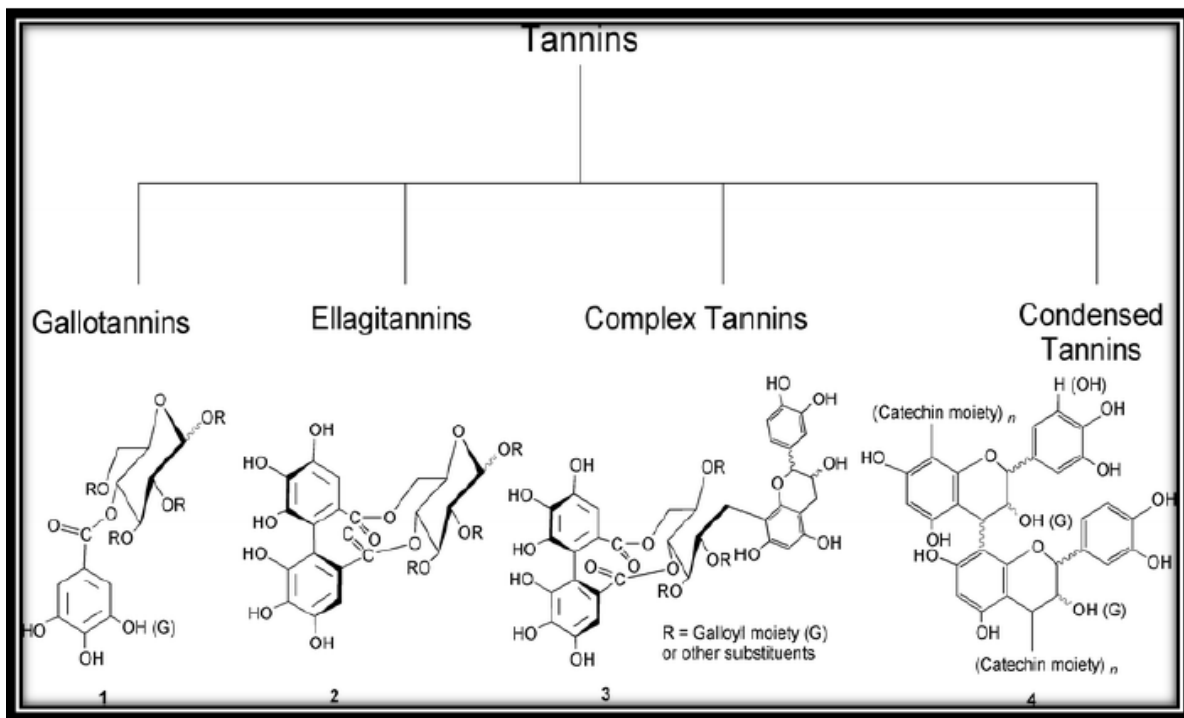


Figure 05 : Structure des tanins (Bramki et Nekia, 2016)

2.1.5. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (**Figure 06**) (flavonoïdes proches des flavones), qui donnent aux fleurs et aux fruits leur teinte bleue, rouge ou pourpre.

Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres. Ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux (Messioughi, 2010).

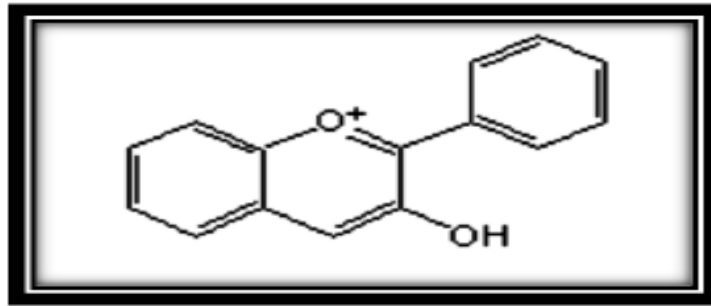


Figure 06 : Structure de base des anthocyanidines (Bramki et Nekia, 2016).

2.1.6. Les lignanes

Les lignanes désignent des molécules qui résultent, le plus souvent de l'établissement d'une liaison entre deux carbones de la chaîne latérale de deux acides hydroxycinnamiques. Ils interviennent dans les mécanismes de défense de la plante (Yang *et al.*, 2006).

2.2. Les terpénoïdes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structures soit cyclique soit chaîne ouverte : leurs formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont x : est variable en fonction de degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les poly terpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc), la molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (**figure 07**)(Bezzaz, 2014).

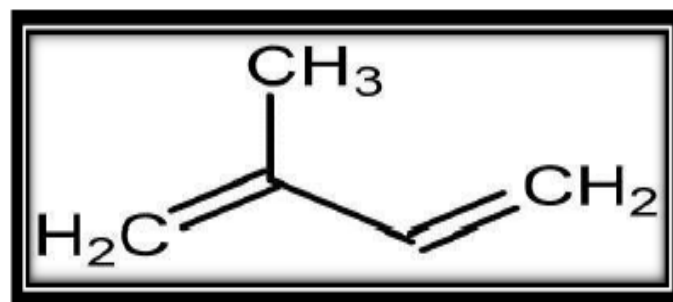


Figure 07 : Molécule isoprène (Bramki et Nekia, 2016).

2.3. Les hétérosides

Les hétérosides ou glycosides sont des molécules formées par combinaison d'oses et de substances non glucidiques appelées aglycones ou génines (**Figure 08**). Ces métabolites secondaires sont les plus anciennement connus. Ils forment des substances de réserve localisées dans les vacuoles cellulaires. Les hétérosides se différencient entre eux par leurs génines qui appartiennent à tous les groupes de métabolisme secondaire (flavonoïde, saponosides, et tanins)

et par le mode de liaison entre le génine et l'ose ainsi que par la nature de la partie glucidique. Ils sont classés selon la nature de la liaison en C-, N-, O-, S- hétérosides (Aref, 2015).

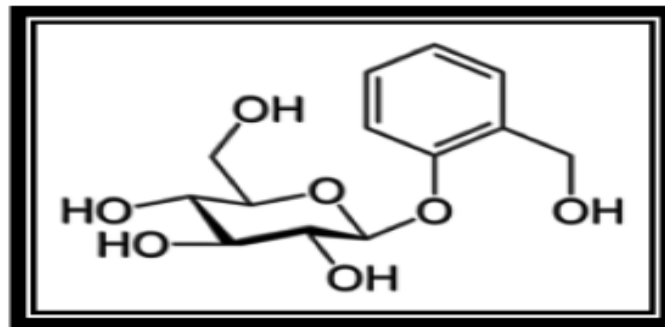


Figure 08 : La salicyline (exemple des hétérosides)(Bramki et Nekia, 2016).

2.4. Les saponosides

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques (**Figure09**) fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs, en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés aussi par certains animaux marins tels que les concombres de mer ou les étoiles de mer.

Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques, notamment des propriétés immunes modulatrices, immunoadjuvante, cytotoxique, anti tumorale et hypocholestérolémiant (Kissoum et Khalfaoui, 2015).

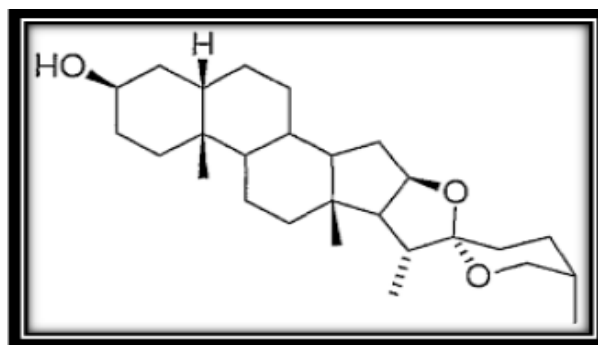


Figure 09 : Squelettes des génines stéroïdiques des saponosides (Bramki et Nekia, 2016).

2.5. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques naturelles composés de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote (**Figure10**). Typiquement comme les amines primaires, secondaires, ou tertiaires et cela confère la basicité à l'alcaloïde, ces molécules sont très intéressantes au point de vue biologique car certaines sont le principe actif de plusieurs extraits de plantes anciennement utilisés comme médicaments. Ils existent rarement à l'état libre, mais le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques ou à des tanins (Aref, 2015).

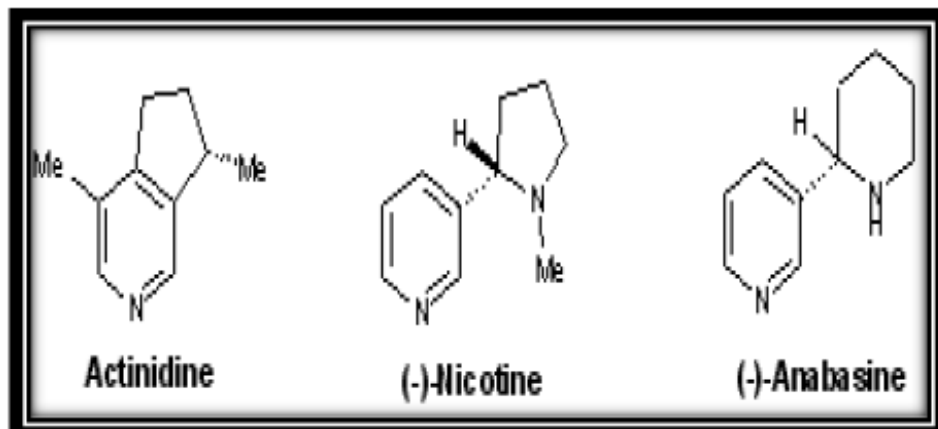


Figure 10 : Structure des quelques alcaloïdes (Bramki et Nekia, 2016).

3. Importances des métabolites secondaires fongiques

Les métabolites secondaires fongiques occupent une grande variété des molécules, qui jouent un rôle très important en raison de leurs activités biologiques. Ces molécules complexes peuvent être des composés à activités biologiques, entre autres : antibactériens, anti-tumoraux, antifongiques, antiviraux, inhibiteurs d'enzymes (Zain *et al.*, 2014). Ces activités donnent des intérêts et ouvrent à ces molécules d'intéressantes applications, également pour l'agriculture dans le but de contrôler les maladies des plantes. (Mathivanan *et al.*, 2008).

Les métabolites secondaires affectent surtout les agents phytopathogènes comme les champignons, les bactéries et même les virus à cause de leur activité antagonistes (Devi *et al.*, 2020). Ils servent aux espèces fongiques eux-mêmes de plusieurs fonctions, par exemple ils jouent un rôle d'armes de compétition utilisés contre d'autres champignons, bactéries, amibes et plantes; mais aussi comme des agents de transport de métaux, agents de symbiose entre les microorganismes et les plantes, les nématodes, les insectes et les animaux supérieurs; comme des hormones sexuelles; et médiateur pour la communication et plusieurs autres fonctions (Zain *et al.*, 2014).

4. Principaux groupes fongiques producteurs de métabolites secondaires

D'après les évaluations il y a environ 1.5 millions espèce fongique, dont environ 150 000 espèces ont été décrites (Agrios, 2005). Ces espèces ont une grande importance, pas seulement en ce qui concerne la santé et l'industrie mais aussi du point de vue économique et agricole grâce à leurs activités et propriétés métaboliques (Awad, 2005).

En effet, environ 33 500 métabolites microbiens bioactifs ont été décrits, sur ces métabolites presque 47% (15 600) sont d'origine fongique. Le taux de découverte de nouveaux métabolites fongiques a considérablement augmenté au cours des deux dernières décennies. Ces métabolites secondaires sont complexes, riches et très développés chez les champignons filamenteux (Bills et Gloer, 2017).

Les principaux genres producteurs de métabolites secondaires sont (Kumar *et al.*, 2018) :

- *Penicillium*
- *Aspergillus*
- *Fusarium*
- *Trichoderma*

5. Le genre *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* fait partie des Ascomycètes et appartient à la famille des Hypocreaceae. Aujourd'hui, les *Trichoderma* sont considérés comme des antagonistes microbiens puissants, et des agents de contrôle biologique (ACB) de choix pour l'exploitation industrielle, en les utilisant comme des antagonistes vis-à-vis d'autres champignons phytopathogènes grâce à leur développement rapide et à la production de substances bioactives (Sharon *et al.*, 2011).

Son activité antagoniste s'exerce indirectement, par compétition pour les nutriments, et par antibiose avec la libération des molécules antifongiques (Vinale *et al.*, 2014), ou directement par mycoparasitisme (Howell, 2003).

Ces mécanismes, indirects et directs dépendent de la souche de *Trichoderma*, le champignon phytopathogène ciblé, de la culture envisagée et des conditions environnementales. L'activation de chaque mécanisme implique la production de composés et métabolites spécifiques, comme des facteurs stimulateurs de croissance des plantes (Lorito, 1998).

Selon BISSETT (2004); la position taxonomique du genre *Trichoderma* se présente comme suit :

Embranchement : Amastigomycota et/ou Eumycètes

Sous embranchement : Ascomycotina

Classe : Sordariomycètes

Ordre : Hypocréales

Famille : Hypocraceae

Genre : *Trichoderma*

5.1.Morphologie

Le genre *Trichoderma* est caractérisé par une vitesse de croissance rapide et extensive avec une sporulation abondante sur la surface du milieu de culture.

L'aspect macroscopique des *Trichoderma sp* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées. 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, les conidies donnent 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. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour un feutrage épais se superpose à la culture (Benkada, 2006).

Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (**Figure 11**) 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 (Benkada, 2006).

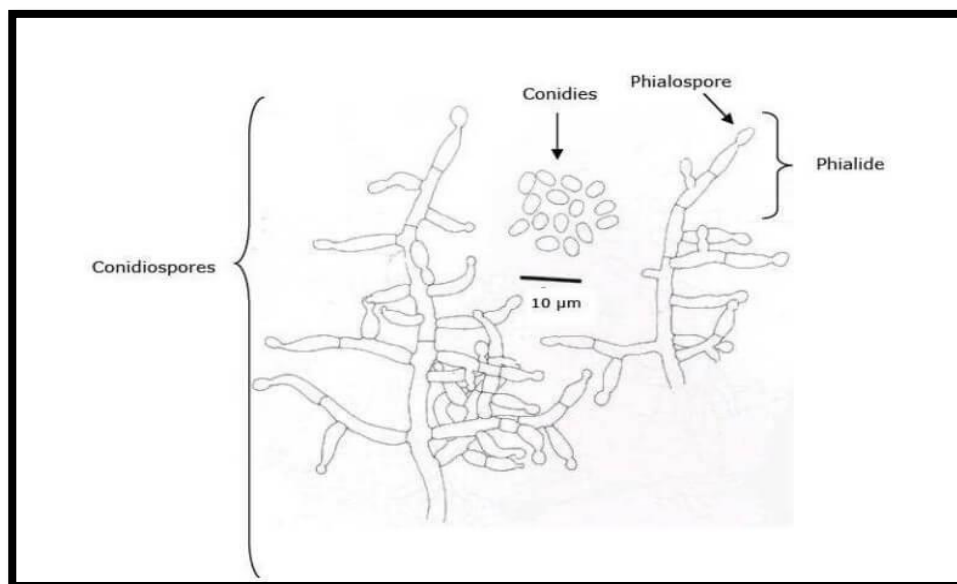


Figure 11 : Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma longibrachiatum*

(Samuels *et al.*, 1994)

5.2. Croissance et cycle de vie

La majorité des espèces de *Trichoderma sp* croît rapidement à des températures comprises entre 25°C et 30°C, certaines espèces poussent bien à 35°C, Cela a servi comme un critère important pour la différenciation entre les espèces morphologiquement identiques. Ils sont capables de croître dans une large gamme de pH comprise entre 1,4–9,8. La limite en activité de l'eau AW pour la croissance est 0,88 aw ce qui est relativement élevée comparativement aux autres espèces (Samuels, 2004).

La production des conidiospores chez les champignons filamenteux se considère comme une étape importante dans le processus de multiplication végétative. Par conséquent, un développement normal du mycélium est une condition préalable à la production des conidiospores. Cette production est étroitement liée à la quantité et à la nature de la source de carbone et d'azote présentes dans les milieux de culture (Hamrouni, 2019).

Toutefois, la reproduction asexuée des *Trichoderma* est inconnue. On parle alors de forme anamorphe. Ce sont également les conidiospores, 2 à 3µm de diamètre, très volatiles, qui sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement. La germination des spores se déroule en deux étapes. Dans des conditions adéquates, les conidiospores se gonflent (**Figure 11**). Cette phase de croissance dure 3 à 4h. Après cette phase de gonflement, la croissance devient polarisée. En effet, on observe l'apparition d'un tube germinatif (après 11 heures d'incubation). Par la suite, le mycélium se développe rapidement pendant 40 heures et suite à des phénomènes d'induction et d'inhibition exercés en partie par le milieu de culture, il y a initiation de la phase de conidiogénèse qui peut durer jusqu'à plusieurs semaines (Hamrouni, 2019).

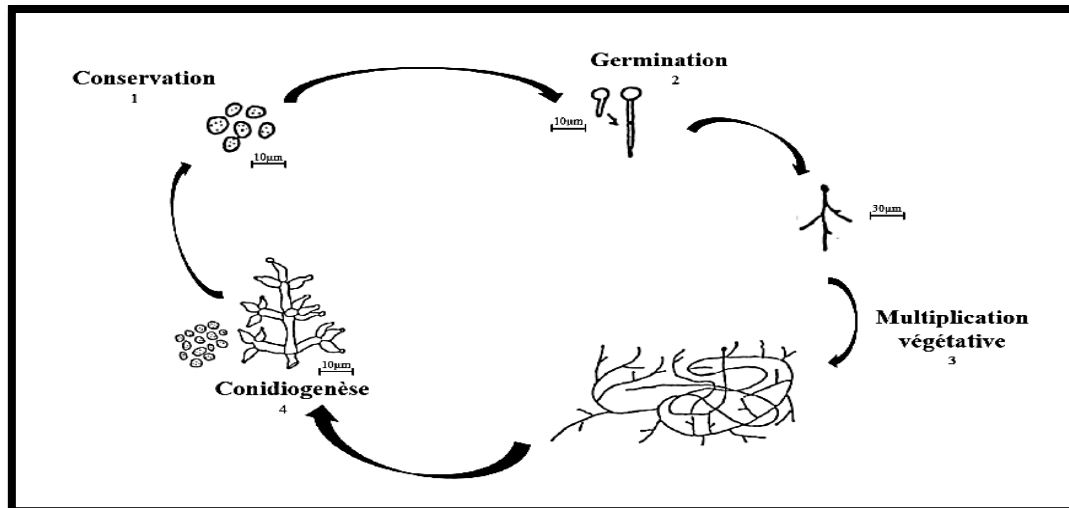


Figure 12 : Schéma des principales étapes du cycle de vie des *Trichoderma* en fonction de l'aspect morphologique de son développement sur substrat solide dans des conditions optimales (Roussos, 1985).

5.3.Métabolites secondaires de *Trichoderma*

Le succès des espèces fongiques en tant qu'agents de lutte biologique contre divers microorganismes phytopathogènes, est associée à la production d'un nombre excessif de composés et de métabolites bioactifs, y compris les métabolites secondaires (Li *et al.*, 2018).

Le genre *Trichoderma* comprend de nombreuses espèces de champignons communes réparties dans le monde entier. Les espèces de *Trichoderma* sont des producteurs bien connus de métabolites secondaires avec une variété d'activités biologiques. Leur utilisation potentielle en tant qu'agents de lutte biologique est connue depuis de nombreuses années. Plusieurs revues sur les métabolites de *Trichoderma* ont été publiées. Ces examens sont basés sur leur type structurel, leur activité biologique ou leur origine fongique.

Les espèces de *Trichoderma* sécrètent divers composés volatils et non volatils (**Tableau 02**) tels que les alkylpyrones, peptaibols, polycétides, stéroïdes, isonitriles, sesquiterpènes, dicétopipérazines et d'autres. Ces composés impliquent une très grande variété d'action car ils inhibent la croissance des bactéries et les champignons phytopathogènes. Par ailleurs, leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique (Li *et al.*, 2019).

Les travaux menés par Moutassem *et al.*, (2020) montre que les métabolites secondaires extraits à partir de cinq espèces de *Trichoderma* ont montré une réduction significative de la croissance mycélienne avec environ 6 à 75%. Cependant, cet effet est dose dépendant, où

l'efficacité augmente significativement avec l'augmentation de la dose. Néanmoins, les métabolites secondaires de *T. harzianum* et *T. viride* ont montré les plus efficaces pour inhiber la croissance du mycélium. Cependant, la variation observée de l'activité fongicide chez les cinq espèces de *Trichoderma* pourrait être attribuée aux différents types de composés chimiques produits par les différentes espèces (Moutassem *et al.*, 2020).

Le travail de Moutassem *et al.*, (2020) montre une nette augmentation des taux de polyphénols et de flavonoïdes chez toutes les plantes traitées avec des métabolites secondaires de différentes espèces de *Trichoderma*. L'analyse biochimique a indiqué une forte accumulation de polyphénols et de flavonoïdes dans les plantes traitées avec les espèces de *Trichoderma* avec des fréquences variables entre 51.15 et 69.54 mg g⁻¹, ainsi qu'entre 37.44 et 72.4 mg g⁻¹ chez les plantules traitées par les extraits fongiques. Cela peut également expliquer l'effet positif des espèces de *Trichoderma* dans la réduction de la gravité de la maladie causée par le flétrissement du pois chiche (Moutassem *et al.*, 2020).

Tableau 02 : Certains métabolites volatiles et non volatiles secrétés par *Trichoderma*.

	Exemple	Références
Les métabolites volatils	6-pentyl- α pyrone, Ethylène Cyanure d'hydrogène Alcools Aldéhydes	(Vizscaino <i>et al.</i> , 2005)
Les métabolites non volatils	Trichotécènes (trichodermines)	(Landreau, 2001)

5.4. La souche *Trichoderma longibrachiatum*

Huit composés connus ont été identifiés à partir du *T. longibrachiatum* endophytique d'origine marine qui sont :

- β -sitostérol,
- Ergostérol,
- Sorbicilline,
- Peroxyde d'ergostérol,
- Cerevisterol,
- Acide 2-anhydromevalonique,
- Squalène,
- Ergokonine A

L'activité biologique a indiqué que le sorbicilline ; présentait une activité modérée contre *Bacillus brevis*, *B. subtilis*, *Sarcinalutea* et *Enterobacterse*, et l'ergokonine A présentait une activité contre les espèces *Candida* et *Aspergillus* mais était inactif contre les espèces *Cryptococcus* ; et il a induit des altérations de la morphologie hyphale d'*Aspergillus fumigatus*.

Deux nouveaux dérivés d'acide tétroni qu'ont été isolés de *T. longibrachiatum* Rifai, le 5-hydroxyvertinolide et le bislongiquinolide, qui étaient antagonistes du champignon *Mycenacitricolor*.

Un nouveau sesquiterpène, le 10,11-dihydrocyclonérotriol, ainsi que deux molécules connus, la caténiobline C et la sohirnone A, ont été identifiés à partir du champignon endophyte *T. longibrachiatum* YM311505.

Les composés, la caténiobline C, et le 10,11-dihydrocyclonérotriol et la sohirnone A ont présenté des activités antifongiques contre *Pyriculariaoryzae* et *Candidaalbicans*. Et les deux composés, les trichokonines A et B, ont été obtenus à partir de *T. longibrachiatum*. Ainsi que les trichokonines A ont présenté une variété d'activités biologiques : antimicrobienne, antivirale, antitumorale et induisant une résistance végétale (Li *et al.*, 2019).

6. Utilisation du genre *Trichoderma* dans la lutte biologique

6.1. La lutte biologique

D'après la National Academy of Science des Etats-Unis d'Amérique la lutte biologique est définie comme : « toute action mettant en jeu des organismes ou modifiant l'hôte y compris les méthodes culturales, qui permettent de diminuer, par voie directe ou indirecte, les dommages causés par un parasite » (Corbaz, 1990).

On peut appeler aussi la lutte biologique comme l'ensemble des méthodes qui permettent de se débarrasser des animaux et des végétaux néfastes à l'homme, aux animaux domestiques et aux végétaux, par l'emploi judicieux de leurs ennemis (Faurie *et al.*, 2003).

La lutte biologique exploite les mécanismes de régulation naturelle des populations reposant sur le potentiel biotique des populations et l'impact des facteurs abiotiques environnementaux. Elle utilise des organismes auxiliaires, qui peuvent être des parasitoïdes, des prédateurs (insectes, acariens, nématodes), des pathogènes (virus, bactéries, champignons) ou des compétiteurs microbiens (Bovin., 2004).

Les souches de *Trichoderma* sont très efficaces pour la lutte contre les maladies des végétaux reliées aux sols, elles peuvent influencer la croissance de la plante, augmenter la disponibilité des nutriments et la résistance vis à vis de la maladie, aussi bien que pour la dégradation de composés toxiques présents dans leur environnement. Les sols inoculés protègent les cultures et garantissent un milieu sain pour un développement normal de la végétation.

En effet, ce champignon secrète de multiples enzymes, antibiotiques, hormones qui sont essentiels 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. De ce fait, la présence de *Trichoderma* dans le sol joue à la fois un rôle préventif et curatif (Harman *et al.*, 2004).

6.2. Quelques espèces utilisées dans la lutte biologique

Les mécanismes de biocontrôle sont susceptibles d'être spécifiques, en particulier pour les antagonistes qui, pourraient fonctionner indépendamment ou en synergisme dans n'importe quelle interaction microbienne (Hermosa *et al.*, 2000 ; Melo et Faull, 2000). L'identification du genre *Trichoderma* comme agent de biocontrôle est nécessaire, puisqu'il peut agir contre les agents phytopathogènes par divers modes d'actions (Shelton, 1997); une fois qu'il est en contact avec la racine, il colonise la surface ou le cortex en améliorant sa croissance et induisant la résistance aux plantes (Shelton, 1997 ; Harman, 2006).

Parmi les espèces du genre *Trichoderma* utilisées dans la lutte biologique :

Trichoderma viride* et *Trichoderma harzianum

6.2.1. *Trichoderma viride*

T. viride et *Trichoderma harzianum* font l'essai sur plusieurs arbres pour éviter la contamination des blessures, le dernier est aussi efficace contre *Sclerotium rolfsii*. Son action est due essentiellement à un parasitisme des hyphes, et la production de β -glucanase et de chitinase (Corbaz, 1990). En effet, *Trichoderma viride* est connue par la transformation des terpènes inactifs en terpènes actifs, qui sont des substances de base des huiles essentielles par la production de molécules 6-pentyl-2-pyrone offrant l'odeur aux noix de coco (Botton *et al.*, 1990).

6.2.2. *Trichoderma harzianum*

L'effet antagoniste de *Trichoderma harzianum* est tout simplement associé à un comportement parasitaire, qui se manifeste par un enroulement des hyphes autour des filaments du champignon parasite. Les parois mycéliennes des champignons phytopathogènes sont ensuite lysées grâce à la production d'enzymes comme β -1,3 glucanase et de chitinase entraînant sa mort (Paulitz et Belanger, 2001 ; Paul et Masih, 2006).

Trichoderma harzianum inhibe la croissance de *Rhizoctonia solani* par la production d'enzymes hydrolytiques de la paroi cellulaire telles que β -glucosidase (Melo et Faull, 2000). Lasouchea été examinée dans les essais de serre chaude. *T.harzianum* peut coloniser toutes les parties du système racinaire et persister pendant une longue durée où elle est appliquée dans le traitement de la graine dans la lutte contre *Rhizoctonia solani*, colonisant le *Géranium*, la *Poinsettia* et le *Patharanthus*. Le mode rapporté à l'action de *T. harzianum* est la compétition pour les nutriments par la production d'enzymes lytiques empêchant la germination des conidies du pathogène (Paulitz et Belanger, 2001).

6.3.Mode d'action de *Trichoderma*

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

6.3.1. Antibiose

L'antibiose repose essentiellement sur la production par un antagoniste, des molécules 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 (Sivasithamparam et Ghisalbert, 1998).

6.3.2. Compétition

La compétition s'exprime par l'aptitude des souches de *Trichoderma* à utiliser les mêmes ressources du milieu que les agents phytopathogènes. Elles utilisent ce mode d'action avant l'apparition des agents pathogènes ce qui permet de limiter leurs apparitions grâce à la colonisation de la surface racinaire et à la compétition trophique. Lorsque *Trichoderma* colonise le milieu, il établit une zone d'interaction dans la rhizosphère des plantes et sécrète des composés tels que les sidérophores qui absorbent le fer et inhibent la croissance du champignon phytopathogène (Leghlimi, 2013).

6.3.3. Mycoparasitisme

Trichoderma peut utiliser le parasitisme pour maîtriser les agents pathogènes. Il les reconnaît grâce à des molécules peptidiques secrétées par ce dernier, ce qui provoque l'activation d'une cascade de signalisation qui induit la synthèse de métabolites secondaires et d'enzymes de dégradation. *Trichoderma* s'enroule ensuite autour de l'agent pathogène, pénètre à l'intérieur puis injecte différentes enzymes (protéases et lipases) qui lysent le contenu cellulaire de l'hôte (Leghlimi, 2013).

*Chapitre 2 : La fermentation en
milieu solide*

« La vie sans air » est bien la définition qui résume la fermentation stricte d'après Pasteur. Dans ce contexte, la fermentation est le terme qui s'applique aux réactions microbiennes en absence d'oxygène se déroulant en milieu liquide. A la suite, Des fermenteurs ont été alors conçus en réponse aux nombreuses applications industrielles développées permettant la culture de micro-organismes anaérobies. Rapidement, les industriels se sont aperçus que les micro-organismes aérobies étaient autant productrices des métabolites d'intérêt. Ils ont donc modifié les fermenteurs afin d'y cultiver ces micro-organismes aérobies. Ce qui a bien sur provoqué une dérive du sens « fermentation ». C'est pourquoi, le terme de fermentation s'est étendu aux processus microbiens en même temps aérobie ou anaérobie et en phase liquide ou solide (Duchiron et Copinet 2011).

1. Définition de la fermentation solide (FMS)

Un processus où les micro-organismes poussent sur une matrice solide, servant de support et/ou de substrat, en absence ou presque d'eau libre décrit la Fermentation en Milieu Solide (FMS) (Pandey, 2003). En revanche, la matrice doit être suffisamment humide pour permettre la croissance du micro-organisme. Le maximum d'humidité dépend de la capacité d'absorption du substrat utilisé.

Le principe de la FMS consiste à assurer la croissance de microorganismes sur des matrices solides préalablement humidifiées pour la production de biomasse ainsi que de métabolites primaires et secondaires. L'eau, nécessaire à la croissance du microorganisme se trouve absorbée ou complexée à l'intérieur de la matrice solide. Cette dernière est envahie par le champignon au cours de sa croissance. En effet, l'adhérence ainsi que la pénétration des microorganismes dans les espaces intercellulaires et intracellulaires au milieu du substrat est lié à des propriétés physiques de ce dernier comme la surface biodisponible, la porosité, etc. qui ont un effet direct sur la croissance ainsi sur la production éventuelle des molécules (Rajendran et Thangavelu, 2013 ; Guan *et al.*, 2014).

2. Les organismes utilisés en fermentation solide (FMS)

Les champignons, les levures et les bactéries peuvent être employés en FMS. Principalement, les bactéries sont utilisées dans le compostage, l'ensilage et les produits alimentaires. Alors que, les levures sont employées dans la production de produits d'alimentation humaine et animale (**Tableau 03**).

Tableau 03 : Exemple de microorganismes utilisés en FMS et leurs applications (Krishna, 2005 ; Restino, 2012 ; Hamrouni, 2019).

	Micro-organisme	Applications
Bactéries	<i>Bacillus sp.</i>	Compostage, production d'α-amylase
	<i>Clostridium sp.</i>	Ensilage, produits alimentaires
	<i>Lactobacillus sp.</i>	Ensilage, produits alimentaires
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Compostage
	<i>Staphylococcus sp.</i>	Production d'inulinase
	<i>Streptococcus sp.</i>	Compostage
Levures et moisissures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pain
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Production de composé aromatique et d'enzyme
	<i>Trichoderma sp</i>	Production de 6-pentyl-α-pyrone (6-PP)
	<i>Aspergillus itaconicus</i>	Production d'acide itaconique

Les milieux solides sont l'habitat naturel des champignons, il est donc spontanément que la FMS soit mieux adaptée à leur culture par rapport aux micro-organismes unicellulaires (Durand, 1998). Grâce à leurs propriétés biochimiques, enzymologiques et physiologiques, les champignons permettent de produire des molécules très divers que nous avons déjà détaillés dans le premier chapitre.

Outre le choix du micro-organisme, il est indispensable de prendre en compte les facteurs physico-chimiques et environnementaux influençant la FMS, et d'essayer de les contrôler tout au long du procédé.

3. Facteurs influençant la fermentation en milieu solide

3.1. Le type d'inoculum

Il existe deux types différents d'inoculum. L'un est obtenu après culture du champignon en milieu liquide sous forme de cellules végétatives (mycélium). L'autre est obtenu après un « grattage » d'une culture fongique sporulée avec une solution de Tween 80 sous forme de spores ou conidies. Outre la forme utilisée, l'inoculum est en solution ce qui permet, après mélange, de le disperser dans le milieu de culture. Néanmoins, l'inoculum sous forme de spores est plus avantageux que celui de cellules végétatives, dans les procédés industriels. En effet, l'utilisation de spores ou conidies permet d'une part, une répartition plus homogène du micro-organisme au sein du milieu de fermentation et d'autre part, une meilleure production répétable. Cependant, l'utilisation de spores comme inoculum engendre un temps de latence plus long (Wolken *et al.*, 2003). En effet, les spores sont métaboliquement en dormance, la croissance fongique et l'utilisation du substrat ne débutera que lorsque l'équipement enzymatique essentiel aura été induit et synthétisé (Krishna, 2005).

3.2. L'humidité

Habituellement, le besoin en eau dépend initialement du type de micro-organisme utilisé et ensuite, de la capacité de rétention d'eau du substrat solide. Ainsi, le taux d'humidité d'une fermentation solide se situe dans une fourchette comprise entre 30 et 85% (Krishna, 2005).

Une humidité suffisante est obligatoirement essentiel pour la croissance du micro-organisme mais elle ne doit pas être trop faible (inférieure à 30%) afin d'éviter tout problème de diffusion des nutriments dû à un milieu trop sec. A l'opposé, une humidité trop importante (supérieure à 85%) entraîne une agrégation des particules (milieu pâteux) ainsi qu'une limitation du transfert gazeux. Les bactéries ont besoin d'un pourcentage d'humidité supérieur à 70% alors que les champignons se développent à des humidités comprises entre 40 et 70% (Rani Singhania *et al.*, 2009). Le minimum d'humidité est de 12%, en-dessous de cette valeur toute activité biologique cesse (Krishna, 2005).

L'augmentation de température ainsi que l'aération, peut induire un amoindrissement de la teneur en humidité. Cette diminution ne doit pas être trop importante ou doit être compensée par un apport hydrique pour pallier un ralentissement ou un arrêt du métabolisme cellulaire (Duchiron et Copinet, 2011).

L'absence de sonde qui permet de mesurer directement l'humidité dans le milieu de fermentation est l'une des difficultés dans le suivi de l'humidité pendant la FMS.

Le besoin en eau des micro-organismes est également décrit en termes d'activité de l'eau (*activity water*, *aw*). Elle est reliée à l'humidité relative (HR) suivant l'équation suivante : $aw = HR/100$ (Restino, 2012).

3.3. La température

Parmi les facteurs physiques qui affectent la FMS, « la température » où le suivi est probablement difficile à mettre en place pour les cultures en erlenmeyer vu que la croissance du micro-organisme se fait en milieu clos et il n'existe pas de sonde permettant de mesurer directement la température du milieu contrairement aux fermenteurs solides (Restino, 2012).

La température peut avoir une influence sur la croissance du micro-organisme mais pareillement sur la production d'enzyme et de métabolites qui peuvent être très sensibles au changement du taux de température. Les champignons se développent, généralement, entre 20 et 55°C (cette température peut diminuer jusqu'à -18°C) mais la température optimale de croissance peut être différente de celle de la production (Restino, 2012).

La régulation et le contrôle de la température sont très difficiles car la conductivité thermique est très faible dans un milieu solide. Ceci est dû à un manque d'eau libre qui facilite le transfert de chaleur. La combinaison humidité-espaces vides disponibles peut conduire à des gradients thermiques. Le problème est aggravé en système à grande échelle car l'accumulation de chaleur est encore plus importante avec une hauteur de couche beaucoup plus élevée. L'augmentation peut atteindre 20°C de plus que la température d'incubation (Pandey, 2003). Ceci provoque une diminution de l'humidité et donc une diminution de l'activité fongique. L'augmentation de température peut causer une dénaturation des protéines, une inhibition enzymatique ou encore l'arrêt de la croissance du mycélium ainsi, la formation des conidies et l'arrêt de production de métabolites. Cela peut être intéressant si le but est de produire des conidies pour la lutte biologique, dans les autres cas cette accumulation de chaleur empêche la production des molécules cibles. La solution au problème est alors d'éliminer le surplus de chaleur. En fermenteur solide, la régulation thermique est réalisée par un brassage « doux » du milieu afin de ne pas démolir ou altérer le mycélium. En combinaison ou parallèlement à ceci, le milieu peut être refroidi grâce au passage d'un flux d'air humidifié et refroidi à travers le milieu (Duchiron et Copinet, 2011). Des recherches portent à présent sur la conception de fermenteurs aidant à l'élimination de la chaleur métabolique produite au cours de la culture (Krishna, 2005).

3.4. Le pH

Chaque micro-organisme a une gamme de pH propre à sa croissance et à son activité métabolique. Les champignons sont capables de se développer à des pH compris entre 2 et 9, avec un optimum entre 3 et 6, ce qui permet donc d'initier une FMS à un pH acide. Cela peut être un avantage afin d'éviter la contamination bactérienne. En effet, chez une grande partie des bactéries à l'exception des bactéries acidophiles un pH initial acide augmente le temps de latence alors qu'il le réduit chez les champignons. La production de métabolites peut faire changer le pH pendant la durée d'une FMS (Restino, 2012).

Pareillement à la température, le pH est également, un paramètre très difficile à contrôler en FMS. Le contrôle est pratiquement impossible du fait de l'hétérogénéité du milieu en absence d'homogénéisation et d'agitation au cours de la FMS. Nous notons qu'il n'existe pas de sonde de pH directement utilisable en milieu solide.

La clé à présent possible pour contrôler le pH est l'ajout d'une source d'azote qui est liée aux variations de celui-ci (Restino, 2012).

3.5. L'oxygène et le dioxyde de carbone

Le développement fongique ainsi que la production enzymatique sont influencés par les gaz. L'aération et le brassage assurent à la fois l'apport d'oxygène nécessaire au maintien des conditions aérobies et l'élimination du dioxyde de carbone. Cependant, Pour ne pas limiter le développement des champignons, la quantité en oxygène doit être bien suffisante. Le processus de fermentation en milieu solide facilite l'accès du micro-organisme à l'oxygène (Krishna, 2005) contrairement à la fermentation en milieu liquide où le transfert d'oxygène est très souvent un facteur limitant.

En mesurant le taux de consommation d'oxygène, ainsi que celui de la production de dioxyde de carbone, on aura des données rapides sur le métabolisme du micro-organisme.

L'évaluation permet de calculer le quotient respiratoire défini comme le ratio entre le dioxyde de carbone produit et l'oxygène consommé (Bellon-Maurel *et al.*, 2003).

3.6. Les facteurs nutritionnels

Le carbone est un facteur très important qui sert à la fois de source d'énergie et de nutriments pour la croissance du micro-organisme. La source de carbone peut être un glucide simple, comme le glucose, ou des glucides complexes tels que la cellulose ou l'amidon. D'autres

sources de carbone telles que le saccharose, le lactose, le glycérol mais encore l'extrait de malt ou la cellobiose peuvent également être utilisées (Couto et Sanroman, 2006).

Les sources d'azote telles que le tartrate d'ammonium, le sulfate et le nitrate de sodium, les peptones ainsi que les éléments incluant le sodium, le calcium, le cuivre, le fer, le zinc stimulent la sporulation des champignons.

3.6.1. La taille des particules

La taille et la forme des particules déterminent l'espace vide qui est occupé par l'air permettant l'oxygénation du micro-organisme. Il est donc essentiel d'avoir une taille de particules convenable car, des particules trop petites entraînent une agrégation du substrat diminuant la respiration microbienne et donc le développement. Au cas contraire, où les particules sont trop grosses, le substrat n'est pas suffisamment accessible (Krishna, 2005).

3.6.2. Les substrats

Les substrats utilisés en FMS peuvent être soit, des supports inertes imprégnés par un milieu de culture où différents matériaux sont utilisés et la plupart présentent une forte capacité de rétention d'eau (exemples : bagasse de canne à sucre, paille, vermiculite, éponge, polyuréthane etc.) soit le plus souvent des matrices naturelles hétérogènes issues de produits ou coproduits agro-industriels assurant à la fois la fonction de support et de source de nutriments (exemples : pulpe de café, son de blé, pulpes de betteraves, écarts de triage de bananes, résidus de produits amylicés, tourteaux de coprah etc.) (Rodriguez Couto *et al.*, 2002) (Mitchell *et al.*, 2006) (Rosales *et al.*, 2007).

Le choix du substrat est lié par sa disponibilité et son coût. 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 et surtout convenable (Restino, 2012).

L'utilisation de tels supports peut résoudre les problèmes économiques et/ou environnementaux causés par leur rejet (Osma *et al.*, 2007).

3.6.2.1. Le son de blé

a) Généralités

Le son de blé regroupe les couches les plus extérieures du blé. Il est constitué de diverses couches fines :

-Le péricarpe extérieur et intérieur.

-Le tégument.

-La couche hyaline et la couche d'aleurone.

Le péricarpe est surtout riche en fibres insolubles comme la cellulose, en lignine et acide férulique. Le tégument contient principalement des alkyl résorcinols (lipide phénolique). Enfin, 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).

b) Rôle et propriétés

Beaucoup de co-produits issus de l'agriculture remplacent les substrats synthétiques généralement plus coûteux. Parmi ces résidus, le son de blé est un des substrats le plus attractif. Il a pour avantage de permettre une bonne circulation de l'air, de ne pas présenter d'agréations des particules entre elles, de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et surtout d'être bon marché. Aujourd'hui, le son de blé est beaucoup utilisé en FMS pour la production d'enzymes, de métabolites secondaires et autres produits d'intérêt biotechnologiques.

Le son de blé a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (Abdullah *et al.*, 1985). De plus, il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons.

Le son de blé contient de la cellulose (13%), de l'amidon (15-25%) et du xylane (12,65%) qui induisent une bonne production de cellulases, d'amylases et de xylanases, respectivement. Le son de blé est un substrat potentiellement intéressant pour la production de biocarburant. Des recherches actuelles portent sur la saccharification et la fermentation simultanée de son de blé qui permet de convertir les complexes polysaccharidiques en réserve de sucre facilement transformable en éthanol (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 connu 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. Cependant, pour être efficace, le son de blé doit être préalablement « déphytisé » car les phytates sont d'importants facteurs antinutritionnels.

En raison de l'abondance de ce coproduit mondialement, ses propriétés et ses nombreuses applications en fermentation mais aussi en médecine, le son de blé est estimé comme « l'or marron » du XXIème siècle (Javed *et al.*, 2012).

4. Applications de la fermentation solide (FMS)

Les principales applications concernent la production d'acides organiques (John *et al.*, 2006), de biopesticides (Dela Cruz Quiroz *et al.*, 2017), de biofuel (Yu *et al.*, 2007), d'antibiotiques (Adinarayana *et al.*, 2003), de polysaccharides (Stredonsky et Conti, 1999), d'enzymes (Botella *et al.*, 2007), d'arômes (Medeiros *et al.*, 2000) et de vitamines (Gupta *et al.*, 2002).

4.1. La production d'enzymes

Il existe quatre grands types d'enzymes :

- Les enzymes dites techniques utilisées dans la papeterie et les détergents...
- Les enzymes alimentaires utilisées dans les confiseries et les édulcorants...
- Les enzymes utilisées dans l'alimentation animale (bétail et animaux de compagnie).
- Les enzymes utilisées dans le domaine de la santé et de la recherche.

4.2. La production de métabolites secondaires

La production de métabolites secondaires est principalement réalisée par FML, cependant, les recherches s'orientent vers la production de ces métabolites par la technique de FMS. Il est noté que cette dernière a pour avantage qui permet de diminuer le temps de culture, d'augmenter la productivité ou encore de réduire le coût de production (Krishna, 2005).

Parmi ces métabolites, nous citons l'acide gibbérellique qui est un facteur de croissance chez les plantes mais aussi les alcaloïdes de l'ergot dont la demande est en constante augmentation car ils 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.

Cette méthode est aussi intéressante en produisant de spores utilisées pour la protection des plantes afin de réduire l'utilisation de pesticides et ces risques dangereux (Restino, 2012).

4.3. La biorémédiation

Ce domaine est actuellement en plein progression. L'élimination des métaux lourds est un défi majeur pour la dépollution des eaux usées. La présence de cuivre et de plomb est dangereuse pour la santé humaine. L'utilisation de coproduit industriel est un filtre naturel pour la décontamination. La fermentation en milieu solide peut être une alternative moins coûteuse que la dépollution classique par des résines synthétiques (Javed *et al.*, 2012).

5. Comparaison des fermentations liquides et solides

La culture des champignons filamenteux en milieu liquide est désormais un procédé courant, qui a donné lieu à des applications industrielles importantes comme la production de métabolites biologiquement actifs. Néanmoins, la culture des champignons en milieu liquide présente certaines difficultés (Pandey *et al.*, 1999). En effet, l'augmentation de la viscosité des milieux liquides est influencé à la fois par le mode de croissance et la nature de ces microorganismes ce qui gêne le transfert d'oxygène, l'agitation et l'homogénéisation (Raghavarao *et al.*, 2003). Grâce à la FMS, ces problèmes peuvent être surmontés. Un des avantages les plus importants de la FMS lorsque l'on valorise les sous-produits agricoles, repose essentiellement sur des critères économiques. En effet, le processus ne nécessite pas d'appareils complexes et ne demande pas d'investissements importants (Holker et Lenz., 2005). En revanche les connaissances physiologiques et technologiques sont moins avancées car la difficulté la plus importante rencontrée en FMS est le maintien des conditions optimales de culture telles que le contrôle du transfert de chaleur et de matière ou encore le maintien du pH (Perez-Guerra *et al.*, 2003). Les *Trichoderma* peuvent donc être utilisés en fermentation solide. De plus, ces moisissures sont capables de produire des métabolites secondaires...

Le tableau suivant (**Tableau 04**) décrit les principales différences entre les deux types de fermentation liquide et solide :

Tableau 04 : Différentes caractéristiques de la FMS et de la FML (Raimbault1998 ; Durand 2003 ; Manpreet *et al.*, 2005 ; Soccol *et al.*, 2017).

Caractéristiques	FMS (fermentation en milieu solide)	FML (fermentation en milieu liquide)
Substrat	Substrat plutôt insoluble, support inerte (naturel ou artificiel) contient le substrat pour la croissance du microorganisme	Substrat généralement soluble
Aseptie	Stérilisation thermique, traitement par vapeur, ou non stérile, dépend de la configuration du réacteur	Stérilisation thermique et contrôle aseptique
Consommation d'eau	Quantité limitée d'eau, faible Aw	Grande consommation d'eau
Chaleur métabolique	Faible capacité de transfert de chaleur	Température facile à contrôler
Aération	Besoin d'air saturé en eau ; Contact direct entre oxygène, substrat et microorganismes	Oxygène soluble limité dans le milieu
Contrôle du Ph	Tamponner le substrat, ou le milieu de biotransformation avant d'imbiber dans le support inerte	Facile à ajuster
Agitation mécanique	Aération statique préférée	Bonne homogénéisation
Scale-up	Réacteur de type Koji disponible ; Besoin de développement d'autre type de réacteur	Equipements industriels disponibles, procédé continu
Inoculation	Difficile à homogénéiser les microorganismes dans les support/substrat	Facile et bien homogène

Contamination	Risque de contamination pour un faible taux de champignons en croissance	Risque de contamination pour certaines bactéries
Utilisation énergétique	Faible consommation d'énergie	Haute consommation d'énergie
Volume de réacteur	Faibles volumes et faibles coûts d'équipements	Volumes élevés et technologie couteuse
Effluents et pollution	Pas d'effluents, moins de pollution	Grands volumes d'effluents polluants
Productivité	Plus élevé	Plus faible

Partie 2 : Partie expérimentale

1. Matériel biologique

1.1. Origine et entretien de la souche

La souche utilisée dans cette étude est la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*. 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 à l'aide de pipettes Pasteur puis étalées avec un râteau 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). 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).

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 13**).



Figure 13 : Préparation de la suspension sporale ; A : Mycélium 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) (**figure 14**) 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).

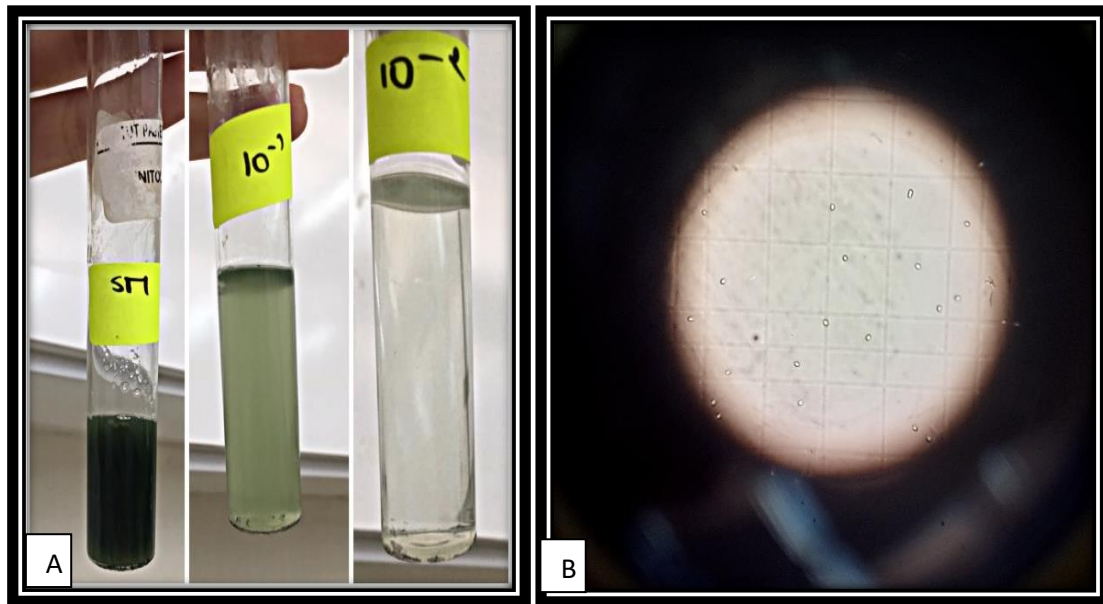


Figure 14 : Dénombrement des spores. A : Série de dilution (SM, 1/10 et 1/100) ; B : Comptage sur la cellule Thoma.

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 (**Annex1**), 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

Le son de blé est la matière première principalement utilisée dans cette étude. Il nous a été gracieusement fourni par la Coopérative des céréales et légumes secs (Hamma Bouziane Constantine, Algérie). Utilisé comme un substrat naturel sans aucun traitement.

2.2. Préparation de la fermentation en milieu solide

La fermentation est réalisée dans 8erlens-meyers de 250 ml. Dans chaque erlenmeyer, 10 g de son de blé sont introduits et pré humidifiés avec une solution d'humidification (**Annexe 1**). Le taux d'humidité utilisé est de 70%. Les milieux sont homogénéisés à l'aide d'une tige en verre puis les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes (**Figure15**).



Figure 15 : Préparation des erlens pour la fermentation en milieu solide.

2.3. Inoculation des erlens de culture

Après refroidissement, les erlens sont inoculés par une suspension sporale de la souche *Trichoderma longibrachiatum* à raison de 3 ml par erlen, dont le taux d'inoculum est de 2.10^7 spores/ gramme de substrat solide. Le tout est homogénéisé stérilement à l'aide d'une baguette en verre stérile, puis incubé à 30°C pendant différents temps comme suit 7 ,8 et 10 jours. Chaque erlenmeyer correspond à un prélèvement et donc à une durée de fermentation.

3. Extraction et mesures effectuées après fermentation

3.1. L'extracteur Soxhlet

3.1.1. Principe

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première. Le schéma d'un appareil Soxhlet est représenté sur la figure (Figure16). Cet appareil est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant (Penchev, 2010).

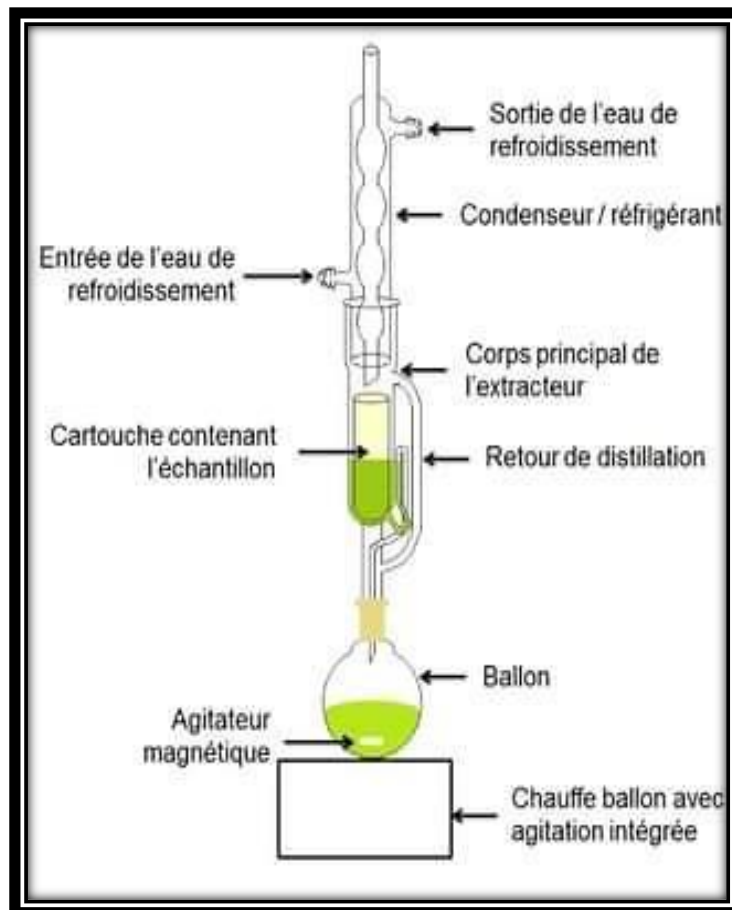


Figure 16 : Schéma de l'extracteur Soxhlet (Google image, 2016).

Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche.

3.1.2 Mode opératoire

Le substrat fermenté obtenu après 7, 8 et 10 jours de culture par *Trichoderma longibrachiatum* sur son de blé, a subi une extraction de type solide –liquide par l'utilisation de deux solvants organiques : acétate d'éthyle et n-butanol, afin de choisir le bon solvant permettant de récupérer le meilleur rendement en métabolites secondaires. Des échantillons de 10 g (poids humide) de substrat fermenté sont extraits avec 200 ml de chaque solvant, en utilisant le Soxhlet à 70°C pendant 6 heures pour chaque prélèvement (**Figure 18**).

3.2. Le rotavapor

3.2.1. Principe

La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide de l'appareil appelé Rotavapor (**Figure 17**). Dans cet appareil on réalise une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation, le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée permettant donc, d'effectuer une évaporation rapide.

L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite, évitant ainsi la dégradation thermique éventuelle des composés (Penchev, 2010).

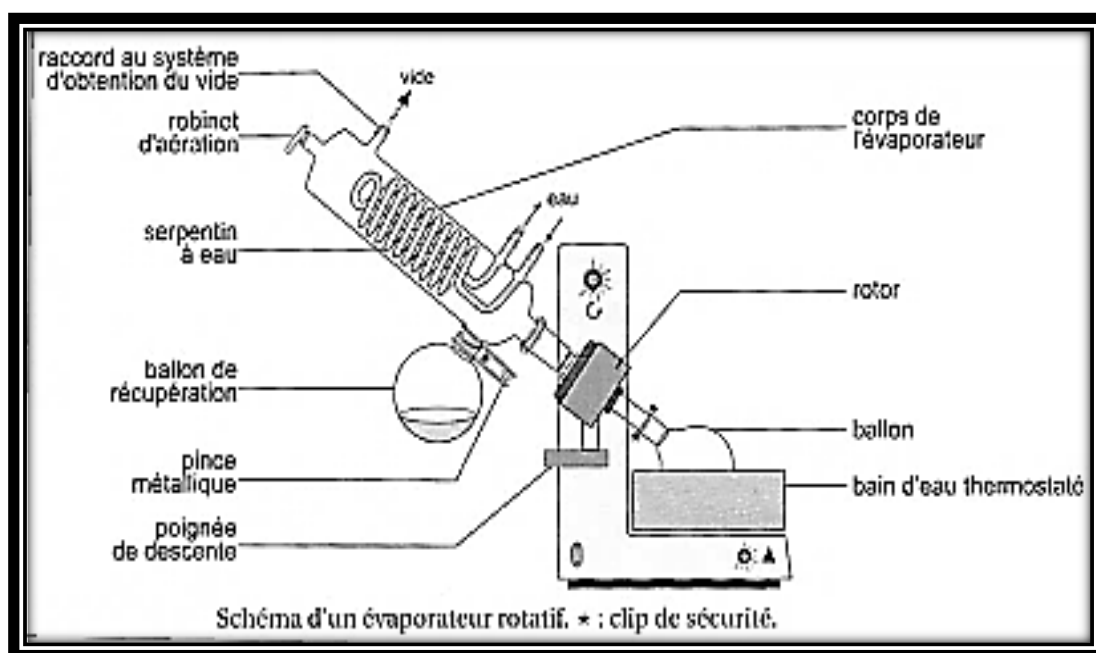


Figure 17 : description d'un évaporateur rotatif (Penchev, 2010).

3.2.2. Mode opératoire

L'extrait obtenu par Soxhlet est évaporé par la suite, à 45°C pour l'acétate d'éthyle et à 55°C pour le n-butanol en utilisant un évaporateur rotatif, puis récupéré dans une solution de méthanol.



Figure 18 : Etapes d'extraction des métabolites secondaires par Soxhlet (A) et par rotavapor (B).

3.3. Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale du substrat fermenté ayant subi l'extraction.

$$R = \frac{\text{Masse d'extraction}}{\text{Masse d'extrait sec}} \times 100$$

R : rendement en (%).

3.4. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation des molécules.

Elle repose principalement sur le phénomène sélectif des composants, la migration (verticale) est fonction de la polarité des molécules, de la polarité de l'éluant (phase mobile) et du pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire. Les composés entraînés par la phase mobile, migrent à une hauteur, variant en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et pour la phase

mobile. Les substances migrent par capillarité. La vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Généralement, en CCM, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires (AMIN, 2013).

De ce fait, nous avons utilisé cette technique pour la mise en évidence des différents métabolites récupérés à partir du substrat fermenté de *Trichoderma longibrachiatum*.

3.4.1. Protocol expérimentale

Afin de mettre en évidence des métabolites à partir de cinq extraits : trois extrait éthylique (7, 8 et 10 jours), deux extraits butanolique (7 et 10 jours). Nous avons réalisés la séparation par CCM selon les étapes suivantes :

- La ligne de base sous forme d'un trait horizontal, tracé à environ 1 cm du bas de la plaque de CCM.
- Le dépôt des extraits est effectué de façon perpendiculaire, à l'aide de pipettes Pasteur.
- La plaque est déposée en position verticale dans une cuve de chromatographie contenant l'éluant (système solvant), à une hauteur d'environ 1 cm. La cuve est hermétiquement fermée avec un couvercle adhésif.
- La plaque de CCM est retirée lorsque les taches atteignent la ligne frontale (la limite du bord supérieur à 1 cm qui représente le front du solvant, ce dernier est marqué avec un crayon).
- Après séchage sous hotte, les différents spots sont observés à l'œil nu, sous UV et après révélation chimique.

Plusieurs systèmes éluants ont été utilisés pour choisir ceux qui donnent une bonne séparation des composés métaboliques éventuellement présents dans les extraits (**Tableau 5**).

Tableau 05 : Les différents systèmes éluant utilisés pour la CCM.

Les systèmes éluants essayés	Acétate d'éthyle / Chloroforme (2/18 ; V/V) Acétate d'éthyle / Hexane (2/18 ; V/V) Méthanol / Chloroforme (4/16 ; V/V) Méthanol / Chloroforme (6/14 ; V/V)	Référence: (Djafar et Menzri, 2017)
Les systèmes éluant choisi	Acétate d'éthyle / Chloroforme (2/18 ; V/V) Méthanol / Chloroforme (4/16 ; V/V)	(Kissoum et Khalfaoui, 2015)

- Déposer, à l'aide d'une pipette Pasteur sur la ligne de dépôt une goutte de chaque extrait de gauche à droite. Les dépôts sont espacés régulièrement afin d'éviter leur chevauchement lors de la migration.
- L'éluant (système solvant) remonte par capillarité le long de la plaque. Lorsqu'il arrive à environ 1 cm du bord supérieur (front du solvant), on fait sortir la plaque de la cuve et on la sèche.
- Après ces étapes, on procède à la révélation des chromatogrammes sous lampe UV à 254nm mettant en évidence sous forme de taches, la présence des métabolites secondaires.
- **Révélation chimique** : Le principe est de mettre en contact de la plaque un réactif spécifique qui donne une coloration spécifique par réaction chimique. Cette révélation est réalisée avec le réactif : **la Vanilline sulfurique (Annexe 1)** (Lhuilier, 2007).
- Déposer la plaque dans une étuve à 100°C pendant 15min.

3.4.2. Détermination du rapport frontal Rf

Les spots sont repérés et les distances parcourues sont mesurées, les rapports frontaux (**Rf**) sont calculés par l'équation suivante : **{Rf = X/Y}**.

X : Distance parcourue par le constituant.

Y : Distance parcourue par le front de l'éluant.

4. Etude de l'activité biologique

4.1. Activité antibactérienne

Les spots choisis (S1 /S2/S3) qui apparaissent sur la plaque de CCM des extraits de 8 jours (**Figure 19**), sont grattés et déposés à la surface du milieu Mueller Hinton coulé en boîtes de Pétri, et déjà ensemencé avec les bactéries tests (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*). Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Ce test permet de mettre en évidence la présence ou l'absence d'activités antibactériennes des métabolites secondaires contenus dans les extraits préparés.

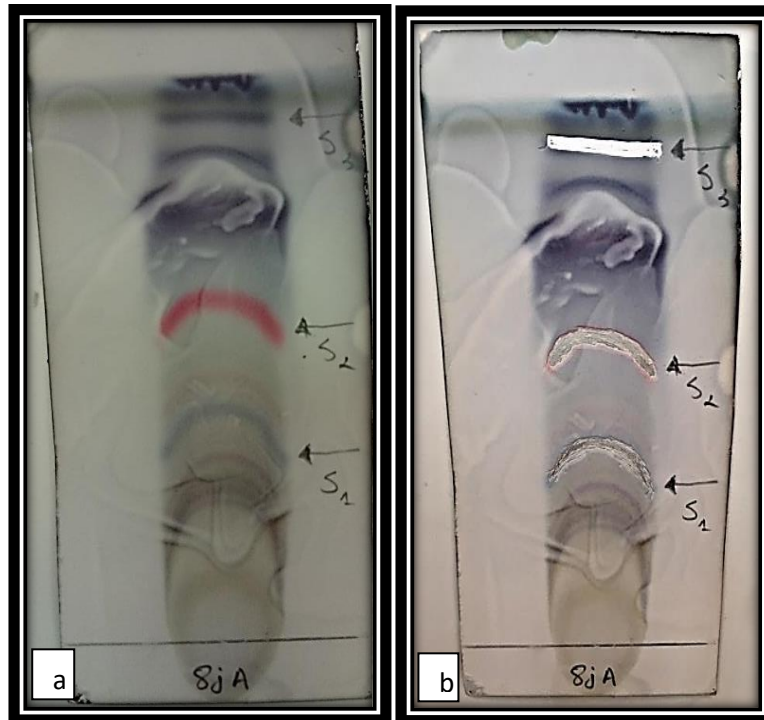


Figure 19 : Spots (S1, S2 et S3) de la plaque CCM des extraits de 8 jours. La plaque CCM après révélation chimique (a) ; la plaque CCM avec les spots grattés (b).

4.2. Activité antifongique

L'activité antifongique, appelée aussi activité antagoniste, est évaluée par l'utilisation des disques de croissance de la souche *Trichoderma longibrachiatum* contre les souches phytopathogènes du citronnier isolées et fournies gracieusement de la part de nos collègues de Master. Il s'agit de 8 souches fongiques appartenant aux genres suivants : *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Cladosporium*.

Cette étude est réalisée selon deux méthodes différentes : confrontation à distance et confrontation directe.

4.2.1. Confrontation à distance

Il consiste à repiquer l'antagoniste *Trichoderma longibrachiatum* et le pathogène dans deux boîtes séparées coulées de milieu *PDA*, par la suite, un assemblage est réalisé par la superposition des deux boîtes, l'antagoniste *Trichoderma longibrachiatum* en bas et le pathogène en haut (**Figure 20**). La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles. On expose ainsi l'agent pathogène à l'influence des substances volatiles émises par la souche *Trichoderma longibrachiatum*.

Le témoin est formé par super position de deux boîtes, celle du haut contenant un disque de croissance de l'agent pathogène, alors que celle du bas ne contient que le milieu *PDA*. Les boîtes sont incubées pendant 5 jours à 25°C dans l'obscurité.

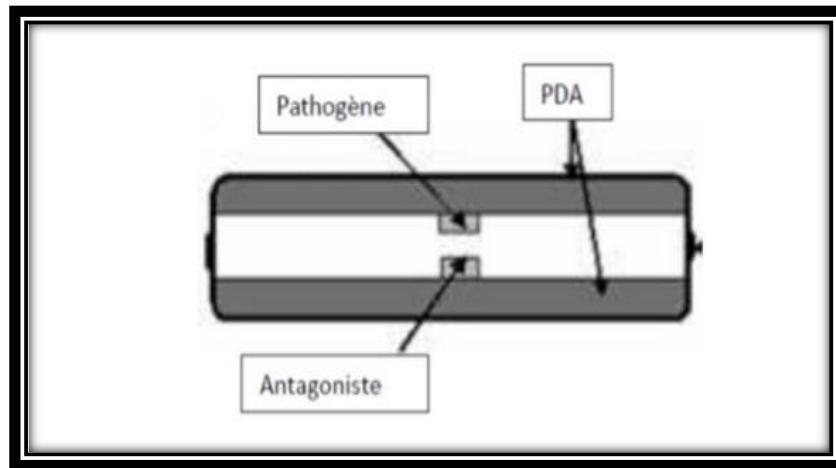


Figure 20 : Confrontation à distance entre l'antagoniste *Trichoderma longibrachiatum* et l'isolat pathogène (Hamouni, 1996).

4.2.2. Confrontation directe

Dans une boîte de Pétri contenant le milieu *PDA*, deux disques de croissance fongique (à raison de 5 mm de diamètre) constitués par l'inoculum du pathogène et celui de l'antagoniste sont placés à 60 mm l'un de l'autre, symétriquement par rapport au centre de la boîte (**Figure 21**). Pour le témoin, un disque mycélien du pathogène est déposé sur le milieu *PDA* dans une autre boîte.

Les boîtes ainsiensemencées, sont incubées à 25°C et à l'obscurité, pendant 5 jours (Berber *et al.*, 2009).

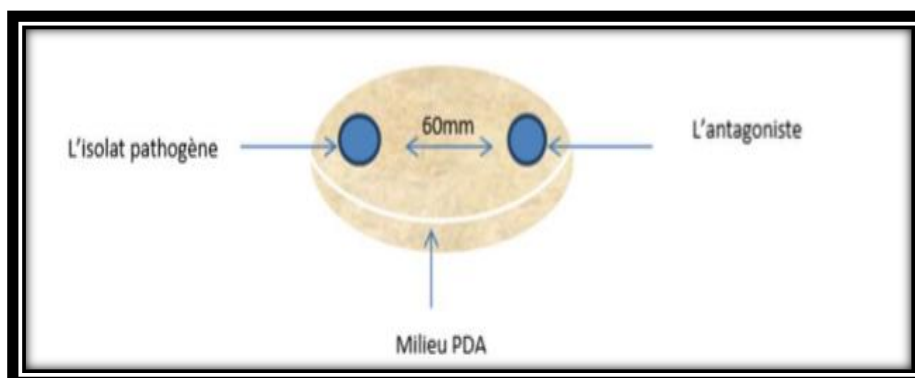


Figure 21 : Confrontation directe de l'antagoniste *Trichoderma longibrachiatum* et l'isolat pathogène par contact direct sur milieu *PDA* (Hibar, 2005).

4.2.3. Mesure de l'inhibition de la croissance mycélienne

Pour déterminer le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de l'agent pathogène causée par l'agent antagoniste *Trichoderma longibrachiatum*, des mesures du diamètre des colonies fongiques sont effectuées. Le taux d'inhibition de la croissance est calculé selon la formule suivante (Rapily, 1968).

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

DT : croissance diamétrale du témoin.

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

IC% : Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne.

4.2.4. Examen microscopique de la confrontation directe

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration au bleu de Cotton. La manipulation consiste à mettre un petit fragment mycélien prélevé d'une boîte de la confrontation directe de l'antagoniste vis-à-vis l'isolat pathogène, sur une lame contenant une goutte du bleu Cotton, et le dilacéré légèrement, puis le recouvrir délicatement d'une lamelle en évitant de créer des bulles d'air ou des débordements (Botton *et al.*, 1990). Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (Chabasse, 2002).

L'examen microscopique permet d'observer et de détecter le moyen de lutte utilisé par la souche antagoniste *Trichoderma longibrachiatum* à l'égard des souches phytopathogènes testées.

Résultats et discussion

5. Résultats et discussion

5.1. Réactivation de la souche fongique

Après 7 jours d'incubation, la souche fongique *Trichoderma longibrachiatum* montrée un développement avec une bonne sporulation sur le milieu PDA (**Figure 22**).

Trichoderma longibrachiatum a un aspect où les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compacté en touffe. Le mycélium d'abord coloré en blanc et au fil du temps devient d'une couleur verdâtre bien visible sur les parties aériennes du mycélium correspondant à la conidiogénèse.

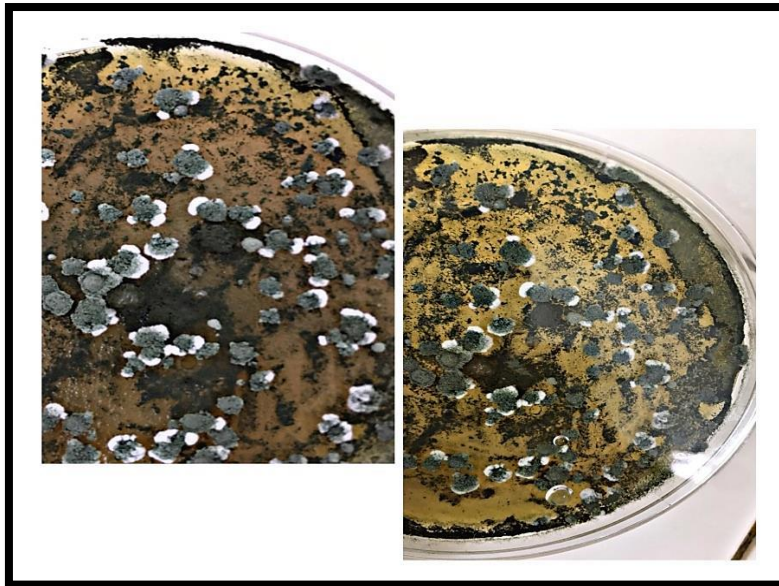


Figure 22 : Aspect macroscopique de la souche *Trichoderma longibrachiatum* sur milieu PDA âgée de 7 jours.

5.2. Fermentation et extraction des métabolites secondaires

La production de métabolites secondaires par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*, est effectuée par fermentation sur milieu solide (le son de blé).

Les résultats de la croissance de la moisissure sur son de blé (**Figure 23**) montrent un aspect fongique de couleur blanchâtre qui devient verdâtre au fur et à mesure de la durée d'incubation.

Ce substrat fermenté contient les métabolites secondaires libérés par cette souche.



Figure 23 : Développement de la souche *Trichoderma longibrachiatum* sur le son de blé après différentes durées d'incubation.

5.3.Extraction des substances actives de *T.longibrachiatum*

Après les fermentations de 7jours ; 8jours et 10jours, le contenu de chaque erlenmeyer subi une extraction par Soxhlet en utilisant deux solvants organiques (l'acétate d'éthyle et le n-butanol) à 70°C pendant 6 heures.

L'extrait obtenu par Soxhlet est évaporé à sec (à l'aide du rotavapor), à 45°C pour l'acétate d'éthyle et à 55°C pour le n-butanol. Enfin et une fois sec, les extraits sont remis en solution dans le méthanol et gardés dans des flacons en verre pour tester les activités antibactérienne et antifongique (**Figure 24**).

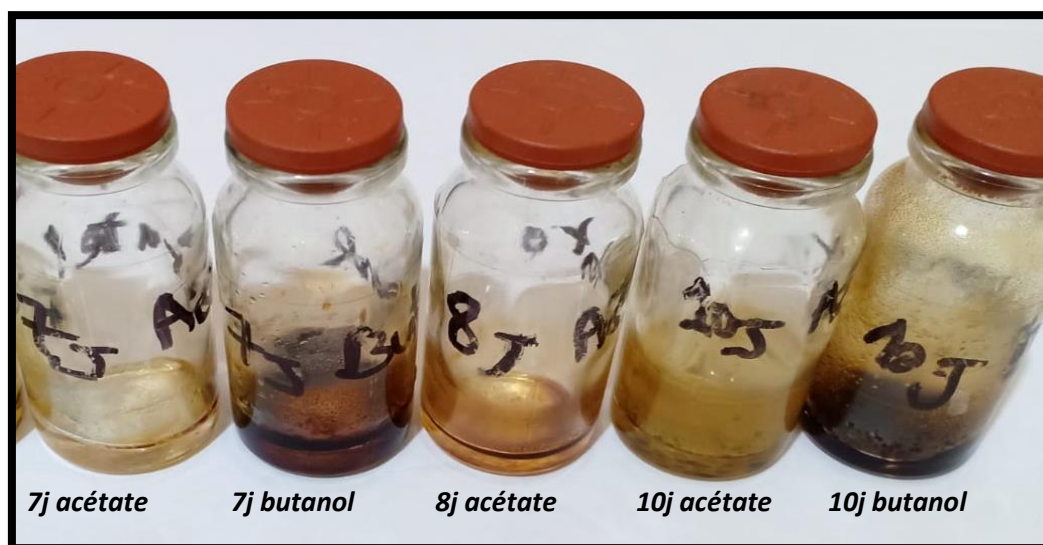


Figure 24 : les extraits obtenus par extraction de métabolites secondaires de la souche *Trichoderma longibrachiatum*.

5.4.Détermination de rendement

Pour chaque extrait, nous avons calculé le rendement de l'extraction (**R%**) selon la formule ci-dessous. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 25**.

$$R\% = \frac{\text{Masse d'extraction}}{\text{Masse d'extraits}} \times 100$$

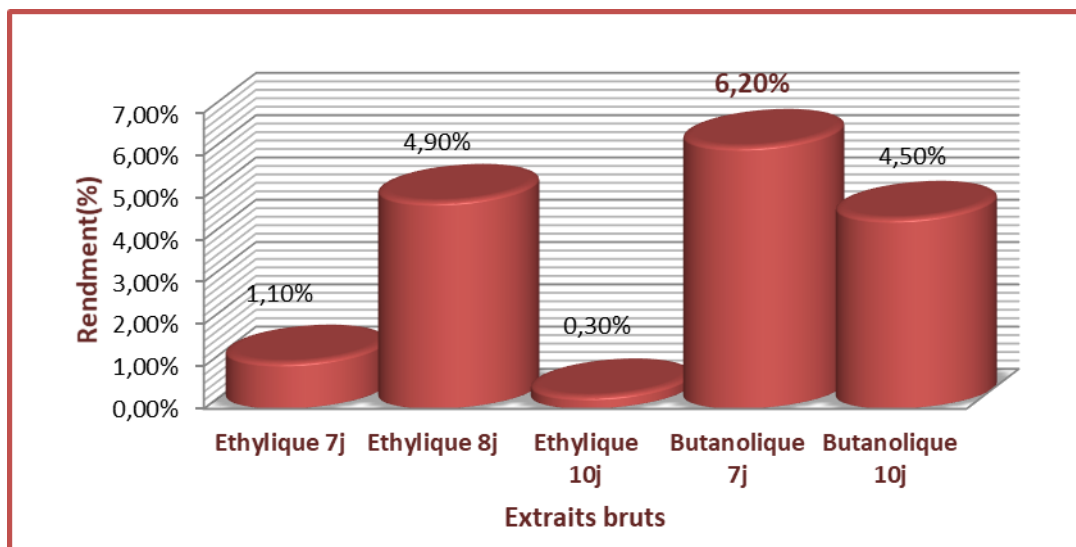


Figure 25 : Le rendement (R%) des extraits bruts.

L'analyse de l'histogramme mentionné dans la **figure 25**, montre que le rendement le plus élevé des extraits éthyliques est celui obtenu après 8 jours d'incubation, et évalué à **4,9%**, suivi par l'extrait de 7 jours à **1,1%**, et le plus faible est celui de l'extrait éthylique de 10 jours (**0,3%**). En revanche, les extraits butanoliques ont enregistré les rendements les plus élevés par rapport aux extraits précédents, dont **6,2%**, et **4,5%** pour 7 jours et 10 jours, respectivement. Donc d'après ces résultats, le meilleur rendement des extraits éthyliques est celui de 8 jours, ainsi que celui des extraits butanoliques est de 7 jours.

Par conséquent, la production des métabolites secondaires expliquerait le meilleur rendement pendant la phase stationnaire qui s'étale entre 7 et 8 jours d'après les résultats.

Par ailleurs, 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 méthode de la fermentation en milieu solide à raison de sa simplicité, de son coût faible, de sa productivité et de son rendement élevé. D'après Sarhy-Bagnon *et al.*, (2000), les premiers travaux de la production de 6-pentyl- α pyrone par fermentation en milieu

solide (FMS), ont montré que la production du 6-PP par *T. harzianum* était possible sur la bagasse de canne à sucre imprégnée d'un milieu liquide.

Par ailleurs, De Souza Ramos *et al.*, (2008) ont optimisé la production du 6-pentyl- α pyrone par *T. harzianum* 4040. Après fermentation en conditions optimales, cette souche a produit et donnée un rendement en métabolites secondaires 6-PP, évalué à 0.8mg/g de substrat sec.

En effet, les rendements importants obtenus par FMS pour la production de 6-PP et des conidies, indiquent que ce mode de culture a des potentialités intéressantes pour la production de ces derniers.

D'après Sarhy-Bagnon *et al.*. (2000) ont trouvés un rendement en 6-PP de 2.8mg/g de matière sèche, par la souche *Trichoderma harzianum* IM 206040. Par contre, l'équipe de Serrano-Carreón (2004), ont trouvés un rendement élevé en 6-PP, produit par la même souche, mesuré à 6.4mg/g de matière sèche.

5.5.Séparation des métabolites secondaires par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des métabolites (**Figure 26**).

La plaque de silice est révélée par la lumière UV à 254 nm et par un révélateur chimique (**annexe 1**), après avoir utilisé 2 systèmes solvants ; Acétate d'éthyle / Chloroforme (2/18 ; V/V) et Méthanol / Chloroforme (4/16 ; V/V).

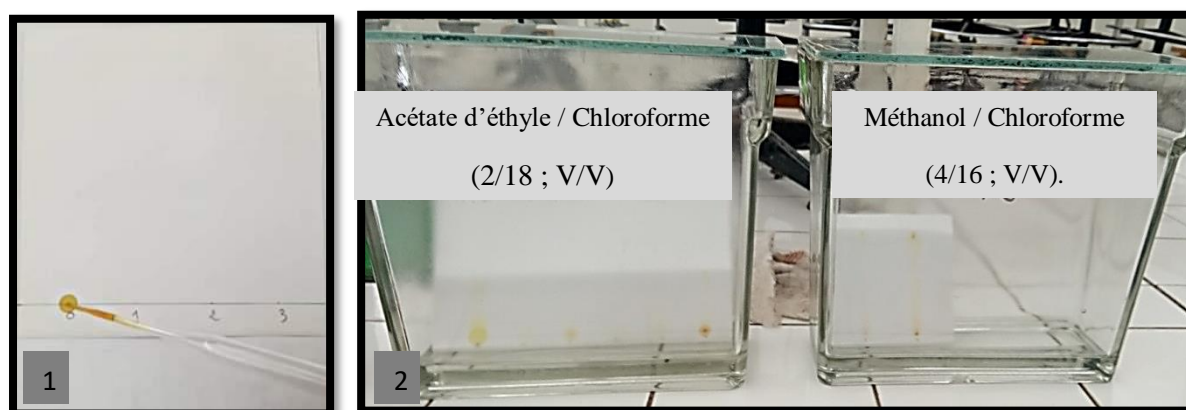


Figure 26 : Chromatographie sur couche mince ; 1 : Dépôt des extraits sur la plaque CCM ; 2 : Migration des molécules sur la plaque CCM, dans les deux systèmes solvants utilisé.

Les résultats obtenus, après migrations des extraits dans les deux systèmes solvants utilisés, sont présentés dans les figures 27 (Système1 : Acétate d'éthyle / Chloroforme (2/18 ; V/V)), et 28 (Système 2 : Méthanol / Chloroforme (4/16 ; V/V)).

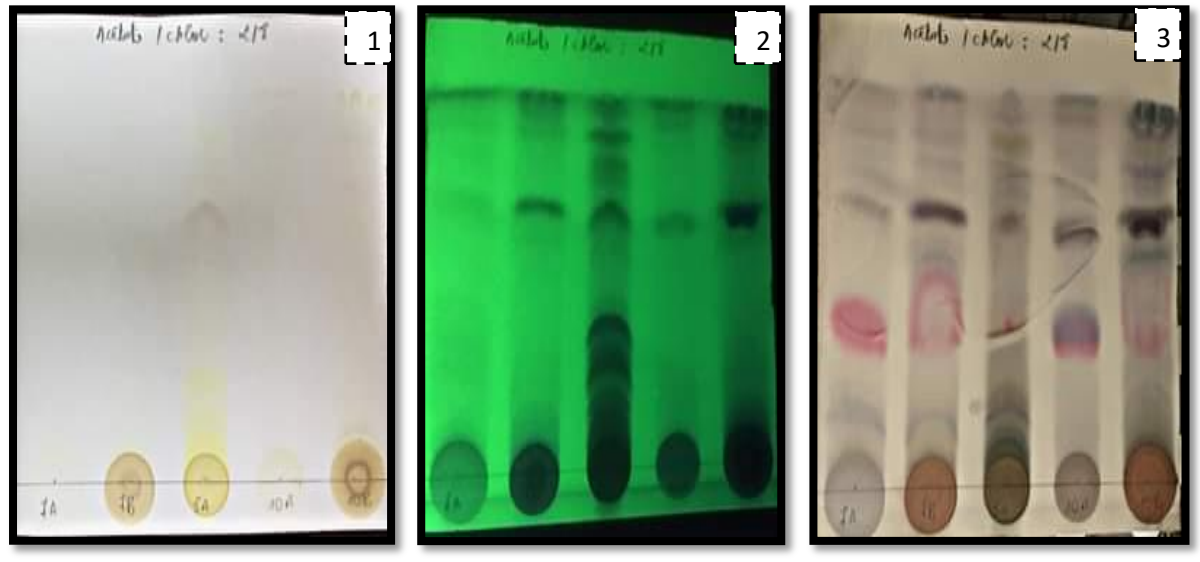


Figure 27 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des substances actives produites par *T. longibrachiatum*. Après 7, 8 et 10 jours selon le système [Acétate d'éthyle / Chloroforme (2/18 ; V/V)] ; 1 : Plaque chromatographique observé par lumière visible ; 2 : Plaque chromatographique observé sous la lampe UV à 254 nm ; 3 : Plaque chromatographique révélée par un révélateur chimique.

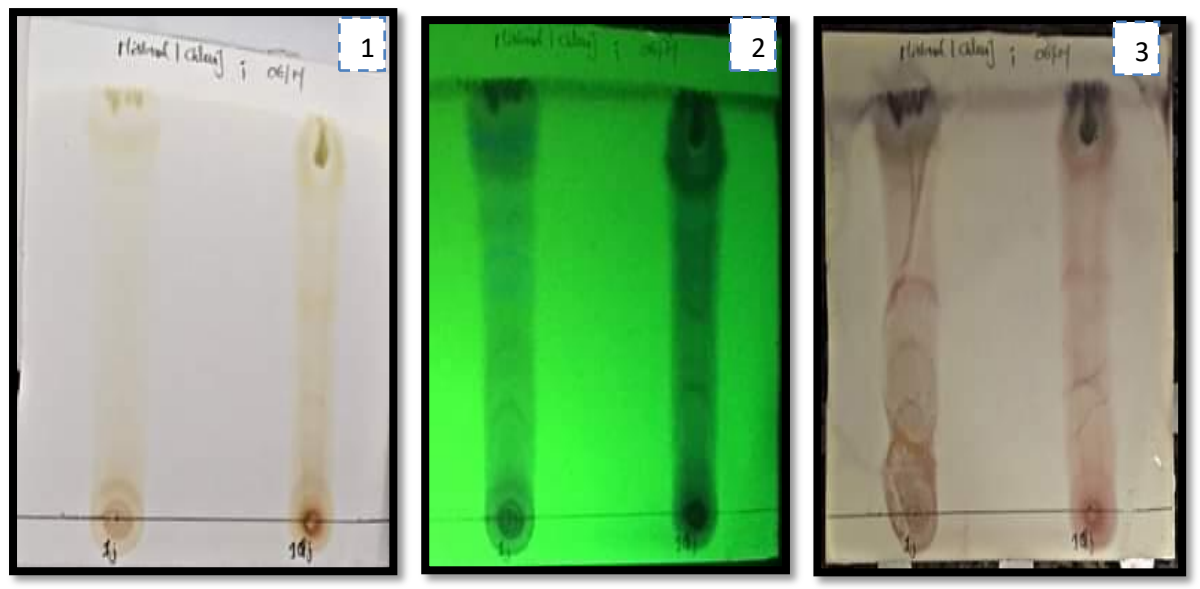


Figure 28 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des substances actives produites par *T. longibrachiatum*, après 7,8 et 10 jours selon le système [Méthanol / Chloroforme (4/16 ; V/V)] ; 1 : Plaque chromatographique observé par lumière visible ; 2 : Plaque chromatographique observé sous la lumière UV à 254 nm ; 3 : Plaque chromatographique révélée par un révélateur chimique.

Suite à l'observation sous la lampe UV (254 nm) et la révélation chimique (**Figure 27et 28**), les résultats de la CCM confirment la présence de métabolites secondaires dans les différents extraits, récupérés après fermentation par la souche *Trichoderma longibrachiatum*.

Pour chaque extrait, on observe différents métabolites qui ont migré selon leur polarité avec les deux systèmes éluant essayés ; Acétate d'éthyle / Chloroforme (2/18 ; V/V) et Méthanol / Chloroforme (4/16 ; V/V).

En comparaison des deux systèmes éluant essayés, le premier système a présenté une migration avec une bonne séparation des métabolites par rapport au deuxième système.

La chromatographie montre l'apparition des spots majoritaires pour les cinq extraits (**Tableau 06**), ce qui reflète l'existence d'une quantité importante de molécules dans chaque extrait, surtout pour l'extrait éthylique de 8jours qui a enregistré la présence de 24 spots, suivi par l'extrait éthylique de 7jours avec 13 spots, puis l'extrait butanolique de 10jours avec 12 spots, et finalement, les extraits éthyliques de 10 jours et butanoliques de 7 jours avec 11 spots (pour chacun deux).

Aussi, on note l'apparition des spots dans les mêmes niveaux et avec les mêmes couleurs, pour les fractions (7jA, 7jB) et (10jA, 10jB), cela peut être expliqué par l'existence de mêmes molécules dans les quatre fractions à la fois.

D'après l'étude de Kahlouche et Meziane, (2017). Le résultat montre que les composés antibactériens actifs ont plusieurs points fluorescents sombres sous une lumière UV ainsi des valeurs Rf différentes. Après une révélation des plaques CCM des extraits fongiques par les différentes radiations UV et à lumière visible elles ont notées l'apparition de 15 spots pour la souche *Aspergillus sp1*, 28 spots pour la souche *Aspergillus sp2* et 33 spots pour la souche *Aspergillus sp3*.

5.5.1. Détermination des rapports frontaux Rf

Pour chaque spot (S), nous avons calculé le rapport frontal (Rf), selon la formule ci-dessous. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

$$Rf = \frac{X}{Y}$$

Tableau 06 : Rapports frontaux des spots obtenus pour chaque extrait brut.

	7jA	8jA	10jA	7jB	10jB
S1	0,05	0,06	0,08	0,09	0,08
S2	0,10	0,09	0,35	0,13	0,09
S3	0,16	0,12	0,38	0,35	0,13
S4	0,20	0,13	0,39	0,38	0,21
S5	0,22	0,14	0,46	0,55	0,59
S6	0,40	0,15	0,64	0,60	0,60
S7	0,75	0,20	0,79	0,68	0,68
S8	0,83	0,25	0,85	0,81	0,71
S9	0,88	0,26	0,92	0,92	0,81
S10	0,90	0,29	0,99	0,96	0,91
S11	0,96	0,30	1	1	0,97
S12	0,99	0,31			1
S13	1	0,35			
S14		0,43			
S15		0,49			
S16		0,52			
S17		0,71			
S18		0,80			
S19		0,84			
S20		0,88			
S21		0,91			
S22		0,93			
S23		0,99			
S24		1			

A : acétate d'éthyle

B : Butanol

L'analyse des résultats mentionnés dans le **tableau 6**, montre que les rapports frontaux des spots obtenus diffèrent selon les extraits. On remarque une compatibilité entre certains rapports frontaux comme le **Rf = 0,08** mesuré dans chacun des deux extraits de 10jA et 10jB, ainsi le **Rf = 1** mesuré dans tous les extraits bruts obtenus, on trouve aussi le **Rf = 0,99** mesuré dans chacun des extraits bruts de 7jA, 8jA et 10jA, un autre **Rf = 0,09** mesuré dans chacun des extraits bruts de 8jA et 10jB. On note plusieurs autres rapports frontaux compatibles entre ces extraits bruts qui traduisent la présence de la même molécule ou la même couleur des spots sur la plaque de CCM.

Dans ce contexte, la chromatographie sur couche mince de l'extrait de *Trichoderma hazianum* 127 a, a permis de révéler la présence de peptaïbols apparus sous forme de tache colorée en vert olive clair et un $R_f = 0,11$ (Messikh et Briek, 2019).

5.6. Etude de l'activité biologique








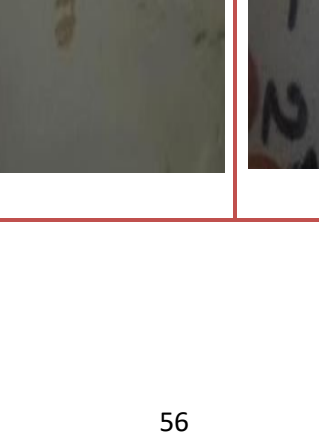

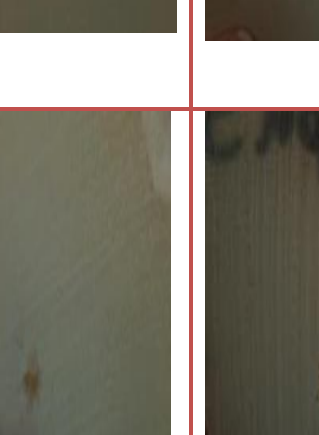
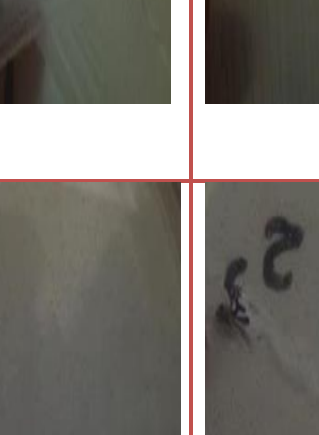
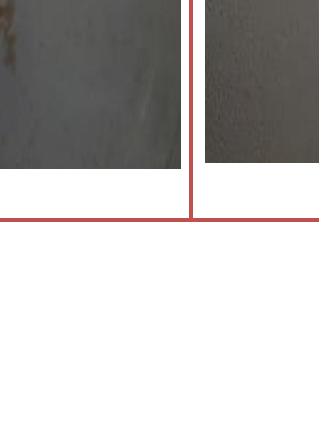
5.6.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits fongiques est testée par la méthode de grattage des spots obtenus sur les plaques de la CCM.

La méthode utilisée pour étudier l'activité antibactérienne est la diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Grâce à sa spécificité et à sa composition, ce milieu permet une bonne croissance aux bactéries-tests tout en offrant des résultats clairs. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage afin d'assurer une distribution uniforme de l'inoculum bactérien sur la gélose, et de faciliter la diffusion des molécules actives (Horikawa *et al.*, 1999 ; Woo *et al.*, 2002).

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des extraits par l'utilisation de leurs spots grattés, sur trois souches tests (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) (**Tableau 07**).

Tableau 07 : Activité antibactérienne des extraits fongique selon la technique de grattage des spots, après 24 heures d'incubation à 30°C.





	Témoins	S1	S2	S3
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>Staphylococcus aureus</i>				
<i>Escherichia coli</i>				

Après 24h d'incubation des boîtesensemencées par les bactéries testées, avec dépôt des spots choisis de la plaque CCM de 8 jours (S1, S2 et S3) (**Figure 19**), les résultats obtenus récapitulés dans le tableau 7, indiquent une activité antibactérienne seulement contre *Bacillus subtilis*, et le S3 a présenté une légère activité contre *Staphylococcus aureus* traduite par une zone d'inhibition, susceptible de disparaître au bout de 48h pour cette dernière, à l'opposé de *Bacillus subtilis*.

Par contre, *Escherichia coli* montre une résistance contre tous les spots (S1, S2 et S3), et *Staphylococcus aureus* montre une résistance contre les spots (S1 et S2) et par la suite, contre S3.

En effet, l'activité biologique indique que le sorbicilline qui est un composé connu, et identifié à partir de *Trichoderma longibrachiatum*, présente une activité modérée contre *Bacillus brevis* et *Bacillus subtilis* (Li et al., 2019).

Tableau 08 : Activité antibactérienne des extraits fongiques selon la technique de grattage des spots, contre *Bacillus subtilis*, après 48 heures d'incubation à 30°C.

Témoin (<i>Bacillus subtilis</i>)	S1	S2	S3
			

Après 48h d'incubation, les spots S1, S2 et S3 ont montré une bonne activité contre *Bacillus subtilis* ce qui est expliqué par l'apparition des zones d'inhibitions stables et visibles (**Tableau 08**).

Ce test a prouvé la capacité de la souche *Trichoderma longibrachiatum* à produire des substances biologiquement actives.

En effet, *Trichoderma* est réputé pour sa production d'une large variété de métabolites secondaires estimé à plus de 100 composés dotés d'activités antibiotiques (Aiteche *et al.*, 2018). Plusieurs espèces du genre *Trichoderma* produisent une grande variété de peptaïbols, qui font partie d'une classe d'antibiotiques. Grâce à leurs charges positives, ces molécules se déposent facilement à la surface des bactéries de charge négative, certains sont actifs sur les bactéries GRAM positif, d'autres sur les bactéries GRAM négatif, tandis que d'autres sont actifs sur les deux groupes (Cosette *et al.*, 1999).

D'après l'étude de Irobi *et al.*, (2000) l'espèce fongique *Aspergillus quadrilineatus* a une activité antimicrobienne remarquable contre *S.aureus* et *B. subtilis*. Aussi Niedege *et al.*, (2002) ont montrés que *A. fumigatus* a une activité antimicrobienne remarquable contre *S.aureus*, *Candida albicans* et *Micrococcus luteus*.

5.6.2. Activité antifongique




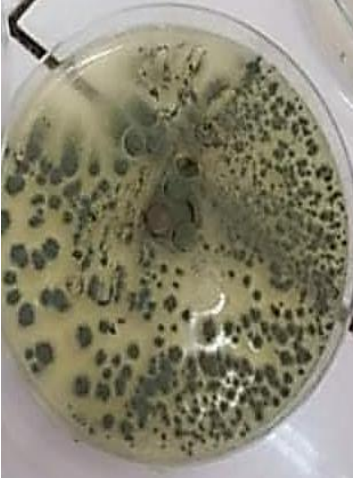

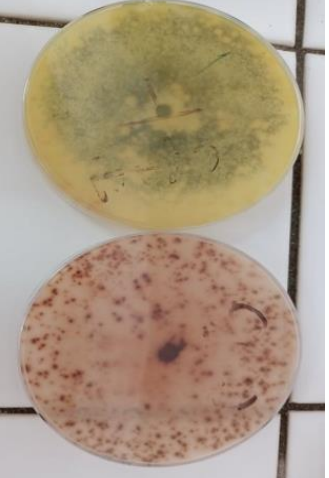
Nous avons étudié le pouvoir antagoniste de la souche *Trichoderma longibrachiatum* contre les souches phytopathogènes du citronnier appartenant aux genres suivants : *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Cladosporium* selon deux méthodes :


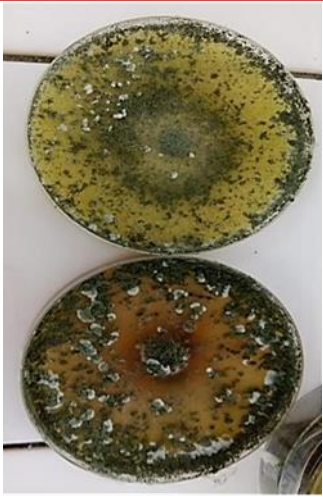
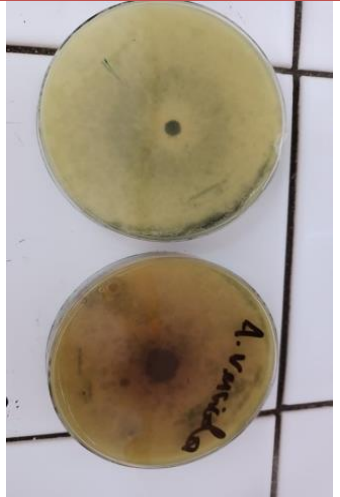

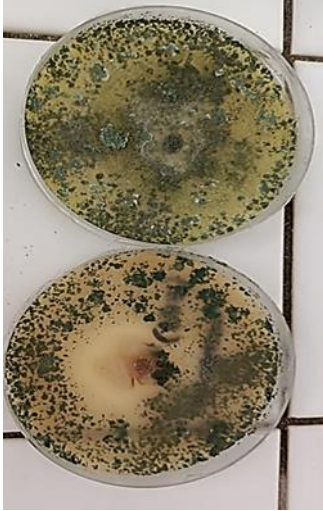


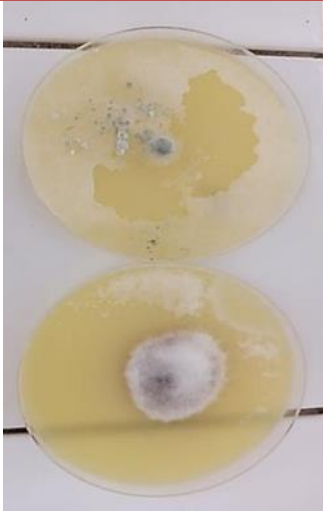

5.6.2.1.Confrontation à distance

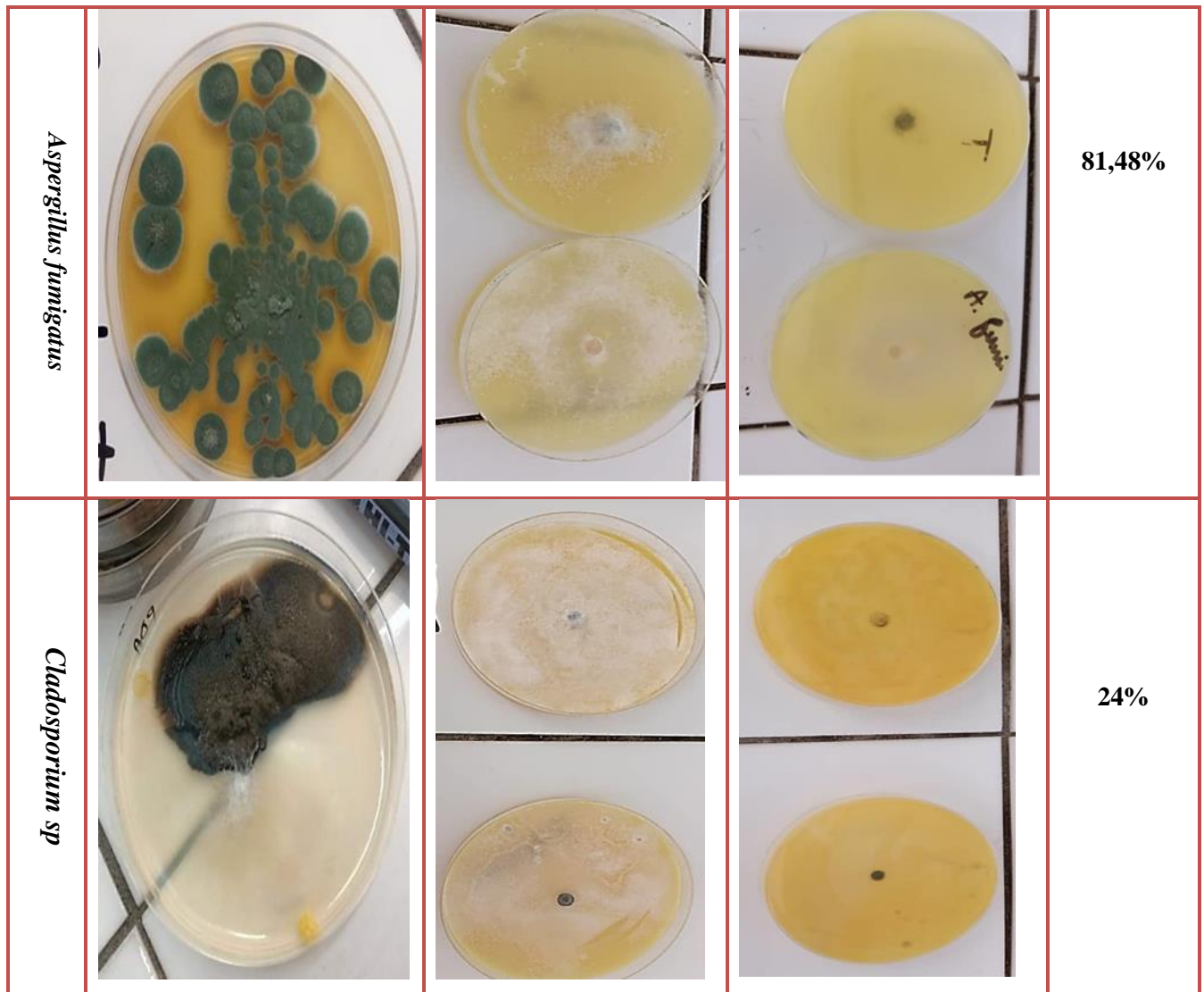
Ce test nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance de la souche *T.longibrachiatum*, exercé vis-à-vis les isolats (*Penicillium camembertii*, *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium solani*, *Alternaria sp*, *Aspergillus fumigatus* et *Cladosporium sp*) par la sécrétion des substances antifongiques volatiles (**Tableau 09**). Le taux d'inhibition de la croissance est calculé selon la formule suivante :

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

Tableau 09 : Activité antifongique de la souche antagoniste *Trichoderma longibrachiatum* (boite en haut), à l'égard des isolats pathogènes (boite en bas), selon la confrontation à distance.

L'isolat	Après incubation à 30°C, pendant 6 jours.			Pourcentage d'inhibition
	Témoin	Recto	Verso	
<i>Penicillium camemberti</i>				56,63%
<i>Penicillium requesfortii</i>				3,5%

<p><i>Aspergillus versicolor</i></p>				<p>76,76%</p>
<p><i>Fusarium solani</i></p>				<p>35%</p>
<p><i>Alternaria sp</i></p>				<p>60%</p>



Dans le cas de la confrontation à distance, les résultats obtenus montrent un ralentissement de la croissance mycélienne des isolats (*Penicillium camembertii*, *Penicillium roquefortii*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium solani*, *Alternaria sp*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium sp*) exercé par *T.longibrachiatum* (**Tableau 09**), et ça malgré l'absence de contact direct entre l'agent antagoniste et l'agent pathogène, ce qui indique que *Trichoderma longibrachiatum* agit seulement par la production de substances antifongiques qui sont capables de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène (Biljana et Jugoslav, 2012), ce qui provoque la décoloration de la colonie et la perte d'une sporulation, comme s'est montré dans le Tableau 9. Aussi, une réduction significative de la croissance des isolats en présence de *T.longibrachiatum*, comparativement aux témoins.

L'analyse de l'histogramme mentionné dans la **Figure 29**, montre une inhibition de la croissance des agents pathogènes avec un haut pourcentage d'inhibition de **81 ,48%** contre A.

fumigatus suivi par *A. versicolor* avec **76,76%**, ensuite **60%** pour *Alternaria sp*, **56,63%** pour *P. camembertii*. De ces résultats, les isolats pathogènes testés s'avèrent être sensible aux substances volatiles secrétés par *T.longibrachiatum*. En revanche, les métabolites volatiles de cette dernière se sont avérés inefficaces, dont **35%** contre *Fusarium solani*, **24%** contre *Cladosporium sp* et un très bas pourcentage d'inhibition de **3,5%** contre *P. roquefortii*.

D'après Ghorri (2015) ; le pourcentage d'inhibition de *Trichoderma longibrachiatum* (codé par TT2) contre *Fusarium solani* (codé par FP2), est évalué à **29%**, ce dernier est proche de nos résultats (**35%**).

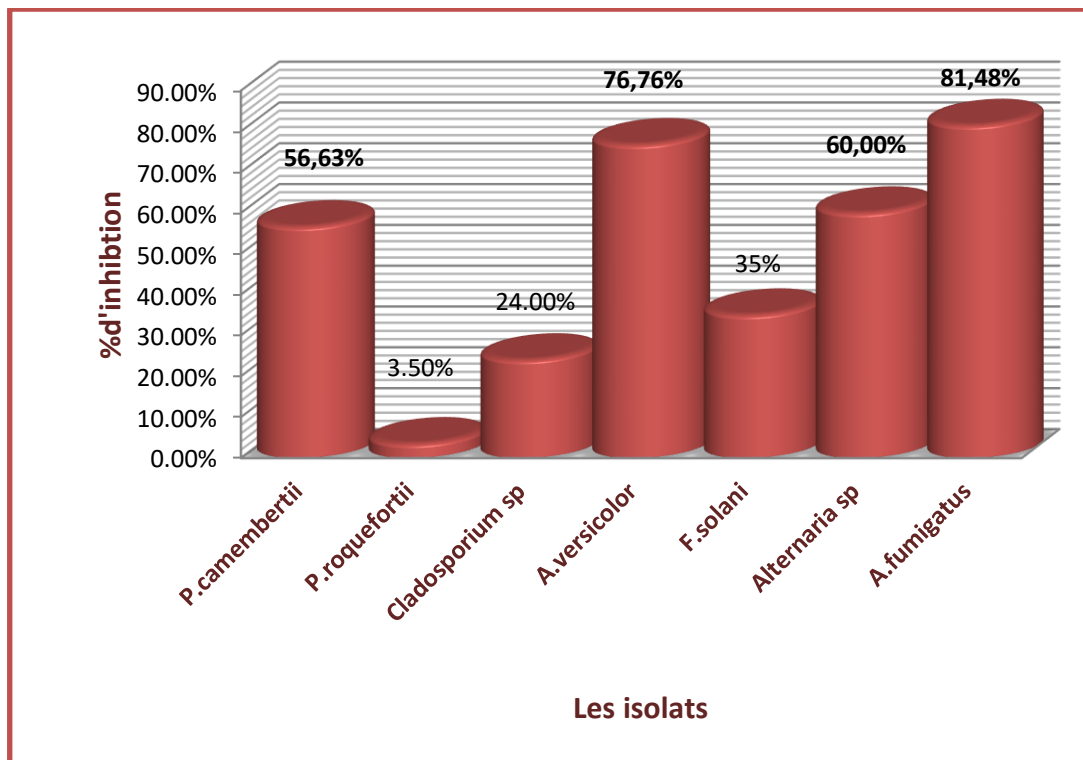


Figure 29 : Pourcentages d'inhibition des isolats fongiques par *Trichoderma longibrachiatum*, selon la confrontation à distance.

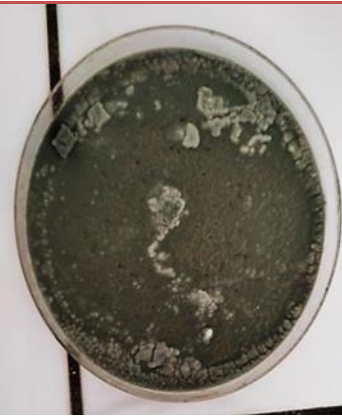
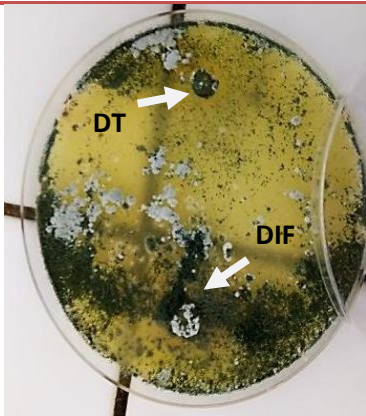

5.6.2.2.Confrontation directe


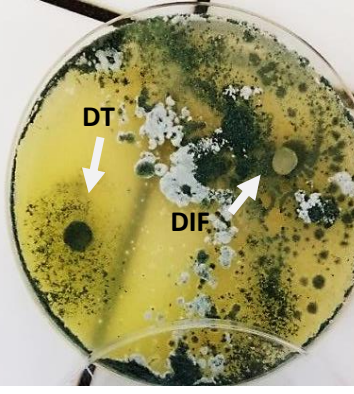


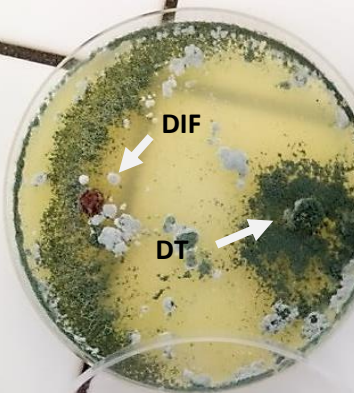


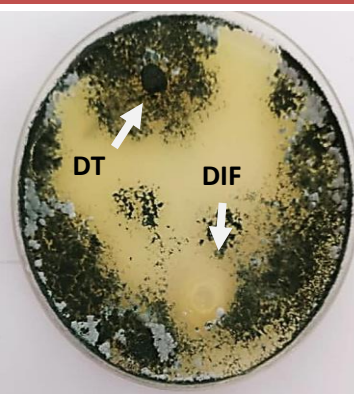


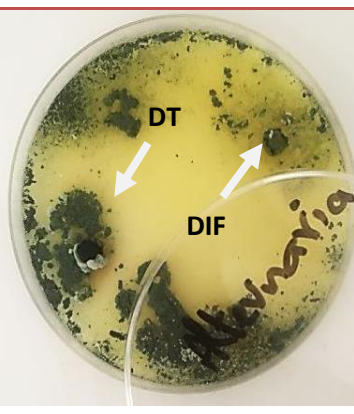
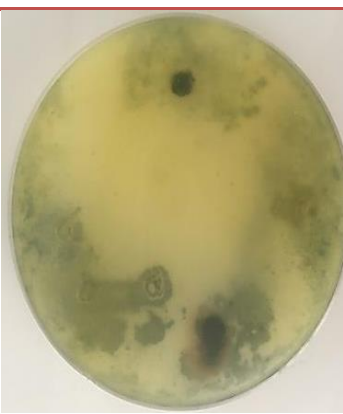
Les résultats de la confrontation directe de la souche antagoniste *Trichoderma longibrachiatum*, contre les champignons phytopathogènes testés (**Tableau 10**) montrent une croissance rapide de *T.longibrachiatum* avec un envahissement complet de toute la surface des boîtes.

D'après la comparaison avec les isolats pathogènes témoins, ces derniers présentent, une croissance importante en absence de la souche antagoniste. Par contre, en présence de cette dernière, on note l'absence totale de la croissance des souches pathogènes, ce qui explique l'effet inhibiteur puissant de la souche *T.longibrachiatum* contre les souches phytopathogènes testées.

Remarquant aussi, les pourcentages d'inhibition obtenue (100%) pour toutes les souches montrent une sensibilité totale des souches pathogènes, d'une part, et de l'autre part, une action inhibitrice très forte de la part de *T.longibrachiatum*. Ce résultat est expliqué par la production des molécules bioactives vis-à-vis les souches phytopathogènes. En effet, elle colonise le milieu de culture et assimile les éléments nutritifs, autrement ce phénomène est appelé compétition. Ces résultats peuvent être aussi expliqués par un autre phénomène qui est l'antibiose, qui est due à la sécrétion de substances agissant comme étant des antibiotiques et qui inhibent aussi la croissance du pathogène (Haran, 1996 ; Zhihe, 1998). Le parasitisme est aussi présent comme un enroulement des hyphes de *T.longibrachiatum* autour des isolats phytopathogènes pour appliquer l'effet inhibiteur de celui-ci (Ezziymani, 2004).

Tableau 10 : Activité antifongique de la souche antagoniste *Trichoderma longibrachiatum*, à l'égard des isolats pathogènes, selon la confrontation directe (DT : disque *Trichoderma longibrachiatum*, DIF : disque de l'isolat fongique).

L'isolat	Après incubation à 30°C, pendant 6 jours			Pourcentage d'inhibition
	Témoin	Recto	Verso	
<i>Penicillium canembartii</i>				100%

<p><i>Penicillium requefortii</i></p>				<p>100%</p>
<p><i>Aspergillus versicolor</i></p>				<p>100%</p>
<p><i>Fusarium solani</i></p>				<p>100%</p>
<p><i>Alternaria sp</i></p>				<p>100%</p>

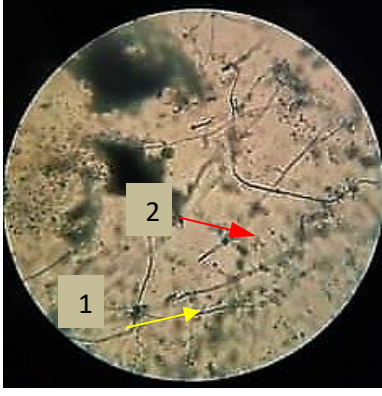
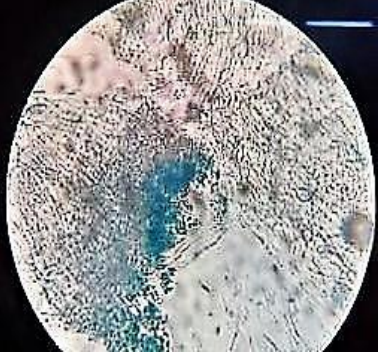

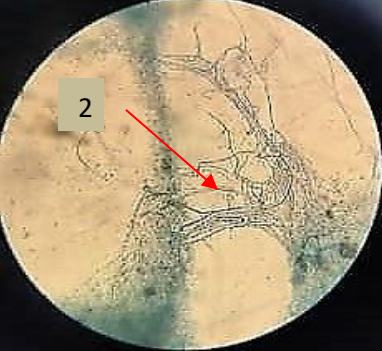
<i>Aspergillus fumigatus</i>				100%
<i>Cladosporium</i> sp				100%

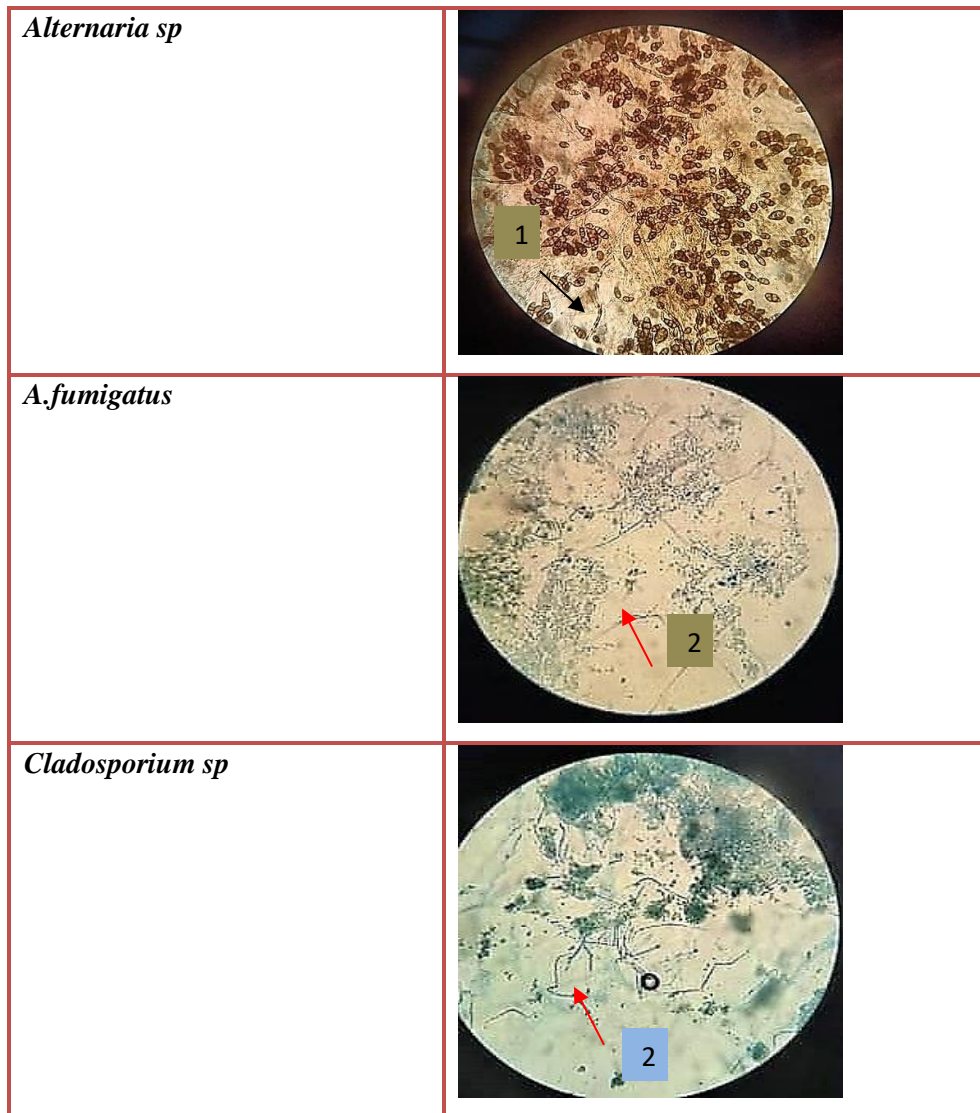
5.7.Examen microscopique de la confrontation directe

Après 7 jours d'incubation des boîtes de la confrontation directe, à 30°C, un examen microscopique est réalisé au niveau de la zone de contact entre les deux protagonistes (*T.longibrachiatum* et l'isolat pathogène) (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Examen microscopique de la confrontation directe.

L'isolat	Examen microscopique
<i>Témoin (T.longibrachiatum)</i>	

<p><i>P.camembertii</i></p>	 <p>A circular micrograph showing a network of thin, branching hyphae. A yellow arrow points to a hypha labeled '1', and a red arrow points to a hypha labeled '2'. The background is a light brownish-tan color.</p>
<p><i>P.roquefortii</i></p>	 <p>A circular micrograph showing a dense, tangled mass of hyphae. A blue stain is visible in the lower-left quadrant. A white scale bar is present in the upper-right corner.</p>
<p><i>P.Versicolor</i></p>	 <p>A circular micrograph showing a network of hyphae. A blue stain is visible in the lower-left quadrant. A black arrow points to a hypha labeled '3'.</p>
<p><i>F. solani</i></p>	 <p>A circular micrograph showing a dense, tangled mass of hyphae. A red arrow points to a hypha labeled '2'.</p>



(1) : Un enroulement autour des hyphes de l'agent pathogènes.

(2) : Une lyse des mycéliums de l'agent pathogène.

(3) : Une vacuolisation et une formation des chlamydozoospores.

Les 7 isolats (*P.camembertii*, *P.requefortii*, *A.versicolor*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *A.fumigatus*, *Cladosporium sp*) confrontés avec *Trichoderma longibrachiatum* ont montré des modifications profondes au niveau de leurs mycéliums (**Tableau 11**). Par conséquent, le mycoparasitisme s'exerce par un enroulement au tour des hyphes de son hôte de *T.longibrachiatum* sur celui de *P.camembertii* (1), ils sont fixés par des liaisons covalentes, la pénétration s'exerce à l'aide de crochets et par la formation d'un appressorium qui est un système utilisé pour pénétrer dans une cellule hôte par la sécrétion de chitinases et de β 1-3 glucanases qui dissolvent la paroi de l'hôte (Pierre,1996 ; Benitez *et al.*,2004), et une lyse des mycéliums

des pathogènes (2), suivie par une digestion des contenus plasmiques grâce à la production des enzymes et se traduit par la force de pression occasionnée par l'enroulement du mycélium de *T.longibrachiatum* au tour du mycélium de *Fusarium sp* (Howell *et al.*, 2003). Autrement, les *Trichoderma* produisent aussi des enzymes dégradant les parois cellulaires des champignons pathogènes (Elad *et al.*, 1982). En effet, les interactions de *Trichoderma* avec plusieurs espèces phytopathogènes entraînent aussi la mort ou l'inactivation des hyphes de l'agent pathogène qui seront envahis plus facilement par les hyphes de l'antagoniste (Askary *et al.*, 1997 ; Bahous *et al.*, 2008). Ainsi une vacuolisation et une induction du vieillissement précoce par une formation des chlamydo-spores (3). En plus de son effet inhibiteur, *Trichoderma* est aussi capable d'induire une résistance localisée et systémique. A cet effet, l'amélioration de la croissance des plantes par *Trichoderma* peut prendre lieu, soit au niveau de la plante (Yedida *et al.*, 2001), soit au niveau du sol (Chang *et al.*, 1986; Harman, 2000).

En effet, *Trichoderma* est résistante aux cyanures, et produit deux différentes enzymes qui sont capables de dégrader les cyanures dans la zone racinaire (Ezzi et Lynch, 2002). Ce champignon peut augmenter aussi la croissance racinaire, comme il peut détruire les métabolites toxiques produits par la microflore et contrôle directement les pathogènes des racines.

Bereber, (2009) a rapporté que *Trichoderma sp* agit par mycoparasitisme, et connue comme un agent de lutte biologique. Plusieurs recherches ont confirmé l'efficacité de cette méthode de lutte dans la protection des cultures à importance économique (Ladjel et Benkhaled, 2017).

Certains champignons sont aussi utilisés dans la lutte biologique, entre autres : *Talaromyces flavus*, *Ghocladium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus giganteus*, *Penicillium chrysogenum*. Ces derniers ont montré une activité contre plusieurs phytopathogènes (Whipps, 2001), particulièrement contre les flétrissements vasculaires qui représente la maladie qui affecte le système vasculaire des plantes, causés par les différentes formes spéciales de *Fusarium oxysporum*.

Conclusion et perspectives

La présente étude a pour objectif, l'extraction des métabolites secondaires de la moisissure *T. longibrachiatum*, tester leurs effet sur certaines bactéries testes d'un côté, et de l'autre côté exploiter les aptitudes antagonistes de cette moisissure pour la lutte biologique contre des champignons pathogènes du citronnier.

D'abord, la culture de la souche *T. longibrachiatum* est effectuée par fermentation sur milieu solide, dans des erlens meyers de 250 ml, à raison de 10 g de son de blé par erlen. Le substrat de fermentation est humidifié à 70%, avec une solution de glucose et de sels minéraux. Après inoculation et incubation des erlens de culture à 30°C, pendant différentes durée de temps (7, 8 et 10 jours), nous procédons à une extraction des métabolites secondaires recherchés selon la technique solide-liquide, par deux solvants organiques (l'acétate d'éthyle et le n-butanol) en utilisant l'extracteur Soxhlet. L'extrait obtenu par ce dernier est, évaporé à l'aide du rotavapor, et récupéré dans une solution de méthanol. Ensuite la séparation des métabolites contenus dans ce dernier est réalisée par la chromatographie sur couche mince en utilisant deux systèmes éluants (système 1 : Acétate d'éthyle / Chloroforme (2/18 ; V/V), et système 2 : Méthanol / Chloroforme (4/16 ; V/V). Quelques activités biologiques sont aussi évaluées, l'activité antibactérienne de la souche *Trichoderma longibrachiatum* est effectuée par la technique de grattage des spots de la CCM sur trois bactéries testes (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*). L'activité antifongique est aussi testée, contre des moisissures pathogènes du citronnier (*Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, et *Cladosporium*) selon une confrontation à distance et une confrontation directe.

L'ensemble de ces travaux a permis de :

- ✓ Développer le mode de fermentation sur substrat solide afin de produire des métabolites secondaires bioactifs ;
- ✓ Découvrir la technique d'extraction solide-liquide des métabolites secondaires, par l'utilisation de l'appareil Soxhlet ;
- ✓ Montrer que le meilleur rendement est obtenu dans l'extrait butanolique de 7jours (6,2%) ;
- ✓ Montrer que la séparation des métabolites par la chromatographie sur couche mince confirme la richesse des extraits en quantités importantes de molécules (24 spots pour l'extrait éthylique de 8jours).

Conclusion et perspectives

- ✓ Confirmer le pouvoir antibactérien de la moisissure *T.longibrachiatum* contre *Bacillus subtilis*, et une forte activité antifongique dans la confrontation directe contre les isolats pathogènes du citronnier (inhibition à 100%). En revanche, la confrontation à distance est variable, une faible inhibition (3.5%) contre *Penicillium roquefortii* (souche résistante), et une très bonne inhibition (81.48%) contre *Aspergillus fumigatus* (souche sensible).
- ✓ Découvrir un des mécanismes d'action (le mycoparasitisme) de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* pour lutter et inhiber la croissance des isolats testés.

Sachant que le genre *Trichoderma* est très utilisé comme un agent actif dans la lutte biologique grâce à ses mécanismes d'action et sa capacité à empêcher la croissance d'autres microorganismes et de réduire ainsi les attaques des champignons phytopathogènes par la production de substances bioactifs intéressantes. Ce qui peut servir à une éventuelle application biotechnologique comme agent de biocontrôle. On propose comme perspectives à ce travail :

- L'identification structurale des produits obtenus par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ou bien la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ;
- La purification des fractions résultant par la CCM avec des méthodes spécifiques ;
- L'essai *in vivo* de la souche *Trichoderma longibrachiatum* sur un champ de citronnier ;
- La fabrication d'un biopesticide avec un inoculum sporal de la souche *Trichoderma longibrachiatum*.
- Confirmer l'efficacité de l'effet inhibiteur des spots de la CCM sur les moisissures phytopathogène et des bactéries pathogènes.

Références bibliographiques

Abdullah, A.L., Tengerdy R.P., Murphy V.G. (1985). "Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw." *Biotechnology and Bioengineering*. 27(1): 20-27.

Adinarayana K., Ellaiah P., Srinivasulu B., Devi R.B., Adinarayana G. (2003). Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 38, 1565-1572.

Agrios, G.N., (2005). *Plant pathology 5th Edition*: Elsevier Academic Press. Burlingt. Ma USA 79–103.

Aïteche H., & Benzid K. (2018). Activité antagoniste de la souche *Trichoderma asperellum* (T34) sur demi-tubercules de pomme de terre infectés par *Dickeya solani*. Mémoire de master : écologie microbienne. Université A. Mira-Béjaia. p:40.

Ghasemzadeh, A., Ggasemzadehed, N. (2001).Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical lactivity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*.5(31) : 6697-6703.

Alignan, M. (2006) .Thèse de doctorat : Phoma du Tournesol : déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie, Toulouse. France.

Amin. A. Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'Hyptis atorubens Poit (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat : pharmacognosie. Université Lille Nord de France. France. 2013. p:84.

Antoine, C., Lullien,V., Abécassis,J., Rouau, X. (2002). "Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer." *Sciences des Aliments* 22: 545-556.

Aref M. (2015).Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica L* (Région d'Oued Souf). Mémoire de master : Biochimie appliquée. Universite echahid hamma lakhdar d'el-oued. p: 13.

Arimboor, R., Kumar K.S., Arumugan, C.(2008).Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47 (1): 31-38.

Askary, H., Benhamou, N., Brodeur, J. (1997). Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology* 87, 359-368.

Awad, G. (2005). Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A. Thèse de doctorat : génie des procédés. Institut national polytechnique de Toulouse. France. Page : 129-132.

Références bibliographiques

- Azoun, S.** (2016). Le, p. e. s. p. épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques au chu de Marrakech. Thèse de doctorat : Médecine. Faculté de médecine et de pharmacie de marrakech. Maroc. Page : 34-50.
- Bahous, M., Ouazzani-Touhami, A., Douira, A.,** (2008). Survie de quelques pathogènes fongiques sur les feuilles de riz conservées au laboratoire. Bulletin de l'institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie. Maroc. n°30, 13-18.
- Bellon-Maurel, V., Orliac, O., Christen, P.** (2003). "Sensors and measurements in solid state fermentation: a review." *Process Biochemistry* 38: 881-896.
- Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C. et Codon, A. C.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Berber, F, Amina, O, Alain,B et Allal, D.** (2009). Antagonisme in vitro et in vivo de deux *Tichoderma* à l'égard de quatre espèces de bipolaris pathogènes sur le sorgho ; Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 148, 93-114.
- Bezzaz, N.** (2014). Détermination structurale des métabolites secondaires, et extraction des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia*. Mémoire de magistère : chimie organique. M'sila: Université de M'sila. Algérie. p: 14.
- Bills, G., Gloer, J.,** (2017). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. pp. 1087–111. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch54> . Consulter le 6/08/2021.
- Biljana, G., Jugoslav, Z.,** (2012). *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. *Ati. Applied Technologies & Innovaions.* 7 (2) : p 67-76.
- Bissett J.,** (2004): Commentaires de l'adresse internet suivante : [https://www. Medical glossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html](https://www.Medical glossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html). Consulté le: 11/08/2021.
- Botella, C., Diaz, A., Ory, I., Webb, C., Blandino, A.** (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochemistry.* 42, 98– 101.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P. H., Larpent, J. P., Reymond P. Sanglier, J. J., Vayssier, Y. and Veau, P.,** (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. France. Page : 428.
- Boudjouref, M.** (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister En Biochimie. Université Ferhat Abbes, Sétif. Algérie. Page : 9-28.
- Bovin, G.** (2001). Parasitoids et lutte Biologique : paradigme ou panacée. Centre de recherche et de développement en Horticulture , Agriculture et Agrolimentaire. Canada. Vol 2N2. http://www.vertigo.Uqam.ca/vol_2N2/art8_vol2N2/guybovin.html. Consulté le: 22/08/2021.

Carboué, Q., Perraud-Gaime, I., Tranier, M.S., Roussos, S. (2017). Production of Microbial Enzymes by Solid State Fermentation for Food Applications. In: Ray, R.C., Rosell, C.M. (eds.) *Microbial Enzyme Technology for Food Applications*, pp. 437-451. CRC Press, Boca Raton.

Chabasse, D., Bouchara J-P ; De gentile, L., Brun S., Cimmon, B., Penn, P. (2002). Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.

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

Couto, S. R. et M. A. Sanroman. (2006). "Application of solid-state fermentation to foodindustry-A review." *Journal of Food Engineering* 76(3): 291-302.

Daayf F., Lattanzid V. (2008).Recent Advances in Poly phenol Research 1; Ed: Wiley-Blackwell.31:1- 24. Tableau 1.

De Souza Ramos A., Fiaux S.B., Ferreira Leite S.G.P. (2008). Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology.* 39, 712-717.

Dela Cruz-Quiroz, R., Roussos, S., Hernandez-Castillo, D., Rodríguez-Herrera, R., López, L.I.L., Castillo, F., Aguilar, C.N. (2017). Solid-State Fermentation in a Bag Bioreactor: Effect of Corn Cob Mixed with Phytopathogen Biomass on Spore and Cellulase Production by *Trichoderma asperellum*. In: *Fermentation Processes*, A.F., Jozala, Editor. pp. Ch. 03.In Tech.

Devi, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K.L., Kour, D., Yadav, N., Yadav, A.N., Saxena, A.K. (2020). Chapter 9 - Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health, in: Rastegari, A.A., Yadav, A.N., Yadav, N. (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 147–161. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820528-0.00010-7> Consulter le : 2/09/2021.

Djafar, I. Menzri, I. (2017).Extraction et purification des métabolites secondaires du champignon Algérien *Pleurotuseryngii* et évaluationde leur activité antioxydante.Mémoire de Master.Biochimie Moléculaire et Santé. Université Mentouri Constantine 1.Algérie. p : 30.

Duchiron, F. et E. Copinet. (2011). "Fermentation en Milieu Solide (FMS)." *Technique de l'ingénieur*: 1-13.

Durand A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 13, 113-125.

Durand, A. (1998). "La fermentation en milieu solide " *Biofutur* 181: 41-43.

Elad Y., Chet, I and Henis H., (1982): Degradation of plant pathogenic fungi by *Tichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol* 28, 719-726.

Ezzi, M.I. and Lynch, J.M., (2002): Cyanide catabolising enzymes in *Trichoderma* spp. *Enzyme an microbial technology* 31, 1042-1047.

Faurie, C., Ferra, Medori, P Dévaux, J. and Hemptienne, J.L. (2003), *Ecologie Approche scientifique et pratique*. 5^e éd. Lavoisier. 450 p.

Figure 56: Extracteur de Soxhlet. (s. d.). ResearchGate., à l'adresse https://www.researchgate.net/figure/extracteur-de-Soxhlet_fig40_315842186 Consulté le : 06/09/2021.

Ghorri S. (2015). Isolement des microorganismes possédant une activité anti- *Fusarium*. Thèse de doctorat : Microbiologie. Bioprocédés et Biotechnologie, Applications Mycologiques. Université Mentouri Constantine 1. 53 p

Guan J., Yang G., Yin H., Jia F., Wang J. (2014). Particle size for improvement of peptide production in mixed-culture solid-state fermentation of soybean meal and the corresponding kinetics. *American Journal of Agriculture and Forestry*. (1), 2,1-6.

Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*, (edn) Dunod. Paris. 696 pp.

Gupta R., Beg Q.K., Khan S., Chauhan B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60, 381–95.

Gutiérrez-Sánchez G., Roussos S., Augur C. (2013). Effect of caffeine concentration on biomass production, caffeine degradation, and morphology of *Aspergillus tamaris*. *Folia Microbiologica*. 58, 195-200.

Hamrouni, R. (2019). Criblage, identification, physiologie de croissance et métabolisme de *Trichoderma asperellum* cultivé sur des substrats solides. Thèse de doctorat : Microbiologie et chimie analytique. Université Aix Marseille. France. p :26.

Harman G.E., (2000): Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84, 377-393.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. et Lorito, M., (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* 2, 43-56.

Harrar A. (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Diplôme de Magister Biochimie et physiologie expérimentale. Université Ferhat Abbas-Sétif. 8_31.

Hermosa, M .R. , Grondona, I ., Iturriaga, E. A., Diaz – Minguez, J.M., Castroc,C., Monte,E. and Garcia – Acha, I.(2000). Molecular characterization and Identification of biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. University Spain. /Universidad de Salamanca. Spain.

Hibar, K., Daami-Ramadi, M., Khiareddine, H. et El Mahdjoub, M. (2005). Effet inhibiteur in vivo et in vitro du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radialis lycopersici*.

- Hmouni, A., Hajlaoui, MR., Mlaiki, A.,** (1996). Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. OEPP/EPPO : p 697-705.
- Hölker U., Lenz J.** (2005). Solid-state fermentation - are the reany biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology.* 8, 301–306.
- 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.* (1), 87, 4-10.
- Howell C.R.,**(2003). Mecanisms employed by *Trichodema*. Species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant dis.*
- Hu H., Ahn N.S. and Yang X.** (2002). Ganoderma lucidum extract sinduce cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 humanbreast cancer cell. *Int J Cancer* ,102,250-253.
- Javed, M. M. et al.** (2012). "Wheat Bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications." *African Journal of Microbiology Research* 6(4): 724733.
- John R.P., Nampootheri K.M., Pandey A.** (2006). Solid-state fermentation for L-lacticacid production from agrow astes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry* 41, 759–763.
- Junaid J.M., Dar N.A., Bhat T.A., Bhat A.H., Bhat M.A.** (2013). Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens. *International Journal of Modern Plant Animal Sciences.* 1, 39-57.
- Kitouni M.** (2007). Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat .Microbiologie appliquée. Université Mentouri de Constantine, Algérie. 176.
- Krishna, C.** (2005). "Solid-State Fermentation Systems-An Overview." *Critical Reviews in Biotechnology* 25: 1-30.
- Kumar, A., Asthana, M., Gupta, A., Nigam, D., Mahajan, S.,** (2018). Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Penicillium*, in: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.* pp. 47–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00003-X> Consulté le : 8/09/2021.
- Ladjel, Y., Benkhaled, H .,** (2017) . Activité antifongique des métabolites secondaires de quelques espèces de *Trichoderma* sp., isolées de rhizosphère de pois chiche (*Cicer areitinum*) dirigées contre *Fusarium oxysporum* F.sp. agent de la fusariose vasculaire. Mémoire de master. Phytopathologie. Université Mentouri Constantine 1.p :42.
- Landreau, A.** (2001). Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii Oudemans* isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Th. : Pharmacie : Nantes : 201 p.

- 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.
- Leghlimi H.** (2020). Biotechnologie fongique 1. Polycopié de Cours. Département Microbiologie. Université Mentouri Constantine 1. Algérie.
- Lhuillier, A.** (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat en sciences des agro ressources à l'Institut National Polytechnique de Toulouse. 200.
- Li, M.-F., Li, G.-H., & Zhang, K.-Q.** (2019). Non-Volatile Metabolites from *Trichoderma* spp. *Metabolites*, *National Library of medicine* (3), 58. <https://doi.org/10.3390/metabo9030058>. Consulté le : 18/09/2021.
- Li, Y.T., Hwang, S.G., Huang, Y.M., Huang, C.H.** (2018). Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. *Crop Protection*, 110: 275–282.
- 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.
- Manganiello G.** (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*. 8, 127-139 - 2(1):1-9.
- Manpreet S, Sawraj S, Sachin D, Pankaj S, Banerjee UC** (2005) Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malay J Microbiol*.
- Mascarin G.M., Jaronski S.T.** (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32, (11) 177.
- Mathivanan, N., Prabavathy, V.R., Vijayanandraj, V.R.,** (2008). The effect of fungal secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens, in: *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. Springer, pp. 129–140.
- Medeiros A.B.P., Pandey A., Freitas R.J.S., Christen P., Socol C.R.** (2000). Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 6, 33–39.
- Melo, J.S. and faull J.L.** (2000) Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *Scientia Agricola*. 14 p.

Références bibliographiques

- Messikh R ., Briek A.,** 2019. Recherche des peptaibols dans les extraits de fermentation de *Trichoderma harzianum* 127a. Mémoire de master. Microbiologie. Université Mentouri Constantine 1. Algérie. p : 26.
- Messioughl. M.** (2010). Analyse des substances actives "les flavonoïdes" et action antibactérienne d'une fabacée à intérêt médicinal "Medicagosativa.L." cultivée sur des sols du Nord-Est algérien. Mémoire de magistère : Physiologie des Plantes Médicinales. Annaba : Université Badji Mokhtar. Algérie. p: 25.
- Mitchell, D. A. et al.** (2006)."Solid state fermentation bioreactors fundamentals: introduction and overview " In: D.A. Mitchell Berovic M Krieger N (eds). Solid State Fermentation Bioreactors. Springer: 1-12.
- Mohamed-Benkada M.** (2006). Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles: substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Thèse de doctorat d'état :sciences pharmaceutiques. Université de Nantes, 2006. France. Page :119.
- Moutassem Dahou, Lakhdar Belabid et Yuva Bellik.,** (2020). Efficiency of secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Fusarium* wilt in chickpea. J. Crop Prot. 2020, 9 (2): 217-231.
- Niege A. J. C. F., Suraia S., Izabel Y. I. and Jairo K. B.** (2002). The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. Microbiol. Res. 157, 207–211.
- Osma J.F., Toca-Herrera J.L., Rodriguez-Couto S.** (2007).Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dyed ecolouration. Dyes and Pigments. 75, 32-37.
- Pandey A** (2003) Solid-state fermentation. Biochem Eng J 13(2–3):81-84.
- Pandey A., Selvakumar P., Soccol C. R., Nigam P.** (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current Science. 77, 149–162.
- Paulitz, T. C. and Bélanger, R.R.** (2001). Biological Control in Greenhouse Systems. Annual Reviews.Phytopathology . 348 p.
- Penchev,I.** (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat : Génie des Procédés et de l'Environnement.Université de Toulouse. France. p : 50.
- Pérez-Guerra N., Torrado-Agrasar A., López-Macias C., Pastrana L.** (2003). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 2, 343-350.
- Pierre ,D.** (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. INRA Editons,383 p.
- Raghavarao K.S.M.S., Ranganathan T.V., Karanth N.G.** (2003). Some engineering aspects of solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal. 13, 127–135.

- Raimbault M.** (1998). General and Microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1, 1-15.
- Rajendran A., Thangavelu V.** (2013). Utilizing Agricultural Wastes as Substrates for Lipase Production by *Candida rugosa* NCIM 3462 in Solid-State Fermentation: Response Surface Optimization of Fermentation Parameters. *Waste and Biomass Valorization*. (2),4, 347-357.
- Restino, C.**(2012). Production d'acide itaconique par des souches d'Aspergilli par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat : Microbiologie Industrielle. Université de Reims Champagne-Ardenne.France. p : 33-52.
- Rodriguez-Couto S., Gundin M., Lorenzo M., Sanroman A.** (2002). Screening of supports for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*. 38, 249–257.
- Rosales E., Rodriguez-Couto S., Sanroman M.A.** (2007). Increased laccase production by *Trametes hirsute* grown on ground orange peelings. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 1286–1290.
- Roussos S.** (1985). Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse Doctorat d'Etat, Université de Provence, Marseille, France. Page : 76.
- Samuels G.J., Chaverri P., Farr D.F., Mc Cray E.B.,** (2004): *Trichoderma* Online. Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved August 31, 2004, from <http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>. 8. Consulté le: 01/09/2021.
- Samuels G.J., Petrini O., and Manguin S.,** (1994): Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* 86, 421-435.
- Sarhy-Bagnon, V., Lozano, P., Saucedo-Castañeda, G., Roussos, S.,** (2000). Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochemistry* 36, 103–109.
- Serrano-Carreón L., Flores C., Rodríguez B., Galindo E.** (2004). *Rhizoctonia solani*, an elicitor of 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum* in a two liquid phases, extractive fermentation system. *Biotechnology Letters*. (18), 26, 1403-1406.
- Sharon E., Chet I., Spiegel Y.** (2011). *Trichoderma* as a Biological Control Agent. In: Davies K., Spiegel Y. (eds) *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Building Coherence Between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*. Springer, Berlin, pp. 183-202.
- Shelton, T.** (1997). *Trichoderma* for Biocontrol of Plant Pathogens: From Basic Research to commercialized products. Cornell University NYSAES. Geneva.p 8. (<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/bcconf/talks/harman.htm>). Consulté le: 28/08/2021.
- Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L.** (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Basic biology taxonomy and genetics*, 1:139191.

Thomas L., Larroche C., Pandey A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 81, 146-161.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Woo S. L., Nigro M., Marra R., Vizcaino, J.A. ; Sanz, L. ; Cardoza, R.E. ; Monte, E. & Gutierrez, S. ., (2005). Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of Micro element concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235, 235–242.

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.

Walton N., Brown D. (1999). *Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products*; Ed: world scientific. 43:1-14.

Whipps J.M., 2001: Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.

Wolken, W. A. M. et al. (2003). "What can spores do for us?" *Trends in Biotechnology* 21(8): 338-345.

YANG B; LINKO A et al.(2006). Secoisolariciresinol and matairesinol of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different subspecies and harvesting times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (21):8065-8070.

Yedidia I., Srivastva A.K., Kapulnik Y., Chet I.,(2001): Effects of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soli*235-242.

Yu J., Zhang X., Tan T. (2007). An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *Journal of Biotechnology*. 129, 415–420.

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

Zain, M.E., Awaad, A.S., Al-Othman, M.R., Alafeefy, A.M., El-Meligy, R.M., 2014. Biological activity of fungal secondary metabolites. *Int. J. Chem. Appl. Biol. Sci.* 1, 14.

Annexes

Annexe 1

La composition du milieu *PDA*

-Pomme de terre : 200g

-Glucose : 20 g

-Agar : 20 g

-Eau distillée stérile : Qsp 1000 ml.

Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 mn.

La solution d'humidification

-Glucose : 1g

-Sulfate d'ammonium : 0,09g

-Tartrate double Na,K : 0,09g

-Eau distillée : 100ml

Le révélateur chimique : la Vanilline sulfurique (Lhuilier, 2007).

-Méthanol : 100ml

-Acide sulfurique : 2ml

-Vanilline : 1g

La solution de conservation

-Glycérol : 20ml

-Tween : 3ml

-Eau distillée : 100 ml

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

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Titre :

Extraction des métabolites secondaires bioactifs de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé.

Résumé :

La production de nouvelles molécules antimicrobiennes par des procédés fermentaires économiques, nécessite une attention particulière pour faire face la résistance des microorganismes pathogènes. Notre étude a pour objectif, l'extraction des métabolites secondaires de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*, puis tester leurs effet sur certaines bactéries testes, et exploiter le potentiel antagoniste de cette souche contre certains champignons pathogènes du citronnier, par une confrontation à distance et une confrontation directe. La fermentation est effectuée sur son de blé humidifié à 70% avec une solution de glucose et de sels minéraux. Après inoculation et incubation à 30°C, avec des prélèvements effectués à intervalles de temps régulie. Les métabolites secondaires sont extraits selon une technique solide liquide en utilisant l'appareil de Soxhlet, suivi d'une évaporation par rotavapor. La séparation des métabolites contenus dans les extraits est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant deux différents systèmes éluants. Les résultats montrent que le meilleur rendement (6,2%) est obtenu dans l'extrait butanolique de 7jours. La séparation des métabolites par CCM confirme la richesse des extraits en quantités importantes de molécules. Cependant, l'étude des activités biologiques des spots de la CCM, confirme leur pouvoir antibactérien contre *Bacillus subtilis*, et une forte activité antifongique de *T.longibrachiatum*, dans la confrontation directe contre les isolats pathogènes du citronnier (inhibition à 100%). Par contre, la confrontation à distance est variable, une faible inhibition (3.5%) contre *Penicillium roquefortii*, et une très bonne inhibition (81.48%) contre *Aspergillus fumigatus*. A la lumière de ces résultats, la moisissure *T.longibrachiatum* semble intéressante pour la production de métabolites secondaires et constitue un agent potentiel de lutte biologique, qui nécessite d'éventuelle application industrielle.

Mot clés : Métabolites secondaires bioactifs, *Trichoderma longibrachiatum*, son de blé, Soxhlet, CCM, FMS, antagonisme

Membre du jury :

Présidente du jury : Mme LABBANI Fatima Zohra Kenza (MCB. E Assia Djebar de Constantine).

Rapporteur : Mme LEGHLIMI Hind (MCA-UFM Constantine 1).

Examinatrice : Mme GHORRI Sana (MCB -UFM Constantine 1).

Présentée par : BENYERBAH Asma et ALIGUECHI Amel

Année universitaire : 2020-2021