

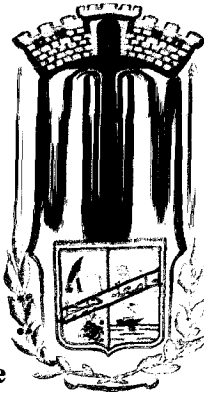
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET

DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE JIJEL

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences
de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Animale et Végétale



جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة و علوم الطبيعة

قسم البيولوجيا النباتية والحيوانية

Handwritten signature and stamp area.

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du
diplôme de Master II
Option : Phytopharmacie et gestion
des agrosystèmes

Thème

Effet inhibiteur de *Trichoderma*
viride* sur la croissance mycélienne de *Phoma sp.
et *Epicoccum sp.* et amélioration des milieux
de culture.



Remerciement

Lorsqu'on atteint notre but, on commence à remercier celui et cela sans faire attention à ce qui doit être vraiment remercier.

Pour cela, je dis de tous mes profonds :

MERCI

NOTRE

DIEU

Pour la protection, l'aide, le sauvegarde et le bénisseurnon limités

Sans lesquels, jamais j'ai pu franchir plusieurs barrières pour être avec vous dans ce grand jour.

AMEN

Amén

Remerciement

Cette étude a été effectuée au sein de laboratoire de contrôle de qualité et d'éco toxicologie. Un grand et sincère merci donc à ceux qui ont contribué à la réussite de ce travail, que ce soit grâce à leur soutien scientifique et technique, ou grâce à leur amitié et leur sympathie.

Tout d'abord, Je tiens à remercier très sincèrement et particulièrement *Mme Bouziane Zahira*, de son aide précieuse au laboratoire, pour sa gentillesse et sa disponibilité mais également, pour son soutien et son écoute tout au long de ces 4 mois.

Un énorme merci aux membres de jury d'avoir accepté de juger et d'évaluer ce travail, je tiens à remercier tout particulièrement mon président du mémoire *Mr Bouljedri*, pour son écoute avec gentillesse à notre interrogation et pour sa méthode de présentation des cours durant toutes les années qu'il m'a enseigné. Ainsi, *Melle Balli* pour sa patience pendant la correction de ce travail.

J'adresse tous mes remerciements à ma famille; mes parents, mes frères et mes sœurs pour m'avoir lancé sur le chemin exacte, ainsi pour leur soutien et leur présence précieuse dans ma vie. J'espère d'avoir un jour l'occasion de les rendre ce qu'ils m'ont apporté.

Également, je remercie spécifiquement et très chaleureusement ma petite sœur *Badia Amani* de son aide et sa patience non limité pour aller avec moi jusqu'au bout du rêve. Je la remercie pour les moments difficiles au terme desquels je l'ai trouvé toujours avec moi, je la remercie de son pouvoir de représenté avec excellence le terme de *ma sœur*.

Merci encore à mes amis ; *Aicha, Fayza, Hana, Manel et Meriem* pour les bons moments passés ensemble, sans d'oublier *Akila, Ismahane et Roufia* : Merci, pour l'appareil photo.

Enfin, J'exprime mes sentiments à tout les gents et les enseignants qui participent à ma formation depuis la première année primaire jusqu'aujourd'hui.

AIRRI

2012

Remerciement

D'abord, je remercie notre Dieu qui ma donner les compétences et la passionne tout au long de ma vie notamment à réaliser ce travail.

C'est avec un grand plaisir que je tiens à exprimer mes vifs remerciements qui s'adressent à

Mme Bouziane Z. d'avoir accepté d'encadrer notre mémoire et de m'avoir fait confiance et m'avoir encouragée à allier les différentes disciplines qui font la richesse de cette recherche.

J'adresse tous mes remerciements au notre enseignant, notre chef de département Mr. Bouldjedri M. pour les conseils qu'il n'a cesse de me prodiguer ainsi que de notre fructueuse collaboration datant de plusieurs années, je l'exprime ma sincère gratitude de faire l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Je remercie également Mlle Balli.N d'avoir bien voulu faire partie du jury.

Je pense notamment à ceux qui m'ont aide durant la réalisation de la pratique aux laboratoires de l'Université Jijel, et à la recherche bibliographique, y compris ceux de l'Université Lakhdar-Batna et de l'Université Mentouri-Constantine.

■ ■ ■ ■ ■

[Signature]

SOMMAIRE

Introduction	1
Partie 1: Recherche bibliographique	
Chapitre I: Les champignons microscopiques du genre <i>Trichoderma</i>	
1- <i>Trichoderma sp.</i>	3
1.1-Définition	3
1.2-Habitat	3
1.3-Histoire de la taxonomie.....	3
1.4-Morphologie	6
1.5-Écologie.....	6
1.6-Production de métabolites intéressants	6
1.6.1- Production d'enzymes	7
1.6.2-Production de substances bioactives	7
2- <i>Trichoderma viride</i>	8
2.1-Définition	8
2.2-Habitat	8
2.3-Taxonomie.....	9
2.4-Morphologie	9
2.5-Biologie	10
2.6-Cycle de vie	10
2.7-Les métabolites secondaires	10
2.8-Avantages et limites d'utilisation de <i>Trichoderma</i> comme agent de lutte	11
2.9-Le pouvoir antagoniste de <i>T. viride</i>	12

2.9.1-L'antibiose	12
2.9.2-Compétition	12
2.9.3-Parasitisme.....	13

Chapitre II : Phytopathologie

1- <i>Phoma sp.</i>	15
1.1-Définition.....	15
1.2-Taxonomie.....	15
1.3-Ecologie.....	15
1.3.1-Habitat et isolement.....	15
1.3.2- Exigences de croissance	16
1.4-Morphologie	16
1.5-Mycotoxines	17
1.6-Maladies, symptômes et dégâts	17
1.7-Fréquence d'apparition.....	18
2- <i>Epicoccum sp.</i>	19
2.1-Définition.....	19
2.2-Taxonomie.....	19
2.3-Écologie.....	19
2.3.1-Habitat et isolement.....	19
2.3.2-Exigences de croissance	20
2.4-Morphologie	20
2.5-Mycotoxines	21
2.6-Maladie, symptômes et dégâts.....	22

2.7-Fréquence d'apparition.....	22
---------------------------------	----

Chapitre III : Milieux de culture

1-Définition.....	23
2-Caractéristiques d'un bon milieu de culture.....	23
3-Types de milieux de culture	23
4-Principaux axes d'amélioration.....	24
4.1-La qualité nutritionnelle	25
4.1.1-Régulation de source de carbone.....	25
4.1.2-Régulation de source d'azote	26
4.1.3-Oligoéléments et facteurs de croissance.....	26
4.2-Les conditions physicochimiques de la croissance	26
4.2.1-Température.....	26
4.2.2-Teneur en oxygène	27
4.2.3-pH du milieu.....	27
4.2.4-Taux d'humidité et l'activité de l'eau	27
4.2.5-Densité de l'inoculum	28
4.2.6-Mutation	28

Partie 2 : Matériel et méthodes

1-matériel fongiques	29
2-Réactivation des souches.....	31
3-La multiplication des souches fongiques <i>in vitro</i>	31
4-Tests de développement sur milieux (PDA et V8) solides et liquides	31
4.1-Sur milieux (PDA et V8) solides.....	31

4.1.1-Test de la température	31
4.1.2-Test du pH	32
4.2-Dans les milieux (PDA et V8) liquides	32
5-Tests d'antagonisme	32
5.1-Test de confrontation directe	32
5.2-Test d'antagonisme par l'effet de filtrats de fermentation	33
Partie 3 : Résultats et discussion	
1-Test de la température	35
2-Test du pH	39
3-Test de développement dans les milieux (PDA et V8) liquides	43
4-Test de confrontation directe	57
5-Test d'antagonisme par l'effet de filtrats de fermentation	62
Conclusion	64
Références bibliographiques	66
Index I	

Liste des abréviations

PDA: Potato-Dextrose-Agar.

V8: Vegetable 8

°C : degré Celsius

g/l : gramme par litre

g : gramme

g : grossissement

mm : millimètre

ml : millilitre

H.R : humidité relative

T : température

pH: nombre d'hydrogène

T.v : *Trichoderma viride*.

T.viride : *Trichoderma viride*

n° : numéro

h: heurs

Fig: figure

ESP: exopolysaccharides

Aw: activity water

UV: Ultra Violet

Liste des figures

Figure 1 : Les 5 sections systématiques de <i>Trichoderma sp.</i> et quelques- unes des espèces y appartenant, selon Bisset (1991).....	5
Figure 2 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu Czapek	8
Figure 3 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA.....	8
Figure 4 : <i>Trichoderma viride</i> sur différents matériaux	9
Figure 5 : Conidiophore de <i>Trichoderma viride</i>	10
Figure 6 : <i>Phoma</i> sur milieu gélosé	16
Figure 7 : <i>Phoma</i> sous le microscope optique	17
Figure 8 : <i>Epicoccum sp.</i> sur milieu gélosé	20
Figure 9 : <i>Epicoccum sp.</i> sous microscope.....	21
Figure 10 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA	29
Figure 11 : <i>Phoma sp.</i> sur milieu PDA.....	30
Figure 12 : <i>Epicoccum sp.</i> sur milieu PDA	30
Figure 13 : Confrontation direct de <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA	33
Figure 14 : Confrontation de <i>Trichoderma viride</i> par l'effet de filtrat de fermentation sur milieu PDA	34
Figure 15 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA solide à 25°C, après 3 jours d'incubation	35
Figure 16 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu V8 à 25°C, après 3 jours d'incubation..	35
Figure 17 : Croissance mycélienne de <i>Trichoderma viride</i> sur milieux PDA et V8 solides dans des conditions favorables (pH5, 25°C), durant 6 jours d'incubation....	38
Figure 18 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA solide à 5°C, après 5 jours d'incubation	39
Figure 19 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu V8 solide à 5°C, après 5 jours d'incubation	39
Figure 20 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA solide à 37°C, après 5 jours d'incubation	39
Figure 21 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu V8 solide à 37°C, après 5 jours d'incubation	39

Figure 22 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA solide à pH5, après 4 jours d'incubation	40
Figure 23 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu V8 à pH5, après 4 jours d'incubation	40
Figure 24 : <i>Trichoderma viride</i> sur le milieu PDA solide à un pH9, après 4 jours d'incubation	41
Figure 25 : <i>Trichoderma viride</i> sur le milieu V8 solide à un pH9, après 4 jours d'incubation	41
Figure 26 : Croissance de <i>Trichoderma viride</i> sur milieux PDA et V8 solides à un pH9 et 25°C durant 7 jours d'incubation.....	42
Figure 27 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA dans un pH9, après 6 jours d'incubation	43
Figure 28 : <i>Trichoderma viride</i> sur milieu V8 dans un pH9, après 6 jours d'incubation	43
Figure 29 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA, après 2 jours d'incubation	45
Figure 30 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA sans glucose, après 3 semaines d'incubation	45
Figure 31 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA sans extrait de levure, après 3 semaines d'incubation	45
Figure 32 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA liquide, avec 1 g/l glucose après 3 semaines.....	46
Figure 33 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA liquide, avec 2 g/l glucose après 3 semaines d'incubation	46
Figure 34 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA liquide, avec 1 g/l extrait de levure après 3 semaines d'incubation	46
Figure 35 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA, avec 2 g/l extrait de levure après 3 semaines d'incubation	46
Figure 36 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA avec de l'extrait de levure, après 3 semaines d'incubation	47
Figure 37 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA liquide, avec 1g/l glucose après 21 jours d'incubation	47
Figure 38 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu PDA liquide avec 2g/l glucose, après 21 jours d'incubation	47

Figure 39 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu V8 liquide avec les différentes concentrations du glucose, après 5 jours d'incubation	48
Figure 40 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu V8 liquide avec 1g/l extrait de levure, après 2 semaines d'incubation	48
Figure 41 : <i>Trichoderma viride</i> dans le milieu V8 liquide avec les différentes concentrations du glucose, après 2 semaines d'incubation	49
Figure 42 : Biomasse sèche de <i>Trichoderma viride</i> contenant l'extrait de levure, après une semaine d'incubation.....	49
Figure 43 : Biomasse sèche de <i>Trichoderma viride</i> en milieux contenant le glucose, après 1 semaine d'incubation.....	50
Figure 44 : Biomasse sèche de <i>Trichoderma viride</i> en milieux contenant l'extrait de levure, après 2 semaines d'incubation	50
Figure 45 : Biomasse sèche de <i>Trichoderma viride</i> en milieux contenant le glucose après 2 semaines d'incubation	51
Figure 46 : Biomasse sèche de <i>Trichoderma viride</i> en milieux contenant l'extrait de levure, après 3 semaines d'incubation	51
Figure 47 : Biomasse sèche de <i>Trichoderma viride</i> en milieux contenant le glucose, après 3 semaines d'incubation	52
Figure 48 : Colonie d' <i>Epicoccum sp.</i> en absence de <i>Trichoderma viride</i> après 144heurs d'incubation à 25°C (Témoin)	57
Figure 49 : Colonie d' <i>Epicoccum sp.</i> en présence de <i>Trichoderma viride</i> après 144heurs d'incubation à 25°C	58
Figure 50 : Colonie de <i>Phoma sp.</i> en absence de <i>Trichoderma viride</i> après 144heurs d'incubations d'incubation à 25°C (Témoin)	58
Figure 51 : Colonie de <i>Phoma sp.</i> en présence de <i>Trichoderma viride</i> après 144heurs d'incubation à 25°C	58
Figure 52 : Effets inhibiteurs de <i>Trichoderma viride</i> sur la croissance mycélienne (mm) de <i>Phoma sp.</i> et <i>Epicoccum sp.</i> après 144h d'incubation à 25°C (Technique de confrontation directe).....	60
Figure 53 : lyse au niveau de mycélium du pathogène en présence du <i>Trichoderma viride</i> (x400)	61
Figure 54 : croissance mycélienne des deux pathogènes en présence du filtrat de fermentation après 24h d'incubation à 25°C	63

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différentes observations lors du développement de <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA solide, dans des conditions favorables (pH5, 25°C), durant 6 jours d'incubation	36
Tableau 2 : Différentes observations lors du développement de <i>Trichoderma viride</i> sur milieu V8 solide, dans des conditions favorables (pH5, 25°C), durant 6 jours d'incubation	37
Tableau 3 : Mesures de la croissance de <i>Trichoderma viride</i> sur milieu PDA à un pH basique (pH9, 25°C) durant 7 jours d'incubation	40
Tableau 4 : Mesures de la croissance de <i>Trichoderma viride</i> sur milieu V8 à un pH basique (pH9, 25°C) durant 7 jours d'incubation	41
Tableau 5 : Les résultats de la filtration du milieu PDA contient de l'extrait de levure comme source d'énergie pour les 03 semaines d'incubation	53
Tableau 6 : Les résultats de la filtration du milieu PDA contient de glucose comme source d'énergie pour les 03 semaines d'incubation	54
Tableau 7 : Les résultats de la filtration du milieu V8 contient de l'extrait de levure comme source d'énergie pour les 03 semaines d'incubation	55
Tableau 8 : Les résultats de la filtration du milieu V8 contient du glucose comme source d'énergie pour les 03 semaines d'incubation	56
Tableau 9 : Effets inhibiteurs de <i>Trichoderma viride</i> sur la croissance mycélienne (mm) et taux d'inhibition des souches de <i>Phoma sp.</i> et <i>Epicoccum sp.</i> après 144h d'incubation à 25°C.(Technique de confrontation directe).	59

Introduction

Introduction

Les moisissures sont des organismes pluricellulaires qui se propagent par leurs spores. Chaque spore qui germe peut donner lieu à la croissance d'une nouvelle moisissure, laquelle peut, à son tour, produire de millions de spores dans des conditions de croissance appropriées (Goyer et *al.*, 2001).

Certaines moisissures appelées phytopathogènes, ont des effets néfastes sur les cultures, c'est le cas de moisissures du genre *Phoma* et *Epicoccum*, d'autres genres sont bénéfiques pour l'agriculture telle que *Trichoderma*. Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon. Il désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des «Gastéromycètes». Ces organismes cosmopolites appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Mohammed –Benkeda, 2006).

Les propriétés antagonistes des *Trichoderma* sont connues depuis longtemps puisque la première publication qui en fait mention date de 1887. Cependant, l'étude approfondie du phénomène d'antagonisme et de son application comme moyen de lutte à l'égard des parasites des plantes cultivées n'a débuté qu'entre les deux guerres mondiales. Les modèles étudiés s'intéressaient essentiellement aux parasites du sol mais déjà, en 1952, Wood signalait l'efficacité de *Trichoderma viride* pour contrôler *Botrytis cinerea* sur la laitue (Johanne, 2002). Ce n'est toutefois qu'en 1971 que Dennis et Webster ont pu élucider les différents mécanismes d'action de ce champignon antagoniste qui incluent principalement le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition pour les nutriments et l'espace. Mais ce n'est qu'à partir de 1990 que ce champignon a été commercialisé sous forme de bio pesticide, ce qui indique la somme considérable de connaissances qu'il faut acquérir avant de permettre l'utilisation pratique d'une telle méthode de lutte.

La sélection *in vitro* des souches de *Trichoderma* est influencée par de nombreux paramètres : la souche du pathogène, la souche antagoniste, les conditions préalables de la croissance des pathogènes et antagoniste (T°C d'incubation, pH du milieu de culture) et enfin les milieux de culture utilisés pour la révélation de l'antagonisme) (Lepoivre, 2003).

L'objectif général de notre travail- consacré a l'étude du *Trichoderma viride*_ était d'améliorer les qualités nutritionnelles du milieu de culture utilisé pour multiplier *Trichoderma viride* afin de maximiser son potentiel antagoniste.

Les objectifs spécifiques étaient de :

Tester l'effet antagoniste de *T.viride* contre deux agents pathogènes fongiques *Phoma sp.* et *Epicoccum sp.* par réalisation des tests de confrontation en Pétri.

Déterminer si l'ajout d'une source d'extrait de levure ou de glucose ou bien la modification du pH et de la température, améliore les qualités nutritionnelles du milieu de culture utilisé.

Partie 1 : Recherche bibliographique

**Chapitre 1 : Les champignons
microscopiques du genre *Trichoderma***

1- *Trichoderma sp.*

1.1-Définition

Trichoderma est un genre de champignon (Fungi) ascomycète de la famille des Hypocreaceae, Champignon du sol le plus commun (Mohammed-Benkeda, 2006). On le reconnaît facilement en culture grâce à la couleur généralement verdâtre de ses spores et le port typique de ses phialides (en forme de quilles) (Mouria et *al.*, 2005).

Trichoderma est un champignon qui décompose naturellement la cellulose et à un degré moindre, la lignine. C'est également un des agents de lutte biologique le plus connu dans le monde (Johanne et Laverdière, 2003).

1.2-Habitat

Le genre *Trichoderma* regroupe un ensemble de champignons imparfaits saprophytes qui se retrouvent couramment dans le sol, sur le bois mort, les débris végétaux et les organes aériens des plants (Johanne et Laverdière, 2003).

Trichoderma sp. y ont été identifiés à tous les niveaux ;

Les *Trichoderma sp.* terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) et sur les végétaux en décomposition. Ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivantes.

Dans la mer, les *Trichoderma sp.* sont marins facultatifs, Ils ont été également isolés à partir d'algues marines (*Rhodophyta sp.* et *Phaeophyta sp.*) (Genilloud et *al.*, 1994; Liberra et Lindequist, 1995; Esposito et Silva, 1998).

1.3- historique de la taxonomie

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de polémiques. Or, les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, en tant que tels, n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique, on se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert, 1996).

Si on répertorie succinctement les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma sp.* on se rend vite compte que leur positionnement taxonomique n'a pas été chose facile.

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

En 1821, Fries classa les *Trichoderma sp.* parmi les Gastéromycètes.

En 1860, débutent les controverses sur cette systématique, Tulasne contredit Fries puisqu'il ne trouve pas de forme téléomorphes (sexuées) à ce genre.

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

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

En 1926, Abbot identifie 4 espèces de *Trichoderma* selon des critères une fois de plus différents des précédents.

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

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

En 1969, Rifai propose une classification « utilisable avec le concept d'« espèces agrégées », basée sur les caractères microscopiques. Neuf espèces agrégées sont créées (*T.aureoviridae* Rifai, *T. hamatum* Bain, *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudemans, *T.longibrachiatum* Rifai, *T. piluliferum* Webster et Rifai, *T. polysporum* Rifai, *T.pseudokoningii* Rifai et *T. viridae* Gray), tout en tolérant une certaine variabilité au sein de chaque espèce agrégée (in Mohammed -Benkeda, 2006).

En 1991, Bissett propose la notion de « section » pour faire face au nombre croissant des espèces nouvelles de *Trichoderma sp.* sans rapport avec les espèces agrégées. Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*)

(Fig1).

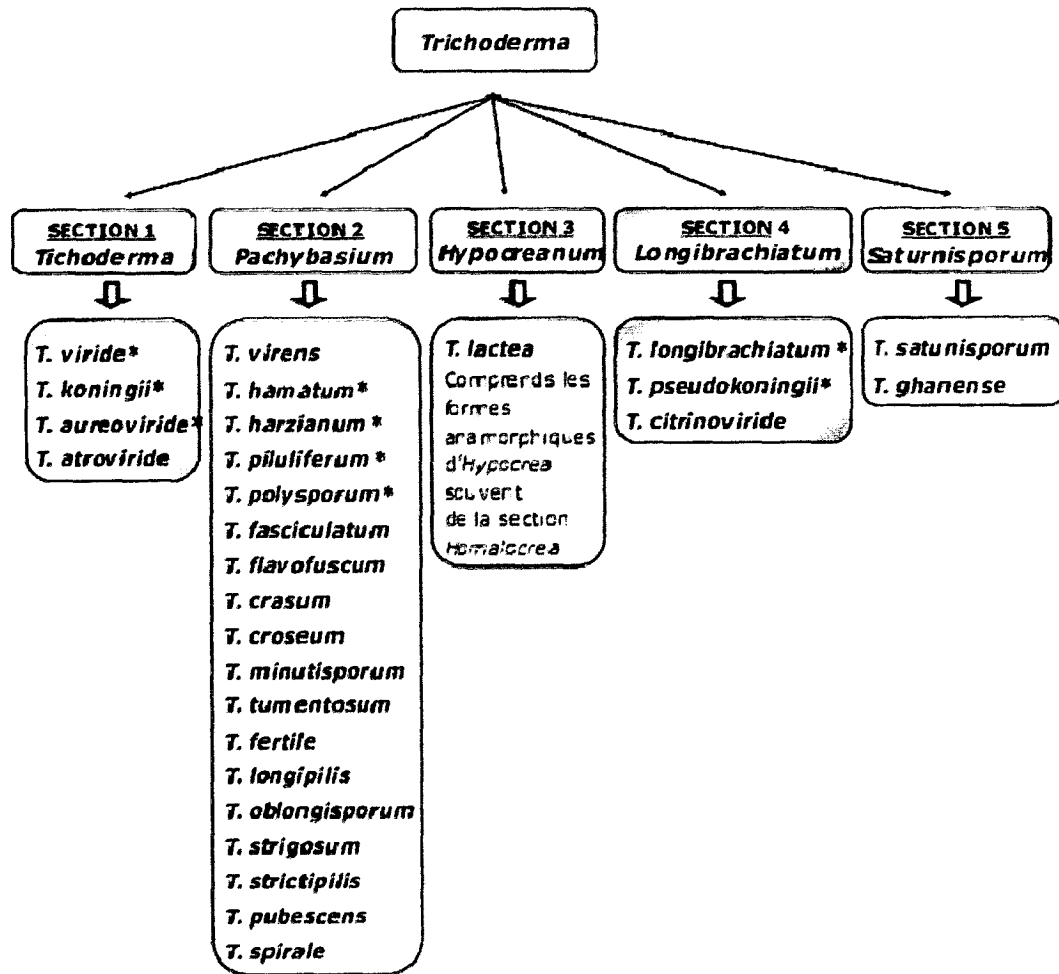


Fig 1 : Les 5 sections systématiques de *Trichoderma sp* et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bissett (1991).

* Les espèces agrégées de Rifai

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

Embranchement	Amastigomycota et/ou Eumycètes
Sous embranchement	Ascomycotina
Classe	Sordariomycètes
Ordre	Hypocréales
Famille	Hypocraceae
Genre	Hypocrea mitosporique (<i>Trichoderma</i>)

1.4-Morphologie

1.4.1- Etude macroscopique

L'aspect macroscopique des *Trichoderma sp.* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Le mycélium apparaisse d'abord blanc et stérile en forme de cercle, puis une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium (Landreau, 2001).

1.4.2- Etude microscopique

Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores 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 (phialospores ou bien conidies) (Landreau, 2001).

1.5-Ecologie

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996).

La présence des *Trichoderma sp.* en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (Landreau, 2001).

L'abondance des *Trichoderma sp.* dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Widden, 1980).

1.6- Production de métabolites intéressants

Les souches du genre *Trichoderma* sont capables de produire un très grand nombre de métabolite secondaire, dont certains jouent un rôle dans l'antagonisme (Lepoivre, 2003).

La littérature cite que les métabolites importants de *Trichoderma sp.* sont principalement des enzymes et des molécules bioactives.

1.6.1-Production d'enzymes

La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre. Principalement les xylanases ou les cellulases.

1.6.2-Production de substances bioactives

***Métabolites volatiles** : 6 pentyl pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes.

***Métabolites non volatiles diffusibles** : polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines.

***Métabolites polypeptidiques** ; ciclosporines (immunosuppresseurs, antiinflammatoire) et les peptaïbols.

Les peptaïbols sont définis comme étant une classe de molécules antibiotiques et toxiques importantes. En raison de leurs caractéristiques chimiques et biologiques, les peptaïbols sont généralement assimilés à des mycotoxines peptidiques.

Plusieurs espèces du genre *Trichoderma* (*T. atroviridae*, *T. harzianum*, *T. longibrachitum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei*, *T. polysporum*, *T. saturnisporum*, *T. virens* et *T. viridae* ; *T. asperellum*) produisent une grande variété de peptaïbols ces peptides semblent être un moyen de défense et de compétition pour les ressources. Dans certaines conditions, ils sont capables d'inhiber la croissance d'autres organismes contigus, et protègent les spores de la consommation animale (Mohammed -Benkeda, 2006)

2-TRICHODERMA VIRIDE

2.1-Définition

Trichoderma viride l'espèce type du *Trichoderma*, est un moule qui produit des spores de façon asexuée, par mitose (Jaklitsch et al., 2006). C'est une espèce cosmopolite très répondeuse et très résistante (Subramanian, 1983) (Fig2-3).

Egalement, *Trichoderma viride* est un antagoniste fongique des organismes présents dans le sol et il est très efficace pour le contrôle des semences et des maladies transmises par le sol (Johanne, 2002; Shalini et Kotasthane, 2007).

Leur synonyme est: *Trichoderma lignorum*.

Les formes parfaites de *T.viride* sont *Hypocrea rufa*, *Hypocrea aurantiaca*, *Hypocrea coprosma*, *Hypocrea atrogelatinosa*, *Hypocrea muroiana*, *Hypocrea albo-medullosa* (*Ascomycète unitunique inoperculé, hypocréale*) (Domsh et al., 1993).

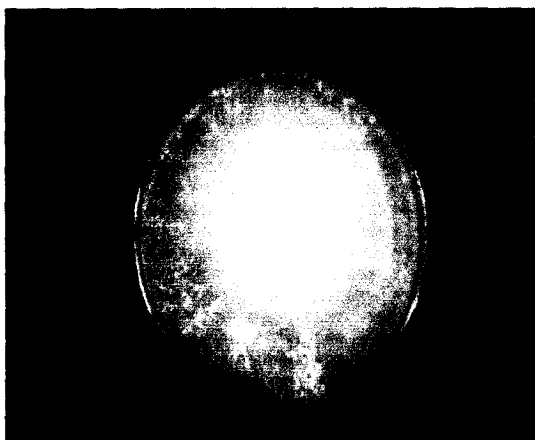


Fig 2 : *Trichoderma viride* sur milieu Czapek

(Jaklitsch et al., 2006).

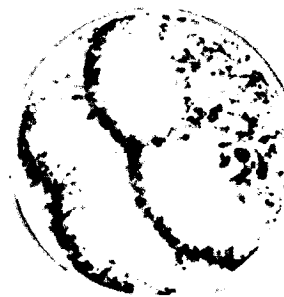


Fig 3 : *Trichoderma viride* sur milieu PDA

(Jaklitsch et al., 2006).

2.2-Habitat

Trichoderma viride est une espèce très répandue (extrême nord, zones alpines, régions tropicales) qui a été isolée de substrats et habitats divers, entre autres ; algues, bois (sain, en décomposition), matières synthétiques (plastique), produits alimentaires (céréales, blé, avoine, orge, arachide, tomates, patates douces et citruses en stockage, tomates), sol, papier, textile (coton) (Fig4) (Subramanian, 1983 ; Domsh et al., 1993).

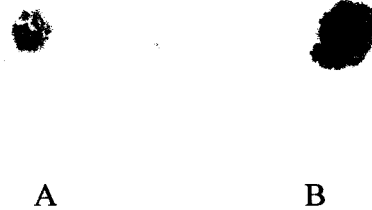


Fig 4 : *Trichoderma viride* sur différents matériaux (Subramanian, 1983).

A : sur papier (coton)

B : sur textile (coton)

2.3-Taxonomie

La taxonomie actuelle de *Trichoderma viride* selon Bisset ; 2004 est :

Embranchement	Amastigomycota et/Eumycètes
Sous embranchement	Ascomycotina
Classe	Sordariomycètes
Ordre	Hypocréales
Famille	Hypocraceae
Genre	<i>Trichoderma</i>
Espèce	<i>Trichoderma virideae</i>

2.4-Morphologie

Le Thalle plus ou moins hyalin devenant blanc et vert en vieillissant avec des amas duveteux verts de conidies, ces derniers sont ovoïdes rugueuses de 3.6 - 4.5 μm de diamètre

Les Conidiophores sont ramifiés suivant une structure pyramidale, plus courts vers l'apex qu'à la base (Fig5).

Les Phialides sont regroupées en bouquets de 2 à 4.

Ainsi, on a noté la présence de chlamydospores globuleuses, lisses hyalines, intercalaires ou terminales, dans les cultures âgées (Samson ,1994).

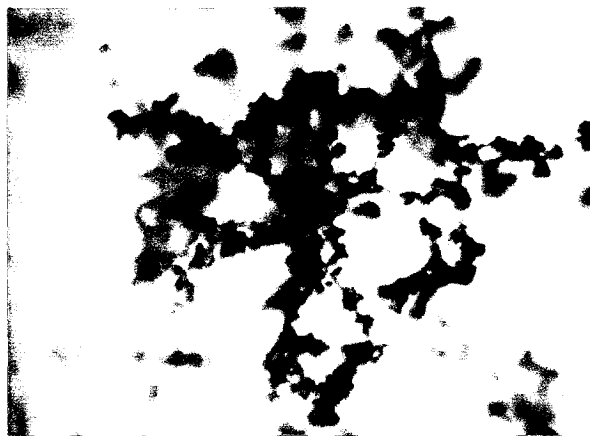


Fig 5 : Conidiophore de *Trichoderma viride* (Jaklitsch et al., 2006).

2.5-Biologie

La température optimale de croissance est comprise entre 20 et 28 °C. Une bonne croissance est également observée pour des températures de 6 et 32 °C. Quelques cas exceptionnels de croissance ont été observés à 37 °C, mais aucune à 0°C. Le point thermique de mortalité dans le sol est de 49 à 55 °C pendant 30 minutes.

Le pH doit être compris entre 3 et 9, le pH optimum étant de 4,5-5,5 (Hawksworth et al., 1983 ; Subramanian, 1983).

2.6-Cycle de vie

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

2.7-Les métabolites secondaires de *Trichoderma viride*

Trichoderma viride est capable de sécréter une gamme intéressante de métabolites secondaires y compris :

- Amylases
- cellobiases

- cellulases
- émodine
- endo 1,3 β -cellulases

- endo 1,3 β -glucanases
- endo 1,3 β -xylanases
- endo β -1-4-hydrolases
- exo-glucanases
- gliotoxine
- griséofulvine
- polypeptide cyclique (antibiotique)
- protéases
- suzukacilline (antibiotique)
- tichotoxine cyclique (antibiotique)
- trichodermine
- trichothecine (antibiotique)
- β -D-xylopyranosidases
- β -glucosidase (Gallo, 1994; Subramanian, 1983).



2.8-Avantages et limites d'utilisation de *Trichoderma* comme agent de lutte

L'adaptation écologique très large que montrent les souches de *Trichoderma* sp. se reflète par l'isolement de ces champignons à partir de nombreux substrats soumis à différentes conditions environnementales. Cette diversité, couplée à la possibilité de croître sur des substrats très peu coûteux en font un candidat potentiellement intéressant pour de nombreuses applications en lutte biologique. Cependant, malgré une sélection rigoureuse des meilleures souches, celle-ci montrent souvent des performances insuffisantes lors d'essai de protection en champs.

La sensibilité des isolats aux différents facteurs environnementaux explique en partie ces résultats insuffisants. À l'intérieur d'une même espèce, la capacité de protection varie d'un isolat à l'autre en fonction de la température, l'humidité inadéquate est un autre facteur limitant la capacité de *Trichoderma viride* à coloniser les organes végétaux.

Les conditions de sécheresse affectent fortement la croissance de ce champignon (coût énergétique de l'osmo-régulation), tandis que le manque d'oxygène devient le facteur limitant en condition d'excès d'humidité, la germination des conidies de *T. viride* est optimale à 100 % d'humidité relative (H.R) alors qu'à 95%, ce pourcentage de germination diminue, entraînant une perte de l'activité protectrice vis-à-vis de *Sclerotinia sclerotiorum* et de *Botrytis cinerea* sur haricot.

La disponibilité des éléments nutritifs est également importante, car la germination de *Trichoderma sp.* requiert un apport exogène de nutriments.

Ces contraintes expliquent la nécessité de développer une formulation adéquate qui en cas d'apport en éléments nutritifs, ne doit pas favoriser les phytopathogènes (Lepoivre, 2003).

2.9- Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma viride*

Trichoderma est sans contexte l'agent de lutte biologique fongique le plus étudié au niveau des mécanismes d'action. Ces mécanismes d'action peuvent intervenir seuls, en association ou séquentiellement (Lepoivre, 2003).

2.9.1- l'antibiose

Les tensions de *Trichoderma* deviennent connues par leur production des antibiotiques et des toxines qui sont volatiles ou non volatiles dans la nature, ils ont un effet direct sur les autres organismes en inhibant leurs croissances (Johanne, 2002 ; Ranasingh et al., 2006).

En 2009, Berber et al ont cité des recherches récentes montrant que la production de composés volatiles par *T. viride* comme la 1-hydroxy-3-méthylanthraquinone a montré une forte capacité à limiter le développement de plusieurs champignons pathogènes du sol.

Ainsi, la trichothecine et la trichodermine peuvent effectuer un effet antimicrobien sur les bactéries et les moisissures (Ranasingh et al., 2006).

Par conséquent, il est vraisemblable que ces métabolites peuvent être impliqués dans le bio contrôle des pathogènes de la pourriture du manioc des racines aussi bien que dans les tubercules de l'igname et dans des autres situations (Ubalua et Oti, 2007).

2.9.2- la compétition

Qui se manifeste par l'aptitude de *Trichoderma* à utiliser les mêmes ressources du milieu (aires d'alimentation, sites de développement) que les champignons pathogènes, mais *Trichoderma* emploie ce mode d'action surtout pour occuper les lieux avant l'arrivée des indésirables (Johanne, 2002).

Pendant ce processus, l'antagoniste peut réprimer la croissance de la population du pathogène dans la rhizosphère ce qui réduit le développement de la maladie (Ranasingh et al., 2006).

D'après les recherches réalisées *Trichoderma viride* a la capacité d'entrer en concurrence avec un large spectre de pathogènes tels que ; *Pythium sp*, *Macrophomina phaseolus*, *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lini*, *Helminthosporium sp*, *Alternaria sp*, *Rhizoctonia solani*, *Athelia rolfsii*, *Armillaria mellea* (Samson, 1994).

2.9.3-Le mycoparasitisme

C'est le phénomène par lequel l'agent antagoniste (*Trichoderma*) parasite d'autres moisissures, cela est manifesté par la destruction de l'agent pathogène lorsque *Trichoderma* s'enroule autour de celui-ci soit en l'étranglant, en pénétrant à l'intérieur et/ou en lui « Injectant » des substances (enzymes) qui le détruisent (Johanne, 2002).

Ce mécanisme contient différentes étapes d'interactions :

Première étape : une stimulation chimique de moisissures pathogènes attire l'agent antagoniste et induit une réponse chémotropique chez l'antagoniste.

Deuxième étape : une reconnaissance entre le pathogène et l'antagoniste grâce aux lectines a été constaté.

Troisième étape : elle est suivie par les interactions entre les hyphes du pathogène et celles du l'antagoniste.

Les hyphes de l'antagoniste (*Trichoderma*) grandissent le long des hyphes de l'hôte ou s'enroulent autour de celui-ci et sécrète différentes enzymes du lytique tel que cellulase chitinase, glucanase et pectinase et des antibiotiques comme la gliotoxine qui sont impliqués dans le processus de mycoparasitisme (Haran et al., 1996; Ranasingh et al. , 2006).

La littérature a mentionné que *Trichoderma viride* est hautement mycoparasitaire à l'égard de ; *Fusarium oxysporum*, *Cochliobolus sativus*, *Rhizoctonia solani*, *Athelia rolfsii*, *Pythium sp*, *Phytophthora parasitica*, *Lentinus edodes*, *Armillaria mellea*, *Phaeolus schweinitzii*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor plumbeus*, *Mucor hiemalis* *Actinomucor elegans*, *Phycomyces nitens*, *Circinella muscae*, *Zygorrhynchus moelleri* (Samson, 1994).

Le déploiement des modes d'action varie également selon les partenaires en présence et les conditions physico-chimiques du milieu (températures, humidité, etc...). *Trichoderma* est efficace lorsqu'on lui permet de s'installer avant l'arrivée des champignons pathogènes. Son action est donc préventive. Il permet, au niveau des racines, de créer un manchon protecteur autour de celles-ci et ainsi contrer l'entrée des agents pathogènes à l'intérieur des racines. Une fois installée, *Trichoderma* peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes (Johanne, 2002).

Chapitre 2 : Phytopathologie

1-*Phoma* sp.

1.1-Définition

Les *phoma* sont des hyphomycètes anamorphes dématiacés: plusieurs espèces de *phoma* ont été connu, qui ont des formes sexuées ou télémorphes incluses dans 30 genres, les plus connus étant *Pleospora*, *Didmyella* et *Leptosphaeria*. Il est un des agents phytopathogènes les plus importants (St-Germain et Summerbell, 1996).

1.2-taxonomie

Selon Champion (1977)

Règne	Fungi
Phylum	Ascomycota (deutéromycota)
Classe	Euascomycetes
Ordre	Pleosporales (sphaerospidales)
Famille	Pleosporaceae
Genre	<i>Phoma</i>

1.3-Ecologie

1.3.1-Habitat et isolement

Phoma est une moisissure omniprésente et répandue; des espèces ont été trouvées dans le sol et sur diverses matières végétales mortes. Plusieurs espèces de *phoma* s'adaptent facilement aux paramètres de l'environnement intérieur et se développent bien sur des matériaux de construction. Le *Phoma* se trouve également sur les produits du bois (bouleau), le papier, les textiles (laine), le cuir, certains aliments contenant des gras végétal et animal, les produits laitiers de même que sur les fruits et les légumes. Les espèces de *phoma* semblent avoir une affinité pour les substrats contenant les lipides, telles les graines et les noix (Abdel-Hafez et Shoreit, 1985).

La prévalence des spores de *phoma* dans l'air extérieur tente à être faible ou très faible, même si le *phoma* est un des mycètes les plus communs et les plus abondants à la surface des feuilles. Le *Phoma* peut produire des taches roses et pourpres sur les murs peints en raison de la présence de pigments diffusibles (Lugauskas et al., 2006).

1.3.2- exigences de croissance

La température de croissance optimale des espèces de *phoma* est de 26 à 37°C, mais certaines espèces comme le *P.glomerata* sont incapables de se pousser à 37°C. Ces mycètes sont hydrophiles et poussent bien sur des matériaux humides à des taux approchant le point de saturation (Domsch et al., 1993).

1.4-Morphologie

1.4.1-Morphologie macroscopique

Les colonies de *phoma* se développent bien sur les milieux de culture mycologique habituels. Elles viennent à maturité habituellement en dedans de 5 jours et ont tendance à s'étendre. Les colonies atteignent une taille d'environ 10 cm après 8 à 10 jours en culture sur gélose à l'extrait de malt (MEA). Les colonies sont brunes grisâtres et poudreuses, veloutées ou cotonneuses. Le revers de la colonie est brun foncé à olive au centre et plus pâle à la périphérie. Quelques espèces produisent un pigment diffusible, allant du pourpre rougeâtre au brun jaunâtre, qui est facilement visible au revers de la colonie (Visconti et al., 1987) (Fig6).

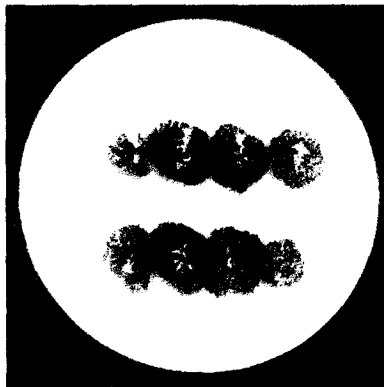


Fig 6 : *Phoma* sur milieu gélosé (Filip et al., 2003).

1.4.2-Morphologie microscopique

Les hyphes : septés (70-100 μm de diamètre), hyalins ou bruns, portent des fructifications asexuées, nommées pycnides.

Les pycnides : sont rondes ou piriformes et de 200-10000 μm de diamètre, et elles contiennent des conidies qui s'échappent à maturité par une ouverture appelée Ostiole (Fig7).

Les conidies : formées sur des conidiophores à l'intérieur de la pycnidie, sont ovales, unicellulaires et hyalines.

Les pycnidies ostiolées septées : sont une caractéristique qui distingue les *Phoma* des autres moisissures semblables (Domsch et *al.*, 1993).

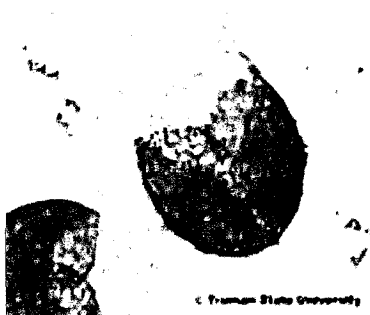


Fig 7: *Phoma* sous le microscope optique (Herrera, 2008).

1.5-Mycotoxines

Les espèces de *phoma* sont connues pour leur production de toxines dirigées contre des cellules végétales ou animales. Parmi ces dernières, des substances ont été reconnues comme étant cytotoxines lorsqu'elles sont étudiées avec un model animal, parmi ces substances il faut noter :

- Les phytochaldasines A et B (la cytochaldasine B est également appelée phomine)
- La déoxaphomine
- La proxiphomine
- L'acide tenuazonique
- L'acide kojique et de l'aflafoxine (Cole et *al.*, 2003).
- La malseccine (Roger, 1990).

1.6-Maladies, symptômes et dégâts

Les symptômes qu'elle provoque frappent beaucoup le cultivateur. Les dégâts qu'elle cause sont cependant minimes. Ils ne sont importants que dans les plantations mal entretenues, insuffisamment fumées et par forte présence de la cécydomyie des tiges, où l'on constate un dessèchement marqué des sarments atteints.

Les symptômes sont très marqués sur les plantes affaiblies par le dépérissement des racines. Pendant la période de végétation, les taches s'agrandissent et brunissent, recouvrant toute la circonférence de la tige. Le champignon ne pénètre pas profondément dans les tiges.

Son mycélium se développe dans les tissus corticaux et n'envahit que rarement le liber et le bois (Viret et *al.*, 1997).

1.7-Fréquence d'apparition

Ces champignons possèdent des équipements enzymatiques très importants, ce qui leur confère des facultés d'adaptation extrêmement vastes (Raimbault, 1981). Ils colonisent des milieux très variables, dont les dégâts sont extrêmement répandus dans toutes les cultures variées (Kilbertusa et *al.*, 1993).

2-*Epicoccum* sp.

2.1-Définition

Les *Epicoccum* sont des saprophytes courants que l'on rencontre sur les semences les plus variées (Champion, 1997). Ce sont des champignons imparfaits filamenteux appartenant à la classe des Deutéromycètes, pouvant causer des dommages importants aux récoltes (maïs, millet, soja, blé, avoine, etc.). Le genre comprend 2 espèces phytopathogènes opportunistes (Patrick, 2006), nommées *E. purpurascens* (anciennement connu sous le nom d'*E. nigrum*) et *E. andropogonis*, ainsi que de nombreuses autres souches enregistrées, mais auxquelles aucun nom n'a encore été attribué (Vojdani et al., 2003).

L'*Epicoccum nigrum* est un agent de contrôle biologique potentiel de certaines maladies des plantes comme la moisissure blanche de la fève. Il est fréquent dans la nature, en particulier comme envahisseur secondaire de végétaux morts (Zhou et al., 1996).

Par ailleurs, Dans certains cas, *Epicoccum* sp. peut jouer le rôle d'un agent de lutte biologique. Dont il a la capacité d'empêcher l'infection avec *Nectria galligena* et *Leucostoma* sp. (Nasraoui, 2006).

2.2-Taxonomie

Selon Champion (1997)

Règne	Fungi
Phylum	Ascomycota
Classe	Dothideomycètes
Ordre	Pleosporales
Famille	Leptosphaeriaceae
Genre	<i>Epicoccum</i>

2.3-Écologie

2.3.1-Habitat et isolement

L'*Epicoccum* est une moisissure saprophyte cosmopolite répandue, elle est souvent associée à des plantes sénescents et à de la matière végétale en décomposition. *Epicoccum* sp. est isolé à partir du bois, du papier, de textiles et d'une variété d'aliments, et il est trouvé sur des insectes et de la peau humaine (St-Germain et Summerbell, 1996).

On le trouve également dans le sol et il est facilement isolé dans les échantillons d'air. Il arrive même qu'il soit trouvé occasionnellement dans les échantillons d'air intérieur (Mold-Help, 2001).

Les spores sèches d'*Epicoccum* sont facilement dispersées par le vent et les mouvements hygrosopiques. Dehors, les spores d'*Epicoccum* sont plus communes les jours secs et venteux, avec des décomptes plus élevés à la fin de la journée (Visconti et al., 1987).

2.3.2-Exigences de croissance

Epicoccum est un mycète mésophile capable de se développer entre -3°C et 45°C, avec une croissance optimale à 23-28°C, à un pH de 3-4,5 (Abdel-Lateff et al., 2003).

A l'obscurité, le champignon ne sporule pas ou que très exceptionnellement ; à la lumière, il sporule abondamment (Champion, 1997).

2.4-Morphologie

2.4.1- Morphologie macroscopique

Les colonies mycéliennes sont roses ou rouges avec un mélange de jaune et parfois de gris (Fig8). Une légère pigmentation vert clair ou orangée peut être observée dans le substrat. La couleur des colonies se rapproche de celle de *Fusarium roseum* mais le mycélium est moins exubérant. Quand les spores sont présentes, le dessus de la colonie se recouvre d'un feutrage marron (Simmons et al., 1997).

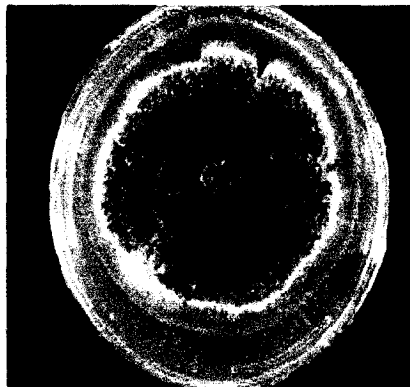


Fig 8 : *Epicoccum* sp. sur milieu gélosé (Nielsen, 2006).

2.4.2-Morphologie microscopique

Les hyphes : sont de jaunes à bruns. Les conidiophores sont courts, mesurant 5-15 x 3-6 μm et ils sont légèrement pigmentés (d'incolores à brun pâle); chaque conidiophore pousse directement sur un hyphe, et la plupart du temps, ils sont regroupés en faisceaux (Bisht et *al.*, 2004).

Les conidiophores : sont foncés, courts, trapus, serrés les uns aux autres. Ils donnent naissance à des spores terminales, subsphériques, cloisonnées, brun noirâtre, de 15 à 25 μm de diamètre (Champion, 1997). Chaque conidiophore produit des conidies (Weber, 2006).

Conidie : produite par chaque conidiophore, multicellulaire, globuleuse ou piriforme, de 15-25 μm de diamètre, avec une base en forme d'entonnoir et une large cicatrice lors du détachement de la conidie à maturité (Zhang et *al.*, 2007).

Elles sont habituellement présentes dans les masses denses de faisceaux de conidiophores. Elles sont brunes foncées dorées, puis noircissent à maturité jusqu'à cacher les septa qui divisent les conidies, parfois jusqu'en 15 cellules (Mallea et *al.*, 1991) (Fig9).



Fig 9 : *Epicoccum sp.* sous microscope (Caltex, 2007)

2.5- Mycotoxines

Les métabolites secondaires sont des composés non essentiels au métabolisme basique des champignons. Ces composés sont généralement produits au cours de l'idiophase et peuvent être très diversifiés au niveau de leur structure chimique. Quelques métabolites sont spécifiques à une ou deux espèces alors que d'autres peuvent être produits par différents genres (Gaitatzis et *al.*, 2002). Les enzymes responsables de la synthèse des métabolites secondaires sont très diversifiées suite à l'évolution de gènes impliquées, à l'origine, dans les fonctions métaboliques fondamentales (Steyn, 1980).

Les mycotoxines sont des substances élaborées par des champignons (Roger, 1990). Ces métabolites secondaires sont des dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques (Awad, 2005). Les mycotoxines sont un moyen de défense pour les champignons contre les parasites ou contre d'autres organismes en concurrence dans le même environnement (Adams, 2002).

Selon les connaissances actuelles, il n'y a aucune mycotoxine produite par *Epicoccum* qui serait nocive pour les humains ou les animaux. *Epicoccum* produit quelques substances toxiques connues qui sont biologiquement actives contre des plantes, des mycètes, bactéries, des virus (cas de la lutte biologique) et quelques cellules animales *in vitro* (Su et al., 1992).

Certaines toxines, telle l'épicorazine B, ont des propriétés antifongiques et antibactériennes. Toutefois, l'épicoccine A montre une faible activité antimicrobienne (Dixit et al, 1992). Les autres substances antibiotiques produites par *Epicoccum* sont les suivantes : l'épicorazine A et B, l'indole-3-acetonitrile et la flavipine (Hogan et al., 1996).

Par exemple, les épicoccamides (B-D) ont des effets antiprolifératifs envers des lignées cellulaires de la leucémie (Wangun et al., 2007). L'épicoccone est un antioxydant et l'épicocconone est un fluorochrome naturel dont l'affinité pour les protéines pourrait être utile comme marqueur (Choi et al., 2006).

2.6-Maladie, symptômes et dégâts

Ces saprophytes s'installent dans les téguments avant même que la semence ait atteint sa pleine maturité. Ils sont généralement en mélange avec d'autres organismes, notamment sur les céréales. Leur présence gêne, à l'analyse, le développement de parasites importants, notamment de *Fusarium nivale* (Champion, 1997).

2.7-Fréquence d'apparition

Suivant les semences, les échantillons et les années de production, les taux d'infestation sont extrêmement variables.

Sur céréales, carottes et quelques autres espèces, il n'est pas rare de rencontrer jusqu'à 80 ou 100 % de graines infestées (Champion, 1997).

Chapitre 3 : Les milieux de culture

Milieux de culture

La composition d'un milieu de culture pour cultiver les champignons est un facteur important puisqu'elle influence la quantité et la qualité des spores. Pour *Trichoderma*, il était donc primordial d'améliorer la qualité nutritionnelle du milieu de base employé pour sa multiplication (Johanne et Laverdière, 2003).

3.1-Définition

Une préparation nutritive destinée à la croissance de microorganismes en laboratoire s'appelle milieu de culture (Tortora et *al.*, 2003).

Un milieu de culture est une préparation solide ou liquide, utilisé pour faire croître, pour transporter et conserver des organismes (Prescott et *al.*, 2003).

3.2-caractéristiques d'un bon milieu de culture

Un bon milieu doit contenir tout les nutriments dont le micro-organisme a besoin pour se développer, il faut des milieux spéciaux pour l'isolement, l'identification et la mesure de la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques, pour les analyses d'eau et de nourriture, pour la micro bio-industrielle et d'autre activité.

Bien que tous les microorganismes exigent une source d'énergie, de carbone d'azote, de phosphore, de soufre et de divers minéraux.

La composition précise d'un bon milieu dépend de l'espèce à cultiver car les besoins en éléments nutritifs sont très spécifiques.

La connaissance de l'habitat normale d'un microorganisme est souvent utile dans la sélection d'un milieu de culture approprié, les besoins nutritifs reflétant les besoins naturels.

Très souvent, un milieu est utilisé pour la croissance sélective de certains microorganismes spécifiques ou pour l'identification d'une espèce particulière dans ce cas, la fonction du milieu déterminera aussi sa composition (Prescott et *al.*, 2003).

3.3-Les types des milieux de culture

Il existe une grande diversité de milieux destinés à la culture de microorganismes en laboratoire. On peut se procurer la majorité d'entre eux dans le commerce sous la forme de mélanges auxquels on doit ajouter de l'eau et qu'on doit ensuite stériliser.

Les milieux liquides, appelés couramment bouillons de culture, sont fort utiles mais, lorsqu'il est préférable de faire croître des microorganismes sur un milieu solide, on ajoute au bouillon de culture un agent de solidification tel que l'agar-agar, ou agar ; le milieu de culture s'appelle alors **gélose** (Tortora et *al.*, 2003) .

Les milieux synthétiques ou définis

Ce sont les milieux de culture de composition connue.

Tous les milieux définis ne sont pas aussi simples, ils peuvent être constitués de dizaines de composants, les milieux définis sont beaucoup utilisés en recherche afin de déterminer ce que le microorganisme étudié est capable de métaboliser (Prescott et *al.*, 2003).

Les milieux complexes

Les milieux qui contiennent des ingrédients de composition chimique indéterminée sont appelés milieux complexes.

Ces milieux sont très utiles, car un seul milieu complexe peut être suffisamment riche et complet pour satisfaire les besoins nutritifs d'un microorganisme particulier sont inconnus et donc qu'un milieu défini ne peut pas être préparé.

Les milieux complexes contiennent des composants indéfinis comme des peptones, des extraits de levures (Prescott et *al.*, 2003)

Les milieux sélectifs

Généralement l'analyse qualitative est réalisée sur un échantillon complexe comportant une flore mixte pouvant provenir de diverses origines : eau, sol, prélèvements biologiques...(Bousseboua, 2002).

4-Principaux axes d'amélioration des milieux

L'élaboration constamment de nouveaux milieux de culture, et l'amélioration des milieux existants, sont dirigées pour conforter le potentiel antagoniste des microorganismes, auxquelles s'intéressent les chercheurs dans des domaines tels que la phytopathologie.

4.1-La qualité nutritionnelle

La qualité d'un milieu de culture dépend avant tout du rapport des concentrations des divers constituants, car l'excès d'un seul substrat (minéral ou organique) peut rendre le milieu toxique (Le Minor et Véron, 1982).

L'azote et le carbone sont les principaux éléments nutritifs présents dans la nature, leur interaction joue un rôle important dans le métabolisme secondaire des champignons (Da Silva et *al.*, 2001). Plusieurs voies de biosynthèse de métabolites secondaires sont affectés négativement par les sources de carbone et d'azote qui sont favorable à la croissance, par exemple, le glucose et les sels d'ammonium (Sanchez et Demain, 2002) alors que l'amidon, le nitrate et certains acides aminés sont des stimulateurs de la production de plusieurs métabolites secondaires (Awad, 2005).

4.1.1-Régulation par la source de carbone

Le choix de la source du carbone influence fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production de mycotoxine (Martain et Demain, 1980). Les substrats rapidement métabolisés tels que le glucose peuvent souvent réaliser des taux de croissance cellulaire maximale, mais sont connus pour inhiber la production de nombreux métabolites secondaires. Cette "répression du catabolite" semble être due aux intermédiaires, produits du catabolisme rapide du glucose interférant avec les enzymes dans le processus du métabolisme secondaire. (Demain et *al.*, 1982). Les sucres simples tels que le glucose et le fructose comme uniques sources du carbone révèlent une grande croissance fongique, une bonne sporulation et une meilleure production de l'aflatoxine (Awad, 2005). Par contre, les sucres plus complexes comme le galactose, le xylose, le mannitol et le lactose (Kacholz et Demain, 1983) ne permettent pas bien la production de l'aflatoxine. Les substrats lentement assimilés tels que l'amidon (Basak et Majumdar, 1973) ont des meilleurs rendements de production d'antibiotiques chez les champignons.

Les sources de carbone telles que l'amidon, la dextrine, le glucose et le saccharose sont communément utilisées comme des substrats de croissance pour produire des enzymes, des antibiotiques et d'autres métabolites secondaires par la fermentation (Sanchez et Demain, 2002).

4.1.2-Régulation par la source d'azote

La source d'azote régule le métabolisme secondaire, comme la source de carbone. Les niveaux élevés de l'azote répriment la production d'antibiotiques pendant l'idiophase (Junker et *al.*, 1998) ont trouvé pour leur part que le contrôle de la concentration des ions ammonium était important pour la production de métabolite secondaire. L'utilisation des acides aminés comme sources d'azote, peut inhiber fortement ou améliorer la biosynthèse de certains métabolites secondaires (Ahronowitz, 1980). Ces effets bénéfiques peuvent être dus à un rôle inducteur joué par l'acide aminé ou simplement par un apport accru en précurseurs.

Le choix de la source d'azote utilisée dans le milieu de croissance peut avoir des effets différents sur la production de l'aflatoxine chez différentes espèces de champignons.

La source d'azote n'influence pas seulement la production du mycotoxine mais aussi la croissance et un développement sclérotique (Bennett et *al.*, 1979).

4.1.3-Oligoéléments et facteurs de croissance

Les moisissures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (Benaouida, 2008). Par exemple, la production d'EPS par *Lactobacillus casei* a doublé après ajout de Mn^{2+} dans un milieu défini (Bergmaier, 2002). De plus, d'autres facteurs sont essentiels comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique), qui interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des coenzymes (Botton et *al.*, 1990).

4.2-Les conditions physicochimiques de la croissance

4.2.1-Température

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance, la germination et la sporulation des champignons, mais aussi sur leur métabolisme. En effet l'influence de la température sur les moisissures est complexe. En particulier, les températures extrêmes de croissance, de germination et de sporulation peuvent être très différentes (Raimbault, 1981).

La thermotolérance est très variable suivant les espèces :

Aspergillus niger tolère une température maximale de croissance proche de 50°C, mais pousse encore à une température inférieure à 20°C.

Notre souche de *Trichoderma viride* possède un spectre de thermotolérance tout à fait en accord avec la littérature, bien que son optimum de croissance situé entre 23 et 29°C. En plus de son influence sur l'organisme lui-même, la température agit également sur l'activité de l'eau (Raimbault, 1981).

L'expression des phénomènes d'antagonisme est très dépendante de la température ; en effet, si presque toutes les souches de *Trichoderma* possèdent des propriétés antagonistes entre 18 et 25°C, très peu en présentent en-deçà et au-delà de ces limites (Dubos et *al.*, 1983). Donc, il faut relever l'importance de la température sur l'expression des capacités antagonistes des *Trichoderma* (Olivier et Germain, 1983).

4.2.2-Teneur en oxygène

La quantité d'oxygène mise à la disposition du mycélium est un facteur important de son développement. Cette quantité doit être suffisante pour ne pas limiter sa croissance. Elle dépend de la vitesse de diffusion du flux gazeux dans le milieu, de la vitesse et de la vitesse de consommation d'O₂ par le mycélium pour sa respiration (Raimbault, 1981).

4.2.3-pH du milieu

Le pH du milieu est un facteur essentiel dans l'amélioration des milieux de culture, en effet, il doit être suffisamment acide dès le début pour éliminer les risques de contaminations. Cependant lors de la croissance, il se produit une acidification très importante qui amène rapidement le pH aux environs de 2.4 lors de la sécrétion de produits acides : cette acidification tend à ralentir et même à stopper la croissance du mycélium après 8 à 10 jours d'incubation. Lors des études cinétiques de croissance, il apparaît qu'un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée peut avoir un effet tampon sur le pH du milieu et donc favoriser la croissance du mycélium (Raimbault, 1981).

4.2.4-Taux d'humidité et l'activité de l'eau

La production de mycotoxine est favorisée par l'humidité et l'activité de l'eau (Aw) élevées. Les champignons sont capables de se développer à des humidités relatives beaucoup plus faibles que celles requises pour le développement des bactéries ou des levures.

Il faut faire ici une distinction importante entre l'humidité relative de l'atmosphère (H.R.) et la teneur en eau du substrat (H₂O %). Les champignons peuvent se développer sur des substrats comportant au moins 12 % d'eau et à des humidités relatives supérieures à 60 %. Donc, l'eau joue un rôle capital dans ce type de fermentation. La quantité d'eau solvante et le

degré d'activité de cette eau ont une influence déterminante sur le développement du mycélium (Raimbault, 1981).

L'humidité est en relation avec la pression osmotique qui joue un rôle sélectif sur la croissance des microorganismes. En effet, contrairement aux levures et aux bactéries, les moisissures tolèrent et même préfèrent, en général, des milieux à pression osmotique élevée. Ce facteur, lié à l'utilisation d'un pH acide, peut permettre d'effectuer des cultures fongiques dans des conditions non stériles, sans avoir de contaminations bactériennes importantes (Raimbault, 1981).

4.2.5-Densité de l'inoculum de spores

L'inoculation par les spores de la souche de champignon doit être suffisante* pour assurer un ensemencement homogène du substrat et un démarrage rapide de la croissance de façon à éviter une éventuelle compétition avec des contaminants. Cependant l'inoculum ne doit pas être trop important, d'abord pour des raisons pratiques évidentes, ensuite parce qu'une densité de spores trop élevée peut entraîner des phénomènes d'inhibition et diminuer le pourcentage de germination (Raimbault, 1981).

4.2.6-Mutation

L'exposition aux UV a été utilisée par plusieurs auteurs pour améliorer la production des métabolites secondaires des champignons dans les milieux de culture. Par ailleurs, l'irradiation aux UV de matières brutes par "UV engenders" dans les industries agricoles, a produit des métabolites plus toxiques que ceux présents dans la souche sauvage, et/ou a induit la production de mycotoxine par des moisissures non toxigéniques (Aziz et Smyk, 2002). Les données obtenues dans les études suggèrent que les traitements mutagènes sont la source des changements génétiques qui mènent aux variations biochimiques dans les cultures (Agrawal *et al.*, 1999). La mutagenèse ou la biosynthèse combinatoire offrent des possibilités de modification des voies de biosynthèse aboutissant à la production de nouvelles molécules (Reynolds, 1998).

Le meilleur exemple est l'amélioration des souches de *Penicillium* pour la production de la pénicilline. Cette production est de 50 g/l, avec une amélioration d'au moins 4000 fois par rapport à la souche sauvage (Peberdy, 1985).

Partie 2 : Matériel et méthodes

1- matériel fongiques

1.1-l' agent antagoniste utilisé

L'agent antagoniste utilisé est représenté par la souche de *Trichoderma viride*, a été isolée du sol de Tahir de la willaya de Jijel et identifiée au laboratoire de Mycologie Appliquée de l'Université Mentouri Constantine (Fig10).

La souche récupérée sous la forme d'une culture sur milieu PDA solide (200 g de pommes de terre, 1/ l de l'eau, 20 g de glucose et 20 g de l'agar-agar) (Pierre et Francis, 1997) en erlenmyer.

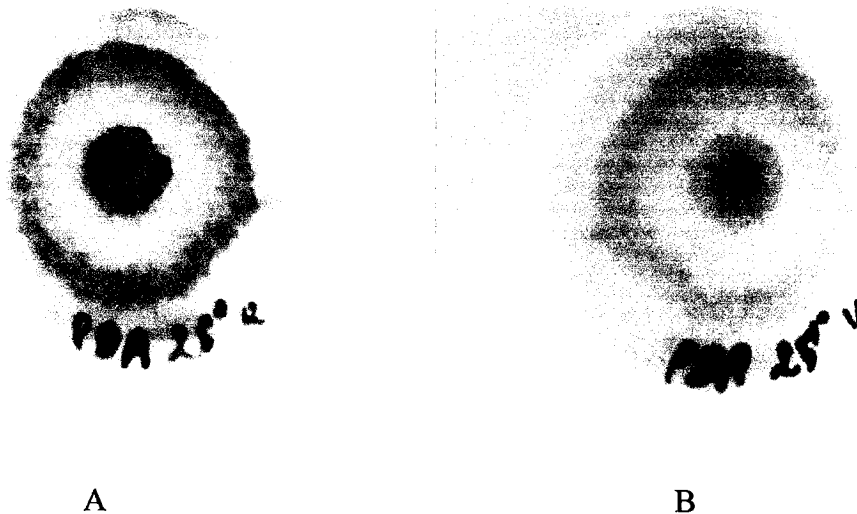


Fig 10 : *Trichoderma viride* sur milieu PDA ; A :(recto) ;B :(verso) .

On a intéressé à cette espèce grâce à ses propriétés biologiques et ses applications biotechnologiques ;

En effet, *Trichoderma* a été un bon modèle exceptionnel pour étudier les mécanismes de bio- contrôle, car elle est omniprésente, facile à isoler et de cultiver sur les milieux de culture, elle se dispose d'un système enzymatique capable d'attaquer un large éventail d'agents pathogènes des plantes.

Également, *Trichoderma* croît très rapidement sur les milieux de culture, ce qui devrait l'avantagé lors des confrontations *in situ* et pour la colonisation rapide des niches écologiques (Johanne, 2002; Shalini et Kotasthane, 2007).

Notre étude est basée sur cette espèce par le suivi de son développement sur milieux PDA et V8 solides (2.5 g de CaCO₃, 200 ml de jus de légumes commercial V-8, 20 g de l'agar-agar, 1 l de l'eau distillée) (Pierre et Francis, 1997), sa fermentation sur deux milieux liquides (PDA et V8) (la composition est celle des milieux solides en absence de l'agar-agar) son pouvoir antagoniste contre deux agents pathogènes *Phoma sp. et Epicoccum sp.*

1.2-Les agents pathogènes utilisés

On a utilisé comme agents pathogènes deux souches fongiques ; *Phoma sp. et Epicoccum sp.*, isolées à partir de la tige de la plante de maïs cultivée à Tahir de la willaya de Jijel, provient de même laboratoire sous les mêmes conditions. Elles ont un pouvoir pathogène différent sur les végétaux hôtes (Fig11-12).

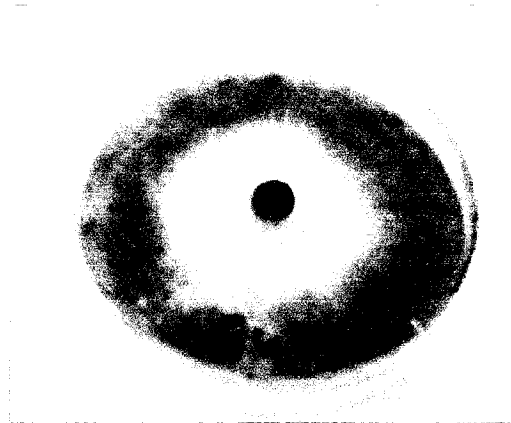


Fig 11 : *phoma sp* sur milieu PDA.

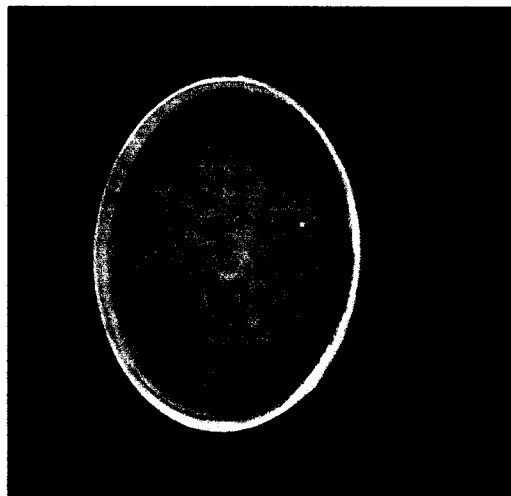


Fig 12 : *Epicoccum sp.* sur milieu PDA.

2- Réactivation des souches

2.1- *Trichoderma viride*

A proximité du bec Bunsen on prélève attentivement à l'aide d'une anse de platine stérile quelques spores de *T.viride* trouvée dans l'erenmyer, et on la fait ensemencée dans un tube stérilisé préalablement dans le four pendant 20 min, contenant 10 ml d'eau physiologique stérile. Les tubes sont bien fermés et incubés à 25°C pendant 3 jours.

Même méthode de réactivation est faite pour les souches fongiques pathogènes.

3- la multiplication des souches fongiques *in vitro*

3.1- *Trichoderma viride*

Après cette période de réactivation, la souche est prête à la multiplication. On transfère aseptiquement 0.5ml de la solution sporale de *T.viride* contenants dans les tubes d'eau physiologique stérile concentrée à 9% à des boîtes de Pétri coulés préalablement par le milieu PDA. La mise en culture se fait par l'étalement de la solution sur toute la périphérie de la boîte à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Les boîtes ont été bien fermées et incubées dans l'étuve à une température de (25°C) pendant 7 jours (Davet et Rouxel, 1997).

Même méthode de culture est faite pour les deux souches fongiques pathogènes.

4-Tests de développement sur milieux (PDA et V8) solides et liquides

4.1-Sur milieux (PDA et V8) solides

A proximité du bec bunsen, des disques du 5 mm Ø ont été formés sur toute la surface fongique de *Trichoderma viride* de 7 jours. Les disques ont été localisés aux centres des boîtes de Pétri coulées par le milieu PDA ou V8 et bien fermées (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1997).

4.1.1-Test de la température

Parmi les boîtes de Pétri ensemencées, 6 boîtes ont été dirigées vers le test de la température, dont, pour chaque milieu, 2 boîtes ont été incubées, à la température ambiante 25°C, 2 boîtes à 37°C et 2 boîtes à 5°C. La surveillance a été effectuée au long des 10 jours d'incubation.



4.1.2-Test du pH

Les boîtes de Pétri ont étéensemencées par la même méthode du test de la température, sauf que les deux milieux PDA et V8 ont été préparés à être acides pH5, ou basiques pH9. Pour chacun des deux milieux, 2 boîtes de Pétri ont été coulées par le milieu basique pH9, et 2 boîtes par le milieu acide pH5, l'incubation se fait à une température ambiante 25°C et les observations sont mentionnées tous les 10 jours d'incubation.

4.2-Dans les milieux (PDA et V8) liquides

Les milieux concernés sont de nature liquide, dont ils manquent de l'agar-agar ; dans ce test, chaque 4 disques du 5mm Ø de la souche *Trichoderma viride* cultivée sur milieu PDA solide ont été inoculés dans un flacon contenant 150 ml PDA ou V8 liquide. La durée d'incubation optimum est de 21 jours à une température de 25°C.

La filtration a été effectuée grâce à un papier Wattman n° 4. Le mycélium a été pesé frais et après séchage (à 105°C) jusqu'à l'obtention du poids sec stable (Goulard et *al.*, 1995).

5-Tests d'antagonisme

L'activité antagoniste *in vitro* de *Trichoderma viride* vis-à-vis de *Phoma sp* et *Epicoccum sp* a été étudiée selon deux méthodes ; Test de confrontation direct en Pétri et test d'antagonisme par l'effet de filtrats de fermentation.

5.1-Test de confrontation directe

Cette méthode appelée encore « technique des cultures opposées », les confrontations *in vitro* sont effectuées selon la méthode de Patel et Brown (1969), qui consiste à déposer dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, contenant 15 ml de milieu PDA, deux pastilles gélosées (5 mm de diamètre) prélevées des cultures des 2 champignons âgés de 7 jours à l'aide d'un emporte pièce stérile, l'une portant la souche antagoniste *Trichoderma viride* et l'autre l'agent pathogène à tester). Ces dernières sont placées suivant un axe diamétral à 3 cm de distance et à équidistance du centre de la boîte.

L'incubation des boîtes est réalisée pendant 7 jours à l'obscurité à une température de (25 °C). Les témoins sont représentés par des boîtes de Pétri contenant uniquement au centre une pastille gélosée (5mm de diamètre) constituée par l'inoculum de moisissure pathogène âgée de 7 jours. Chaque traitement est répété 2 fois.

L'évolution de la croissance mycélienne est effectuée toutes les 24 heures par la mesure du diamètre des colonies mycéliennes des deux champignons antagoniste et pathogène.

Après cette période les notations sont faites en mesurant la largeur de la zone d'inhibition observée entre les deux colonies (Fig13).

5.1.1-évaluation de la zone d'inhibition

Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne exercés par *T. viride* ont été calculés selon la formule décrite par Patel et Brown (1969) :

$$I (\%) = (1 - D_n / D_o) \times 100$$

Où I (%) représente inhibition moyenne de la croissance mycélienne,

D_n est le diamètre moyen du champignon pathogène en présence de *T. viride*.

D_o est le diamètre moyen du champignon pathogène en absence de *T. viride* (témoin)

Pastille gélosé de l'agent pathogène.

Pastille gélosé de *Trichoderma viride*

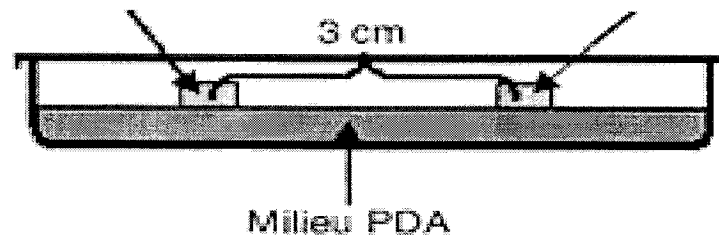


Fig 13 : Confrontation direct de *Trichoderma viride* sur milieu PDA.

6.2-Test d'antagonisme par l'effet de filtrats de fermentation

Même méthode est employée avec les deux agents pathogènes (*Phoma sp. et Epicoccum sp.*) pour les filtrats issus de milieu V8 liquide et celle de milieu PDA liquide. Chaque expérimentation est répétée deux fois.

Après la récupération des filtrats des cultures de la fermentation âgées de 15 jours, des disques en papier wattman stérile n° 4 de 5mm Ø sont imbibés de 02 ml de filtrat contenant les métabolites brutes de *T. viride* à concentrations décroissantes (0 ; 1 ; 2) g glucose et (0 ; 1 ; 2) g extrait de levure.

Dans chaque boîte de Pétri coulée préalablement par le milieu PDA gélosé, trois disques de papier filtre contenant la même dose, ainsi que la même concentration de filtrat sont transférés aseptiquement et déposés à la surface de la gélose à des distances définies de la souche de moisissure pathogène qui y est représenté par un disque gélosé de 5mm de diamètre au centre de la boîte (fig14). L'ensemble des boîtes est incubée à une température de (25°C) pendant 4jours, au terme desquelles on effectue la notation des résultats en calculant la croissance radiale (mm) de parasite (Clement, 1968).

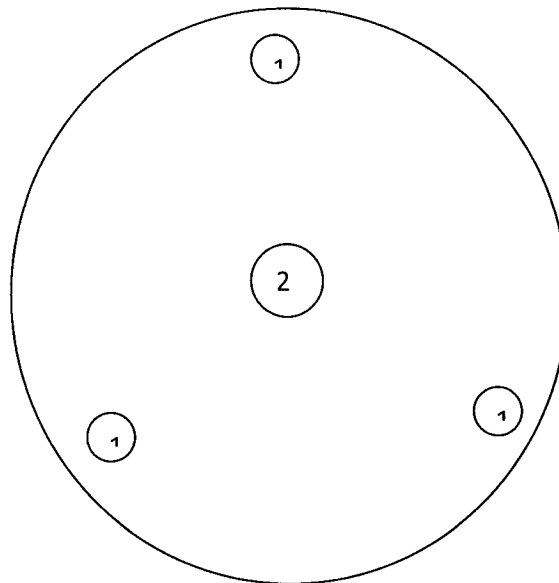


Fig 14 : Confrontation de *Trichoderma viride* par l'effet de filtrat de fermentation sur milieu PDA.

1 ; disque de papier wattman stérile imbibé de filtrat

2 ; pastille gélosé de l'agent pathogène

Partie 3 : Résultats et discussion

1- Test de la température

A une température de 25°C, dans les deux milieux solides, à partir du 3^{ième} jour (Fig15-16), on observe une augmentation importante de la phase de germination (77mm sur PDA et 68mm sur V8). Toutefois la vitesse de la croissance du mycélium est encore relativement importante. Ceci montre que la souche que nous avons utilisée peut supporter des variations de température ambiante (25°C). De même les températures optimale et maximale de germination des spores sont relativement ambiantes (25°C). Nous rappellerons à ce sujet que la thermotolérance était un critère de sélection de l'organisme, car elle permet de simplifier les problèmes de refroidissement des produits en fermentation.

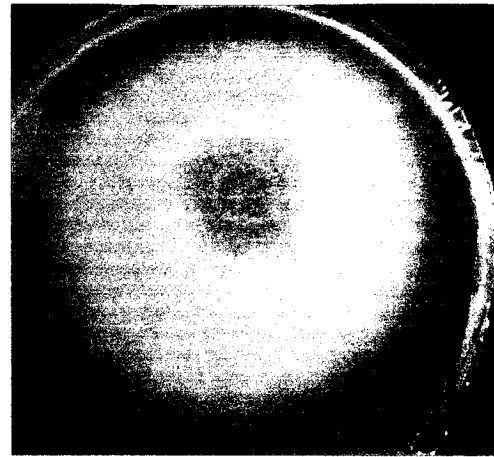
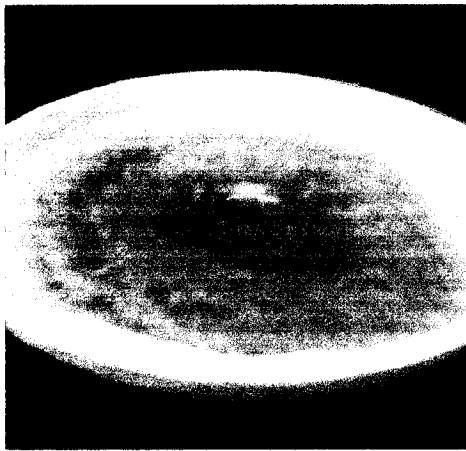


Fig 15 : *Trichoderma viride* sur milieu PDA solide à 25°C, après 3 jours d'incubation. **Fig 16 :** *Trichoderma viride* sur milieu V8 à 25°C, après 3 jours d'incubation.

Les observations liées à ces figures (Fig15-16), y compris les mesures de la croissance radiale, la couleur, la densité de l'occupation et l'apparition des spores sont représentées dans les tableaux (Tableau1 et 2).

La (Fig17) montre que la croissance mycélienne sur le milieu V8 est effectuée en retard avec celle en milieu PDA du 1^{ier} jour (18mm sur PDA et 13mm sur V8) au 3^{ième} jour (77mm sur PDA et 68mm sur V8), où elle s'étend à rapprocher à celle du milieu PDA au 5^{ième} jour et devient semblable.

Tableau 1 : Différentes observations lors du développement de *Trichoderma viride* sur milieu PDA solide, dans des conditions favorables (pH5, 25°C), durant 6 jours d'incubation.

Jours	1	2	3	4	5	6
Diamètre de la croissance (mm)	18	45	77	90	90	90
Couleur	Transparente	Blanchâtre	Bleu-verte	Verdâtre	Verdâtre	Verdâtre
Densité du mycélium	Fin mycélium	Mycélium plus observable	Mycélium enchevêtré	Densité considérable	Grande densité au long de toute la boîte et le couvercle	Grande densité au long de toute la boîte et le couvercle
Apparition des spores	-	-	++	+++	++++	++++

Tableau2 : Différentes observations lors du développement de *Trichoderma viride* sur milieu V8 solide, dans des conditions favorables (pH5, 25°C), durant 6 jours d'incubation.

Jours	1	2	3	4	5	6
Diamètre de la croissance (mm)	13	37	68	81	90	90
Couleur	Transparente	Beige	Blanchâtre	Bleu-verte	Verdâtre	Verdâtre
Densité du mycélium	Trop fin mycélium	Fin mycélium	Mycélium plus observable	Mycélium enchevêtré	Densité considérable	Grande densité au long de toute la boîte et le couvercle
Apparition des spores	-	-	+	++	+++	++++

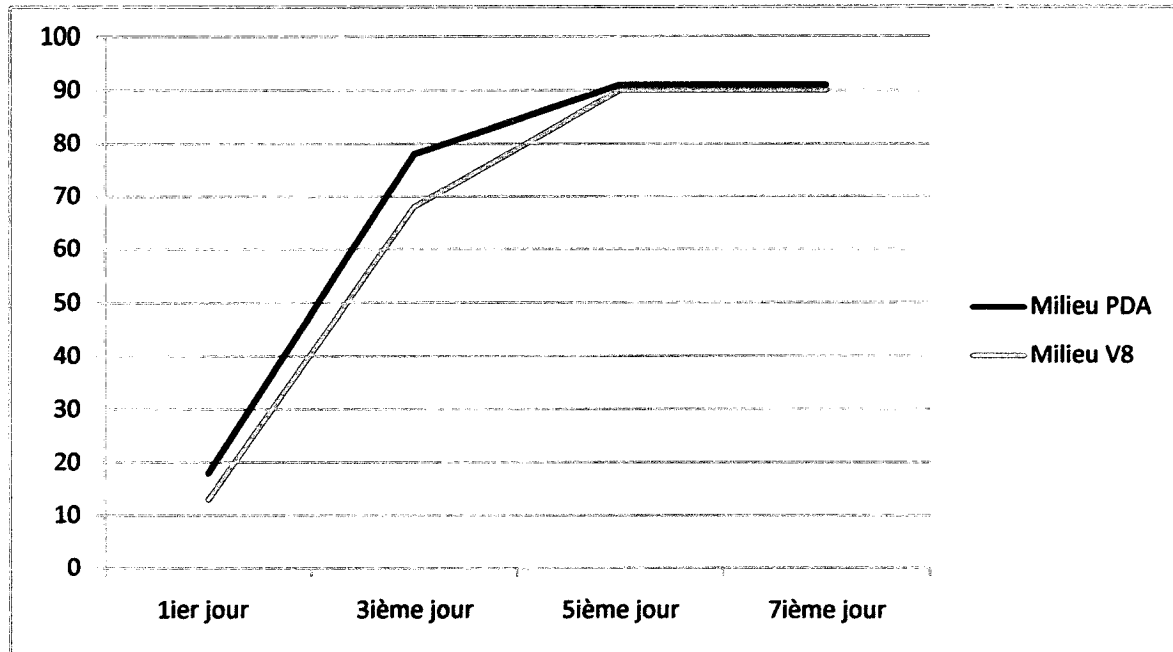


Fig 17 : Croissance mycélienne de *Trichoderma viride* sur milieux PDA et V8 solides dans des conditions favorables (pH5, 25°C), durant 6 jours d'incubation.

Par expérience, un abaissement brutal de la température à 5°C ou une augmentation à 37°C est à l'origine d'une absence totale de développement mycélien (Fig18-19-20 et 21). En effet, l'équipement végétatif est de nature protéique ou glycoprotéique, qui s'influence fortement par les degrés de la température, dont l'activité est inhibée à des niveaux trop bas. Alors qu'à des températures plus élevées 37°C, les protéines sont dénaturées en arrêtant la biosynthèse des différents composés nécessaires au développement.

La dénaturation thermique ou l'inactivation par la température a été étudiée par Raimbault (1981) sur des champignons filamenteux, en dosant l'activité enzymatique résiduelle, après différentes durées d'incubation à des températures comprises entre 30 et 85°C. Les résultats montrent que la dénaturation par la chaleur apparaît pour des températures supérieures à 45°C. Après 15 minutes à 60°C, une perte d'activité de 50 %. Un traitement de 15 minutes à 65°C suffit pour détruire complètement l'enzyme.



Fig 18 : *Trichoderma viride* sur milieu PDA solide à 5°C, après 5 jours d'incubation.



Fig 19 : *Trichoderma viride* sur milieu V8 solide à 5°C, après 5 jours d'incubation.

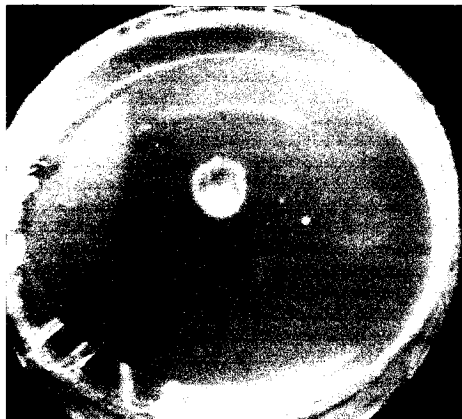


Fig 20 : *Trichoderma viride* sur milieu PDA solide à 37°C, après 5 jours d'incubation.

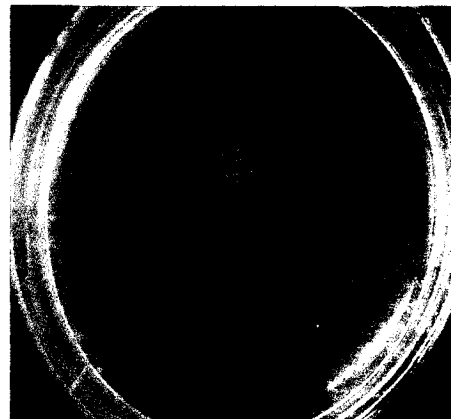


Fig 21 : *Trichoderma viride* sur milieu V8 solide à 37°C, après 5 jours d'incubation.

Par contre, la présence des spores encore existées sur le disque est pour assurer la survie, dont elles sont un moyen de conservation. En revanche, il est connu qu'un champignon sporule davantage lorsqu'il rencontre un obstacle ou qu'il atteint les parois d'un contenant (Johanne et *al.*, 2006).

2-Test du pH

Le pH a une grande incidence ; dans un pH5, le développement mycélien a été observé dès le deuxième jour sur PDA (45mm) (Tableau 1), et suivi par l'apparition des spores au 3^{ème} jour (Fig22-23) avec le changement de la couleur du blanchâtre au bleu-verte et en suite en verdâtre.

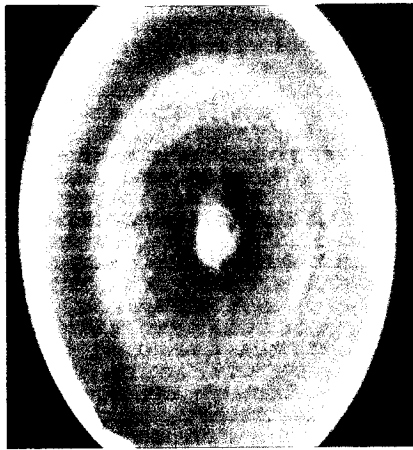


Fig 22 : *Trichoderma viride* sur milieu PDA solide à pH5, après 4 jours d'incubation. **Fig 23 :** *Trichoderma viride* sur milieu V8 à pH5, après 4 jours d'incubation.

Nous notons qu'à un pH9, la couleur du mycélium est seulement plus clair, sans les tons beige au lieu du verdâtre qui est la couleur type de *Trichoderma viride*, en plus de la diminution de la croissance mycélienne (Fig24-25 et 26).

Les mesures de la croissance à pH9 ont été notées dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3 : Mesures de la croissance de *Trichoderma viride* sur milieu PDA à un pH basique (pH9, 25°C) durant 7 jours d'incubation.

Jours	1	2	3	4	5	6	7
Diamètre de la croissance (mm)	5	8	15	37	44	52	60
Couleur	-	Transparente	Beige	Blanchâtre	Blanchâtre	Bleu-verte	Verdâtre
Densité du mycélium	-	Traces	Fin mycélium	Mycélium observable	Mycélium observable	Mycélium enchevêtré	Mycélium enchevêtré
Apparition des spores	-	-	-	+	+	++	+++

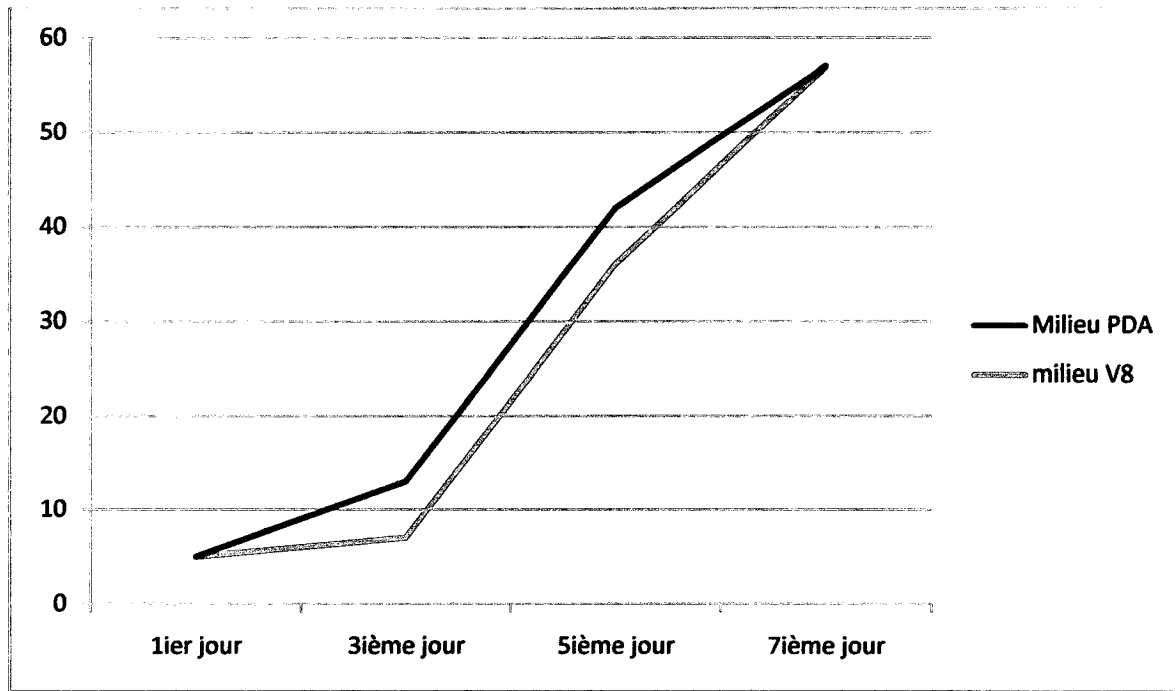


Fig 26 : Croissance de *Trichoderma viride* sur milieux PDA et V8 solides à un pH 9 et 25°C durant 7 jours d'incubation.

Les travaux du Barreau (2007) confirment nos résultats ; chez les champignons filamenteux, l'homéostasie du pH est régulée par un facteur de transcription à doigt de zinc appelé facteur PacC qui contrôle directement l'activation de gènes dit « basiques » (gènes exprimés dans des conditions neutre et basique) et la répression de gènes dit « acides » (exprimés uniquement lorsque les conditions environnantes sont très acides). Cela permet au champignon de s'adapter à des changements extrêmes de pH du milieu environnant (Arst et Penalva, 2003).

Après 6 jours, une fine sporulation visible sur les deux milieux (Fig27-28), c'est-à-dire après le transfert à un milieu acide, qui due des mycotoxines acides secrétés (Barreau et *al.*, 2007).



Fig 27 : *Trichoderma viride* sur milieu PDA

dans un pH9, après 6 jours d'incubation.

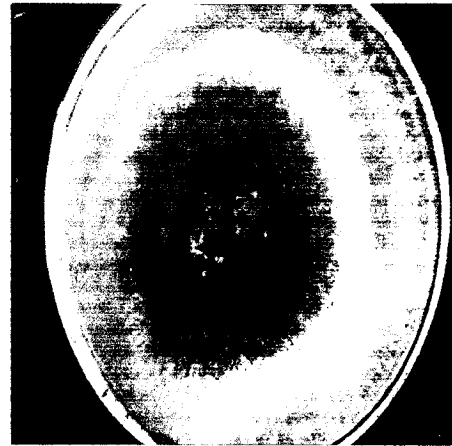


Fig 28 : *Trichoderma viride* sur milieu V8

dans un pH9, après 6 jours d'incubation.

3-Test de développement dans les milieux (PDA et V8) liquides

Le test a été réalisé à la température de la pièce 27°C. Le résultat espéré était que les deux milieux de culture (PDA et V8) solides et liquides favorisaient la croissance de *Trichoderma viride*. Ainsi, les productions se comportent différemment selon la composition chimique ;

L'évolution cinétique de la biomasse dans le milieu PDA montre un démarrage au cours de la phase de croissance, à partir de 2^{ème} jour d'incubation avec 2g/l glucose (Fig29). La croissance est observée au 4^{ème} jour avec l'extrait de levure.

Dans les cultures en milieu liquide, les sources présentes sont facilement utilisées par le champignon et un environnement relativement homogène peut être maintenu par une agitation convenable. Dans ce type de culture, lorsque la croissance est filamenteuse, on constate un développement mycélien sans organisation particulière qui semble s'orienter au hasard (Raimbault, 1981).

3.1-Filtration et extraction

La durée d'incubation optimum est de 21 jours. Les résultats de tous les essais réalisés à ce jour ne montrent pas l'intérêt de poursuivre l'incubation au-delà de la troisième semaine. En effet, Raimbault (1981) a montré que c'était à cause du mode de croissance et la nature de ces microorganismes filamenteuse qui tendent à augmenter la viscosité des milieux, qui rend plus difficile le transfert d'oxygène, l'agitation et l'homogénéisation de tels milieux.

Par ailleurs, nous avons trouvé que la production de la biomasse, en présence de l'extrait de levure unique source de carbone, est très élevée (Tableau5) et lente par rapport à l'autre source d'énergie étudiée (le glucose); cela pourrait être dû à une hydrolyse lente et continue de l'extrait de levure fournissant des conditions renouvelables de source de carbone (Awad, 2005).

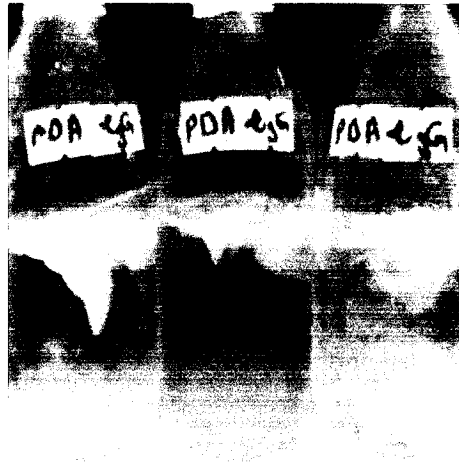


Fig 29 : *Trichoderma viride* dans le milieu PDA, après 2 jours d'incubation.

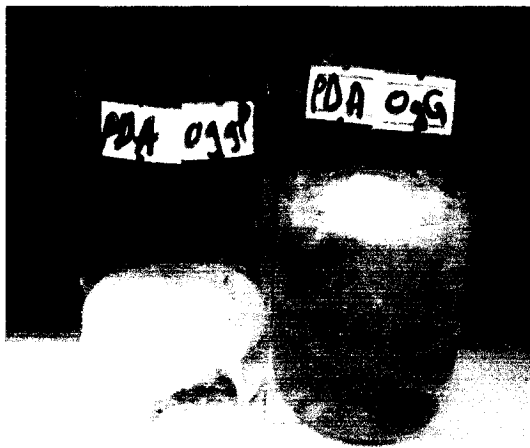


Fig 30 : *Trichoderma viride* dans le milieu PDA

sans glucose, après 3 semaines d'incubation.

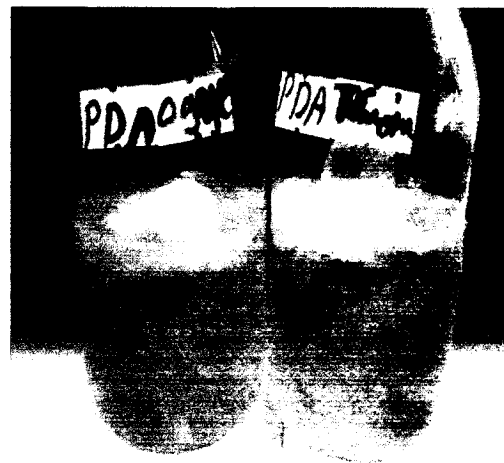


Fig 31 : *Trichoderma viride* dans le milieu

PDA sans extrait de levure, après 3 semaines

d'incubation



Fig 32 : *Trichoderma viride* dans le milieu PDA liquide, avec 1 g/l glucose après 3 semaines d'incubation.

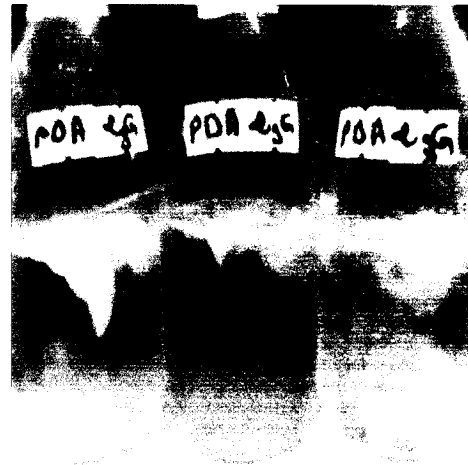


Fig 33 : *Trichoderma viride* dans le milieu PDA liquide, avec 2 g/l glucose après 3 semaines d'incubation.



Fig 34 : *Trichoderma viride* dans le milieu PDA liquide, avec 1 g/l extrait de levure après 3 semaines d'incubation.



Fig 35 : *Trichoderma viride* dans le milieu PDA liquide, avec 2 g/l extrait de levure après 3 semaines d'incubation.



Fig 36 : *Trichoderma viride* dans le milieu PDA avec de l'extrait de levure, après 3 semaines d'incubation.

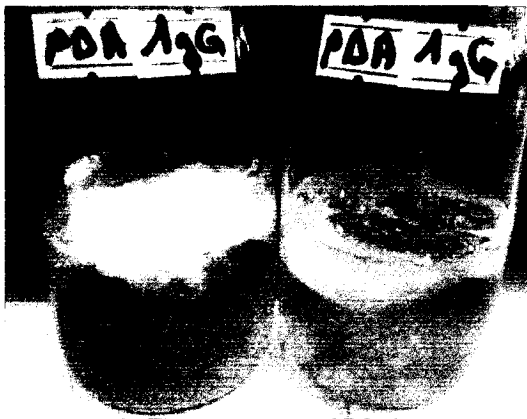


Fig 37 : *Trichoderma viride* dans le milieu PDA liquide, avec 1g/l glucose, après 21 jours d'incubation

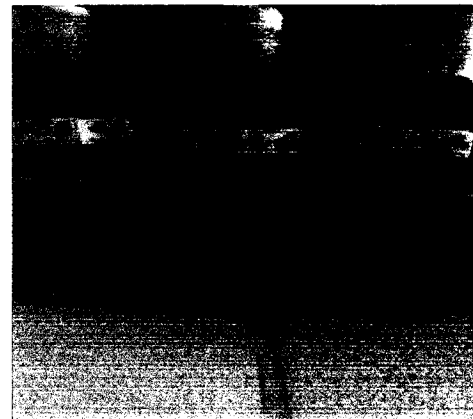


Fig 38 : *Trichoderma viride* dans le milieu PDA liquide avec 2g/l glucose, après 21 jours d'incubation.

Dans le milieu V8, la production de la biomasse commence en retard, après 5 jours (Fig 39). Elle atteint son maximum au 21^{ème} jour (1.93g) avec de 2g l'extrait de levure.

De sa part, comme celle en milieu PDA, en fonction de la concentration de source d'énergie, la composition du milieu V8 montre une graduation observable du poids sec synthétisé par la souche *Trichoderma viride* après 5 et 15 jours d'incubation (Fig 39 et 41), dont après 3 semaines, il est 0.98g avec 0g/l glucose , 1.08g avec 0g/l extrait de levure, 1.48g avec 1g/l glucose, 1.81g avec 1g/l extrait de levure (Fig 40 et Tableau 7), 1.67g avec 2g/l glucose (Tableau 8) et 1.93g avec 2g/l extrait de levure.



Fig 39 : *Trichoderma viride* dans le milieu V8 liquide avec les différentes concentrations du glucose, après 5 jours d'incubation.

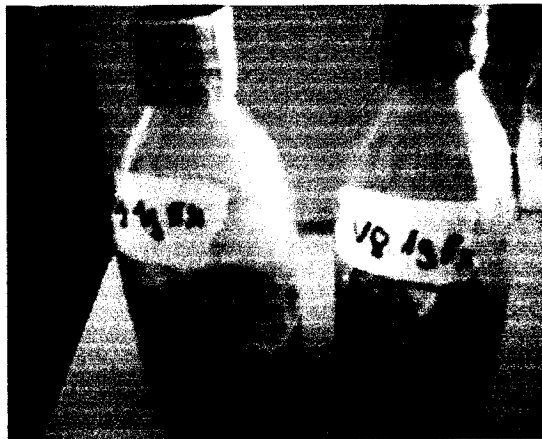


Fig 40 : *Trichoderma viride* dans le milieu V8 liquide avec 1g/l extrait de levure, après 2 semaines d'incubation.



Fig 41: *Trichoderma viride* dans le milieu V8 liquide avec les différentes concentrations du glucose, après 2 semaines d'incubation.

Les figures (42-43-44-45-46-47) illustrent les résultats obtenus, en donnant les poids secs avec comparaison entre les deux milieux liquides (PDA et V8) et les deux sources d'énergie (glucose et extrait de levure) à travers les 3 semaines d'incubation.

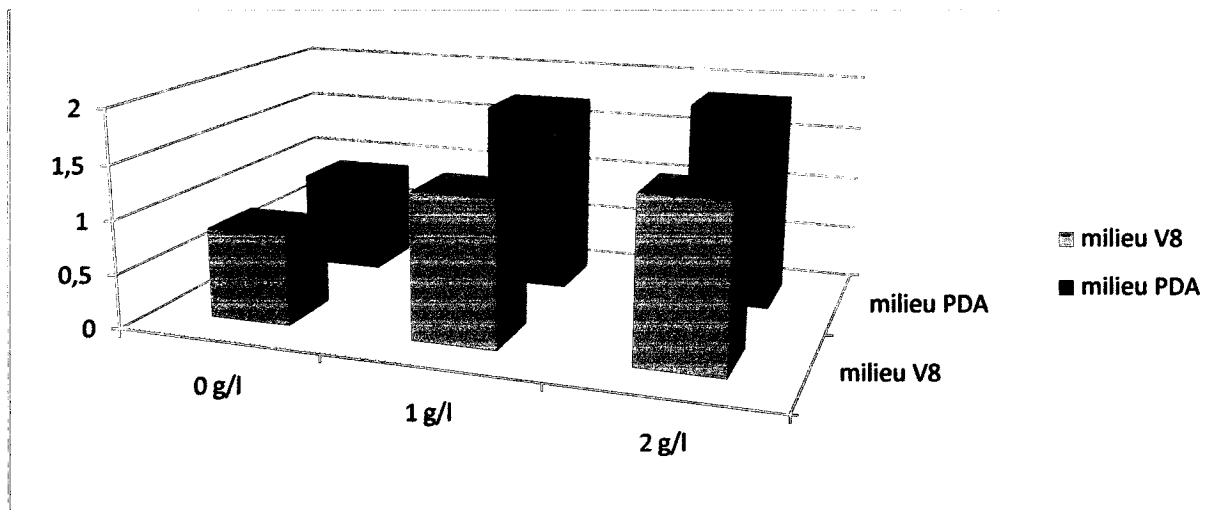


Fig 42 : Biomasse sèche de *Trichoderma viride* contenant l'extrait de levure, après une semaine d'incubation.

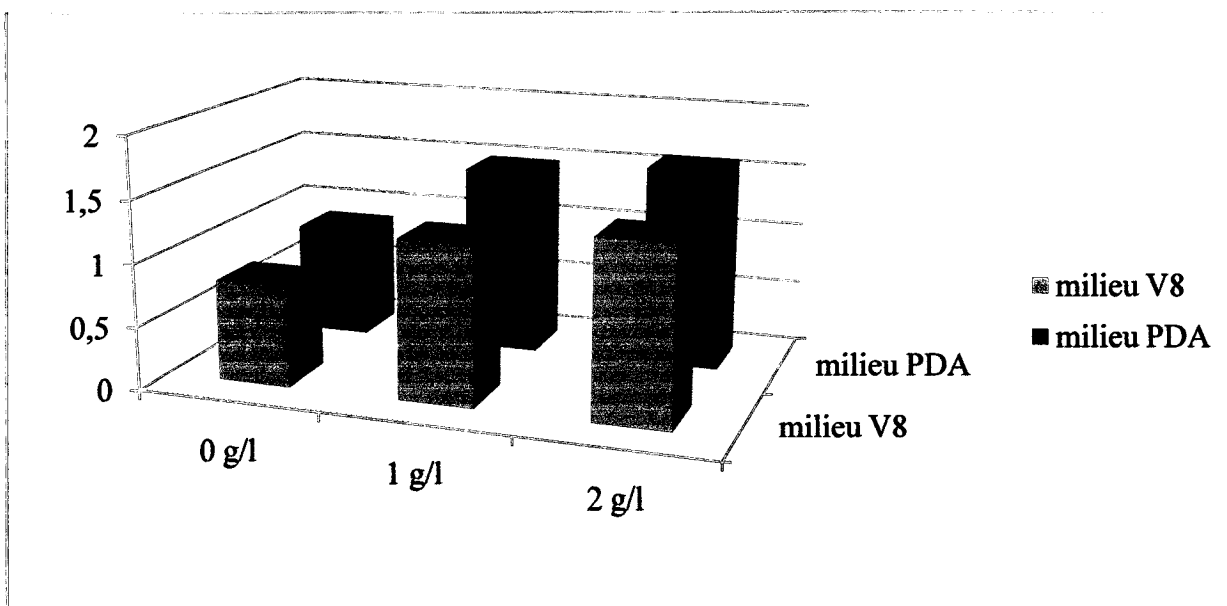


Fig 43 : Biomasse sèche de *Trichoderma viride* en milieux contenant le glucose, après 1 semaine d'incubation.

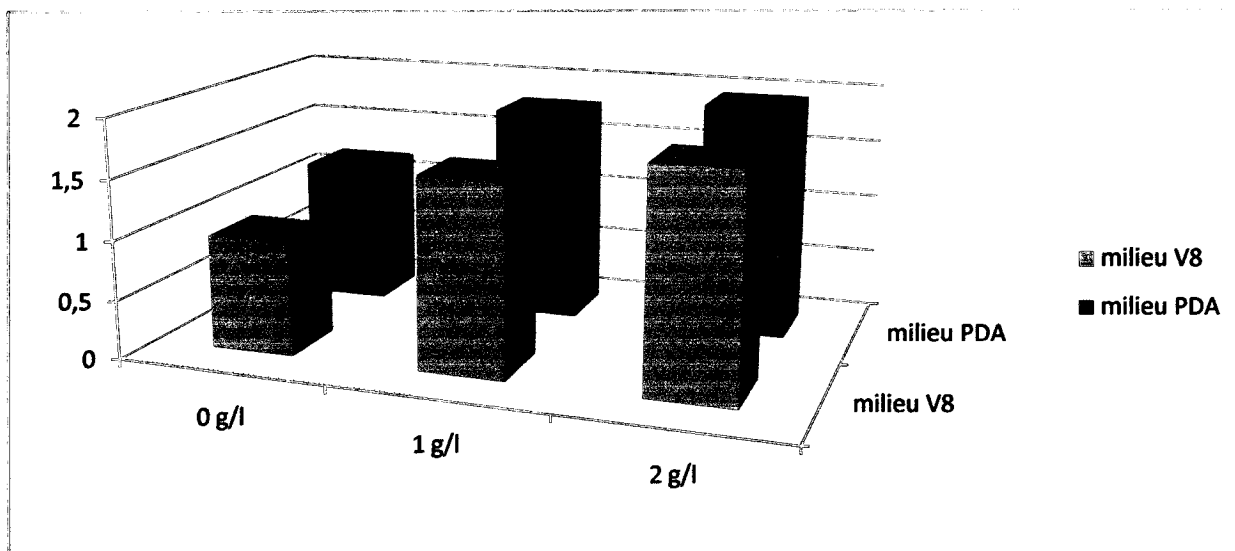


Fig 44 : Biomasse sèche de *Trichoderma viride* en milieux contenant l'extrait de levure, après 2 semaines d'incubation.

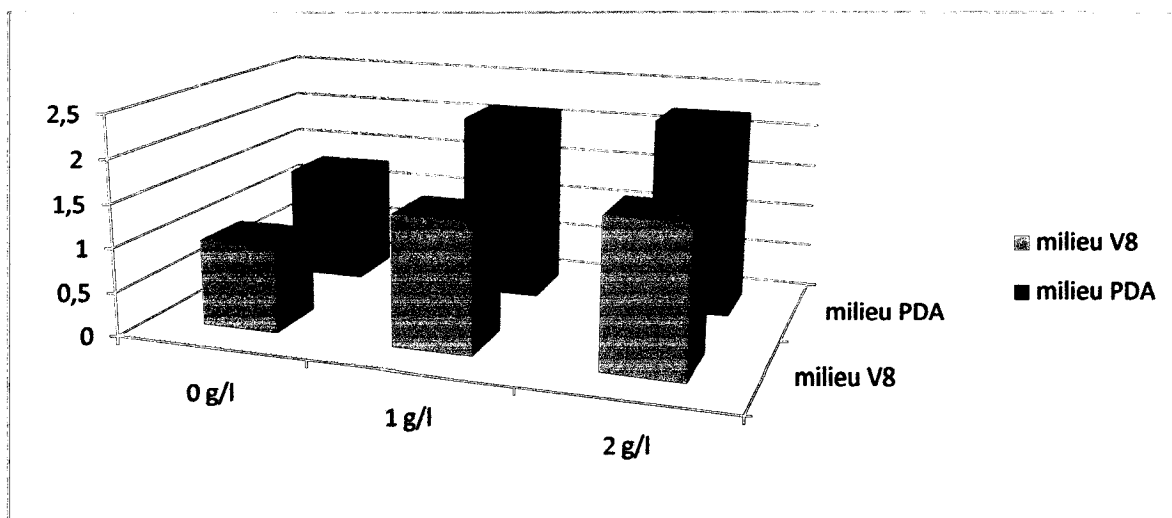


Fig 47 : Biomasse sèche de *Trichoderma viride* en milieux contenant le glucose, après 3 semaines d'incubation.

Tableau 5: Les résultats de la filtration du milieu PDA contient de l'extrait de levure comme source d'énergie pour les 03 semaines d'incubation.

Milieu PDA													
Source d'énergie		Extrait de levure											
Concentration g/l		0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
1 ^{ère} semaine	Poids frais (g)	4.00				8.50				8.50			
	Poids sec (g) (après 3h)	0.9				1.73				1.87			
	Poids sec (g) (après 5h)	0.9				1.73				1.87			
2 ^{ème} semaine	Poids frais (g)		10.00	7.11			12.80	8.86			9.00	8.76	
	Poids sec (g) (après 3h)		1.39	0.99			2.00	1.61			1.97	1.95	
	Poids sec (g) (après 5h)		1.39	0.99			2.00	1.61			1.97	1.95	
3 ^{ème} semaine	Poids frais (g)				6.91				13.00				10.00
	Poids sec (g) (après 3h)				1.23				2.35				2.52
	Poids sec (g) (après 5h)				1.23				2.35				2.52

Tableau 6 : Les résultats de la filtration du milieu PDA contient de glucose comme source d'énergie pour les 03 semaines d'incubation.

Milieu PDA													
Source d'énergie		Glucose											
Concentration g/l		0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
1 ^{ère} semaine	Poids frais (g)	4.90				7.47				9.82			
	Poids sec (g) (après 3h)	0.89				1.49				1.60			
	Poids sec (g) (après 5h)	0.89				1.49				1.60			
2 ^{ème} semaine	Poids frais (g)		7.80				13.80				10.19		
	Poids sec (g) (après 3h)		1.10				1.93				2.07		
	Poids sec (g) (après 5h)		1.10				1.93				2.07		
3 ^{ème} semaine	Poids frais (g)			10.00	6.7			12.22	11.00			10.47	11.70
	Poids sec (g) (après 3h)			1.51	1.09			2.12	2.12			2.20	2.26
	Poids sec (g) (après 5h)			1.51	1.90			2.12	2.12			2.20	2.26

Tableau 7 : Les résultats de la filtration du milieu V8 contient de l'extrait de levure comme source d'énergie pour les 03 semaines d'incubation.

Milieu V8													
Source d'énergie		Extrait de levure											
Concentration g/l		0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
1 ^{ère} semaine	Poids frais (g)	3.60	3.97			6.70	4.00			8.60	7.89		
	Poids sec (g) (après 3h)	0.81	0.87			1.38	1.30			1.59	1.39		
	Poids sec (g) (après 5h)	0.81	0.87			1.38	1.30			1.59	1.39		
2 ^{ème} semaine	Poids frais (g)			3.98				6.70				7.80	
	Poids sec (g) (après 3h)			0.96				1.60				1.83	
	Poids sec (g) (après 5h)			0.96				1.60				1.83	
3 ^{ème} semaine	Poids frais (g)				4.44				8.97				9.12
	Poids sec (g) (après 3h)				1.08				1.81				1.93
	Poids sec (g) (après 5h)				1.08				1.81				1.93

Tableau 8 : Les résultats de la filtration du milieu V8 contient du glucose comme source d'énergie pour les 03 semaines d'incubation.

Milieu V8													
Source d'énergie		Glucose											
Concentration g/l		0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2
1 ^{ère} semaine	Poids frais (g)	4.00				4.81	3.92			8.45	6.97		
	Poids sec (g) (après 3h)	0.80				1.26	1.26			1.70	1.10		
	Poids sec (g) (après 5h)	0.80				1.26							
2 ^{ème} semaine	Poids frais (g)		3.47	5.22				4.91				8.60	
	Poids sec (g) (après 3h)		0.81	1.02				1.62				1.80	
	Poids sec (g) (après 5h)		0.81	1.02				1.62				1.80	
3 ^{ème} semaine	Poids frais (g)				5.01				9.57				9.12
	Poids sec (g) (après 3h)				0.98				1.48				1.67
	Poids sec (g) (après 5h)				0.98				1.48				1.67

4-Test de confrontation directe

Les résultats obtenus montrent une réduction importante de la croissance mycélienne des souches pathogènes confrontées par l'antagoniste *Trichoderma viride* par rapports aux témoins.

L'observation quotidienne des boîtes a montré une croissance très rapide de *Trichoderma viride* et une aptitude à coloniser le milieu, plus élevés que celles d'*Epicoccum sp.* et similaire de *Phoma sp.* (presque la moitié de la boîte de confrontation pour chacun).

Après 96 heures d'incubation, on a constaté l'apparition d'une zone d'inhibition suivie par un arrêt de croissance pour l'ensemble des souches du pathogène.

Au bout de 144heurs, les souches témoins des deux pathogènes envahissent toutes la surface des boîtes, tandis que les souches de *Phoma sp.* et celles d'*Epicoccum sp.* confrontées par *Trichoderma viride* restent inhibé et n'expriment respectivement que (51 et 39) mm de rayon moyen des boîtes de confrontation (Fig48-49-50-51).

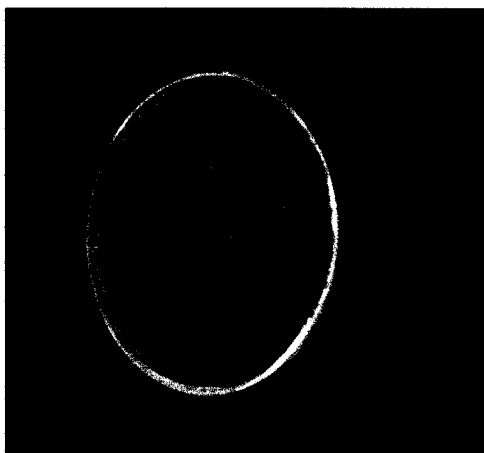


Fig 48 : Colonie d'*Epicoccum sp.* en absence de *Trichoderma viride* après 144heurs d'incubation à 25°C (Témoin).

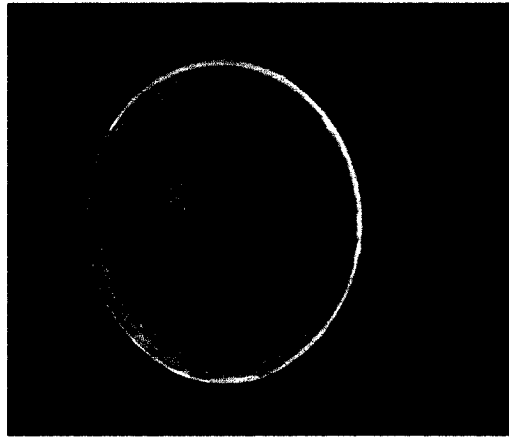


Fig 49 : Colonie d'*Epicoccum sp.* en présence de *Trichoderma viride* après 144heurs d'incubation à 25°C.

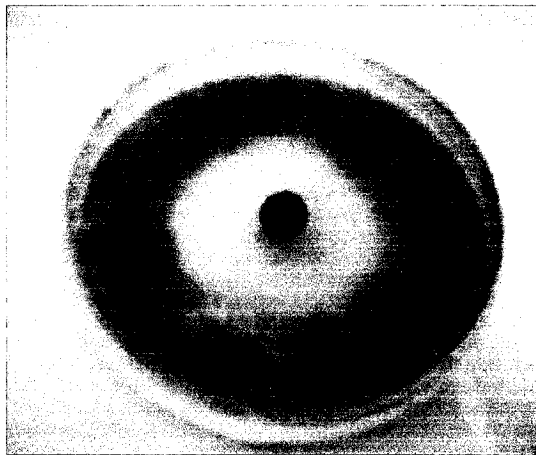


Fig 50 : Colonie de *Phoma sp.* en absence de *Trichoderma viride* après 144heurs d'incubation à 25°C (Témoin).

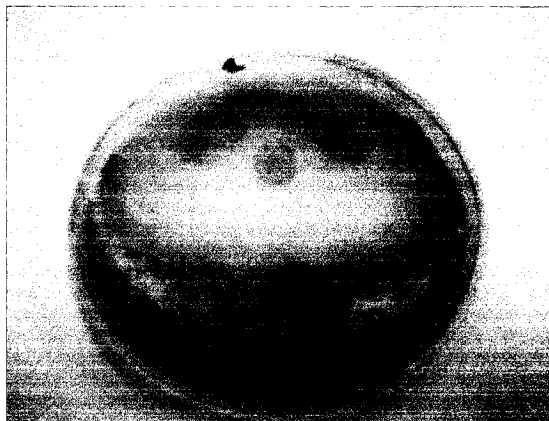


Fig 51 : Colonie de *Phoma sp.* en présence de *Trichoderma viride* après 144 heurs d'incubation à 25°C.

Le calcul du taux d'inhibition confirme ces résultats. L'antagoniste *Trichoderma viride* a inhibé efficacement la croissance mycélienne de *Phoma sp.* et *Epicoccum sp.* à des taux d'inhibition de 43.5% et 46.5% respectivement. Ces variations des degrés d'inhibitions expriment bien la différence entre la pathogénicité des deux moisissures, *Phoma sp.* est un agent hautement pathogène peut entrer en concurrence avec l'antagoniste *Trichoderma viride* révélant donc une croissance rapide sur le milieu nutritif tandis que *Epicoccum sp.* est caractérisé par une croissance lente que celle des deux moisissures précédents ainsi il est considéré comme envahisseur secondaire ce qui le montre dans une position plus sensible. (Tableau 9 et Fig 52).

Tableau 9: Effets inhibiteurs de *Trichoderma viride* sur la croissance mycélienne (mm) et taux d'inhibition des souches de *Phoma sp.* et *Epicoccum sp.* après 144h d'incubation à 25°C.

(Technique de confrontation directe).

Confrontations		Diamètre moyen (mm)	Taux d'inhibition
Confrontation (A1-T.V)	A1	48.46	43.5 %
	T.v	37	
Témoin		75.83	
Confrontation (A2-T.V)	A2	37.25	46.5 %
	T.v	43	
Témoin		42.41	

A1=*Phoma sp.*

A2=*Epicoccum sp.*

Témoin = souche pathogène en absence de *Trichoderma viride*

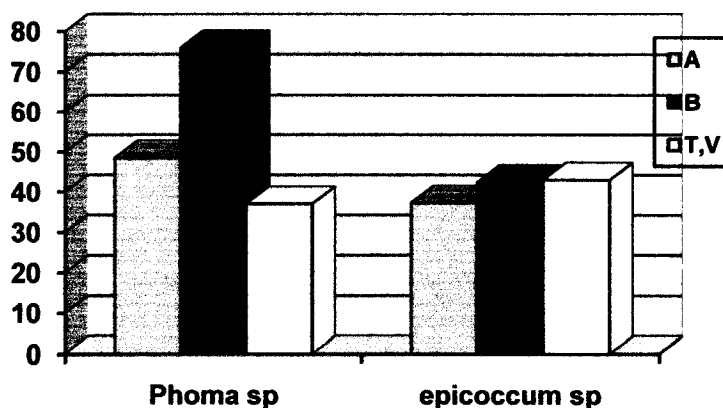


Fig 52 : Effets inhibiteurs de *Trichoderma viride* sur la croissance mycélienne (mm) de *Phoma sp.* et *Epicoccum sp.* après 144h d'incubation à 25°C (Technique de confrontation directe).

A=souches pathogènes confrontés à *T.viride*

B=souches pathogènes témoins

T.v=l'antagoniste *Trichoderma viride*

Les champignons du genre *Trichoderma*, connus depuis 1887 pour leurs propriétés antagonistes, ont été utilisés comme agents de lutte biologique contre un large spectre de phytopathogènes. *Trichoderma viride* est un bon modèle exceptionnel pour étudier les différents mécanismes d'action qui incluent principalement le mycoparasitisme, l'antibiose et la compétition pour les nutriments et l'espace (Mouria et *al.*, 2007)

D'après les résultats obtenus et les recherches déjà réalisés concernant l'antagonisme de *Trichoderma viride*, on a pensé à la possibilité d'existence chez *T.viride* d'une action fongistatique inhibitrice associé à des substances toxiques diffusibles dans le milieu. Dennis et Webster (1971) ont mis en évidence un antibiotique sécrété par *T. viride* (Trichodermine), solubles dans le chloroforme et extractibles à partir du milieu de culture. Ces auteurs n'excluent pas toutefois la possibilité de production, chez cette espèce, d'autres antibiotiques tels que la gliotoxine et la viridine découverts auparavant par d'autres chercheurs. D'après Ghisalberti et Rowland (1993) ces antibiotiques peuvent affecter la croissance des microorganismes et provoquer une réduction de la sporulation en bordure de la zone d'inhibition par le biais de phénomène d'antibiose.

Nous pensons qu'en plus de l'action des enzymes, *Trichoderma viride* se développe très rapidement en colonisant le milieu nutritif et en ravissant les éléments nutritifs, c'est le phénomène de compétition, en particulier l'effet prédateur de *Trichoderma viride* sur l'agent pathogène (Dubot, 1985; Davet, 1996 ; Johanne, 2002).

Par conséquent l'antagoniste a supprimé la croissance du pathogène et se mis a se regroupé autour de ce dernier en visant la pointe de leur mycélium en parallèle à celle du pathogène jusqu'à l'accolement (Shalini et Kotasthane, 2007).

Ceci peut être expliqué par l'affinité apparente des conidies de *Tichoderma viride* sur les conidies de l'agent pathogène. Le résultat corrobore l'hypothèse que l'antagoniste est attiré par les cellules hôtes par un mécanisme implique probablement des stimulations chimiques spécifiques (Whipps et *al.*, 1988)

L'interaction entre les deux hyphes par l'intermédiaire d'une liaison lectine –sucre favorise l'action des enzymes diffusible dans le milieu de culture (β 1-3-glucanase, chitinase) conduisant à la lyse du mycélium et des spores du pathogène par ventilation des polysaccharides la chitine et les bêta-glucane qui sont responsables de la rigidité de la paroi cellulaire des champignons, par la suite l'antagoniste pénètre dans les cellules de l'hôte et consomme le contenu cytoplasmique, révélant ainsi leur capacité hautement mycoparasitique (Elad et *al.*, 1983; Camporota , 1985; Shalini et Kotasthane, 2007) (Fig 53).

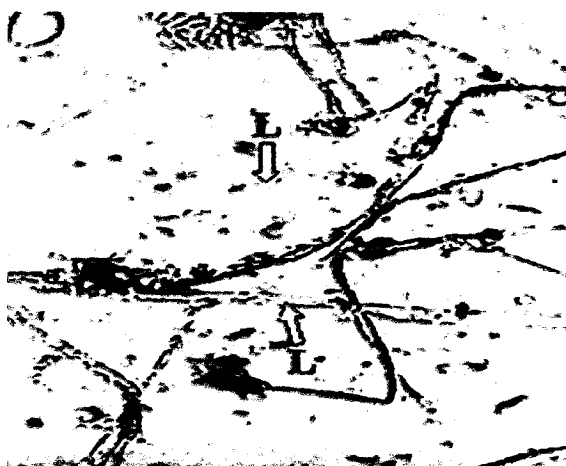


Fig 53 : lyse au niveau de mycélium du pathogène en présence du *Trichoderma viride* (x400)
(Hibar et *al.*, 2005).

Pour l'agriculture, il est donc plus avantageux d'utiliser *Trichoderma viride* comme agent de lutte biologique. Sa priorité à établir les substrats avant l'arrivée des agents pathogènes en permettant à *Trichoderma* de coloniser la rhizosphère en premier lieu, celui-ci pourra créer plus facilement son manchon protecteur autour du système racinaire empêchant ainsi, aux différents agents pathogènes potentiels, l'accès aux sites recherchés. Par le fait même, la répression de l'ennemi à combattre est facilitée (Johanne, 2002). Par ailleurs, *Trichoderma* présente non seulement un avantage incontestable dans la protection des maladies racinaires (*Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*; *Phytophthora*, ...) mais aussi des parties aériennes, en particulier, *Trichoderma viride* peut réduire la pathogénicité d'*Helminthosporium sativum* agent d'helminthosporiose sur les feuilles de céréales (Liette, 2002; Berber et al., 2009).

Ainsi, l'utilisation de ce champignon dans la lutte contre la pourriture grise de la vigne demeure efficace et apporte une amélioration de l'état sanitaire de la vendange. L'antagoniste colonise la base nutritive constituée par les capuchons floraux sénescents et limite ainsi une première installation en saprophytes de *Botrytis cinerea* (Dubos et al., 1982).

5-Test d'antagonisme par l'effet de filtrats de fermentation

Cette technique nous a permis de visualiser les effets de l'antagoniste en absence de son interaction avec le pathogène (Essalmani et Lahlou, 2004), en testant l'effet des métabolites brutes secrétés dans le filtrat de culture de *Trichoderma viride* sur la croissance mycélienne des souches pathogènes.

Les résultats obtenus de cet essai a montré que la croissance mycélienne de pathogène continue d'évoluer avec le temps contrairement au test de confrontation directe (Fig54).

Ce qui indique l'absence d'une action fongistatique inhibitrice chez les métabolites secrétés dans le filtrat de culture de *Trichoderma viride* sur la croissance mycélienne des souches pathogènes en absence de l'antagoniste.

Cela peut être expliqué par la faible dose ou l'absence des mycotoxines fongistatiques dans le filtrat de culture.

Yedida et al.(1999) ont rapporté que l'action antagoniste de *Trichoderma viride* est réalisée par d'autres substances qui ne sont pas secrétées qu'en présence du pathogène.

Ainsi en 2001, Landreau a montré que *Trichoderma viride* produise des concentrations très faible des substances antifongiques en absence du pathogène.

Ces résultats constituent ainsi un témoignage illustrant les hypothèses qui ont signalé que l'action antagoniste de *Trichoderma viride* est une réponse caractéristique de l'antagoniste exige l'établissement d'une certaine interaction entre les deux moisissures suite à des stimulations chimiques spécifiques du pathogène (Whipps et *al.*, 1988; Vergnault, 2004).

En plus, les métabolites secrétés dans le filtrat de culture de cet antagoniste sont des métabolites brutes non séparés contient une gamme intéressante des molécules rejettent par le champignon dans le milieu de culture et partant modifié qualitativement le milieu sur lequel il pousse. En l'occurrence, cette interaction, très remarquable pour ce qui est du pH en milieu liquide, l'accumulation des différents composés fait acidifié le milieu ce qui limite les échanges ioniques dans le milieu. Cela agit directement sur le fonctionnement des substances, ainsi des réactions chimiques peut être favorisées entre eux conduisant à l'inhibition ou à la destruction de certaines substances. Ceci est montré la nécessité d'une identification précise de la mycotoxine pure pour un bon effet fongicide (Abdoul, 1976 ; Moreau, 1994).

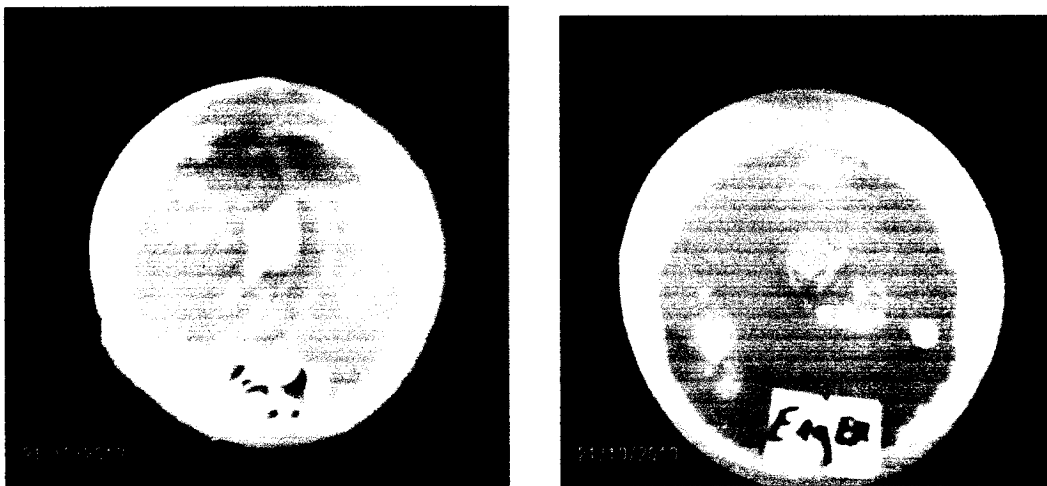


Fig 54 : croissance mycélienne des deux pathogènes en présence du filtrat de fermentation après 24h d'incubation à 25°C.

Conclusion

Conclusion

Le travail présenté dans cette étude consiste à tester *in vitro* l'effet inhibiteur de *Trichoderma viride* sur la croissance mycélienne de *Phoma sp.* et *Epicoccum sp.* et amélioration des milieux de culture.

La composition d'un milieu de culture est un facteur important influence la croissance mycélienne des souches fongiques et donc, leur mécanisme d'action.

Les résultats obtenus d'après les tests du développement sur les deux milieux solide (PDA et V8) montrent que la souche de *Trichoderma viride* est capable de se développer sur différents milieux de culture mais à des degrés variables. Le milieu PDA est le plus convenable pour une bonne croissance mycélienne ainsi qu'une meilleure sporulation.

Egalement, le développement mycélien est influencé par les deux facteurs étudiés (T et pH), il est notable au pH9 et absent à 5°C et 37°C, tandis qu'il est de son optimum à 25°C et pH5.

Ainsi, les tests de la fermentation sur les deux milieux liquide (PDAetV8) confirment ces résultats, ils montrent aussi que la production de la biomasse dépend de la qualité nutritive du milieu de culture.

L'ajout d'une source du glucose ou d'extrait de levure accélère bien la production de la biomasse, elle est du mieux en mieux lorsque en augmente les concentrations (1g/l ; 2g/l). La meilleure biomasse est obtenue avec 2g/l de la source ajoutée.

De plus la production de la biomasse en présence d'extrait de levure unique source de carbone, est très élevée et lente par rapport à l'autre source d'énergie étudiée (le glucose).

Les tests de confrontation effectués montrent que *Trichoderma viride* est un agent de bio-contrôle par excellence, doué d'un pouvoir pathogène important sur un large spectre des agents phytopathogènes, soit des maladies racinaires ou bien celles des parties aériennes (*Phoma sp.*, *Epicoccum sp.*) par le biais des différents mécanismes (antibiose ; compétition ; parasitisme) qui interagissent dans notre cas en association.

Par ailleurs, le test du filtrat de culture montre que l'efficacité de métabolites de *Trichoderma viride* contre les pathogènes est perdue en absence de l'antagoniste. Alors, elle dépend des conditions spécifiques, l'absence ou la modification de tels éléments perturbe leur effet.

Donc, l'application du *T. viride* en agriculture est une stratégie amicale de la nature qui permet de réduire l'utilisation des produits chimiques, en protégeant l'environnement sous le terme d'une agriculture durable.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdel-Hafez. S. I. and Shoreit. A. A. (1985). Mycotoxins producing fungi and mycoflora of air-dust from Taif. *Mycopathologia*, Saudi Arabia.

Abdel-Lateff. A.; Fisch. K. M.; Wright. A. D.; and Konig. G. M. (2003). A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum sp.* *Planta Med.*, Québec.

Abdoul. A. (1976). Contribution à l'étude de de *pyricularia oryzae* CAV-morphologie, biologie et physiologie –recherche in vitro d'antagonismes dans une perspective de lutte biologique. [en ligne], Thèse Docteur ingénieur, Toulouse, pp149-151, disponible sur: <http://www.sist.snc/gi-bin/library>.

Adams. R. Z. (2002). Indoor Environment Connections. [en ligne], *Featured Public Library Closes Down for Mold Investigation*, disponible sur :

http://www.ieconnections.com/archive/jan_01/jan-01.htm

AES CHEMUNEX. (2008). Extrait de levure. [en ligne], Combourg, disponible sur : <http://www.aeschemunex.com> - contact@aeschemunex.com

Agrawal. R.; Deepika. N. and Joseph. R. (1999). Strain improvement of *Aspergillus sp* and *Penicillium sp.* by induced mutation for biotransformation of α -Pinene to Verbenol. *Rev. Biotechnol Bioeng*, 63: 249-252.

Aharonowitz. Y. (1980). Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Rev Annu Rev. Microbiol*, 34: 209-233.

Caltex. M. (2007). Manufacturer of Ecologically Responsible Products. [en ligne], disponible sur:http://www.caltexmoldservices.com/.../epicoccum_sp/

Arst. H.N. and Penalva. M.A. (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Rev. Trends in Genetics*, 19 : 224-231.

Awad. G. (2005). Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et de l'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A. [en ligne], Génie des procédés, Université Toulouse, 222p, disponible sur: <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000636/01/awad.pdf>

Soutenu le 07 janvier 2005.

Aziz. N.H. and Smyk. B. (2002). Influence of UV radiation and nitrosamines on the induction of mycotoxins synthesis by nontoxicogenic moulds isolated from feed samples. *J. Nahrung/Food*, 46:118-121

Basak. K. and Majumdar. S.K. (1973). Utilization of carbon and nitrogen source of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. *J. Antimicrob Agents Chemother*, 4: 6-10.

Barreau. C.; Boutigny. A.L.; Merhej J.; Bernarde. C.; Pinson-Gadais, L.; Forget-Richard. F. (2007). Mycologie et Sécurité des Aliments (MycSA) Pôle Qualis. [en ligne], INRA–U.R. INRA, Paris, 81, disponible sur: <http://cbarreau@bordeaux.inra.fr75011>

Benaouida. K. (2008). Etude de l'alpha amylase des levures isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Thèse Magister en biotechnologie microbienne, Université Mentouri-constantine.

Soutenue le 02-07-2008.

Bennett. J.W.; Rubin. P.L.; Lee. L.S. and Chen. P.N. (1979). Influence of trace elements and nitrogen source on versicolorin production by a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Rev. Mycopathologia*, 69 :161-166.

Berber. F.; Ouazzani-Touhami. A. et Douira. A. (2009). Antagonisme in vitro et in vivo de deux *Trichoderma* à l'égard de quatre espèces de *Bipolaris* pathogènes sur le sorgho. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 148: 93-114.

Bergmaier. D. (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *LB. Rhamnosus* RW-959M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. [en ligne], Thèse Doctorat en microbiologie, Université Laval.

Bisht. V.; Arora. N.; Singh. B. P.; Pasha. S.; Gaur. S. N. and Sridhara. S. (2004). Epi p 1, an allergenic glycoprotein of *Epicoccum purpurascens* is a serine protease.

Bisset.J. (1991).A revision of the genus *Trichoderma*. *Can. J. Bot*, 69: 2357-2372.

Bissett. J.(2004). Commentaires de l'adresse internet suivante : http://www.Medicalglossary.org/fung_mitosporic_fungi_definitions.html.

Botton. B. ; Breton. A. ; Fevre. M. ; Guy. P.H. ; Larpeni. J. ; Veau. P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. Masson. Paris, New york, Million, Barcelone, Mixico, Saopaw.

Bousseboua. H. (2002). Eléments de microbiologie générale. In. Techniques d'étude des bactéries, Edition de l'université Mentouri- constantine, pp148-149.

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

Champion. R. (1997). Identifier les champignons transmis par les semences, INRA, Paris, pp164-165.

Choi. H. Y.; Veal. D. A. and Karuso. P. (2006). Epicocconone. a new cell-permeable long Stokes' shift fluorescent stain for live cell imaging and multiplexing. *Fluoresc.*

Clement. N. L. (1986). *J.Assoc-Annal.Chem*, 51: 611-612.

Cole. R. J.; Jarvis. B. B. and Schweikert. M. A. (2003). Handbook of secondary fungal metabolites. Academic Press. Amsterdam.

Da Silva. M.C.; Bertolini. M.C. and Ernandes. J.R. (2001). Biomass production and secretion of hydrolytic enzymes are influenced by the structural complexity of the nitrogen source in *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus nidulans*. *J Basic Microbiol*, 41:269-280.

Davet. P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, Paris, pp 383.

Davet. P. et Rouxel. F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. Techniques et pratiques. INRA, Paris.

Demain. A. L. (1982). Catabolite regulation in industrial microbiology. In. Overproduction of microbial products, Krumphanzl.V.; Sikyta, B.; Vanek. Z. Academic Press, New York, pp3-20.

Dennis.C. and Webster.J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. In. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc*, 57(1): 25-39.

Dixit. A. B.; Lewis. W. H. and Wedner. H. J. (1992). The allergens of *Epicoccum nigrum* Link. Identification of the allergens by immunoblotting.[en ligne], *J. Allergy Clin Immunol*, disponible sur:

http://horizon.documentation.ird.fr/exldoc/pleins_textes/pleins_textes_5/pt5/travaux_d/00626.pdf

Domsch. K. H.; Gams. W. and Anderson. T.H. (1993). Compendium of soil fungi. [en ligne], disponible sur: <http://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiche.asp?no=1>

- Dubos. P. B.; Jailloux. F et Bulit . J. (1982). L'antagonisme microbien dans la lutte contre la pourriture grise de la vigne. [en ligne], *EPPO Bulletin*, 12: 171–175, disponible sur <http://library.wiley.com/doi/10-10.1111/j.1365-2338.1982.tb01701.x>
- Dubos. P. B. Roudet. J. Bulit. J. (1982). Les antagonismes microbiens. In, influence de la température sur les aptitudes antagonistes des *Trichoderma* à l'égard du *Botrytis cinerea* Pers. agent de la pourriture grise de la vigne. Academic Press, New York, pp82-86.
- Dubot. B. (1985). L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* et *Botritis cinerea* .In. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures. INRA, Paris, pp35-49.
- Elad.Y.;Chet. I.; Boyle. P. and Henis .Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp.on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 73: 85-88.
- Esposito.E. and Silva. M. (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*.*Crit. Rev. Microbiol*, 24 (2): 89-98.
- Essalmani. H. et Lahlou. H. (2004). Induction, par *Trichoderma harzianum*, de la résistance des plantes de lentille contre *Fusarium oxysporum* sp. *Actes.Inst.Agron.Vet*, 24(1et 2): 51-58.
- Filip. P.; Weber. R. W. S.; Sterner. O. and Anke. T. (2003). Hormonemate, a new cytotoxic and apoptosis-inducing compound from the endophytic fungus *Hormonema dematioides*. In. Identification of the producing strain, isolation and biological properties of hormonemate. [en ligne], disponible sur: [http:// www.ibwf.de/taxon_index.htm](http://www.ibwf.de/taxon_index.htm)
- Fouet. A.; Jin. S. F.; Raffel. G. and Sonenshein. A. L. (1990). Multiple regulatory sites in the *Bacillus subtilis* *citB* promoter region. *J. Bacteriol* , 172: 5408-5415.
- Gaitatzis. N.; Silakowski. B.; Kunze. B.; Nordsiek. G.; Blocker. H.; Hofle. G. and Muller. R. (2002). The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel Type of Modular polyketide synthase. *Rev. Biol Chem*, 277: 13082-13090.
- Gallo. F. (1994). Recherche sur certains facteurs-clés dans la détérioration biologique des livres et des documents. PARIS, pp 63-69.
- Genilloud.O.;Pelaez.F. ; Fenilloud. O.; Pelaz.F. ; Gonzalez. I. and Diez. M.T. Diversity on actinomycetesand seaweeds from the Iberian coasts. *Microbiologia*, 10 : 413-422.

- Ghizalberti. E.L. and Rowland. G. Y. (1993). Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J. Nat.Prod*, 56: 1799-1804.
- Goulard. C. ; Hlimi. S. ; Rebuffat et Bodo. B. (1995). Trichorzins HA and MA, Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*. In. Fermentation, Isolation and Biological Properties. *J. The Journal of Antibiotics*, 48: 1248–1253.
- Goyer. N.; Jacques. L.; Louis. L. et Geneviève. M. (2001). Les bioaérosols en milieu de travail : guide d'évaluation, de contrôle et de prévention. [en ligne], Programme soutien analytique, IRSST, Québec, pp5, disponible sur : <http://www.irsst.qc.ca>
- Haran. S.; Schinckler. H. and Chet. I. (1996). Molecular mechanism of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 142: 2312-2331.
- Hawksworth. D. L.; Sutton. B. C. and Ainsworth.G.C. (1983). Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi. [en ligne], Commonwealth mycological institute. Kew, disponible sur: <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=43&n=Trichoderma>
- Herrera. Ph.D. (2008). *Phoma sp.* Sous le microscope. [en ligne], disponible sur : www.ibwf.de/taxon_index.htm
- Hogan. M. B.; Patterson. R.; Pore. R. S.; Corder. W. T. and Wilson. N. W. (1996). Basement shower hypersensitivity pneumonitis secondary to *Epicoccum nigrum*. *Chest*, pp854-856.
- Hibar. K.; Daami-Remadi. M.; Khiareddine. H. et El Mahjoub. M. (2005). Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. [en ligne]. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 9(3): 163-171, disponible sur : <http://popups.ulg.ac.be/Base/document.php?id=1442>
- Jaklitsch.W. M.; Samuels .G. J.; Dodd. S.L.; Lu. B. S. et Druzhinina. I. S. (2006). *Hypocrea rufa* / *Trichoderma viride*: une réévaluation, et la description de cinq espèces étroitement apparentées, avec ou sans conidies verruqueuses. *Les études en mycologie*, 56 (1): 135-177.
- Johanne. C. (2002). Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*. [en ligne], Horti-Protection inc. conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi, disponible sur : <http://www.lesitedejp.com/le-pouvoir-antagoniste-de-trichoderma-par-johanne-caron-t1615.html>

Johanne. C et Laverdiaire. L. (2003). Amélioration des qualités nutritionnelles du milieu de culture utilisé pour produire *Trichoderma*, afin d'en maximiser le potentiel antagoniste. Rapport final de recherche. CRAAQ, pp 8-44.

Johanne. C. ; Laverdiaire. S. ; Richard. B. et Philipe. D. (2006). Recherche et développement de biopesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les organismes non ciblés et respectueux de l'environnement. Horti-protection, Université Laval.

Junker. B.; Mann. Z.; Galliot. P.; Byrne. K. and Wilson. S. (1998). Use of soya bean oil and ammonium sulphate to optimize secondary metabolite production. *Rev. Biotech Bioeng*, 60: 580-588.

Kacholz. T. and Demain. A.L. (1983). Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. *J Nat Prod*, 46: 499-506.

Kilbertusa. G.; Moureyr. G.; Schwartz. F. (1993). Prevoistativités biologiques dans les sols traupicaux. [en ligne], Paris, disponible sur : http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_5/b_fdi_02-03/01730.pdf

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. Thèse de doctorat, Pharmacie, Nantes, 201 p.

Larpent. J.P. et Larpent-Gourgau. M. (1997). Mémento technique de microbiologie, 3^{ième} édi. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp7-9.

Le Minor. L. et Véron. M. (1982). Bactériologie médicale. In. Croissance et nutrition bactériennes. Flammarion, Paris, pp33.

Lepoivre. P. (2003). Phytopathologie. In. Les mécanismes de résistances et la spécificité parasitaire. Deboeck, Belgique, pp161-165.

Liberra. K. and Lindequist.U. (1995). Marine fungi – A profilic resource of biologically active natural products. *Pharmacie*, 50 : 583- 588.

Liette.L. (2002). Le biofongicide *Trichoderma* (RootShield) contre les maladies racinaires et la moisissure grise dans la fraise: Tout un potentiel. [en ligne], Horti-Protection inc, conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi, disponible sur: <http://www.agrireseau.qc.ca/petitsfruits>

- Lugauskas. A.; Raila. A.; Railiene. M. and Raudoniene. V. (2006). Toxic micromycetes in grain raw material during its processing. *Ann Agric Environ Med* .
- Mallea. M.; Pesando. D.; Bernard. P. and Khoualene. B. (1991). Comparison between antifungal and antibacterial activities of several strains of *Epicoccum purpurascens* from the Mediterranean area. *Mycopathologia* .
- Martain. J.F. and Demain. A.L. (1980). Control of antibiotic synthesis. [en ligne]. *Rev. Microbiol Rev*, 44: 30-231, disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exldoc/pleins_textes/pleins_textes_5/pt5/travaux_d/00626.pdf
- Mohamed-benkada. M. (2006). Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Thèse Doct, Pharmacie, Nantes, pp 9-19.
- Mold-Help. (2001). Mycotoxin List. [en ligne], disponible sur: <http://www.moldhelp.org/fungi.mycotoxins.currentresearch.htm>
- Moreau.C. (1994). Moisissures toxiques dans l'alimentation. Masson et Cie, Pologne, 322p.
- Mouria. B.; Ouazzani -Touhami. A. et Douira. A. (2005). Effet de diverses farines sur la compétitivité des inoculums de trois souches de *Trichoderma* vis-à-vis des champignons phytopathogènes du sol. *Bull.Soc. Pharm. Bordeaux*, 144: 211-224.
- Mouria. B; Ouazzani-Touhami. A et Douira. A. (2007). Effet de diverses souches du *Trichoderma* sur la croissance d'une culture de tomate en serre et leur aptitude à coloniser les racines et le substrat.[en ligne], *Phytoprotection*, 88(3) : 103-110, disponible sur: <http://id.erudit.org/iderudit/018955ar>.
- Nasraoui. B. (2006). Champignons parasites des plantes cultivées Biologie, Systématique, Pathologie, Maladies. Centre de Publication Universitaire, Tunis, pp331-332.
- Nielsen. K. F. (2006). *Epicoccum sp.* sur milieu gélosé. [en ligne], disponible sur : http://www.biocentrum.dtu.dk/mycology/staff/scientific_staff/nielsen_kristian_f/pdf/phdkfn.pdf
- Olivier. J. et Germain. R. (1983). Les antagonistes microbiens. In. études des antibiotiques volatils des *Trichoderma sp.* Academic Press, New York, pp28.

- Patel J. J. and Brown M.E. (1969). Interactions of Azobacter with rhizosphere and root-surface microflora. *Plant and soil*, 31: 273-281.
- Patrick. B. (2006). Biocontamination fongique. Laboratoire de Mycologie. Faculté de Pharmacie. Lyon. France
- Peberdy. J.F. (1985). Biology of penicillins. In. Biology of industrial microorganisms, Demain. A. Solomon, B.C. Menlo Park, pp. 407-431.
- Pierre. D. Francis. R. (1997) Détection et isolement des champignons du sol. In. Applications pratiques. INRA, Paris, pp55. ISBN : 2-7380-0731-7, ISSN : 1150-3912.
- Prescott. M. Harley. J. P. et Klein.D. (2003). Microbiologie. Deboeck, Belgique, pp1058-1059.
- Raimbault. M. (1981). Fermentation en milieu solide, Office de la recherche scientifique et technique, Paris, 291p : 2-7099-0589-2.
- Ranasingh.N. Saurabh.A. and Nedunchezhiyan. M. (2006). Use of *Trichoderma* in Disease Management.[en ligne], *Orissa Review*: 69-71, Dumduma, Bhubaneswar - 751 019, disponible sur: <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Revilla. G.; Lepez-Nieto. M. J. ; Luengo. J. M. and Martin. J. F. (1984). Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J Antibiot*, 37:781-789.
- Reynolds. K. A. (1998). Combinatorial biosynthesis: Lesson learned from nature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 : 12744-12746
- Rifai. M. A. (2004). Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*. Paris, pp 55-58.
- Roger. C. (1990). Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaires Romandes, pp93-105 : 2-88074-201-3.
- Roquebert. M.F. (1996). Interactions antagonistes des *Trichoderma sp.* dans les systèmes telluriques: Systématique, biologie et écologie des organismes. Paris, pp13-15.
- Samson. R.A.; Flannigan. B.; Flannigan .M. E.; Verhoeff. A.P.; Adan .O.C.G. and Hoekstra. E.S. (1994). Health Implications of Fungi in Indoor Environments. [en ligne], *Air Quality Monographs*, 2(602), disponible sur : <http://mycotacrc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=43&n=Trichoderma>

- Sanchez. S. and Demain. A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzy Microb Technol*, 31 :895-906.
- Shalini. S.et Kotasthane .A.S. (2007). Parasitisme de *Rhizoctonia solani* par des souches de *Trichoderma spp.* *EJEAFChe*, 6 (8): 2272-2281.
- Simmons. R. B.; Price. D. L.; Noble. J. A.; Crow. S. A. and Ahearn. D. G. (1997). Fungal colonization of air filters from hospitals. *Am Ind.Hyg.Assoc.J.*
- St-Germain. G. and Summerbell. R. (1996). Champignons filamenteux d'intérêt médical. Caractéristiques et idenfication. Belmont, Star Publishing Company. 314p.
- Steyn. P. S. (1980). The biosynthesis of mycotoxins. Academic Press, New York, pp1-4.
- Strauch. M. A. and Hoch. J. A. (1993). Signal transduction in *Bacillus subtilis* sporulation. *Curr Opin Genet Dev*, 3: 203-212.
- Su. H. J.; Rotnitzky. A.; Burge. H. A. and Spengler. J. D. (1992). Examination of fungi in domestic interiors by using factor analysis: correlations and associations with home factors. *Appl Environ Microbiol.*
- Subramanian. C.V. (1983). Hyphomycetes Taxonomy and Biology. Academic Press Inc, pp140-146.
- Takahashi. I. and MacKenzie. L.W. (1981). Effect of various inhibitors on sporulation of *Bacillus subtilis*. *Can J Microbiol*, 30 : 80-86.
- Tortora. J.; Funk. B.F. et Case. Ch.l. (2003). Introduction à la microbiologie. Canada, pp179.
- Ubalua. A.O. and Oti. E. (2007). Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on post harvest cassava root pathogen. [en ligne], *African Journal of Biotechnology*, 6 (21); 2447-2450, disponible sur: <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Vergnault. H. (2004). Etude et amélioration de la chromatographie en lit expansé. Thèse Doct, *Microbiologie et Biocatalyse Industrielles*, Toulouse. 215p.
- Viret. O. Bolay. A. et Bosshard. E. (1997). Agroscope. [en ligne], disponible sur: http://www.agroscope.admin.ch/data/publikationen/wa_bai_89_des_1531_f.pdf

- Visconti. A.; Logrieco. A.; Vurro. M. and Bottalico. A. (1987). Tenuazonic acid in blackmold tomatoes: occurrence, production by associated *Alternaria* species, and phytotoxic properties. *Phytopatol.Mediterran.*
- Vojdani. A.; Campbell. A. W.; Kashanian. A. and Vojdani. E. (2003). Antibodies against molds and mycotoxins following exposure to toxigenic fungi in a water-damaged building. *Rev. Arch Environ Health.*
- Wangun. H. V.; Dahse. H. M. and Hertweck. C. (2007). Epicoccamides B-D, glycosylated tetramic acid derivatives from an *Epicoccum sp.* associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. *J Nat.Prod.*
- Weber. R. W. (2006). On the cover: *Epicoccum purpurascens*. *Ann Allergy Asthma Immunol*
- Widden. P. and Abitbol. J. J. (1980). Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia*, 72: 775-784.
- Whipps. K.; Lewis. R. and Cooke. C. (1988). Mycoparasitism and plant disease control. In: *Fungi in biological systems*, Manchester University Press, pp 161-187.
- Widden. P. and Abitbol. J. J. (1980). Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia*, 72: 775-784.
- Whipps. K.; Lewis. R. and Cooke. C. (1988). Mycoparasitism and plant disease control. In: *Fungi in biological systems*, Manchester University Press, pp 161-187.
- Yedidia. I.; Benhamou. N. and Chet. I. (1999). Induction of defence responses in cucumber plant (*Cucumis sativus* L.) by biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol*, 65 : 1061-1070.
- Zhang. Y.; Liu. S.; Che. Y. and Liu. X. (2007). Epicoccins A-D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*. [en ligne], *J Nat.Prod.*
- Zhou. T.; Reeleder. R.D.; Sparace. S.A. (1996). *Influence of nutrients on growth of Epicoccum nigrum*. [en ligne], *Rev / J*, 0008-4166. disponible sur: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3162857>

Index

Agar-agar

L'agar est un polymère sulfaté composé principalement de D – galactose, de 3.6 anhydro – L-galactose et d'acide D-glucuronique. Il est extrait d'algues rouges. L'agar est un bon agent solidifiant car après liquéfaction dans l'eau bouillante, il peut être refroidi à 40- 42°C avant de se solidifier mais ne refondra pas en dessous de 80-90°C, par ailleurs l'agar est un agent solidifiant car les micro-organismes pour la plupart sont incapables de le dégrader. (Prescott et al., 2003)

Extrait de levure

Cet extrait de levure est conforme aux normes de la Pharmacopée Américaine (U.S.P. XIX). Il est obtenu par autolyse d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae*. Il constitue un facteur d'enrichissement de nombreux milieux de culture.

Caractéristiques physiques

Aspect : poudre jaune

Humidité résiduelle : < 5%

Solubilité totale en solution à 5% en eau distillée.

pH : 7,0 + 0,5

Stable après autoclavage de 15 minutes à 121°C.

Caractéristiques chimiques

Cendres sulfuriques < 15,0 %

Azote total 9,5 %

Azote et aminés 5,0 %

Rapport Na aminé/N total 0,53 %

Protéines thermocoagulables absence

Nitrites absence

Potassium 5,5 %

Chlorures (en NaCl) 3,0 %

Fer 0,004 %

Sodium 0,5 %

Calcium 0,1 %

Phosphore total (en P) 2,0 %

Caractéristiques microbiologiques

Sucres réducteurs absence

Indole absence

Teneur moyenne en acides aminés

En grammes pour 100 grammes de produit

Acide aspartique 5,4

Thréonine 3,5

Sérine 3,7

Acide glutamique 7,6

Proline 2,7

Glycocolle 2,7

Alanine 5,5

Valine 3,9

Tryptophane 0,9

Méthionine 0,9

Isoleucine 3,5

Leucine 4,2

Tyrosine 2,3

Phénylalanine 2,6

Lysine 4,4

Histidine 1,5

Arginine 0,9

Teneur moyenne en vitamines

En grammes pour 100 grammes de produit

Riboflavine 12,5

Acide nicotinique 60,0

Acide folique 0,6

Biotine 0,4

Choline 150,0

Acide pantothénique 10,5

Pyridoxine 2,4

Thiamine 2,1 (AES CHEMUNEX, 2008)

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar, pomme de terre glucosée et gélosée)

Faire cuire 200 g de pommes de terre pelées, lavées et coupées en tranches fines dans 1 l d'eau pendant une h. filtrer sur plusieurs couches d'étamine puis presser pour exprimer le liquide restant. Ajouter 20 g de glucose et 15 à 20 g de l'agar. Compléter à 1 l si nécessaire. Autoclaver 15 mn à 121°C (Pierre et Francis, 1997).

Milieu V-8

Dissoudre 2.5 g de CaCO₃ dans 200 ml de jus de légumes commercial V-8 (Campbell Soup Co.), de façon à en relever le pH. Clarifier en filtrant sur étamine ou en centrifugeant à 12000 g pendant 20 mn. Ajouter 20 g de l'agar et compléter à 1 l avec de l'eau distillée. Autoclaver 20 mn à 121°C.

La préparation commerciale V-8 est un mélange de jus de betterave, carotte, céleri, cresson, épinard, laitue, persil et tomate. Si le « V-8 vegetable soup » n'est pas disponible dans le

commerce, il est possible de préparer un milieu qui possède à peu près les mêmes caractéristiques. Il suffit de mélanger une petite boîte de concentré de tomate et un pot de 100 g de légumes assortis pour enfant (sans viande ni tomate). Ajouter 3 g de KH_2PO_4 , 20 g de gélose et de l'eau distillée jusqu'à 1 l. Homogénéiser et autoclaver 20 mn à 121°C (Pierre et Francis, 1997)

Réalisé par :

BOUIDER Sarra
YENNAR Rahima

Thème : Effet inhibiteur de *Trichoderma viride* sur la croissance mycélienne de *Phoma sp.* et *Epicoccum sp.* et amélioration des milieux de culture.

date de soutenance

03 / 07 / 2010

Résumé

Notre étude a montré que la souche de *Trichoderma viride* est capable de croître sur les deux milieux solides (PDA et V8), aux pH testés (pH5 et pH9) et à une température ambiante de 25°C, mais à des degrés variables. La croissance est optimale à pH5 et 25°C (90mm sur milieu PDA et 81mm sur milieu V8 après 4jours d'incubations à 25°C) et moins importante à pH9 (44mm sur milieu PDA et 34mm sur milieu V8 après 5 jours d'incubations à 25°C), mais aucun développement n'est notable à (5 et 37) °C.

La recherche des meilleurs milieux de fermentation pour la production de la biomasse de *T. viride* a révélé que l'amélioration de leurs contenus nutritifs permet d'obtenir une production maximale de la biomasse avec les concentrations les plus élevées du glucose et de l'extrait de levure sur milieu PDA (2.23g avec 2g/l glucose et 2.52g pour 2g/l d'extrait de levure après 21 jours d'incubation à 25°C) ainsi que sur milieu V8 (1.67g avec 2g/l glucose et 1.93g pour 2g/l d'extrait de levure après 21 jours d'incubation à 25°C).

La souche antagoniste *Trichoderma viride* manifeste une activité antagoniste importante à l'égard de *Phoma sp.* et *Epicoccum sp.*, cette action est caractérisée par un ralentissement de la croissance mycélienne suivi par la formation d'une zone d'inhibition entre les deux colonies confrontées et un arrêt de la croissance mycélienne des pathogènes à un diamètre moyen du 51mm pour *Phoma sp.* et 39mm pour *Epicoccum sp.* après 96h d'incubation à 25°C et pH5, traduisant des taux d'inhibitions de 43.5% pour *Phoma sp.* et 46.5% pour *Epicoccum sp.* Comparativement aux témoins. Tandis que, les métabolites secrétés dans le filtrat de culture de cet antagoniste n'exercent aucune action inhibitrice vers les pathogènes en absences de l'agent antagoniste.

Mots clés : *Trichoderma viride* - milieux - amélioration - *Phoma sp.* et *Epicoccum sp.* - taux d'inhibitions.

Abstract

Our survey showed that the stump of *Trichoderma viride* is able to grow on the two strong middles (PDA and V8), to the pH tested (pH5 and pH9) and to an ambient temperature of 25°C, but with variable degrees. The growth is optimal to pH5 and 25°C (90mm on PDA middle and 81mm on V8 middle after 4days of incubation at 25°C) and less important to pH9 (44mm on PDA middle and 34mm on V8 middle after 5days of incubation at 25°C), but no development is considerable to (5 and 37) °C.

The research of the best middle of fermentation for the production of the biomass of *T. viride* revealed that the improvement of the nourishing contents permits to get a maximal production of the biomass with the most elevated concentrations of the glucose and the excerpt of yeast on PDA middle (2.23g with 2g/l glucose and 2.52g for 2g/l excerpt of yeast after 21 days of incubation at 25°C) as well as on V8 middle (1.67g with 2g/l glucose and 1.93g for 2g/l excerpt of yeast after 21 days of incubation at 25°C).

The stump antagonistic *Trichoderma viride* shows an important antagonistic activity against *Phoma sp.* and *Epicoccum sp.*, this action is characterized by a slowing of the mycelial growth followed by the formation of an inhibition zone between the two confronted colonies and a stop of the mycelial growth of the pathogenic to a middle diameter of the 51mm for *Phoma sp.* and 39mm for *Epicoccum sp.* after 96h incubation at 25°C and pH5, translating rates of inhibitions of 43.5% for *Phoma sp.* and 46.5% for *Epicoccum sp.* compared to the witnesses. While, the metabolites in the filtrate of culture of this antagonist don't exercise an inhibitory action toward the pathogenic in absences of the antagonistic agent.

Key words: *Trichoderma viride* - middle- improvement - *Phoma sp.* and *Epicoccum sp.* - rate of inhibitions.

المخلص:

أظهرت دراسة أن فطر *Trichoderma viride* قادر على النمو في الوسطين الصليبين (PDA و V8)، في درجات الحموضة المختبرة (pH5 و pH9) و في درجة حرارة 25°C، ولكن بدرجات متفاوتة.

كان النمو مثاليا في pH5 و 25°C (90ملم في الوسط PDA و 81 ملم في الوسط V8 بعد 4 أيام من الحضانة في 25°C)، و اقل أهمية في pH9 (44 ملم في الوسط PDA و 34 ملم في الوسط V8 بعد 5 أيام من الحضانة في 25°C)، ولكن لم يلاحظ أي نمو في درجة الحرارة 37°C و 5°C.

البحث عن أفضل أوساط التخمر من أجل إنتاج *Trichoderma viride* للكثافة بين أن تحسين محتواها الغذائي سمح بالحصول على أكبر كثافة، مع التراكيز العالية لسكر الجلوكوز و مستخلص الخميرة في الوسط PDA (2.23 غ مع تركيز 2 غ/ل ل غلوكوز، و 2.52 غ مع 2 غ/ل مستخلص الخميرة بعد 21 يوم من الحضانة في 25°C) وكذلك بالنسبة للوسط V8 (1.67 غ مع 2 غ/ل غلوكوز و 1.93 غ مع 2 غ/ل مستخلص الخميرة بعد 21 يوم من الحضانة في 25°C).

وقد أظهر الفطر المضاد *Trichoderma viride* نجاعة عالية ضد الفطرين *Phoma sp.* و *Epicoccum sp.*، إذ تميز نشاطه بإبطاء في النمو الهيفي متنوع بتشكيل منطقة تثبيط بين المستعمرتين المتضادتين، و توقف نمو المرضين عند 51ملم بالنسبة لـ *Phoma sp.* و 39 ملم بالنسبة لـ *Epicoccum sp.* بعد 96 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 25°C و pH5، مترجمين بذلك نسب تثبيط تدل إلى 43.5% بالنسبة إلى *Phoma sp.* و 46.5% بالنسبة إلى *Epicoccum sp.* بالمقارنة مع الشواهد. في حين لم تظهر إفرازات الفطر المضاد في غياب أي نشاط تثبيطي ضد المرضين.

الكلمات المفتاحية:

Trichoderma viride - تحسين - *Phoma sp.* و *Epicoccum sp.* - نسب التثبيط.