

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Microbiologie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en
Microbiologie Option : Biotechnologie des mycètes; Fermentation
et production des substances fongiques.

*Développement et extraction des métabolites
secondaires de **Trichoderma viride** et leurs
effets biologiquement actifs*

Préparation et présentation :

MOUSSAOUI MERIEM

Jury d'évaluation:

Président : Dr N. KACEM CHAOUCHE

Examineur: Dr M L.HADDI

Dr M A.HAMIDECHI

Rapporteur: Dr L. DEHIMAT

Co-encadreure: M^{elle} Z.BOUZIANE

MC. Univ. Mentouri, Constantine

MC. Univ. Mentouri, Constantine

MC. Univ. Mentouri, Constantine

MC. Univ. Mentouri, Constantine

MC.Uni.Mohamed Seddik Benyahia,Jijel

Année universitaire 2009/2010

DEDICACES

A mes chers parents

Mes chers beaux parents

Mon marie Mohamed

Mes chers frères

Ma belle famille

Abd El Raouf

Khaira

... mieux vaut tard que jamais

REMERCIEMENT

A NOTRE *DIEU*

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire de master a été effectué au sein du laboratoire de mycologie appliquée, département de Biochimie et de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri de Constantine.

Ce mémoire n'aurait pu voir le jour sans la participation laborieuse, le soutien, la bienveillance ou tout simplement la présence de nombreuses personnes. Je vais donc m'essayer à trouver les mots justes pour exprimer spécifiquement ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Je tiens d'abord à adresser toute ma gratitude à toute Mr Laid DEHIMAT et M^{elle} Zahira BOUZIENE sans lesquels ce travail n'aurait pu aboutir. Je la remercie pour sa gentillesse, son soutien et pour le fait de m'avoir fait partager son expérience. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour sa patience, sa disponibilité.

Je remercie également encore mon directeur de thèse Mr Laid DEHIMAT le doyen de notre faculté pour sa confiance et son soutien, sa gentillesse, sa patience pendant la correction de la thèse.

Je remercie également Mr KACEM CHAOUICHE .N pour son soutien pendant toutes les années d'études.

J'exprime également mes remerciements à mes deux amies Sana, Wafa et Insaf pour leurs aides.

Je remercie très sincèrement M^{elle} Wided ABDELAZIZE.

Mes remerciements s'adressent aux personnes responsables du magasin de la faculté des sciences de la nature et de la vie pour leur gentillesse et aide.

Merci aussi à Mr MASSBAH enseignant dans la faculté de Chimie.

Un grand merci pour Mr Amar pour l'eau distillée et d'autres choses.

Je tiens à remercier Mr ALLAGUE qui m'a fournie les souches bactériennes.

Également je remercie mes amies Samia Batoul ; Houda; Mounira.

Liste des abréviations

AA : acide aminé.

CHCl₃: Chloroforme

CYA: Czapek- Yeast- Agar.

ESH: Entreprise Spécialisé Hospitalière.

MEA: Malt- Extract- Agar.

MSTVB : métabolites secondaires bruts de *Trichoderma viride*.

PDA : Potato- Dextrose- Agar.

°C : degré Celsius.

gr : gramme.

Gr : grossissement.

mm : millimètre.

N° : numéro.

ph : nombre d'hydrogène.

TV : *Trichoderma viride*.

% : pourcentage.

Ø : diamètre.

UFC : unité par colonie fermante.

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure n° 1 : Les 5 sections systématiques de <i>Trichoderma sp.</i> et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bisset (1991 a et b)..... | 05 |
| Figure n° 2 : Schéma de branchement de conidiospores de <i>Trichoderma.sp.</i> | 07 |
| Figure n° 3 : <i>Trichoderma viride</i> sur différents milieux..... | 10 |
| Figure n° 4 : Cycle de vie de <i>Trichoderma viride</i> | 12 |
| Figure n° 5 : <i>Aspergillus niger</i> ; (A) sur milieu gélosé;(B) sous microscope..... | 20 |
| Figure n° 6 : <i>Epicoccum sp.</i> ; (A) sur milieu gélosé;(B) sous microscope..... | 20 |
| Figure n° 7 : <i>Penicillium sp.</i> ; (A) sur milieu gélosé;(B) sous microscope..... | 20 |
| Figure n° 8 : <i>Serratia marcescens</i> sur milieux géloses..... | 22 |
| Figure n° 9 : <i>Serratia marcescens</i> sous microscope;(A) optique;(B) électronique.. | 22 |
| Figure n° 10 : <i>Proteus mirabilis</i> sur milieux géloses..... | 22 |
| Figure n° 11 : <i>Proteus mirabilis</i> sous microscope;(A) optique, B) électronique..... | 22 |
| Figure n° 12 : Colonies de <i>T. viride</i> sur milieu PDA..... | 28 |
| Figure n° 13 : Colonies de <i>T. viride</i> sur milieu MEA..... | 28 |
| Figure n° 14 : Colonies de <i>T. viride</i> sur milieu Czapek DOX..... | 28 |
| Figure n° 15 : Colonies de <i>T. viride</i> sur milieu Sabouraud..... | 28 |
| Figure n° 16 : Le virage de la couleur de <i>T. viride</i> sur culture de PDA après 21j | 29 |
| Figure n° 17 : Schéma de l'aspect morphologique d'un conidiophore de <i>T. viride</i> | 29 |
| Figure n° 18 : Aspect morphologique de <i>T. viride</i> sous microscope optique Gr×40..... | 30 |
| Figure n° 19 : Colonie de <i>Epicoccum sp</i> en présence de <i>T. viride</i> après 168heurs..... | 33 |
| Figure n° 20 : Colonie d' <i>Epicoccum sp</i> en absence de <i>T. viride</i> après 168heurs;(A) : recto;(B) : verso (Témoin)..... | 33 |
| Figure n°21 : Colonie de <i>Penicillium sp</i> après 168 heures;(A) : en absence de <i>T. viride</i> ;(B) : en présence de <i>T. viride</i> | 33 |

| | |
|---|----|
| Figure n° 22 : Colonie d' <i>Aspergillus niger</i> après 168 heures A : en absence de <i>T. viride</i> ;(B) : en présence de <i>T. viride</i> | 33 |
| Figure n° 23 : La meilleure croissance en milieu CYA..... | 35 |
| Figure n° 24 : La croissance pour différentes concentrations de l'extrait de levure..... | 36 |
| Figure n°25 : La biomasse de <i>T. viride</i> en milieu Malt pour différentes concentrations de l'extrait de levures..... | 36 |
| Figure n° 26 : La phase chloroformique en en milieu Malt..... | 38 |
| Figure n°27 : Effet des MDTVB extrait du milieu Malt sur <i>Serratia marcescens</i> . A (0,25 ; 0,5 ; 1) mg/l et B (2 ; 4 ; 8) mg/l..... | 42 |
| Figure n° 28 : Effet des MDTVB extrait du milieu CYA sur <i>Serratia marcescens</i> . A (0,25 ; 0,5 ; 1) mg/l et B (2 ; 4 ; 8) mg/l..... | 42 |
| Figure n° 29 : Effet des MDTVB sur <i>Proteus mirabilis</i> à différentes concentrations (0.25 ; 0.5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8) mg/l. A extrait du CYA, B extrait du Malt..... | 42 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau n° 01 : Certain métabolites secondaires de <i>Trichoderma viride</i> | 17 |
| Tableau n° 02 : Etude macroscopique de <i>T.viride</i> sur différents milieux à 25°C..... | 27 |
| Tableau n° 03 : La croissance des colonies de <i>T. viride</i> sur différents milieux à 05°C..... | 31 |
| Tableau n° 04 : La croissance des colonies de <i>T. viride</i> sur différents milieux à 25°C..... | 31 |
| Tableau n° 05 : La croissance des colonies de <i>T. viride</i> sur différents milieux à 30°C..... | 31 |
| Tableau n° 06 : Effets inhibiteurs de <i>T. viride</i> (T.V.) sur la croissance mycélienne (mm) et taux d'inhibition des souches de <i>Penicillium sp</i> , <i>Aspergillus niger</i> et <i>Epicoccum sp</i> | 34 |
| Tableau 07 : Le poids sec de la biomasse issue des milieux de fermentations de <i>T. viride</i> | 37 |
| Tableau 08 : Le poids sec des métabolites secondaires de <i>T.viride</i> (MSTVB)..... | 38 |
| Tableau n° 09 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de <i>Serratia marcescens</i> sur Malt par macro méthode en milieu liquide..... | 39 |
| Tableau n°10 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de <i>Serratia marcescens</i> sur CYA par macro méthode en milieu liquide..... | 39 |
| Tableau n° 11 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de <i>Proteus mirabilis</i> sur Malt par macro méthode en milieu liquide..... | 40 |
| Tableau n° 12 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) <i>Proteus mirabilis</i> sur CYA par macro méthode en milieu liquide..... | 40 |
| Tableau n°13 : Effet de la sensibilité des souches bactériennes au MSTVB à différents concentrations..... | 41 |
| Tableau A1 :Milieux Malt à différents concentration de levure. | |
| Tableau A2 :Milieux CYA à différents concentration de levure. | |

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| Introduction..... | 01 |
| PARTIE 1. Recherche bibliographique | |
| 1-Les champignons microscopiques du genre <i>Trichoderma</i> | 02 |
| 1.1- Historique de taxonomie..... | 02 |
| 1.2 - Ecologie..... | 06 |
| 1.3- Morphologie..... | 06 |
| 1.4 - <i>Trichoderma</i> et l'homme..... | 07 |
| 1.5 -Production de métabolites intéressants..... | 08 |
| 1.5.1- Production d'enzymes | 09 |
| 1.5.2- Production de substances bioactives | 09 |
| 1.6- La biosynthèse des acides aminés | 09 |
| 2 - <i>Trichoderma viride</i> | 10 |
| 2.1-Définition | 10 |
| 2.2 - Habitat..... | 10 |
| 2.3- Taxonomie..... | 11 |
| 2.4 - Morphologie..... | 11 |
| 2.5 -Biologie | 11 |
| 2.6 -Cycle de vie | 11 |
| 2.7- Biochimie..... | 13 |
| 2.7.1- Source de carbone | 13 |
| 2.7.2- Source de l'azote (nitrogène) | 13 |
| 2.8- Le pouvoir antagoniste de <i>T. viride</i> | 13 |
| 2.8.1-L'antibiose | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 2.8.2- La compétition..... | 13 |
| 2.8.3 Le parasitisme | 14 |
| 2.9-Les agents antagonistes et parasites de <i>T. viride</i> | 14 |
| 2.10- : Utilisation de <i>T. viride</i> | 15 |
| 2.10.1-Promotion de la croissance des plantes..... | 15 |
| 2.10.2- Agent de biocontrol..... | 15 |
| 3-Métabolites secondaires..... | 15 |
| 3.1- Métabolites secondaires chez les mycètes..... | 16 |
| 3.2- Métabolites secondaires de <i>T. viride</i> | 17 |
| PARTIE 2. Matériels et Méthodes | |
| 1. matériel biologique | 18 |
| 1.1-Souches utilisées..... | 18 |
| 1.1-1Souches fongiques..... | 18 |
| a- <i>Trichoderma viride</i> | 18 |
| b-Etude macroscopique et microscopique de <i>T. viride</i> | 19 |
| c-souches fongiques pathogènes..... | 19 |
| 1.1.2- Souches bactériennes pathogènes..... | 21 |
| 1.2-Réactivation des souches..... | 21 |
| 1.2.1- <i>Trichoderma viride</i> | 21 |
| 2. Développement..... | 21 |
| 3. Test d'antagonisme | 23 |
| 4. Fermentation..... | 23 |
| 4.1- Préparation de cultures..... | 23 |
| 4.2 Détermination de la biomasse par poids sec | 24 |
| 4.3- Procédure d'extraction des métabolites secondaires de <i>T. viride</i> bruts (MSTVB) | 24 |

| | |
|--|----|
| 4.4- Préparation de différentes concentrations du MSTVB..... | 25 |
| 5. Antibiogramme..... | 25 |
| 5.1- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)... | 25 |
| 5.1.1-La technique en milieu liquide..... | 25 |
| a- Les cultures bactériennes..... | 25 |
| b- Préparation de l'inoculum..... | 25 |
| c- Les dilutions | 25 |
| 5.1.2- La technique en milieu solide gélosé | 26 |
| a-Préparation des disques des MSTVB à différents concentrations..... | 26 |
| b-manipulation..... | 26 |

PARTIE 3. Résultats et Discussion.

| | |
|---|----|
| 1-Développement et caractérisation..... | 27 |
| 1.1- Résultats après 6 jours..... | 27 |
| 1.2- Résultat plus tard..... | 29 |
| 2. Etude de microscopie <i>T. viride</i> | 29 |
| 3. Effet des milieux de cultures sur la croissance de <i>T. viride</i> | 30 |
| 4. Effet de la température sur la croissance de <i>T. viride</i> | 30 |
| 5. Le test de l'antagonisme | 32 |
| 6. Détermination de la biomasse par poids sec..... | 35 |
| 7. Détermination des métabolites secondaires bruts de <i>T.viride</i> (MSTVB)..... | 37 |
| 8. Effets des MSTVB sur les souches bactériennes (CMI)..... | 38 |
| 8.1 Effet en milieu solide..... | 38 |
| 8.2 Effet en milieu liquide..... | 41 |

PARTIE 4 Conclusion et Résumé.

| | |
|-----------------------------|----|
| 1- Conclusion générale..... | 44 |
| 2- Résumé..... | 46 |

3- Summary.....47

4- الملخص..... 48

PARTIE 5. Références et Annexes.

1- Références bibliographiques.....49

2- Annexes.....57

Introduction

Les moisissures représentent un groupe hétérogène de champignons microscopiques saprophytes et, parfois parasites, des organismes eucaryotes, thallophytes (filaments mycéliens à croissance apical).

Parmi les termes qui existe sur la liste taxonomique des moisissures ,le terme *Trichoderma* qui 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.

En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font des *Trichoderma sp.* des agents potentiels en agro-alimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle . Quelques-unes des quelques 35 espèces établies à ce jour sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques parmi eux, on a *Trichoderma viride* qui représente une espèce très importantes dans la lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (antibiose, mycoparasitisme, compétition, lyse, promotion de la plante hôte).

Notre travail est consacré à l'étude de *Trichoderma viride*, selon les points suivants :

- Le développement de *T. viride* sur divers milieux solides à différents températures.
- La fermentation et l'extraction des métabolites secondaires bruts de *T. viride* sur deux milieux liquides optimisés et étudier l'effet de l'extrait de levure comme source d'azote et de vitamines sur la biomasse et la production de substances antibactériens.
- Le test de l'antagonisme de *T. viride* contre trois souches fongiques.
- Le test d'antibiogramme du deux souches bactériennes.

1-Les champignons microscopiques du genre *Trichoderma*

1.1- Historique de taxonomie

La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études et de beaucoup de polémiques. Dans le règne vivant les limites de «l'espèce» reposent sur la possibilité de croisement entre individus. Or, les champignons anamorphes du genre *Trichoderma*, en tant que tels, n'ont pas de reproduction sexuée connue, et ce caractère ne peut donc être utilisé pour leur systématique. On se base alors sur les aspects culturels et la morphologie des appareils sporogènes (Roquebert., 1996) ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaires (Gams et Bissett., 1998). Si on répertorie succinctement les dates les plus importantes qui ont marqué la systématique des *Trichoderma 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. Jusqu'à 1939 le raisonnement d'Abbot reste en vigueur, mais aussi à côté d'identifications totalement indépendantes.

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

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

En 1969, conscient de toute cette polémique, Rifai propose une classification «utilisable avec le concept d'« espèces agrégées », basé sur les caractères microscopiques. « Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer ». Neuf espèces agrégées sont 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 (Rifai.,1969).

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

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

Se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces agrégées dans 5 sections (Fig. 1) (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Leuchtmann., 1996)

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

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

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

La biologie moléculaire nous révèle aujourd'hui que des espèces de *Trichoderma* génétiquement différentes, présentent des similitudes morphologiques spectaculaires et leurs caractéristiques se chevauchent ce qui, d'une part explique la longue controverse connue par ce genre auparavant et d'une autre part, montre que les seuls critères morphologiques ne suffisent plus pour une classification incontestable et rigoureuse des formes anamorphes de *Trichoderma sp.* (Cournut., 1984 ; Sugiyama., 1987).

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

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

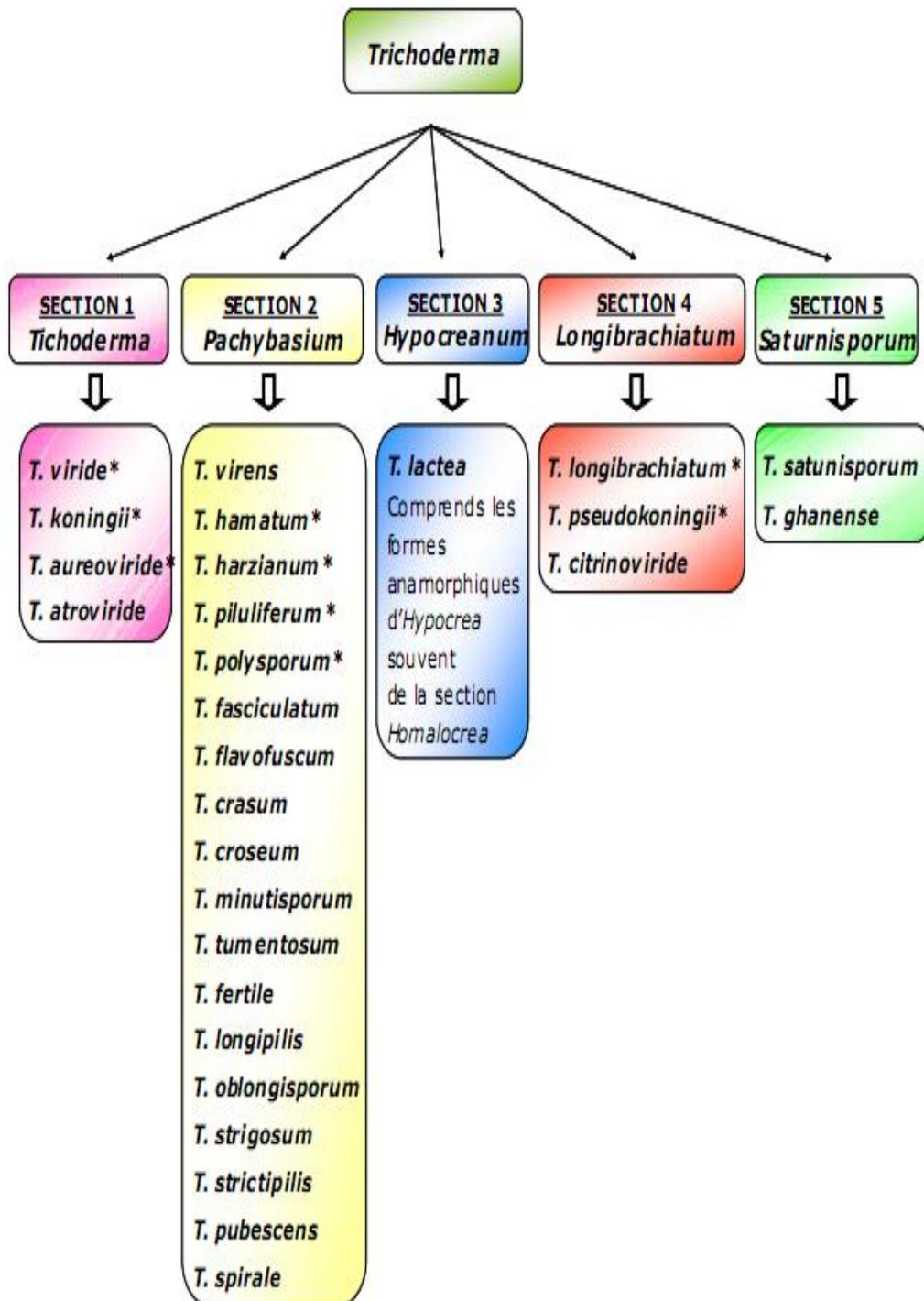


Figure 1 : Les 5 sections systématiques de *Trichoderma* sp. et quelques-unes des espèces y appartenant, selon Bisset (1991 a et b).

* Les espèces agrégées de Rifai (1969)

1.2- 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. En effet, les *Trichoderma sp.* sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats et sont, par conséquent, l'élément majeur dans la microflore terrestre et marine.

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. *Trichoderma sp.* y ont été identifiés à tous les niveaux. Ils ont été également isolés à partir d'algues marines prélevées de la côte Atlantique et méditerranéenne ibériques ainsi qu'à partir de moules au Canada. Leur présence dans le tractus digestif et la surface de plusieurs espèces de concombre des mers reste insolite, puisque ces derniers biosynthétisent des glycosides tri terpéniques aux fortes activités antifongiques et cytotoxiques (Pivkin., 2000).

Le genre *Trichoderma* est l'un des 3 prédominants. Il vient à la 3ème position après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. 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 (Mohamed-Benkada., 2006).

1.3- Morphologie

L'aspect macroscopique de *Trichoderma sp.* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium,

correspondant à la conidiogénèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour un feutrage épais se superpose à la culture. Au microscope optique on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores 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). (Fig. 2)

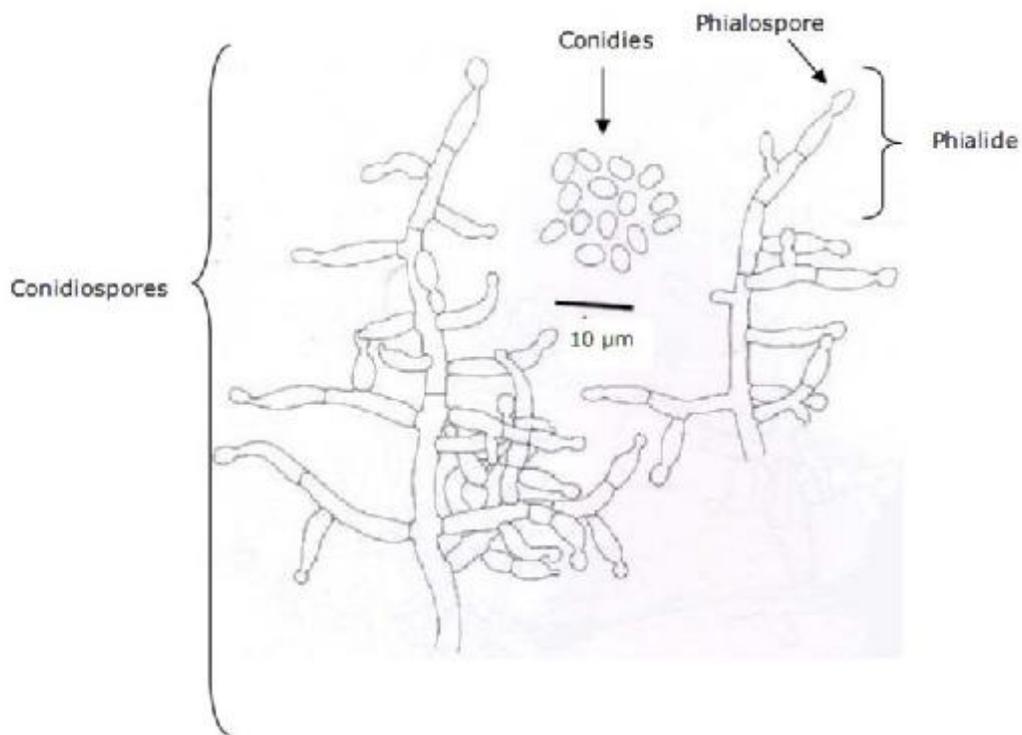


Figure 02 : Schéma de branchement de conidiophores de *Trichoderma*

1.4- *Trichoderma* et l'homme

Les *Trichoderma sp.* peuvent être responsables d'infections chez les patients immunodéprimés, bien que l'Homme ne leur soit qu'un hôte accessoire (Roquebert, 1996). Sous certaines conditions, ils peuvent provoquer chez lui des infections opportunistes fatales (Munoz et al.1997). Il a été constaté que le développement des *Trichoderma sp.* chez l'Homme est souvent le fait de déficits immunitaires spontanés ou post-thérapeutiques, qui en favorise la survenue et en augmente la gravité (Ragnaud et al., 1984). Ces affections invasives ou localisées peuvent engendrer des :

Mycétones (tumeurs inflammatoires) pulmonaires,
Péritonites (Tanis et al., 1995),
Hématomes péri-hépatiques,
Abscesses cérébraux (Seguin et al., 1995),
Kératites fongiques,
Septicémie,
Infections épidermiques et subcutanées localisées,
infections pré-trachéales, du muscle cardiaque et de l'estomac (Gutiérrez et al., 1995).

Le traitement de ces mycoses est souvent chirurgical suivi de thérapie antifongique, mais les cas de décès sont fréquents (Munoz et al., 1997).

1.5- Production de métabolites intéressants

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

1.5.1- Production d'enzymes

La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre principalement les xylanases ou les cellulases (Sandgren et al., 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek et al., 2003).

1.5.2- Production de substances bioactives

Métabolites volatils : 6 pentyl α pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes (Vizscaino et al., 2005)

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

Métabolites polypeptidiques ciclosporines immunosuppresseurs anti- inflammatoire; (et les peptaïbols, qui sont généralement assimilés à des mycotoxines peptidiques (Landreau., 2001).

1.6- La biosynthèse des acides aminés

La biosynthèse des AA chez les micromycètes : Les champignons sont capables de synthétiser les 20 AA usuels des deux séries L et D, en plus d'autres particuliers, en partant de l'ammoniaque environnant provenant soit de la dégradation enzymatique de composés azotés organiques ou inorganiques ou bien suite à la fixation bactérienne de l'azote atmosphérique. Le rythme de croissance élevé des *Trichoderma sp.* leur permet d'assimiler rapidement l'ammoniaque. La biosynthèse des AA est initiée par la production de glutamate (E), rare et précieux dans la nature, car il est la trame de synthèse du reste des AA et se trouve de ce fait à des concentrations élevées dans les cellules vivantes (Ahmed et al., 1995 ; Voet ., 1998).

2 - *Trichoderma viride*

2.1- Définition

C'est l'une des champignons du sol, ou il se développe à l'état saprophyte, mais il s'attaque aussi certain mycélium (Guy.,1993). C'est une espèce cosmopolite très répondeue et très résistante. Cette espèce a été isolée de substrats et habitats divers (Subramanian., 1983).

2.2- Habitat

Trichoderma viride est très répandue: extrême nord, zones alpines, régions tropicales.il habite divers milieux et produits (Fig 03):

Algues, bois, matières synthétiques (plastique), papier, produits alimentaires, sol, textile (Subramanian ., 1983).

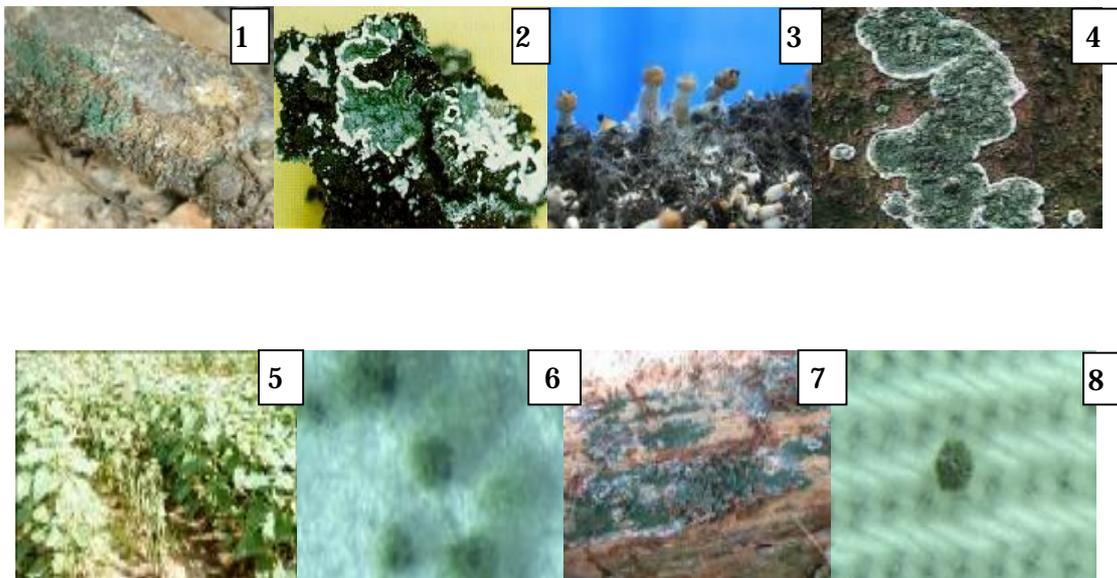


Figure03:*Trichomerma viride* sur différents milieux (1: bois;2:sol;3:mer;4:sol ;5:roché ;6:coton ;7:sol ;8: textile).

2.3- Taxonomie

- Embranchement *Amastigomycota et/Eumycètes*
- Sous embranchement *Ascomycotina*
- Classe *Sordariomycètes*
- Ordre *Hypocréales*
- Famille *Hypocraceae*
- Genre *Trichoderma*
- Espèce *Trichoderma virideae*(Bissett., 2004)

2.4- Morphologie

Thalle d'abord blanc, puis vert-bleu, dans les régions conidiogènes, revers incolore. Conidiophores très ramifiés, à ramification de plus en plus courtes vers l'apex et formant de ce fait un ensemble pyramidal. Phialides par 2- 4, en forme de quille, droites ou incurvées, 8-14(20) × 2,5-3µm. Conidies globuleuses 3,5- 45µm granuleuses. Chlamydo-spores globuleuses, hyalines, atteignant 14 µm de diamètre (Botton et al., 1990).

2.5 - Biologie

La température optimale de croissance est comprise entre 20°C et 28°C. Une bonne croissance est également observée pour 6°C 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°C à 55°C pendant 30 minutes. Le pH doit être compris entre 1.5 et 9, le pH optimum étant de 4,5-5,5. L'analyse de l'ADN montre que *T. viride* est constituée de 49,5-51% GC. Une longueur d'onde comprise entre 430 et 490 et/ou 320 et 380 nm favorise la sporulation. Les ions de cuivre permettent le développement des structures colorées. Une concentration élevée de sel dans le support inhibe la germination des conidies, mais pas la croissance du mycélium. Les conidies sont relativement résistantes aux rayonnements gamma (Subramanian., 1998).

2.6 - Cycle de vie

Trichoderma viride est un champignon asexuée .Conidiospores représente la phase dominante de la multiplication .Dans des conditions appropriées, les spores germent, donne un mycélium, constitué des hyphes ramifier, nouvelles conidiospores sont formés dans des phialides. (Rifai., 2004)

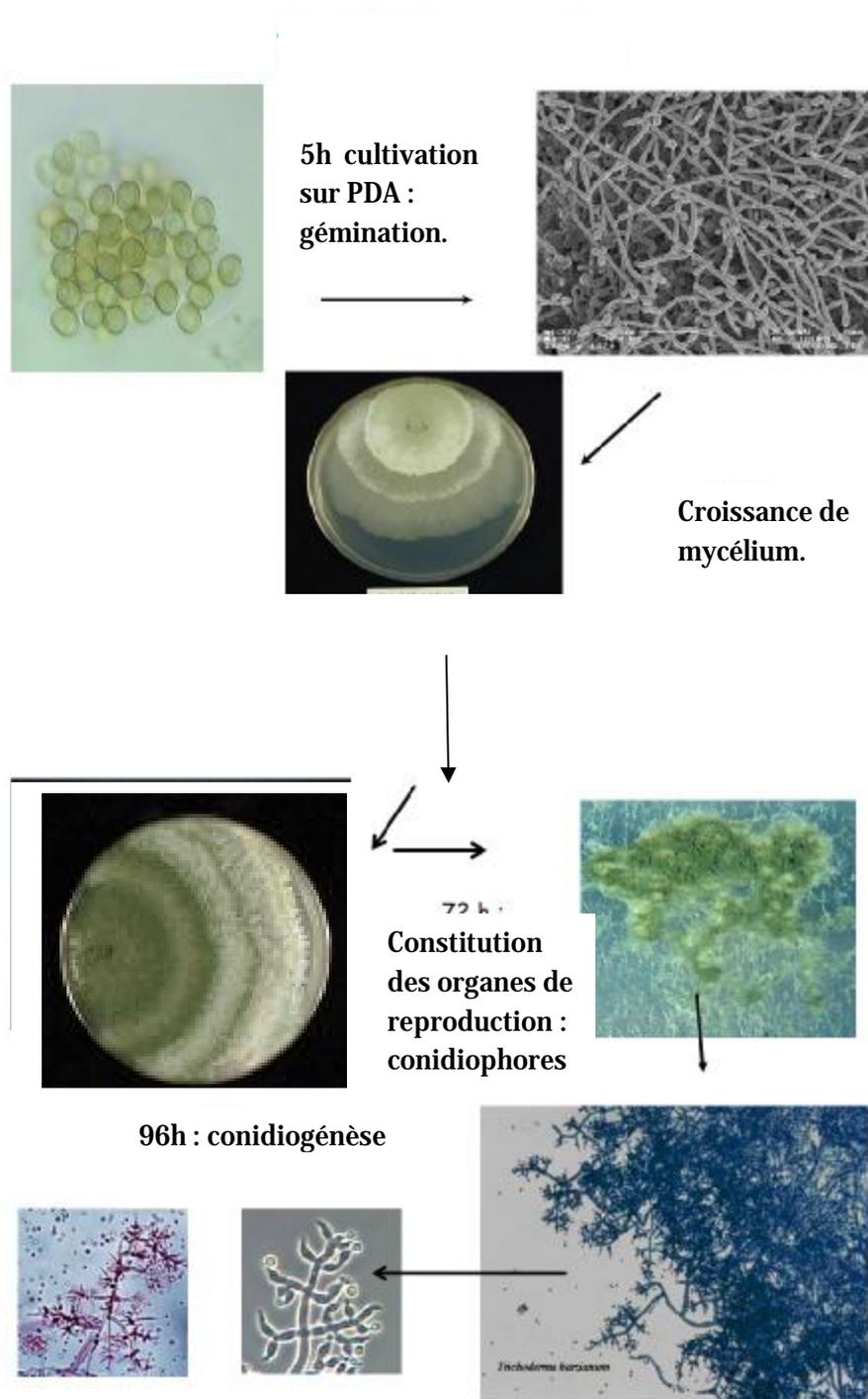


Fig 04 : Cycle de vie de *Trichoderma viride*

7- Chimie

2.7.1-Source de carbone

Pour un développement optimal sur : Manite, fructose, ribose, glucose (dextrose), galactose, manose.

Pour un développement moyen (modéré) sur : Arabinose, sorbose, melibiose, maltose, lactose, celobiose, cellulose, amidon, inuline.

Pour un développement faible sur: Sorbitol, xilose, saccharose (sucrose), glycérol.

1.7.2-Source de l'azote (nitrogène)

Pour un développement optimal sur : DL-leucine, L-cystine, DL-citruline, DL-norleucine, nitrate d'ammonium, tetraté d'ammonium.

Pour un développement moyen (modéré) sur : L-arginine, L-leucine, glycol, asparagine, riboflavine, sulfate d'ammonium, carbonate d'ammonium, monobasique phosphate d'ammonium

Pour un développement faible sur: Tryptophane, tyrosine, D-serine, lysine, urée, Na, K, nitrate de calcium. (Subramanian., 1983)

2.8- Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma viride*

Les propriétés antagonistes de *T.viride* 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 *T. viride* pour contrôler *Botrytis cinerea* sur la laitue. *T.viride* a la capacité d'attaquer les agents pathogènes via différents modes d'action. Il peut utiliser :

2.8.1- l'antibiose qui résulte de la production de substances qui agissent comme des« antibiotiques » et qui inhibent la croissance de l'agent pathogène;

2.8.2- 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;

2.8.3- le parasitisme qui se manifeste 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.

Trichoderma possède une batterie de mécanismes d'attaque potentiellement utilisables mais qui demeurent toutefois complexes. Il peut employer un ou plusieurs modes d'action en même temps pour maîtriser un agent pathogène. 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 pulvérisation aérienne. Une fois installée, *Trichoderma* peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes. (Johanne Caron., 2002)

2.9- Les agents antagonistes et parasites

Trichoderma.viride **antagoniste** les espèces suivantes :

Alternaria sp, Armillaria mellea, Athelia rolfsii, Colltotrichum lini Fusarium Oxysporum, Gaeumannomyces Graminis, Helminthosporum sp, Macrophomina Phaseolus Pythium Sp, Rhisoctonia solani, Verticillium Albo-Artum, Verticillium Dahliae. (Besselat., 1985) ; (Lanusse et al., 1983).

Hyperparasite de sclérotos de: *Sclerotinia sclerotiorum, Sclerotium cepivorum, Sclerotinia trifoliorum, Sclerotinia borealis, Claviceps purpurea.*

Mycoparasite : *Actinomucor elegans, Armillaria mellea, Athelia rolfsii, Cachliobolus sativus, Circinella muscae, Fusarium oxysporium, , Gaeumannomyces graminis, Lentinus edodes, , Mucor plumbeus, M.hiemalis, Phaeolus schweinitzii Phytophthora parasitica Phytophthora citrophthora, Pythium sp, Phycomyces nitens, , Rhizopus oryzae, Rhizoctonia solani, , Zygorrhynchus moelleri, Syncephalastrum rasemosus.* (Domsch., 1993).

2-10 : Utilisation de *Trichodema viride*

2.10.1-Promotion de la croissance des plantes

La capacité de ce champignon pour augmenter le taux de croissance de la plante et développement compris leur capacité à cause de la production de plus vigoureuse des racines a été connue. Le mécanisme de ces capacités ne sont vient de se faire connaître. (Altomare et al., 1999).

2.10.2 Agent de biocontrôle

Le contrôle biologique met de différentes manières. Le mode d'action d'agent du contrôle peut être par exemple : la concurrence pour les éléments nutritifs, la compétition pour l'espace de l'infection des sites sur les racines (les blessures). (Lepoivre et Semal ., 1988).

3-Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme, qu'ils sont de structure et d'activité biologique des plus diverses, qu'ils possèdent des voies de synthèse qui leurs sont propres à partir de produits du métabolisme primaire, que leur synthèse est dirigée par un ensemble de gènes auxquels sont souvent associés des gènes de régulation et de résistance, et qu'ils ne sont généralement produits que par un nombre limité d'organismes.

Les métabolites secondaires sont généralement produits en faible quantité (1 à 20 mg/l) par les souches sauvages, alors qu'une production ne devient rentable qu'à partir d'une synthèse de 5 g/l. Ø L'amélioration du rendement repose sur l'optimisation des procédés de fermentation et la modification des souches, par recherche de mutants spontanés, par mutation dirigée lorsque les bases génétiques de la biosynthèse du métabolite sont connues, ou encore par construction de souches par croisement, fusion de protoplastes ou manipulation génétique.

Les métabolites secondaires expriment l'individualité des espèces en terme chimique, d'autre part des espèces qui sont largement séparés peuvent produire la même classe des métabolites et par fois les mêmes métabolites secondaires. (Taylor et Francis, 1998). Ce sont des molécules caractérisés par des structures chimiques très diversifiées, complexes, et inhabituelles. Ils sont souvent spécifiques aux organismes

producteurs, parfois même à une seule espèce. Les clusters qui codent leur synthèse ne contiennent que des gènes fonctionnels et sont localisés parmi ceux de résistance et de régulation, ce qui montre leur importance pour la cellule productrice (Miller, 2000).

3.1- Métabolites secondaires Chez les mycètes

Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation (Hapwood, 1988 ; Mapleston *et al.*, 1992 ; Stone and Williams, 1992 ; Demain and fang, 2000 ; Calvo *et al.*, 2002). De ce fait, les métabolites secondaires peuvent avoir certaines activités :

- 1- Métabolites qui activent la sporulation:acide linoléique et ses dérivés produit par *Aspergillus nidulans*. (Champ *et al.*, 1987 ; Champ and El-Zayat, 1989 ; Mazur *et al.*, 1991 ; Calvo *et al.*, 2001) ;
- 2- Pigments nécessaires la mélanine pour la formation des spores sexuelles et asexuelle (Kawamura *et al.*, 1999) ;
- 3- Métabolites toxiques secrétés par des colonies à la période approximative de la sporulation : la biosynthèse des mycotoxines. (Trail *et al.*, 1994 ; Hapwood., 1988 ; Alspaugh *et al.*, 1997).

Ultérieurement, les métabolites secondaires peuvent :

1. Retarder la germination des spores jusqu'à ce que les conditions environnementales soient favorables ;
2. Protègent les spores en dormance contre des amibes ;
3. Eliminer dans l'environnement immédiat des microorganismes concurrents pendant la germination (Demain and Fang., 2000).

3-2 Métabolites secondaires de *Trichoderma viride*

Tableau 1 : Certain métabolites secondaires de *Trichoderma viride* :

| Métabolites secondaires | Sources littéraire |
|-------------------------------------|--|
| 1-hydroxy-3-methyl antraquinone | Slater et al (1967) |
| 1-8dihydroxy-3-methyl anthraquinone | Slater et al (1967) |
| Alamethicine | Brewer et al ,Meyer et Reusser,(1967). |
| Trichotoxine | Bruckner et al(1985). |
| Suzukacilline | Katz et al (1985) |
| Trichovirine | Bruckner et Koza (1992) |
| Veridiol | Bruckner et Koza (1992) |
| Polypeptide cyclique | Cahagnier B et al (1998). |
| Trichothecine | Fujita et al (1994) |
| Trichodermine | Cahagnier B et al (1998). |
| Gliotoxine | Cahagnier B et al (1998). |
| Griséofulvine | Cahagnier B et al (1998). |

(Pavlovicova., 1998).

MATERIELS ET METHODES

1. matériel biologique

1.1-Souches utilisées

1.1.1-Souches fongiques

a- *Trichoderma viride*

Dans notre travail, on a utilisé comme microorganisme cible *Trichoderma viride* qui provient du laboratoire de Mycologie Appliquée de l'Université Mentouri de Constantine, isolée et identifiée par le même laboratoire.

La souche récupérée sous la forme d'une culture sur milieu PDA solide en erlenmyer. Dans ce travail on a choisis *T. viride* comme un matériel biologique pour plusieurs raisons :

- Une grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, pour ce la elle est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin.
- Sa croissance rapides, sa capacité à utiliser différents substrats et sont, par conséquent, l'élément majeur dans la microflore terrestre et marine.
- Il protégé et donne même un surplus de vigueur aux plantes et peut jouer un rôle prédominant dans la santé des plantes.
- Un antagoniste contre plusieurs phytopathogènes.
- Sa capacité de produire des métabolites primaires et secondaires très importantes.

Notre étude est basée sur cette espèce par le suivi de son développement sur milieux solides, sa fermentation sur deux milieux, son pouvoir antagoniste et l'antibiogramme de ses métabolites secondaires (substances antibactériennes)

Les souches pathogènes *Penicillium sp*, *Aspergillus niger* et *Epicoccum sp* provient de même laboratoire sous les mêmes conditions.

b-Etude macroscopique et microscopique de *Trichoderma viride*

Dans la partie de développement sur milieux : PDA, MEA, Czapek-DOX, Sabouraud (voire annexe), on fait une observation macroscopique de la croissance des colonies, leurs couleur et texture après 6^e jour d'incubation à 25°C sur chaque milieux (Botton *et al.*, 1990).

On prélève superficiellement d'une boîte de pétri après trois jours d'incubation à 25°C sur milieu PDA, un échantillon à l'aide de l'anse de platine, on le dépose sur une lame de verre puis on ajoute deux gouttes de lactophénol ou bleu coton de méthylène, on déplace bien notre échantillon à fin d'évité a avoir une préparation dense et inobservable, on chauffe la lame portant l'échantillon doucement par le bec bunsen pour faciliter la réaction. En fin on fait couvrir la lame par une lamelle sans laisser des bulles d'aires pour avoir une meilleure observation. Observer et réaliser successivement des différents grossissements du microscope optique jusqu'à immersion (Botton *et al.*, 1990).

c-souches fongiques pathogènes

Les souches utilisés pour le test d'antagonisme contre *T. viride* , qui provient du laboratoire de microbiologie appliquée de l'Université Mentouri de Constantine, isolées du maïs planté dans le sol de Djidjel et identifiée par le même laboratoire .Les souches sont:

- *Aspergillus niger*, (voire annexe2) (Fig05)
- *Epicoccum sp.* (voire annexe2) (Fig06)
- *Penicillium sp.*, (voire annexe2) (Fig07)

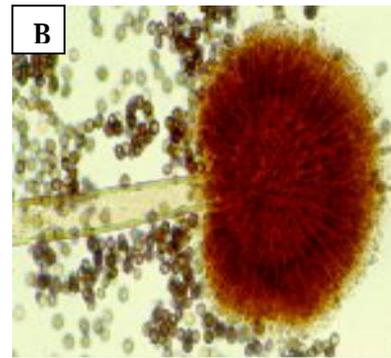
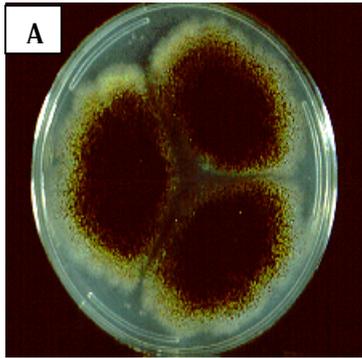


Fig05 : *Aspergillus niger*; (A): sur milieu gélosé; (B): sous microscope.

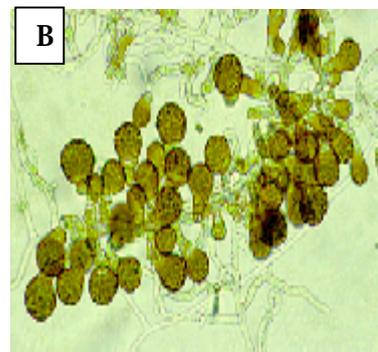
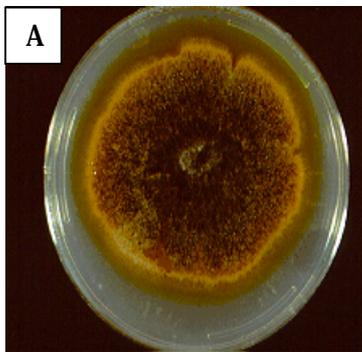


Fig06 : *Epicoccum sp.*; (A): sur milieu gélosé; (B): sous microscope.

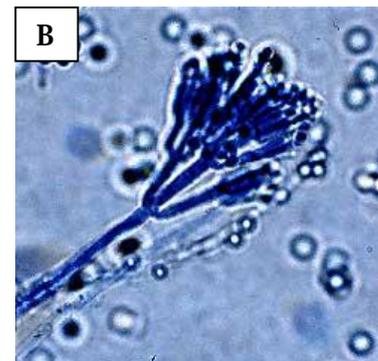
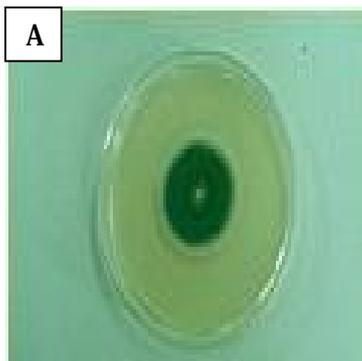


Fig07 : *Penicillium sp.*; (A): sur milieu gélosé; (B): sous microscope.

1.1.2- Souches bactériennes pathogènes

Les souches bactériennes sont: *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* (voire annexe2) provient du laboratoire de bactériologie de l'hôpital de DAKSI (ESH) 'Abdel Kader Bouchret'. Les souches sont fournies dans des boites de Pétri en milieux solides (Fig08, 09, 10,11).

1.2-Réactivation des souches

1.2.1- *Trichoderma viride*

On prélève par l'ance de platine, un échantillon de *T. viride* dans l'erlenmyer et on fait une piqure centrale dans des boites de Pétri coulé préalablement par le PDA et incubées à 25°C pendant 4 à 5 jours (Botton *et al.* 1990).

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

2. Développement

La mise en culture pour l'ensemencement de *T. viride* se fait par des piqures centrales dans des boites de Pétri coulées préalablement par les milieux suivants: PDA, MEA, Czapek-DOX, Sabouraud (voire annexe1), 'incubées dans des étuves à 25°C et 30°C et dans un réfrigérateur pour la température de 5°C pendant 6 jours (Botton *et al.* 1990). Au cours de cette expérimentation, pour chaque milieu, trois boîtes sont utilisées, avec trois ensemencements par boîte et chaque test est répété trois fois pour chaque température. L'évolution de la croissance mycélienne est estimée par la mesure de la moyenne de deux diamètres perpendiculaires des colonies la toutes les 24heures (Botton *et al.* 1990). Toutes les manipulations microbiologiques sont réalisées dans des conditions d'asepsie sous hotte avec l'appoint d'un bec Bunsen.



Fig 08 : *Serratia marcescens* sur milieux géloses.

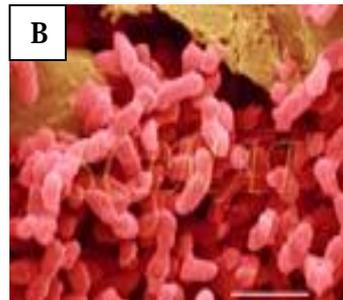
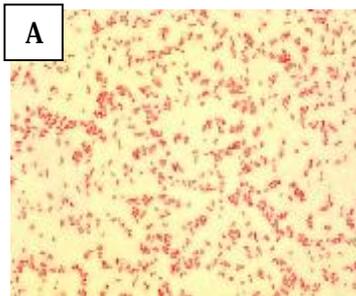


Fig 09 : *Serratia marcescens* sous microscope;(A): optique;(B): électronique.

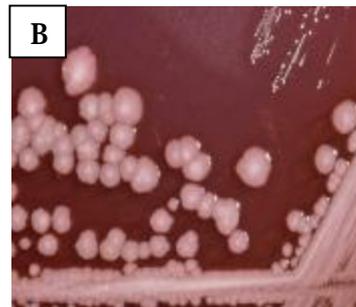
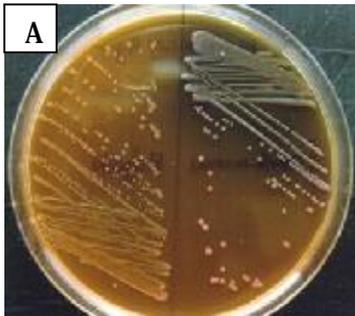


Fig10 : *Proteus mirabilis* sur milieux géloses.

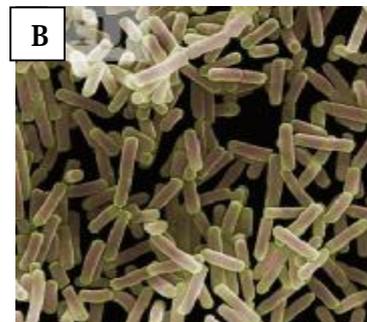
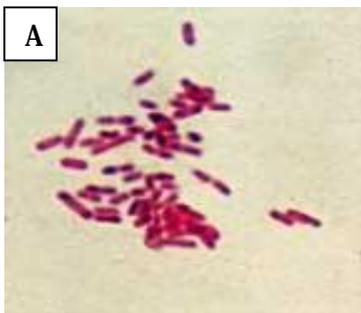


Fig11 : *Proteus mirabilis* sous microscope;(A):optique;(B): électronique.

3. Test d'antagonisme

Toutes les manipulations portant sur l'étude du pouvoir antagoniste à l'égard de *Penicillium sp*, *Aspergillus niger* et *Epicoccum sp* ont été réalisées, en utilisant l'espèce *T. viride*.

On a utilisé la méthode de confrontation directe ,cette méthode appelée encore « technique des culture opposées », consiste à déposer dans des boites de Pétri contenant 15 ml de milieu PDA à 4cm l'un de l'autre, deux explants de 8 mm de diamètre provenant des cultures des champignons (pathogènes et antagoniste).

Les témoins sont représentés par des boites de Pétri contenant uniquement le champignon pathogène. L'ensemble des boites est placé a une température de 25C° et à la lumière continue comme facteur d'activation de certain enzymes. L'évolution de la croissance mycélienne est effectuée toutes les 24heures par la mesure des diamètres de la colonie mycélienne au millimètre près (Rapilly,1968) (Prescot, 1995 ; Madigan *et al.*, 1997).. Les taux d'inhibition de la croissance mycélienne exercés par *T. viride* ont été calculés selon la formule décrite par Whipps (1997) :

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

où I (%) représente inhibition moyenne de la croissance mycélienne, D_n est le diamètre moyen du champignon pathogène en présence de *T. viride* et D_o est le diamètre moyen du champignon pathogène en absence de *T.viride* (témoin).

4. Fermentation

4.1- Préparation de cultures

Afin de tester la production des substances antibactériennes de *T. viride* (métabolites secondaires), on choisi le premier milieu Malt (voire annexe1) un des meilleurs milieux (éprouver dans le développement), le pH 5,5 et le volume pris est 500ml .La quantité est répartie en 05 erlens, chacune possède 100ml, le deuxième milieu CYA (voire annexe 1) .Le pH est de 6,5 et le volume pris est 1000ml .La quantité est

répartie en 10 erlenmeyers, chacune possède 100mL. Une stérilisation par autoclavage à 120 °C pendant 20 min à pression 1,5 atm (Botton et al. 1990). (Guiraud, 1998).

L'ensemencement des deux milieux se fait par la technique des disques ou implants. A l'aide d'un emporte pièce stérile, des implants mycéliens (5 mm Ø) sont préparés sur le pourtour de colonies fongiques cultivées sur gélose de PDA dans des boîtes de Pétri (10 cm Ø) incubées 1 semaine à 25°C (les boîtes de développement). **On met quatre disques prélevés des cultures dans chaque erlenmeyer de 250mL avec une concentration sporale qui correspond à 10⁶spores/mL pour avoir une concentration élevée des métabolites secondaires ensuite l'incubation statique est faite à 25°C pendant 14 jours.**

La croissance mycélienne est évaluée après le 14^{ème} jours. Une observation de la biomasse est faite après le 3^{ème}, 7^{ème} et 14^{ème} jours d'incubation.

4.2 Détermination de la biomasse par poids sec

Pour la détermination de la biomasse par poids sec, le contenu des erlens est fragmenté et filtré par un papier filtre N° 01 de 18.5cm de Ø. Le mycélium est lavé deux fois avec de l'eau distillée, séché à 105° C, jusqu' à poids constant (voire 4.3).

4.3- Procédure d'extraction des métabolites secondaires de *Trichoderma viride* bruts (MSTVB)

Après incubation de 14 jours, on ajoute dans chaque erlenmeyer 70% du volume de cette erlenmeyer en chloroforme(CHCl₃), on met en contacte prolongé, on introduits le mélange dans une fiole conique de 500 ml pour milieu Malt et autre de 1000 ml. Chaque mélange est fragmenté et agité pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique à température 40 °C puis **filtré sur papier filtre N° 01 de 18.5cm de Ø**. Le filtrat transvasé dans une ampoule à décantation pour séparer la phase aqueuse de la phase chloroformiser, **agiter et laisser décanter puis évacuer la phase inférieure dans un bécher.**

La phase chloroformique a pour obtenir les métabolites secondaires brutes ensuite on fait évaporer le chloroforme par rotavapeur (Buch,Suisse), on pèse les résidus.

4.4- Préparation de différentes concentrations du MSTVB (dilutions)

On dissous les résidus précédentes dans un volume minimal du chloroforme (200µl), on ajouté 100ml d'eau distillée ensuite on fait évaporer le chloroforme par rotavapeur, On a fait des dilutions pour la premier concentration du CYA:(6380mg/l) et pour le Malt(4010mg/l) et on mesure par la suite les concentration :128,64,32,16,8,4,2,1,0.5, 0.25 mg/l. Les concentrations sont mesurées par la formule chimique: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

5. Antibiogramme

5.1- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

5.1.1- La technique en milieu liquide

a - Les cultures bactériennes

Cultures des souches: *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* sontensemencées en bouillon nutritif puis incubées 18 heures à 37°C.Un jour avant la préparation de l'inoculum. La concentration bactérienne estimée à 10⁸ UFC. mL⁻¹.

b - Préparation de l'inoculum

Nous avons réalisés la dilution de la culture des souches en introduisant 100 µL des cultures bactériennes fournies dans 25 mL de bouillon Mueller-Hinton (voire annexe1). La suspension obtenue est appelée "**inoculum**".

c - Les dilutions

Nous avons reportés dans une série de tubes stériles 1 mL de chaque dilution de MSTVB (concentrations précédentes tableau06, 07.), puis nous avons ajoutés dans tous les tubes le même volume d'inoculum, ensuite nous avons incubés 24 heures à la température optimale de la souche à tester. Nous avons observés les tubes après incubation .

La CMI sera la concentration en antibiotique la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. En fait, elle est comprise entre le tube correspondant à cette définition et le premier tube dans lequel une croissance est observée.

5.1.2- La technique en milieu solide gélosé

a- Préparation des disques des MSTVB à différents concentrations

On a préparé des disques en papier wattman n°04, de 5mm Ø qui sont imbibés de métabolites secondaires brutes de *T. viride* (MSTVB) à concentrations décroissantes (0.25 ; 0.50 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8) mg/l dont on veut étudier l'effet. La charge du disque est de 0.5 ml.

b-- Manipulation

On réalise à partir de l'isolement (souche pure: *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens*) un ensemencement en tapis sur un milieu gélosé de Mueller-Hinton. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue de MSTVB sont déposés à la surface de la gélose. On dispose ensuite les disques de MSTVB et on place à l'incubateur. Au bout de 24 h, on lit les différents diamètres d'inhibition.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1-Développement et caractérisation

1.1- Résultats après 6 jours

Cinq jours après sa germination, la conidie sur chaque milieu donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Les résultats de l'observation macroscopique de *T. viride* sur différents milieux à 25°C après le 6^e jour sont représentées dans le tableau ci-dessous:

Tableau 02: Etude macroscopique de *Trichoderma viride* sur différents milieux à 25°C

| Milieux | Couleurs | Aspects | pH | croissance |
|-----------------------|--|-------------------------------------|------------------------|---|
| PDA (Fig12) | Face: blanche Revers: crème | Compactées en touffes. | Initial:06 Final:08 | Colonies à croissance rapide |
| MEA (Fig 13) | Face: blanche Revers: crème | Compactées en touffes. | Initial:05 Final:06 | Colonies à croissance rapide |
| DOX (Fig14) | Face: transparente Revers: incolore | gélatineux, mycélium incolore | Initial:06 Final:09 | Colonies à croissance un peu plus lente. |
| Sabouraud (Fig 15) | Face: blanche Revers: crème | Compactées en touffes | Initial:06 Final:07 | Colonies à croissance très lente au départ. |



(Recto)

Fig 12 : Colonies de *Trichoderma viride* sur milieu PDA.

(Verso)



(Recto)

Fig 13 : Colonies de *Trichoderma viride* sur milieu MEA.

(Verso)



(Recto)

Fig 14 : Colonies de *Trichoderma viride* sur milieu Czapek DOX.

(Verso)



(Recto)

Fig 15 : Colonies de *Trichoderma viride* sur milieu Sabouraud.

(Verso)

La croissance des colonies *Trichoderma viride* sur plusieurs milieux à 25°C de températures.

1.2- Résultat plus tard

Deux jours plus tard (7 et 8^e jours), une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse. En forme de cercle les colonies sont d'aspect grumeleux, de couleur blanche et verte par endroit réparti de façon hétérogène et le revers est de couleur crème sur les quatre milieux. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^e et le 20^e jour un feutrage épais se superpose à la culture. (Fig16).

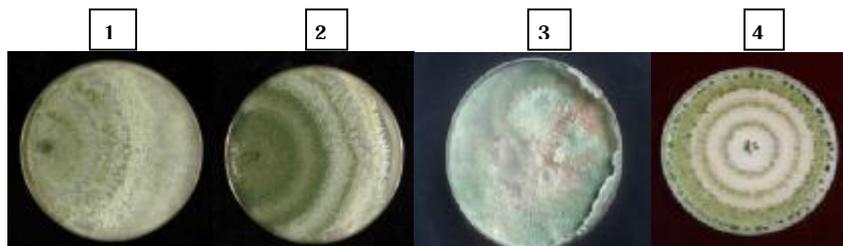


Fig 16 : Le virage de la couleur de *Trichoderma viride* sur la culture de PDA après 21 jours de croissances. :1, 2 repycage à l'extrême, 3 changement de la couleur à cause de la contamination, 4 repycage centrale

2. Etude de microscopique *T. viride*

L'étude microscopique a montré que le mycélium de *T. viride* composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (Fig 17) ont une forme conique, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Fig18)

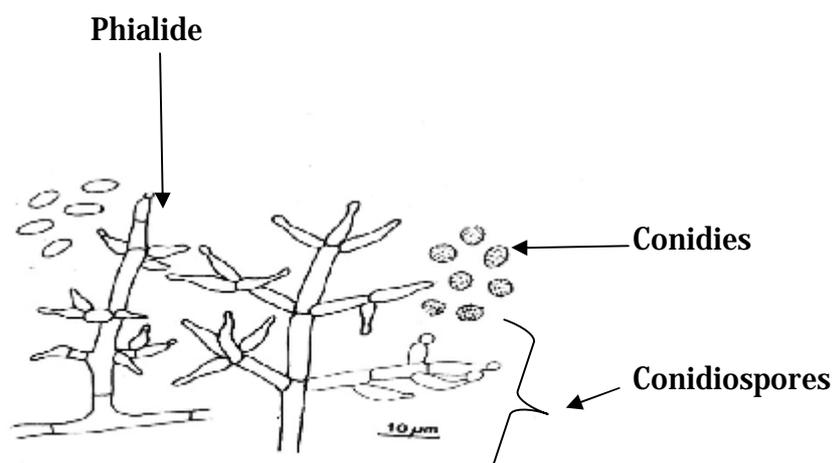


Fig17 : Schéma de l'aspect morphologique d'un conidiophores de *Trichoderma viride*.

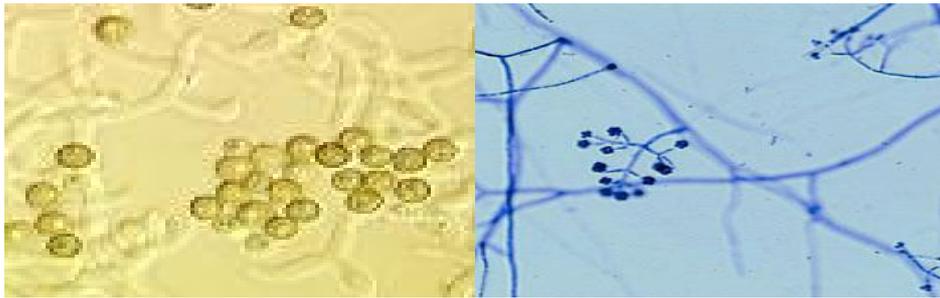


Fig 18 : Aspect morphologique de *Trichoderma viride* sous microscope optique Gr×40.

3. Effet des milieux de cultures sur la croissance de *T. viride*

Tous les milieux de culture ont permis la croissance mycélienne de *T. viride*. Après 128h d'incubation à 25°C, un tapis des colonies de *T. viride* qui envahisse toutes les boîtes uniquement sur le Sabouraud qui remplit la boîte au 6^{ème} jour.

Les milieux PDA, MEA, Czapek et Sabouraud permettent une rapidité et bonne croissance mais à divers degrés, le PDA puis MEA ensuite Czapek-DOX et enfin Sabouraud même aux différentes températures (5,25 et 30°C). Les milieux montrent une croissance variable. Le Sabouraud présente la croissance la plus lente au départ.

Le milieu de culture naturel à base de pomme, le PDA a permis une croissance rapide et bonne de *Trichoderma viride* vu les composés complexes (inconnues), les autres sont des milieux synthétiques moins favorables par rapport au naturel. Les milieux (MEA, Sabouraud et DOX) présentent une croissance moins que le PDA, mais elle a éprouvé sa grande capacité à utiliser différents substrats d'après l'étude de (Widden et Abitrol, 1980 ; Kubicek et al. 2003).

4. Effet de la température sur la croissance de *T. viride*

L'effet de la température est remarquable sur la croissance mycélienne *T. viride*, la croissance est faible à 5 et 30°C d'incubation. Par contre, elle est maximale (optimale) à 25°C pour cette espèce. On a observé une de la croissance mycélienne sur le Sabouraud à 30°C après 24h à 5°C. (Tableaux 05, 06,07)

Tableau 03: Croissance des colonies de *Trichoderma viride* sur différents milieux à 05°C (mm).

| Jours Milieux | 01 (24h) | 02 (48h) | 03 (72h) | 04 (96h) | 05 (128h) | 06 (144) |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| PDA | — | 4.5 | 10 | 14 | 15 | 17 |
| MEA | — | 03 | 08 | 11 | 14 | 15 |
| Czapek-DOX | — | 02 | 06 | 10 | 11 | 12 |
| Sbouraud | — | 01 | 04 | 06 | 08 | 10 |

Tableau 04: Croissance des colonies de *Trichoderma viride* sur différents milieux à 25°C (mm).

| Jours Milieux | 01 (24h) | 02 (48h) | 03 (72h) | 04 (96h) | 05 (128h) | 06 (144) |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| PDA | 20 | 35 | 55 | 75 | 80 | 80 |
| MEA | 15 | 25 | 40 | 60 | 80 | 80 |
| Czapek-DOX | 10 | 20 | 30 | 50 | 80 | 80 |
| Sabouraud | 05 | 10 | 25 | 45 | 65 | 80 |

Tableau 05: Croissance des colonies de *Trichoderma viride* sur différents milieux à 35°C (mm).

| Jours Milieux | 01 (24h) | 02 (48h) | 03 (72h) | 04 (96h) | 05 (128h) | 06 (144) |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| PDA | 03 | 12 | 20 | 30 | 45 | 55 |
| MEA | 02 | 10 | 15 | 25 | 35 | 45 |
| Czapek-DOX | 01 | 08 | 12 | 20 | 30 | 40 |
| Sabouraud | — | 02 | 08 | 15 | 22 | 32 |

Le choix de la température abordé concerne la recherche de la température optimale de développement du *T. viride* et de sa production de métabolites secondaires à activité antibactérienne. Les résultats obtenus montrent que la souche croît normalement dans un intervalle de température de 5 à 30°C et la meilleure croissance est atteinte lorsque, le *T. viride* est incubé à 25°C. Par ailleurs, même constatation est faite pour l'activité antibactérienne.

L'intervalle de température montre sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques par ce qu'elle est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998; Widden et Abitrol, 1980 ; Vining, 1990; Kubicek et al., 2003) des résultats qui sont confirmés par plusieurs chercheurs qui indiquent que la souche *T. viride* se développe à 25°C. Davet, (1996) a montré que chaque organisme est caractérisé par un minimum et un maximum de température au-delà desquels son développement n'est plus possible. Entre ces limites, il existe une température optimale à la quelle la croissance maximale est obtenue. Par ailleurs, la température adéquate pour la production des métabolites secondaire se trouve souvent proche de celle de la croissance .la production de métabolites secondaires sont généralement plus basses que celles de la croissance (Wineberg, 1973).

5. Le test de l'antagonisme

Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (Pathogène – Antagoniste). Après 144 heures d'incubation, une action inhibitrice exercée par *T. viride* vis à vis de la croissance mycélienne des pathogènes a été observée. Nous avons constaté l'apparition d'une zone d'inhibition suivie par un arrêt de croissance pour l'ensemble des souches du pathogène (Fig19, 20, 21,22).



Fig19 : Colonie de *Epicoccum sp* en présence de *Trichoderma viride* après 168heurs.



Fig 20 : Colonie d'*Epicoccum sp* en absence de *Trichoderma viride* après 168heurs.
A : recto.B : verso (Témoin).



Fig 21: Colonie de *Penicillium sp* après 168 heures. A : en absence de *Trichoderma viride*
B : en présence de *Trichoderma viride*.



Fig 22 : Colonie d'*Aspergillus niger* après 168 heures A : en absence de *Trichoderma viride*.
B : en présence de *Trichoderma viride*

Le calcul du taux d'inhibition confirme ces résultats. Toutes les souches du pathogène sont inhibées à plus de 50% et ce quelque soit l'antagoniste utilisé. La souche A2 se montre la plus sensible avec un taux d'inhibition de 59,28%. (Tableau 08)

Tableau 06: Effets inhibiteurs de *Trichoderma viride* sur la croissance mycélienne (mm) et taux d'inhibition des souches de *Penicillium sp*, *Aspergillus niger* et *Epicoccum sp*

| Confrontations | Période d'incubation (heures) | | | | | | | Taux d'inhibition |
|----------------|-------------------------------|-----|-------|------|------|------|-------|-------------------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 | 168 | |
| A1 TV | 2.0 | 4.5 | 6.25 | 8.55 | 11 | 14 | 14 | 56,92% |
| Témoin | 2.4 | 5.6 | 11.25 | 16.5 | 22.5 | 26.5 | 32.5 | |
| A2 TV | 1.4 | 4.4 | 6.8 | 7.2 | 8.6 | 10.3 | 10.3 | 59,28% |
| Témoin | 1.5 | 4.4 | 10.6 | 16 | 19.6 | 23.5 | 25.3 | |
| A3 TV | 1.4 | 2.8 | 5.8 | 10.3 | 18.2 | 22.5 | 22.5 | 55,48 % |
| Témoin | 1.5 | 4.4 | 11.6 | 24.5 | 32.1 | 42.2 | 50.55 | |

A1=*Aspergillus niger* A2=*Penicillium sp* A3=*Epicoccum sp* Témoin : en absence de *Trichoderma viride*.

Les *Trichoderma* sont connus de longue date pour leurs activités antagonistes à l'égard de nombreux champignons, *Botrytis cinerea* (DUBORDIEU, 1983) *Armilaria obscura* et *Armilaria mellea* (Lanusse et al., 1983) ; *Rosellina nectarix* et *Phomopsis viticola* (Besselat, 1985) ; *Phytophthora citrophthora* et *Phytophthora parasitica* (Chet, 1984) . Dennis et Webster (1971) mettent en évidence des antibiotiques secrété par les *Trichoderma*, solubles dans le chloroforme et extractibles à partir du milieu de culture.

D'après Comporata (1985), cette interprétation favorise l'action des enzymes (β 1-3) gluconase- chitinase qui conduisent à la lyse du mycélium du parasite. Vue les résultats obtenus et le taux d'inhibition , nous pensons qu'en plus de l'action des antibiotiques, la vitesse de croissance de *T. viride* importante, elle se développe plus rapidement par rapport à A1,A2,A3 en colonisant le milieu nutritif et en ravissant les éléments nutritifs, c'est le phénomène de compétition (Alabouvette et al., 1983 ; Dubot, 1985 ; Davet, 1996). C'est un envahissement de *T. viride* sur

l'agent pathogène et une sporulation très abondante de l'agent de lutte biologique sur ces derniers. L'envahissement de *Trichoderma* est généralement direct et intense.

Des cas d'enroulement et de pénétration de *Trichoderma* contre *Rhizoctonia*, les *Alternaria*, *Botryosporium*, *Sclerotinia* et *Cladosporium* ont été observés au microscope optique. L'affaissement des hyphes a même été noté dans certains de ces systèmes.

6. Détermination de la biomasse par poids sec

On observe en CYA au départ une formation des anneaux transparents (3jours), ensuite après 7jours, sont devenus blanc, épais, puis jaune-blanc à la fin de la fermentation (14jours) bien définie et attaché (Fig 23).



Fig 23 : La meilleure croissance en milieu CYA.

Une bonne croissance est observée pour les concentrations de l'extrait de levure suivantes: 1.5, 2.5, 3.5 % et mois pour : 0 et 5% sur le CYA (Fig24). Une très bonne croissance sur le Malt pour 1.5, 2.5, 3.5 % et mois pour : 0 et 5%.



Fig 24 : La croissance en milieu liquide pour différentes concentrations de l'extrait de levure. Sur le Malt la croissance au départ par la formation des amas blancs, **compactés en touffes**, formant un anneau irrégulier dans chaque erlenmeyer, après 7 jours, l'anneau occupe toute la surface et devient vert (conidies) puis la couleur devient plus foncée avec le temps (vert foncé) avec certain couleur vert-bleu après 14 jours. (Fig 25).



Fig 25: La biomasse de *T. viride* en milieu Malt pour différentes concentrations de l'extrait de levures.

Une très bonne croissance de la biomasse sur le Malt de 4.42g par 500ml avec 6g par 1000ml sur CYA, qui représente la moitié de la quantité par rapport au CYA.

Le poids sec de la biomasse issue des milieux de fermentations de *T. viride* représente la bonne croissance de la souche sur les deux milieux (Tableau09).

Tableau 07: Le poids sec de la biomasse issue du fermentations de *T. viride*

| Heurs (g) H) Biomasses | 03H | 24H | 48H | 72H |
|---|-------|-------|-------|-------|
| Malt (500ml) | 15.30 | 04.45 | 04.42 | 04.42 |
| CYA (1000ml) | 11.60 | 07.03 | 06.00 | 06.00 |

La croissance rapide de la biomasse qui été observée sur le Malt et le CYA est due à la présence des sources de carbone (extrait de Malt et extrait de levure) et d'énergies (glucose ,saccharose) et l'extrait de levure aussi comme source d'oligoéléments et vitamines adéquate dans les milieux de fermentation .Selon Chater et Bibb, (1997) , Marwick *et al.*, 1999 ; Voelker and Altaba (2001), les substrats rapidement assimilables comme le saccharose et le glucose provoquent une augmentation de taux de croissance. Le Malt est le meilleur pour la production de la biomasse à cause de sa richesse par deux sources de carbone, l'extrait de Malt et l'extrait de levure par rapport au CYA qui est riche en minéraux et le NaNO₃ comme source d'azote.

La couleur de la biomasse dans chaque milieu représente les pigments des conidies se qui montre que le Malt favorise la croissance des conidies de couleur vert et le CYA les conidies incolore.

7. Détermination des métabolites secondaires de *T.viride* bruts (MSTVB)

La filtration de la biomasse du milieu CYA de la fermentation a donné une phase chloroformique claire et transparente, et celui du milieu Malt a donné une phase chloroformique de couleur jaune sans trouble (Fig 26). La couleur jaune résulte de la présence de pigment jaune.



Fig26: La phase chloroformique en milieu Malt

Le poids sec des métabolites secondaires bruts issu du milieu CYA a été de 638mg/l et du Malt été de 410mg/l (Tableau 10).

Tableau 08: Le poids des métabolites secondaires de *T. viride* bruts (MSTVB).

| <i>Milieus</i> | <i>MALT (500ml)</i> | <i>CYA (1000ml)</i> |
|----------------|---------------------|---------------------|
| <i>Poids</i> | | |
| <i>M (mg)</i> | 401 | 638 |

8. Effets des MSTVB sur les souches bactériennes (CMI)

8.2 Effet en milieu liquide

Comme la CMI sera la concentration en antibiotique la plus faible pour laquelle il n'y a pas de croissance visible. En fait, elle est comprise entre le tube correspondant à cette définition et le premier tube dans lequel une croissance est observée .

Pour *Serratia marcescens* sera évaluée par le tube n°9 (32mg/l) sur Malt et le tube n°8(16mg/l) et sur CYA. (Tableau 12,13).

Pour *Proteus mirabilis* sera évaluée par le tube n°10 (64mg/l) sur Malt et le tube n°9(32mg/l) et sur CYA. (Tableaux 14,15).

Tableau 09 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de *Serratia marcescens* sur Malt par macro méthode en milieu liquide.

| Numéro des tubes : | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|--|---|---|---|---|
| Concentration finale en MSTVB (mg/l) | Témoin | 0.25 | 0.50 | 01 | 02 | 04 | 08 | 16 | 32 | 64 |
| Aspect des tubes : |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Importance du trouble (-, +, ++) | +++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | — | — |

Tableau 10 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de *Serratia marcescens* sur CYA par macro méthode en milieu liquide.

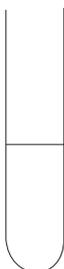
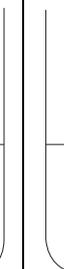
| Numéro des tubes : | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---|--|---|---|---|---|
| Concentration finale en MSTVB (mg/l) | Témoin | 0.25 | 0.50 | 01 | 02 | 04 | 08 | 16 | 32 | 64 | 128 |
| Aspect des tubes : |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Importance du trouble (-, +, ++) | +++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | — | — | — | — |

Tableau11 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de *Proteus mirabilis* sur Malt par macro méthode en milieu liquide.

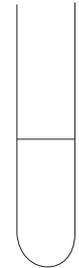
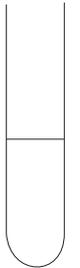
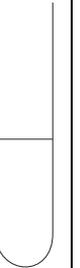
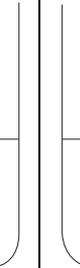
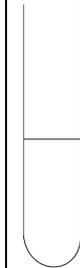
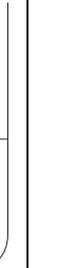
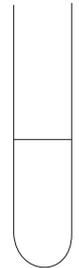
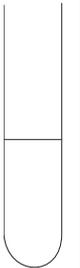
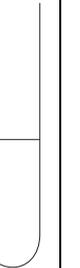
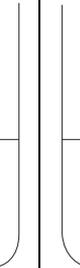
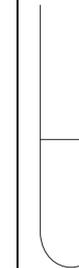
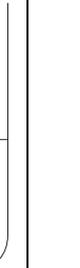
| Numéro des tubes : | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentration finale en MSTVB (mg/l) | Témoin | 0.25 | 0.50 | 01 | 02 | 04 | 08 | 16 | 32 | 64 | 128 |
| Aspect des tubes : |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Importance du trouble (-, +, ++) | +++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | + | — | — |

Tableau 12 : Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) *Proteus mirabilis* sur CYA par macro méthode en milieu liquide.

| Numéro des tubes : | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentration finale en MSTVB (mg/l) | Témoin | 0.25 | 0.50 | 01 | 02 | 04 | 08 | 16 | 32 | 64 | 128 |
| Aspect des tubes : |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Importance du trouble (-, ++, +) | +++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + | — | — | — |

8.1 Effet en milieu solide

Les MSTVB diffuse à partir des disques en créant un gradient de concentration. La zone d'inhibition est croissante en parallèle avec la différente concentration des MSTVB pour les deux souches bactériennes.

La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice.

Les caractères de sensibilité ou de résistance des souches bactériennes sont déduits par les résultats qui montrent que *Serratia marcescens* est plus sensible que *Proteu mirabilis* pour les deux milieux Malt et CYA avec des différences dans la zone d'inhibition de 1,1 mm pour le Malt et 0,05mm pour le CYA. *Proteu mirabilis* est plus résistante que *Serratia marcescens* .

L'intervalle de la zone d'inhibition sur *Serratia marcescens* est de [7.50-8.30mm] pour le Malt et de [8.50-8.95mm] pour le CYA.

L'intervalle de la zone d'inhibition sur *Proteu mirabilis* est de [6.00-7.20mm] pour le Malt et de [8.50-8.90mm] pour le CYA. (Tableau 11) (Fig27, 28,29).

Tableau13: Effet de la sensibilité des souches bactériennes au MSTVB à différents concentrations.

| [] | 0.25 (mg/l) | 0.50 (mg/l) | 01 (mg/l) | 02 (mg/l) | 04 (mg/l) | 08 (mg/l) | Milieux de l'extraction |
|--------------------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------------------|
| <i>Serratia marcescens</i> | 7.50 | 7.80 | 8.05 | 8.10 | 8.20 | 8.30 | Malt |
| | 8.50 | 8.60 | 8.70 | 8.80 | 8.90 | 8.95 | CYA |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 6.00 | 6.50 | 6.90 | 7.00 | 7.10 | 7.20 | Malt |
| | 8.50 | 8.60 | 8.70 | 8.80 | 8.85 | 8.90 | CYA |



Fig 27 : Effet des MDTVb extrait du milieu Malt sur *Serratia marcescens*; (A): (0,25 ; 0,5 ; 1) mg/l et (B): (2 ; 4 ; 8) mg/l.



Fig 28 : Effet des MDTVb extrait du milieu CYA sur *Serratia marcescens*.

(A): (0,25 ; 0,5 ; 1) mg/l et(B): (2 ; 4 ; 8) mg/l.

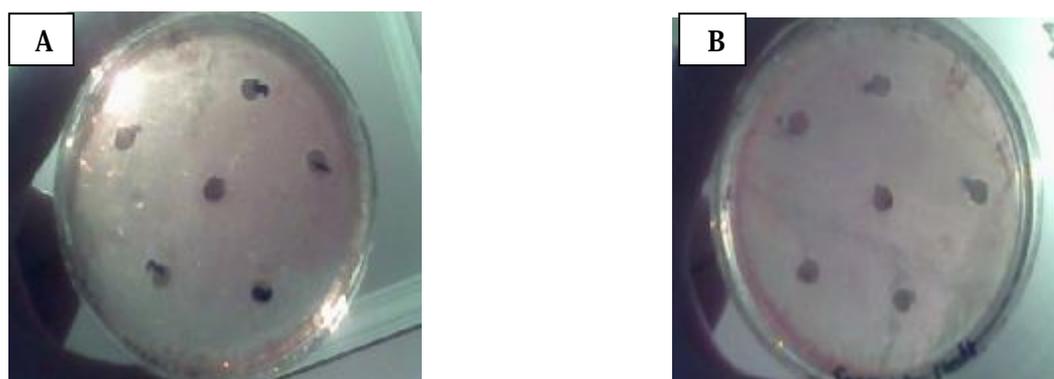


Fig 29 : Effet des MDTVb sur *Proteus mirabilis* à différentes concentrations (0.25 ; 0.5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8) mg/l. (A): extrait du CYA;(B): extrait du Malt.

L'étude de l'effet des métabolites secondaires bruts de *T. viride* a donné des résultats positifs sur la sensibilité des souches bactériennes *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens*. La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma sp.* a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934), concernant un antifongique (Papavizas, 1985).

Par ailleurs, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino et al., 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990).

En outre, la littérature cite que les métabolites importants de *Trichoderma sp.* sont principalement des enzymes et des molécules bioactives métabolites non volatils diffusibles: polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines (Blumenthal, 2004). Leur production dépend de conditions environnementales régissant des facteurs intrinsèques et extrinsèques (composition des substrats naturels, température, pH, taux d'O₂ et de CO₂, compétitivité microbienne...) (Frisvad et Samsom, 1991) donc ces informations peuvent être des explications pour la différence de la CMI trouvée pour les deux milieux et les deux souches bactériennes.

Dans certaines conditions, leur production est décisive pour l'existence des organismes producteurs, inhibant le métabolisme primaire d'autres espèces compétitives et antagonistes (animales, végétales ou microbiennes) dans leur écosystème afin d'y conforter leur présence (Frisvad, 1990 ; Demain & Fang, 2000 ; Miller, 2000) ce qui explique les résultats positifs trouvés sur la sensibilité des souches bactériennes.

En milieu liquide (tubes) la CMI est évaluée pour les concentrations des MSTVB plus élevées qui s'explique par la faible dose des antibiotiques présente dans chaque concentration puisque les métabolites utilisés sont bruts non séparés donc la pureté des substances est nécessaire pour un bon effet donc pour un bon antibiogramme.

Conclusion générale

Le travail présenté dans cette étude consiste à montrer les meilleurs milieux solides de développement du *Trichoderma viride*, on se basant sur la croissance mycélienne.

Trichoderma viride se développe rapidement sur milieu solide PDA puis MEA ensuite Czapek- Dox, et le Sabouraud représente la vitesse de la croissance la plus lente au départ, si non les quatre milieux sont adéquats pour cette espèce.

Les résultats obtenus montrent que la souche croît normalement dans un intervalle de température de 5 à 30°C et la meilleure croissance est atteinte lorsque, le *T.viride* est incubé à 25°C.

La colonie apparaît d'abord blanche quand elle occupe toute la boîte puis vert clair qui devient foncé plus en plus avec le temps sur tous les milieux solides sauf le DOX où la croissance est uniquement celle du mycélium mais avec le temps, il y a une apparition des spores vertes qui se répartissent par endroit.

L'étude microscopique a permis d'observer un thalle septé à croissance apicale rapide, pourvu d'une paroi épaisse. Les conidies sont très abondantes, de couleur verte s'organisent en longues chaînes ramifiées sur des conidiophores.

La production des métabolites secondaires (substances antibactériennes) par *T. viride* est étudiée par son ensemencement sur les deux milieux de fermentation Malt et CYA liquides contenant des concentrations progressives de l'extrait de levure allant de 0 jusqu'à 5g/L, on montre que le Malt est le meilleur pour la croissance puis le CYA. Cette fermentation a permis de sélectionner l'extrait de levure (1.5, 2.5 et 3.5g/l) comme meilleures concentrations permettant une bonne croissance de la biomasse.

L'extraction des métabolites secondaires après 14 jours de fermentation à 25°C et à effet antibactérien est basée sur le chloroforme comme solvant adéquat par les résultats positifs obtenus.

Le test de ces métabolites sur *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* a montré une certaine sensibilité contre ces métabolites excrétés par *T. viride*.

La méthode des antibiogrammes des MSTVB, qui consiste à rechercher l'activité antibactérienne sur le développement des bactéries test : *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* a révélé que *T. viride* a manifesté un effet antibactérien considérable. Le milieu CYA est le meilleur pour la sécrétion des substances antibactériennes au point de vue effet.

La confrontation directe de *T. viride* avec les trois espèces *Penicillium sp*, *Aspergillus niger* et *Epicoccum sp* se traduit par un arrêt à distance de la croissance mycélienne du pathogène et la formation d'une zone d'inhibition entre les deux colonies confrontées.

A l'instar de ces résultats, nous pensons que *T. viride* possède une aptitude pour éliminer les trois espèces.

PERSPECTIVES

Au terme de cette étude, il serait peut être intéressant de :

- ✓ Envisager, d'étendre l'expérimentation in situ la souche *T. viride* avec d'autres espèces phytopathogènes sur des plants économiquement importante a notre pays.
- ✓ Tester l'effet in vivo la souche *T. viride* sur la croissance des souches *Penicillium sp*, *Aspergillus niger* et *Epicoccum sp* et qui peut donc avoir des intérêts pratiques en lutte biologique contre les effets néfastes des espèces pathogènes présenter dans se travail .
- ✓ Chercher a séparé des métabolites primaires intéressants.
- ✓ Envisager des techniques de séparation les résidus des MSTVB afin de tester chacun sur des bactéries pathogènes.
- ✓ Identification et caractérisation des métabolites secondaires par HPLC.

الملخص

يعد فطر *Trichoderma viride* وحدة أساسية في الدراسات المخبرية للكائنات الدقيقة خصوصا علم الفطريات ويعود سبب ذلك إلى اتساع انتشاره في أقاليم مختلفة و على أوساط متنوعة وكذا سرعة نموه تأقلمه. كما ابرز قدرته على منافسة العديد من الكائنات الدقيقة و تطفله والذي استغل كوسيلة للمحاربة البيولوجية وتحسين الإنتاج النباتي نظرا لعدم بروز أخطار ناجمة عن استخدامه.

اظهر هذا البحث قدرة فطر *T. viride* على النمو في أوساط صلبة مختلفة وفقا للنتائج المحصل عليها على درجة حرارة 25°C خلال 24 سا PDA, MEA, DOX, Sabouraud, 10, 12, 09, 02 ملم حسب متوسط قطر كل مستعمرة على الترتيب.

من خلال هذه الدراسة نثبت أن أحسن البيئات الصلبة للنمو كانت PDA ثم Malt أما DOX فهو وسط يعطي فرصة لنمو الميسيليوم فقط وبعد مرور مدة تظهر الكونيديات بلون اخضر تزداد قنامة مع الوقت في حين إن Sabouraud كان مناسباً إلا إن سرعة النمو في بدايتها كانت بطيئة.

أظهرت تجارب التضاد المجرات على كل من *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Epicoccum sp* من طرف الفطر المضاد *T. viride* نتائج جد ايجابية مبينة القدرة العالية لهذا الفطر على التنافس بنسبة تفوق 50%.

إن الدراسة المجهرية و المظهرية لفطر *T. viride* تظهر انه ذو سرعة في النمو على وسط PDA على شكل هيفات كثيفة مقسمة ذات لون ابيض يصبح مع الوقت بلون اخضر.

أما المنتجات الايضية الثانوية المستخلصة من الوسطين التخمرين CYA و Malt اللذان كانا مناسبين نظرا لكمية المادة الحيوية المنتجة المعتمدة فقد تم اختبار هذه المنتجات على بكتيريا *Serratia marscecens* و *Proteus mirabilis* و أعطت نتائج ايجابية مع التراكيز العالية كما أن *Serratia* كانت أكثر حساسية مقارنة مع *Proteus* و تلك المستخلصة من CYA كانت أكثر تأثيرا بالنسبة للمستخلصة من Malt .

الكلمات المفتاحية : فطر *Trichoderma viride*, مستقلبات الايضية الثانوية, *Antibiogramme*, *CMI*.

Résumé

Cette étude a révélé que les milieux solides PDA, MEA, DOX, Sabouraud suivant cet ordre sont adéquats à la croissance de *Trichoderma viride* selon les diamètres des colonies par ordre: 12, 10,09,02(mm) pendant 24h à 25°C. Le PDA est le meilleur. Le milieu DOX favorise la croissance du mycélium et par le temps la couleur verte des conidies apparaît. Le Sabouraud représente la croissance la plus lente au départ. *T. viride* se développe à 5°C et 30°C avec une température optimale de 25°C.

L'étude macroscopique et microscopique a montré que *T. viride* se développe rapidement sur milieu PDA sous forme de filaments denses et septés développant une couleur blanche qui se transforme en couleur vert foncé avec le temps.

Le test d'antagonisme de *T. viride* contre : *Epicoccum sp*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, éprouve son pouvoir antagoniste (le phénomène de compétition) par un taux d'inhibition plus de 50% pour chaque test.

La recherche des meilleurs milieux de fermentation pour la production de la biomasse et les métabolites secondaires par *T. viride* a révélé que le milieu Malt liquide contenant 2.5 et 3.5 g/L d'extrait de levure, permet à la souche d'atteindre sa production de biomasse par rapport au CYA, qui permet à la souche de sécréter des substances antibactériennes d'effet plus important que celui du Malt, après 14 jours d'incubation statique.

Le test d'antibiogramme (activité antibactérienne) des métabolites secondaires bruts de *T. viride* sur les bactéries test : *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* a révélé que *T. viride* développe une activité antibactérienne considérable avec les grandes concentrations, dont *Serratia marcescens* est plus sensible et *Proteus mirabilis* est plus résistante.

Pour *Serratia marcescens* la CMI est évaluée par 32mg/l sur Malt et par 16mg/l sur CYA.

Pour *Proteus mirabilis* la CMI est évaluée par 64mg/l sur Malt et par 32mg/l sur CYA.

Mots clés : *Trichoderma viride*, métabolites secondaires brutes, CMI, antibiogramme, antagonisme.

Summary

This study showed that solid media PDA, MEA, DOX Sabouraud that order are adequate to the growth of *Trichoderma viride* by the diameters of colonies per order: 12mm, 10mm, 09mm, 02mm for 24 h at 25 ° C. The PDA was the best. The middle DOX promotes growth of mycelium and by the time the green color of conidia appear.

The Sabouraud represents the slowest growth at the start. *T. viride* grows at 5 ° C and 30 ° C with an optimum temperature of 25 ° C.

The test of antagonism of *T. viride* against: *Epicoccum sp*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, feels his power antagonist (the phenomenon of competition) by a rate of more than 50% inhibition for each test. The macroscopic and microscopic study showed that *T. viride* grows rapidly on PDA in the form of dense filaments septate developing a white color that turns dark green with time.

The search for the best fermentation media for production of biomass and secondary metabolites of *T. viride* revealed that the middle Malt liquid containing 2.5 and 3.5 g / L yeast extract, allowing the strain to reach its production of biomass from the CYA, which allows the strain to secrete antibacterial substances effect more important than the Malt, after 14 days of static incubation.

The susceptibility testing (antibacterial activity) gross secondary metabolites of *T. viride* on test bacteria *Proteus mirabilis* and *Serratia marscecens* revealed that *T. viride* develops a considerable antibacterial activity with high concentrations, which is more sensitive *marscecens Serratia* and *Proteus mirabilis* was more resistant.

Key words: *Trichoderma viride* secondary metabolites, CMI, antibiogramme, antagonisme.

Références bibliographiques

1-Ahmed, I., Bissett, J. & Malloch, D. 1995. Effect of phosphinothricin on nitrogen metabolism of *Trichoderma* species and its implications for their control of phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol*, 53 : 49-59

2-Alabouvette C., Couteaudier Y. et Iouvet J. 1983. Importance des phénomènes de compétition nutritive dans l'antagonisme entre microorganismes, pp 7-16. XXIV. Colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).

3-Alonso Fernandez R, Baquero Mochales F. Apr. 1994. The genus *Serratia*: its biology, clinical effects and epidemiology. *Rev. Clin. Esp.* ;N°194Vol:4:294-

4-Alspaught J.A., Perfect J.R and Hatman j. 1997. *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G- protein Alpha subunit GPAI and Camp. *Genes.Dev.*11 :3206-3217.

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

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

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

8-Bissett, J. 2004. Commentaires de l'adresse internet suivante : http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html.

9-Botton ;Breton,A ;Fevre,M ;Guy,PH ;Larpeni,J ;P ;Veau.1990 . Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle.2°Edition Massan,Paris,New york, Million, Barcelone, Mexico,Saopawlo.

10-Calvo A, Guarro J, Suarez G, Ramirez C. 1980. Air-borne fungi in the air of Barcelona (Spain). III. The genus *Aspergillus* Link. *Mycopathologia* 71 (1), 41-43.

11-Calvo A.M., Gardner H., Wand Keller N.P. 2001. Genitic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. biol. Chem.* 276 : 20766-20774.

12-Calvo A.M., Wilson R.A., Bock J.W and Keller N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* 66 : 447-459.

13-Champ S.P., Raw P. and Chang A . 1987. An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans* .. *J. Gen. Microbiol.* 133 : 1383- 1388

14-Champe S.P and El-Zayat A.A.E. 1989. Isolation of sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacterial* . 171 : 3982-3988.

15-Chater K and Bibb M. 1997. Regulation of bacterial antibiotic production, Klein Kauf AND H. Vandhoven edn. INK.

16-Carrero P., Garrote J.A., Pacheco S. Feb. 1995. Report of six cases of human infection by *Serratia plymuthica*. *J Clin Microbiol.* ;N°33(2):275-6.

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

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

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

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

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

22-Davet P. B. 1983 Introduction et conservation de *Trichoderma* dans le sol. Les antagonistes microbiens, mode d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes, pp. 159-168. ACTA, INRA- ENSAM- Montpellier (FR).

23-Davet P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale, 383 p. INRA, Paris (FR).

24-Davet P. and Rouxel F. 1997. Detection et isolation des champignons du sol , (edn) INRA .Paris.

25-Demain A and Fang A. 2000. The natural functions of secondary metabolites .*Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **69** : 1-39.

26-Denis C. and Webster I. 1971. « Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* (II) production of volatile antibiotic. *Trans. Br. Mycology. Soc.* **57**,41-48

27-Domsch k.H., Gams W., Anderson T.H. 1993. Compendium of soil Fungi, volume I and II, IHW - Verlag. Eching.

28-Dubos B. 1985. L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens: *Chondrostereum purpureum* (Pers. Ex. fr.) pouzar (plomb des arbres fruitiers) et *Botritis cinerea* pers. (pourriture grise de la vigne. L'emploi des ennemis naturels dans la protection des cultures, pp 35-49. INRA, Paris (FR).

29-Dubourdiou D. 1983. Dégradation du glucane de *Botrytis cinerea* par les β 13 glucanase de *Trichoderma sp.*, pp 35-49. XXIV colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).

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

- 31-Euzéby J.P.2007** .Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale
- 32-Flieder F. 1994.** Recherches sur l'effet du Rayonnement gamma pour la désinfection des papiers. Actes des 2 èmes journées internationales d'études de l'ARSAG. Environnement et conservation de l'écrit, de l'image et du son. PARIS. p 79-86
- 33-Frisvad, J.C. , 1990** Mycotoxigenic moulds.The international mycological congress (4 ; 1990 ; Regensburg)Regensburg (Germany) : international mycological association. IIE-230-/1
- 34-Gams, W. and Bissett J. 1998.** Morphology and identification of *Trichoderma* sp. *Trichoderma* & *Gliocladium*, Volume1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. :<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/Genusoverview.cfm>).
- 35-Gutierrez, A. ; Florencio, R. ; Ezpeleta, C. ; Cisterna, R. and Martinez, M. 1995.** *Trichoderma pseudokoningii* as a cause of fatal infection in a bone marrow transplant recipient. Clin. Infect. Dis, 20 : 1063-1064
- 36-Harman, G.E. 2006.** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* Phytopathology 96 : 190-194.
- 37-Hayyan I. A., Mohammad B., Aidil A. H. and Wan M.2009.** Optimizing of *Trichoderma viride* Cultivation in Submerged State Fermentation, School of BioSciences and BioTechnology, Faculty Science and Technology, University Kebangsaan Malaysia, UKM Bangi, Selangor, Malaysia -American Journal of Applied Sciences 6 (7): 1277-1281, ISSN 1546-9239© 2009 Science Publications.
- 38-Hapwood D.A. 1988.** Toward's and under standing of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. Proc. .R. .Soc.Land B. 235: 121-138.
- 39-Jean-François T. 2007.** Protocole de réalisation d'un antibiogramme par espace collaboratif en biotechnologies Informations et Ressources Numériques en Biochimie

Génie Biologique.

40-Johanne C. 2002. phytopathologiste Horti-Protection inc. conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi

41-Kawamura C., Tsujimoto T. and Tsug T. 1999. Targeted disruption of melanin biosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the japonese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 12: 59- 63.

42-Kubicek, C.P. ; Bissett, J. ; Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C. and Szakacs, G., 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma sp.*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet. Biology*, 38 (3) : 310-319

43-Landreau, A. 2001. Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Th. : Pharmacie : Nantes : 201 p.

44-Landreau, A. ; Pouchus, Y.F. ; Sallenave-Namont, C. ; Biard, J.-F. ; Boumard, M.C. ; Robiou DU pont, T. ; Mondeguer, F. ; Goulard, C. And Verbist, J.-F. 2002. Combined use of LC/MS and a biological test for a rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. *J. Microbiol. Meth.*, 48 (2-3) : 181-194 .

45-Lanusse M., Lung-escarmant B., Dubot B. et Taris B. 1983. Etude in-vitro des propriétés antagonistes de 8 espèces de *Trichoderma* à l'égard de deux souches d'*Armillaria mellea* , pp 179-192. XXIV colloque de la société Française de phytopathologie, n°34, Bordeaux (FR).

46-Lepoivre P. et Semal J. 1988. La lutte biologique en phytopathologie. Traité de pathologie végétal, pp 465-487. presse agronomique de Gembloux, Bruxelles (Belgique)

- 47-Leuchtman, A. ; Petrini, O. & Samuels, G. 1996.** Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia*, 88 (3) : 384-394
- 48-Lillard-Roberts, S. 2004.** *Trichoderma harzianum*. Mold-Help [en ligne]. [consulté le 21 octobre 2004]. Disponible sur : <http://mold-help.org/content/view/431/>
- 49-Londres : Kubicek, C.P. ; Harman, G.E. & Ondik, K.L.,** CRC Press, pp. 3-34,300.
- 50-Madigan M.T., Matinko J.M and Parker J. 1997.** Brok biology of microorganisms, 8 th edn. USA
- 51-Mapleston R.A., Stone H.G. and Williams P.H. 1992.** The evolutionary rol of secondary metabolite.A *REVIEW.Gen.* **115**:151-157.
- 52-Marwick J.D., Wight P.C. and Burgess J.G. 1999.** Bioprocess identification for production of novel marine bacterial antibiotics .Through bioreactor operation and design. *Mar. Biotechnol.* **12**: 495-507.
- 53-Maslouhi A. 1989.** Contribution à l'étude in vitro des antagonistes de *Fusarium oxysporum*, *F.sp Albedinis*, agent causal du Bayoud, pp 4-8. Thèse de doctorat. INA, Marrakech (Maroc) .
- 54-Mazure P., Nakanishi K., El-Zayat A.A.E. and Champ S.P. 1991.** Structure and synthesis of sporogenic psifactors from *Aspergillus nidulans* .*J. Chem.Soc. Chem. Commun* . 20: 1486- 1487.
- 56-Miller, S.L. 1994.** Functional diversity in fungi. *Can. J. Bot*, 73 (Suppl. 1) : S50-S57
- 57-Mohamed-benkada Mustapha. 2006.** Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Th. : Pharmacie : Nantes : 9,10,11,12,13,p.
- 58-Mohammad Bin Osman. 2009.**School of BioSciences and BioTechnology, Faculty Science and Technology, University Kebangsaan Malaysia, UKM Bangi,

Selangor, Malaysia -American Journal of Applied Sciences 6 (7): 1277-1281, ISSN 1546-9239© 2009 Science Publications

59-Mlynarczyk A, Mlynarczyk G and Pupek J. 2007. *Serratia marcescens* isolated in 2005 from clinical specimens from patients with diminished immunity. *Transplant Proc.* ;39(9):2879-82

60-Munoz, F.M. ; Demmler, G.J. ; Travis, W.R. ; Ogden, A.K. ; Rossmann, S.M. and Rinaldi, M.G. 1997. *Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia. *J. Clin. Microbiol*, 35 (2) : 499-503

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

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

63-Pitt J.I. (1979) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic press, London, New-York, Toronto, Sydney, San Francisco.

64-Pitt JI, Hocking AD (1999) *Fungi and food spoilage*. Second edition. A Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, 385-388.

65-Pivkin, M. V. 2000 Filamentous fungi associated with holoturians from the Sea of Japan, off the Primorye coast of Russia. *Biol. Bull.*, 198 (1) : 101-109

66-Prescott., Harly., Klein. 1995. *Microbiologie*. 2th ed. Debroeck-wesmael.

67-Ragnaud, J.M. ; Marceau, C.; Roche-Bezian, M.C. & Wone, C. 1984 Infection péritonéale à *Trichoderma koningii* sur dialyse péritonéale continue ambulatoire. *Med. Maladies Infect*, N° 7-8 : 402-405

68-Rapilly F., 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyt.*, 101 p. Bruxelles.

69-Rifai, M.A.m1969.A revision of the genus *Trichoderma*.Mycologia.Papers, 116 :1-56

70-Rifai,2004. Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* .Paris.pp55-56-58.

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

72-Rouessac, F. & Rouessac, A., 1996 Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes. 3ème édition Paris: Masson, pp. 263-300, 372 p.

73-SamuelS, G. J.; Petrini, O. & Manguin, S. Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia*, 1994, 86: 421-435

74-Sandgren, M.; Stahlberg, J. & Mitchinson, C. ., 2005

Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Biophys. Mol. Bio*, 89 : 246-291

75-Seguin, P. ; Degeilh, B. ; Grulois, I. ; Gacouin, A. ; Maugendre, S., DUFOUR, T. ; Dupont, B. & Camus, C. , 1995 Successful treatment of a brain abscess due to *Trichoderma longibrachiatum* after surgical resection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 14 : 445-448.

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

78-Subramanian CV (1983) Hyphomycetes : Taxonomy and Biology. Academic Press Inc., p. 179, 312, 356, 358-370, 381, 387-391, 398-400, 406-409.

79-Sugiyama, J. , 1987 Pleomorphic fungi: the diversity and its taxonomic implications. Tokyo: Elsevier, pp. 29-56, 325 p.

80-Tanis, B.C. ; Van Der Pijl, H. ; Van Ogtrop, M.L. ; Kibbelaar, R.E. & Chang, P.C. ., 1995 Fatal fungal peritonitis by *Trichoderma longibrachiatum* complicating peritoneal dialysis. *Nephrol. Dial. Transpl.*, 10 (1) : 114-116

81-Taylor and francis 1998 Bristol basic biology,taxonomy and genetics .*Trichoderma and Gliocladium.* london(UK)(USA). vol1.pp:350, 356, 358-370, 381, 387-391

82-Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.l. (2003). *Introduction à la microbiologie* , (edn) ISBN.Canada.

83-Trail F., Mahinti N. and Linz J.(1995). Molecular biology of aflatoxine biosynthesis. *Microbiology.* 141: 755-765.

84-Vining, L.C. 1990. Fonctions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44 : 395-427.

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

86-Voelker F. and Altaba S. (2001). Nitrogen source governs the patterns of growth and
pristinomycin production in *Streptomyces pristinaspirales*. *Microbiology.* 147: 2447-2459.

87-Voet, D. & Voet, J.G.,1998 ,Biochimie,Paris

Paris, Bruxelles : DeBoeck Université, pp. 56-69, 1360 .

88-Whipps, J. M. 1997.Development in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26, 1-134.

90-Widden, P. & Abitbol, J.J. 1980, Seasonality of *Trichoderma* species in a spruce-forest soil. *Mycologia*, 72 : 775-784.

91-Wineberg E.d. Secondary metabolism: control by temperature and inorganic phosphaté. *Dev.Ind.Microbiol.* **6**:70-81.

Annexe 1**Composition des milieux de cultures****Ø Bouillon Mueller-Hinton :**

| | |
|------------------------|-------|
| - Macération de viande | 300ml |
| - Peptones de caséine | 17,5g |
| - Amidon | 1,5g |
| - Ph | 7,4 |

Ø Bouillon nutritif :

| | |
|---------------------|--------|
| - Peptone | 15g |
| - Extrait de levure | 5g |
| - Na Cl | 5g |
| - Eau distillée | 1000ml |
| - Ph | 7,4 |

Ø PDA (Potatoes Dextrose Agar):

| | |
|------------------|-------|
| - Pomme de terre | 200g |
| - Eau distillée | 500ml |

Chauffage et filtration : le filtrat +.

| | |
|-----------------|--------|
| - Saccharose | 10g |
| - Agar | 15g |
| - Eau distillée | 1000ml |
| - Ph | 6 |

Ø MEA (Malt Extract Agar)

| | | |
|---|-----------------|--------|
| - | Extrait de Malt | 20g |
| - | Glucose | 5g |
| - | Agar | 15g |
| - | Eau distillée | 1000ml |
| - | Ph | 5 |

Ø Czapek DOX :

| | | |
|---|---------------------------------------|---------|
| - | NaNO ₃ | 10g |
| - | KCl | 0,5g |
| - | MgSO ₄ H ₂ | 0,5g |
| - | KH ₂ PO ₄ | 1g |
| - | FeSO ₄ , 7H ₂ O | 0,001g |
| - | Saccharose | 30g |
| - | agar | 20g |
| - | eau distillée | 1000 ml |
| - | Ph | 6 |

Ø Malt-Extract :

Tableau A1: Milieux Malt à différents concentration de levure.

| <i>Milieux</i> | | | | | |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Composés (g/l)</i> | <i>Milieu 1</i> | <i>Milieu 2</i> | <i>Milieu 3</i> | <i>Milieu 4</i> | <i>Milieu 5</i> |
| <i>Extrait de Malt</i> | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| <i>Glucose</i> | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| <i>Extrait de levure</i> | 0 | 1.5 | 2.5 | 3.5 | 5 |

Ø CYA (Czapek-Yeast-Agar):

Tableau A2: Milieux CYA à différents concentration de levure.

| <i>Milieux</i> | | | | | |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Composés (g/l)</i> | <i>Milieu 1</i> | <i>Milieu 2</i> | <i>Milieu 3</i> | <i>Milieu 4</i> | <i>Milieu 5</i> |
| <i>Czapek concentré *</i> | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| K_2HPO_4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Extrait de levure</i> | 0 | 1.5 | 2.5 | 3.5 | 5 |
| <i>Saccharose</i> | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |

• Czapek concentré

- $NaNO_3$ 30g
- KCl 5g
- $MgSO_4, 7H_2O$ 5g
- $FeSO_4, 7H_2O$ 1g
- Eau distillée 1000ml

Annexe 2

Ø *Aspergillus niger* est une espèce cosmopolite, bien que signalée dans le monde entier elle est un peu plus fréquente dans les zones tièdes et les sites exposés au sud (Botton *et al.*, 1990).

On peut la trouver aussi bien sur les sols glacés, dans les environnements marins que dans les stèpes, pâturages, forêts et dunes. Mais c'est une espèce plus courante en zones sèches et dans les sols chauds.

A. niger se développe aussi bien sous peu de lumière (à l'intérieur) que sous la forte lumière de l'extérieur (Botton *et al.*, 1990).

A. niger est une espèce toxique et pathogène, elle provoque des otomycoses (mycoses pulmonaires) chez l'homme et les oiseaux. Elle peut provoquer l'aspergillose

du conduit auditif externe chez les sujets présentant une lésion préalable ou une malformation anatomique du conduit auditif. Cependant, elle possède des toxines à propriété insecticide, actives sur les moustiques responsables de la fièvre jaune (Calvo *et al.*, 1980).

Colonies à croissance rapide d'aspect de velours ou de feutre, blanc cotonneux au départ, devenant poudreux avec l'apparition de spores noires

Les espèces possèdent des fructifications asexuelles de grande taille. Les têtes conidiennes sont très grandes globuleuses à radiales des phialides de 7-20 x 3-5 µm. Les conidiophores très abondants et très fragiles sont longs à parois lisses. Les phialides et métules sont généralement colorées. Les conidies sont globuleuses à sous-globuleuses, elliptiques ou aplaties (Botton *et al.*, 1990)

A. niger est une espèce xérophile, tonophile facultatif mais elle peut se développer très bien à des taux d'humidité relative élevés (90 à 100%).

C'est une espèce mésophile qui se développe cependant très bien à hautes températures. Les températures minimale, optimale et maximale pour la croissance du mycélium sont respectivement de 11-13°C, 17-42°C et 47-48°C. *In vitro*, *A. niger* peut survivre à 60°C. Dans des jus de fruits, l'espèce est tuée après 25 min d'exposition à 63°C. Les micro-ondes n'ont aucun effet sur les conidies.

Cette espèce est capable de se développer sur des pH inférieurs à 2 quand l'humidité relative est élevée. Contenu en eau des conidies : 55%.

Pour bien l'isoler de manière sélective, on peut ajouter du tanin ou du sucre (glucose, saccharose) au milieu de culture (Subramanian CV,1983)

Ø *Epicoccum sp* est genre cosmopolite et isolées à partir de plantes infectées, les débris végétaux, le sol et l'air intérieur.

Epicoccum est un envahisseur secondaire des tissus végétaux endommagés.

Epicoccum est un saprophyte de la distribution dans le monde entier qui est occasionnellement isolé comme un contaminant à partir d'échantillons cliniques, comme la peau. Aucun cas d'infection ont été signalés chez les humains ou les animaux.

Epicoccum espèces considérées comme allergènes courants qui entraînent des allergies de type I (rhume des foins, asthme). Aucun rapport de la production de mycotoxines.

Les colonies sont irréguliers, à croissance rapide avec de la texture duveteuse laineux. La couleur est jaune, orange, rouges ou brunes à la surface. Le revers est brun foncé avec du jaune, orange, rouge, brune ou la pigmentation diffusible.

Les hyphes sont cloisonnées et hyalines à brun. Les conidies sont formées individuellement sur densément compactée, conidiophores légèrement pigmenté appelé sporodocia . Les conidies sont plus ou moins rondes avec une base en forme d'entonnoir. Les conidies pluricellulaires, de couleur sombre et ont une surface rugueuse.

Ø *Penicillium sp* est caractérisé par un mycélium septé et ramifié. La base non ramifiée des conidiophores correspond au stipe. Les conidiophores septés ou non, peuvent être ramifiés (ou verticillés) jusqu'au trois fois de manière symétrique ou non. Leurs extrémités sont porteuses de plusieurs phialides. généralement en forme de quille ou de bouteille. Comme chez les *Aspergillus*, les phialides sont les cellules des reproductrices, porteuses de conidies arrangées en chaînettes. Les conidies de *Penicillium* sont généralement lisses, rondes ou ovoïdes, presque toujours pigmentées en bleu ou en vert, pouvant virer au jaune (PIIT, 1979). Une illustration de ces caractéristiques morphologiques est donnée dans la figure (Fig07).

Les colonies sont modérés à croissance rapide et la texture est veloutée de poudreuse. La couleur est vert, bleu-vert, gris-vert, blanc, jaune ou rose dans la surface et inverse est généralement pâle à jaunâtre et parfois rouges ou brunes. De nombreuses espèces de *Penicillium* sont des contaminants commune sur divers substrats et trouve couramment dans la poussière de maison. Certaines espèces poussent à l'intérieur des plaques de plâtre, papier peint, wallp, tissus en décomposition, panneaux de particules humides, et la peinture. On trouve également dans la pourriture bleue des pommes, des denrées alimentaires secs, fromages, fines herbes, épices, céréales sèches, les noix, les oignons et les agrumes.

Penicillium sp; provoque des allergies de type I (rhume des foins, asthme) et la pneumopathie d'hypersensibilité de type III. Une espèce de *Penicillium* (*P. marneffe*) provoque une infection de l'homme. Différentes espèces de *Penicillium* produisent des mycotoxines.

Ø *Proteus mirabilis* ; bacille à Gram (-) doté de flagelles péritriches (Tortora *et al.*, 2003).

Proteus mirabilis peut réduire le chlorate en chlorite pour leur croissance. (Pelmont *et al.*, 2005).

Les colonies de *Proteus mirabilis* qui se développent sur gélose présentent un mode de croissance par essaimage : les cellules sont disséminées sur la gélose en boîte de pétri, où elles forment des anneaux concentriques.

Cette bactérie joue un rôle dans de nombreuses infections des voies urinaire, où l'activité de l'enzyme qu'elle produit, l'urease, est un facteur déterminent, ainsi que dans les blessures (Tortora *et al.* , 2003).

1. *Serratia marcescens* est l'espèce la plus importante en bactériologie médicale. Chez l'homme, elle est responsable d'infections urinaires, d'infections respiratoires, de contaminations des plaies, de kératites chez les sujets porteurs de lentilles de contact ou utilisant un collyre contaminé plus rarement, elle provoque des septicémies et des méningites (notamment dans les maternités et dans les centres pédiatriques de soins intensifs). Chez les

mammifères domestiques, *Serratia marcescens*.(Carrero P, Garrote JA, Pacheco S, et al.,1995)

Serratia espèces sont opportunistes bactéries gram-négatives bacilles mobiles, classés dans la tribu Klebsielleae et la grande famille des Enterobacteriaceae.(Alonso Fernandez et al ,1994).

Certaines souches de *S marcescens* sont capables de produire un pigment appelé prodigiosine, qui varie en couleur du rouge foncé au rose pâle, en fonction de l'âge des colonies. *S marcescens* a une prédilection pour la croissance sur les denrées alimentaires riches en amidon, où les colonies pigmentées sont facilement confondus avec des gouttes de sang.(Mlynarczyk A, Mlynarczyk G, Pupek J, et al,2007)

Nom: **MOUSSAOUI**
Prénom : **MERIEM**

Date de soutenance : **Le 06 /07 /2010**

Thème : Développement et extraction des métabolites secondaires de *Trichoderma viride* et leurs effets biologiquement actifs

Résumé :

Cette étude a révélé que les milieux solides PDA, MEA, Czapek-DOX, Sabouraud sont adéquats à la croissance de *Trichoderma viride*. Le PDA est le meilleur. Le milieu Czapek-DOX favorise la croissance du mycélium et par le temps la couleur verte des conidies apparaît. Le Sabouraud représente la croissance la plus lente au départ. *T. viride* se développe à 5°C et 30°C avec une température optimale de 25°C. L'étude macroscopique et microscopique a montré que *T. viride* se développe rapidement sur milieu PDA sous forme de filaments denses et septés développant une couleur blanche qui se transforme en couleur vert foncé avec le temps. Le test d'antagonisme de *T. viride* contre : *Epicoccum* sp, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, éprouve son pouvoir antagoniste (le phénomène de compétition) par un taux d'inhibition plus de 50% pour chaque test. La recherche des meilleurs milieux de fermentation pour la production de la biomasse et les métabolites secondaires par *T. viride* a révélé que le milieu Malt liquide contenant 2.5 et 3.5 g/L d'extrait de levure, permet à la souche d'atteindre sa production de biomasse par rapport au CYA, qui permet à la souche de sécréter des substances antibactériennes d'effet plus important que celui du Malt, après 14 jours d'incubation statique. Le test d'antibiogramme (activité antibactérienne) des métabolites secondaires bruts de *T. viride* sur les bactéries test : *Proteus mirabilis* et *Serratia marcescens* a révélé que *T. viride* développe une activité antibactérienne considérable avec les grandes concentrations, dont *Serratia marcescens* est plus sensible et *Proteus mirabilis* est plus résistante. Pour *Serratia marcescens* la CMI est évaluée par 32mg/l sur Malt et par 16mg/l sur CYA. Pour *Proteus mirabilis* la CMI est évaluée par 64mg/l sur Malt et par 32mg/l sur CYA.

Mots clés : *Trichoderma viride*, métabolites secondaires brutes, CMI, antibiogramme, antagonisme.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie Appliquée, Département de Biochimie et microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri de Constantine.

Jury d'évaluation :

President: Dr N. KACEM CHAUCHE
Examineurs: Dr M L.HADDI
Dr M A.HAMIDECHI
Rapporteur : Dr L.DEHIMET

MC. Univ. Mentouri, Constantine
MC. Univ. Mentouri, Constantine
MC. Univ. Mentouri, Constantine
MC. Univ. Mentouri, Constantine

