

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE LIQUALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

جامعة البليدة -1-

UNIVERSITE BLIDA -1-

FACULTEDES SCIENCESDELA NATUREETDELAVIE



DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES ET AGRO ECOLOGIQUE

MEMOIREDEFIND'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master 2 Académique

Filière : science biotechnologique

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

**Caractérisation des molécules d'intérêts
synthétisés par une souche fongique**

Présenté et soutenue par :AMMOUR Safia Et REBZANI Nihed

Soutenu devant les jury :

M ^m TOUA. D	M.A.A	U.Blida 1	Présidente
M ^m AMMAD. F	M.C.A	U.Blida 1	Promotrice
M ^m YALA. A	Doctorante	U.Blida 1	Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE: 2021/2022

Remerciements

Nous tenons avant tout à remercier **Dieu** tout puissant de nous avoir donné la force, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail.

Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude et sincères remerciements à notre Promotrice **Mme Ammad.F** d'avoir proposé et dirigé ce travail, ont les a remercie infiniment pour ses orientations, sa patience, sa confiance et ses conseils, tout au long de ce travail.

Nous remercions très sincèrement les membres du jury:

- **Mme TOUA. D** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.
- **Mme YALLA. A** pour nous avoir fait l'honneur d'examiner notre mémoire.

Nous tenons à remercier nos enseignants pour leurs efforts, nos responsables et nos collègues pour leurs aides, leurs patiences et leurs soutiens.

Nous remercions aussi le **Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – Chimiques à Bou Ismaïl (CRAPC)** pour sa grande part dans la réalisation de cette recherche.

Nous remercions aussi à **Ms. BOUTOUMI**, pour leurs aides et disponibilités pour répondre à nos questions durant cette recherche.

Un grand merci également à **BELARBI Ihsen**, ingénieur du laboratoire de microbiologie, pour sa disponibilité et ses encouragements durant toute l'expérimentation.

- Tous les enseignants qui ont contribué à notre formation, en particulier ceux du département de biotechnologie.
- Toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers :

À mon père que nulle dédicace ne puisse exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour l'encouragement. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez.

À ma chère mère, que Dieu que Dieu la bénisse et lui accorde la paix

À mon Marie et mes cher enfant Mohamed et Zohra.

À mes très chères sœurs Hadjer, Souad, Karima, Ahlem et mes Cher frères Mohamed, Samir et Amine et leur épouses, à qui je dois tout l'amour, avec tous mes vœux de les voir réussir dans leurs vies.

À tous ceux qui m'ont encouragé, soutenus et supporté pour que ce travail puisse s'accomplir

Ammour Safia

Dédicace

*A mes chers parents que je ne pourrai jamais vous oublier et qui ont
Toujours souhaité me voir réussir*

« Que Dieu les bénisse et les accueille dans son vaste paradis »

Je dédie ce modeste travail :

A mon mari et mon petit fils Fadi.

A mes chers frères, Mohamed et Abd el Djabar.

*A tous ceux qui m'ont encouragé, soutenus et supporté pour que ce
travail puisse s'accomplir.*

« Que dieu vous bénisse et vous garde pour moi »

Rebzani Nihed

Liste des tableaux

Tableau 1	Les microorganismes utilisés dans les différents domaines biotechnologiques	7
Tableau 2	La position taxonomique du genre <i>Trichoderma sp</i>	10
Tableau 3	Les groupes fonctionnels identifiés à partir de l'extrait de filtrat de culture	21
Tableau 4	Les groupes fonctionnels identifiés à partir de l'extrait de filtrat de culture de <i>Trichoderma sp</i> de la phase aqueuse.	32
Tableau 5	Les groupes fonctionnels identifiés à partir de l'extrait de filtrat de culture de <i>Trichoderma sp</i> de la phase organique.	34

Liste des Figures

Figure 1	Concept de la biotechnologie	6
Figure 2	Aspect morphologique d'un conidiophore de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	13
Figure 3	Les cinq section de <i>Trichoderma</i> reconnus par Bisset	14
Figure 4	.Les mécanismes d'induction de la résistance systémique par les souches de <i>Trichoderma</i>	18
Figure 5	Mécanisme de mycoparasitisme des <i>Trichoderma sp</i>	20
Figure 6	Fermentation dans milieu liquide les isolats fongiques	24
Figure 7	Représente d'un évaporateur rotatif «l'appareil d'extraction »et une ampoule à décomptation	25
Figure 8	Les procédures de fermentation et de l'extraction des métabolites secondaires du <i>Trichoderma</i> avec l'acétate d'éthyle	29
Figure 9	Aspect macroscopique de <i>Trichoderma sp</i>	31
Figure 10	Aspect microscopique (B, C, D, E) de <i>Trichoderma sp</i> , C : phialides contenant des phialospores (x40) D: conidiophore (x40) E: spores .	32

Liste des Abréviations

PDA Potato dextrose agar.

PDB Potato Dextrose Broth.

GC-MS Chromatographie en phase gazeuse liée à la spectrométrie en masse.

SM Spectrophotomètre.

MSFB Métabolites secondaires fongiques bruts.

AcEt Acétate d'éthyle.

FTIR Fourier Transformed Infra Red spectroscopy.

CPG/SM Couplage chromatographe gazeuse/spectrométrie de masse.

CRAPC Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – Chimiques.

PGPR Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

MSFB Métabolites Secondaires Fongiques Bruts.

AIA Acide Indole Acétique.

ITS Internal Transcribed spacer .

COP21 Conférence de Paris sur les changements climatiques.2021

Caractérisation des molécules d'intérêt d'une souche fongique

Résumé

Notre étude porte sur la caractérisation des molécules d'intérêt de *Trichoderma sp*, cette souche a montré sa capacité de produire des métabolites secondaires volatils et non volatils, des phytohormones comme l'acide indole acétique (AIA) et des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire du pathogène (chitinase, cellulase, protéases et lipases). Les résultats de l'analyse chimique, réalisé sur *Trichoderma* par la méthode (Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy) FTIRa montré la présence de 25 groupes chimique fonctionnels par la dominance selon les bandes d'absorbtion des spectres de composés aromatiques tels que : les cétones, les aldéhydes, les acides carboxyliques, les esters carboxyliques, les lactones, les halogénures d'acides, les anhydrides, les amides et les lactames. L' analyse de l'extrait de filtrat de *Trichodermasp* par (Caractérisation par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse) CG/SMa montré que la souche fongique testées est très riche en molécules bioactives, nous avons enregistré la présence de 42 composés chimiques tels que 2-Hydroxy-4-methyl3nitropyridi(17.94%), alpha-Phellandrene(7.74%), Morphine(6.92%), Cyclopanteine-1.2diol(4.39%), la présence de ces fractions confirme le pouvoir d'inhibition de *Trichoderma* contre les agents pathogènes ,ainsi la présence des phytohormones indique le pouvoir biostimulant de notre souche .

Mots-clés : Métabolite secondaire, *Trichodermasp*, FTIR , CG/SM

Characterization of the molecules of interest of a fungal strain

Abstract

Our study focuses on the characterization of the molecules of interest of *Trichoderma sp*, this strain has shown its ability to produce volatile and non-volatile secondary metabolites, phytohormones such as indole acetic acid (IAA) and enzymes that degrade the cell wall of the pathogen. (chitinase, cellulase, proteases and lipases). The results of the chemical analysis carried out by the FTIR method (Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy) showed the presence of 25 functional chemical groups by the dominance according to the absorption bands of the spectra of aromatic compounds such as: ketones, aldehydes , carboxylic acids, carboxylic esters, lactones, acid halides, anhydrides, amides and lactams. The analysis of the filtrate extract of *Trichoderma sp* by CG / MS (Characterization by gas chromatography / mass spectrometry) showed that the fungal strain tested is very rich in bioactive molecules, we recorded the presence of 42 compounds chemical among them 2-Hydroxy-4-methyl-3-nitropyridin(17.94%),alpha-Phellandrene(7.74%),Morphine(6.92%),Cyclopanteine-1.2diol (4.36%), the presence of these fractions confirms the inhibition power of *Trichoderma* against pathogenic agents, thus the presence of phytohormones indicates the biostimulant power of our strain.

Keywords : FTIR,*Trichoderma sp*,secondary métabolites,CG/MS

Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Listes des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
CHAPITRE I : SYNTHESEBIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Donnéesgénéralesurla Biotechnologie	4
1.1. Historique.....	4
1.2. Objectif de la biotechnologie.....	4
1.3. Ingénierie de la biotechnologie.....	4
1.4. L'importance de biotechnologique.....	5
1.5. Les branches la biotechnologie.....	5
1.6. Les application de la biotechnologie.....	6
2. Les métabolites d'origines microbiennes	7
2.1. Lesmétabolitesprimaires.....	7
2.2. Lesmétabolitessecondaires.....	8
2.3. Les classes des métabolites secondaire.....	8
2.4. Condition de production de métabolites secondaires.....	8
3. Métabolites secondaires fongiques	8
3.1. Importancesdesmétabolitessecondairesfongique.....	9
.	
3.2. Principauxgroupesfongiquesproducteursdemétabolitessecondaire.....	9
4. Généralité sur <i>Trichoderma</i>	9

4.1. Historique et taxonomie de <i>Trichoderma sp.</i>	10
4.2. Approche morphologique.....	14
4.3. Approche moléculaire	14
4.4. Écologie et habitats.....	15
4.5. Utilisation de <i>Trichoderma</i> dans la lutte biologique.....	16
4.6. Mode d'action des <i>Trichoderma sp.</i>	17
4.6.1. Antibiose.....	17
.	
4.6.2. Compétition.....	17
4.6.3. Induction de système de résistance.....	18
4.6.4. Mycoparasitisme.....	19
5. Métabolites secondaire de <i>Trichoderma sp.</i>	20
CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES	22
1. Matériel Biologique	23
1.1. La souche fongique.....	23
2.2. Milieux de culture.....	23
2. Purification des champignons	23
3. Extraction des métabolites secondaires	23
3.1. Fermentation.....	23
3.2. Procédure d'extraction.....	24
4. Analyse chimique des extraits de filtrat de culture de <i>Trichoderma sp</i> par FTIR (Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy)	25
5. Caractérisation par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse «CG/SM»	26
5.1. Couplage chromatographe gazeuse/spectrométrie de masse.....	27
5.2. Appareillage et condition de la chromatographie.....	27
CHAPITRE III: RESULTAT ET DISCUSSION	29
1. La caractérisation macroscopique et microscopique	31
1.1. Caractérisation macroscopique.....	31
1.2. Caractérisation microscopique.....	31

2. Analyse chimique d'extrait de filtrat de culture de <i>Trichoderma sp</i> par Spectroscopie Infrarouge a Transformée de Fourier (Ou FTIR : FourierTransformed InfraRedSpectroscopy).....	32
3. Analyse de l'extrait de filtrat de <i>Trichoderma sp</i> par CG/SM.....	36
Conclusion et perspective	
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

La protection de l'environnement et la gestion des pesticides chimiques a fait l'objet d'une prise de conscience au niveau mondial lors de la Conférence des Parties (COP) 21, bien que certains pays soient toujours réfractaires aux réformes indispensables. L'utilisation d'agro-écosystèmes favorisant la diversité biologique, la productivité et la capacité de régénération à long terme permettrait d'assurer une agriculture durable (Lewandowski *et al.*, 1999). Pour le bon fonctionnement et la protection des agrosystèmes et pour assurer une sécurité alimentaire il faut lutter contre les ravageurs avec des méthodes saines tels que l'utilisation de micro-organismes ou de leurs métabolites toxiques, ciblés pour contrôler les organismes nuisibles représente une alternative très intéressante aux pesticides chimiques traditionnels qui provoquent des problèmes de santé humaine, de respect de l'environnement mais également d'écologie en générant des ravageurs résistants aux pesticides (Tranier *et al.*, 2014 ; De la Cruz Quiroz *et al.*, 2017).

Ces micro-organismes sont dits « Bio » car leurs actions sont basées sur des molécules actives issues d'organismes vivants, de champignons de bactéries ou d'insectes. Leurs métabolites influent sur la compétition naturelle entre les espèces. Ils constituent donc une lutte biologique. Grâce à ces produits, utilisés de manière intensive, il serait possible de contrôler un ravageur. Même si l'objectif visé n'est pas de détruire complètement la cible, mais de la stabiliser à un niveau économiquement acceptable par le producteur, l'utilisation de ces organismes permettrait de limiter les intrants chimiques et donc de préserver la santé de l'homme et de l'environnement tout en autorisant des gains économiques pour les sociétés maraîchères (De la Cruz Quiroz *et al.*, 2015).

Les moisissures sont extrêmement répandues, elles contaminent beaucoup de denrées alimentaires, de ce fait elles intéressent l'économie et l'environnement (Martins *et al.*, 2011). Certaines d'entre elles comme les genres *Trichoderma*, *Aspergillus* et *Penicillium* sont connues pour leur capacité à produire des métabolites secondaires à haute valeur ajoutée, comme les antibiotiques, les pigments, les arômes et les enzymes d'intérêt industriel tel que les cellulases, les lipases, les amylases, etc. (Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000 ; Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2013 ; Pandey, 2003). Plus particulièrement, les enzymes lytiques jouent un rôle très important pour les industries du textile (dégradation des colorants), dans la bioraffinerie (dégradation de substrats lignocellulosiques, production de bioéthanol) et également dans le contrôle biologique (dégradation de la paroi des phytopathogènes)

(Roussos et al., 1997; Sharma et al., 2016; Stoykov et al., 2015). Ces métabolites peuvent présenter des activités anticancéreuses, antibactériennes, antiradicalaires, antioxydantes et antifongiques (Carboué *et al.*, 2017 ; De la Cruz Quiroz *et al.*, 2015).

Aujourd'hui *Bacillus thuringiensis* est considéré comme le traitement biologique le plus utilisé au monde pour ses propriétés insecticides en agriculture biologique. On le retrouve en faible quantité dans pratiquement tous les sols, l'eau, l'air et le feuillage des végétaux et permet de lutter contre de nombreux insectes de structure des cultures : piéride du chou, ver du poireau, noctuelles. Il synthétise les cristaux protéiques toxiques (Bt) pour nombre d'insectes comme certains diptères ou comme les lépidoptères à l'état larvaire. Les cristaux protéiques se transforment en protéines toxiques, qui détruisent les cellules de la paroi intestinales des insectes. En quelques heures, les insectes ne s'alimentent plus, l'organisme des insectes est envahi par les bactéries (Bt). La prolifération des bactéries (Bt) entraîne alors une infection générale ou septicémie qui déduit la mort du parasite dans les jours suivants (Parker, 2005).

Les *Trichoderma*, sont des champignons filamenteux considérés aujourd'hui comme des agents efficaces de lutte biologique vis-à-vis de plusieurs organismes nuisibles. Ils représentent un modèle à étudier en raison de ses mécanismes d'action. Parmi eux, le mycoparasitisme : son mécanisme d'action résulte d'un enroulement de la souche autour du pathogène. La destruction peut se faire ensuite soit par étranglement soit par pénétration en lui injectant des enzymes qui le détruisent. L'autre mécanisme, l'antibiose repose sur la production de métabolites secondaires exerçant un effet inhibiteur voire létal sur l'agent pathogène (Junaid *et al.*, 2013 ; Zachow *et al.*, 2016).

Dans ce cadre, s'inscrit notre étude, qui vise les objectifs suivants :

1. Purification de la souche fongique *Trichoderma sp.*
2. Une analyse chimique des extraits de filtrat de culture de *Trichoderma sp.* par FTIR (Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy) suivi par une Caractérisation chromatographique gazeuse/spectrométrie de masse « CG/SM ».

CHAPITRE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Données générales sur la Biotechnologie

1.1. Historique

Selon Robert Bud (1993), le terme « biotechnologie » a d'abord été utilisé par le hongrois Károly Ereky en 1919 pour décrire une technologie basée sur la conversion des matières premières en un produit plus utile dans un livre intitulé « La biotechnologie de la viande, la production de graisse et de lait dans un agricole à grande échelle agricole ». Pour Ereky, le terme « biotechnologie » indique le processus par lequel des matières premières pourraient être mis à niveau biologique en produits socialement utiles. Depuis sa création, la notion de la biotechnologie a été définie de diverses manières.

1.2. Objectif de la biotechnologie

Elle est orientée vers la conception, la réalisation et la mise en œuvre de nouveaux produits et procédés biologiques, comprenant la production, l'extraction et la purification de produits biologiques mettant en œuvre des micro-organismes, des cellules animales ou végétales (Daniel, 1991).

1.3. L'ingénierie biotechnologique

1.3.1. Les techniques classiques

Sont considéré habituellement comme des techniques de fermentation et de l'enzymologie.

- **La fermentation**

C'est la plus ancienne technique utilisé et la plus connue dans le domaine des biotechnologies, consiste a cultivé des souches des micro-organisme ou de cellule vivante sur un substrat organique, dont elle se nourrissent, les produit sont soit les micro-organisme eux même, soit les métabolisme synthétisé par ces cellules, soit le substrat nutritif transformé en produit intéressant (Hulse, 2004).

- **L'enzymologie**

Dans les cellules de tous les organismes ont lieu des réaction chimiques orchestré par les catalyseur biologique de nature protéique: les enzymes, ces dernier sont généralement spécifique à une seul réaction chimique, la faculté que possède une enzyme particulier de canalisé une réaction donné est déterminer par sa structure dépendant de la séquence des acides aminés dans ces chaînes polypeptidiques (Hulse, 2004).

1.3.2. Les techniques modernes

Elles sont considérées comme des techniques de l'ingénierie génétique et protéique.

- **L'ingénierie génétique**

L'ingénierie génétique comprend l'ensemble des méthodes permettant d'obtenir des cellules ou des micro-organismes dotés d'une structure génétique inédite et stable et permettant une amélioration génétique dans le sens souhaité (Chevalier, 1991).

- **L'ingénierie protéique**

Les protéines sont omniprésentes dans les organismes vivants. Cette technique se base sur une modification au niveau de fonctionnement de la protéine et quelques modifications s'apportent sur son acide aminé en appliquant des méthodes chimiques, physiques ou génétiques (Chevalier, 1991).

1.4. Importance des micro-organismes dans les domaines de la biotechnologie

Les micro-organismes auraient été les premières formes de vie à se développer sur Terre, on trouve les micro-organismes dans tous les types d'environnement présents dans la nature. Ils participent au cycle du carbone et au cycle de l'azote et accomplissent un rôle vital dans presque tous les écosystèmes, tels que la biodégradation et le recyclage d'autres organismes (Perry et al., 2004). Un grand nombre de micro-organismes sont utilisés en lutte biologique à l'égard de diverses maladies sur différentes cultures, en biostimulation et biofertilisants (PGPR) et agro-industriel (Chet, 1987).

1.5. Les branches de la biotechnologie

Le concept central de cette section est que la biotechnologie est de nos jours un domaine très large de la recherche scientifique et le terme «biotechnologie» englobe de nombreux processus et applications. Cette partie couvre le spectre des principales différentes branches de la biotechnologie en utilisant le code des couleurs: biotechnologie verte, rouge, blanc, etc (Fig. 1).

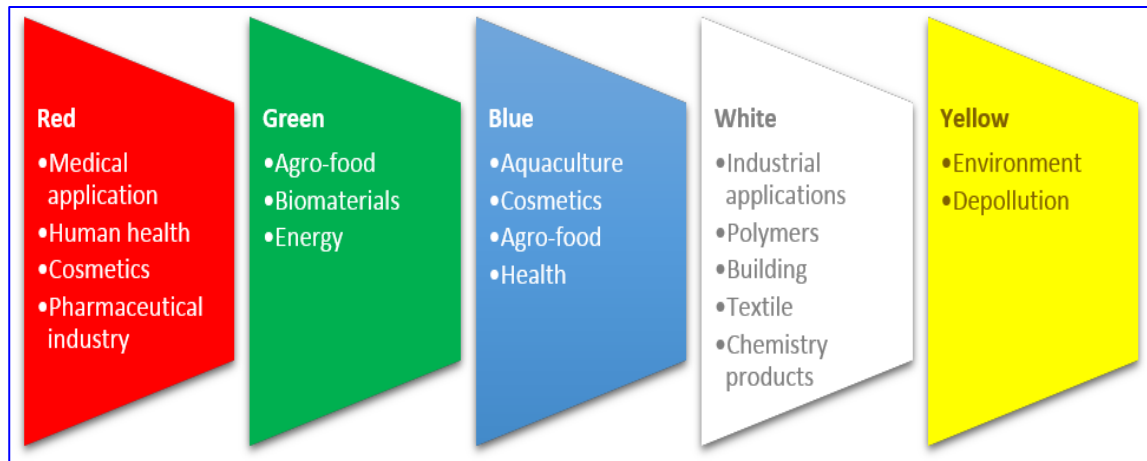


Figure 1: Concepts de la biotechnologie(leonard 1998)

1.6. Les applications de la biotechnologie

Le terme « biotechnologie » englobe de nombreux processus et applications. Cette section couvre le spectre des principales applications de la biotechnologie dans différents domaines (**Tableau1**) .

● Médical

Rassemble toutes les utilisations de la biotechnologie liées à la médecine. La biotechnologie rouge comprend la production de vaccins et d'antibiotiques, le développement de nouveaux médicaments, les techniques de diagnostic moléculaire, les thérapies de régénération et le développement du génie génétique pour guérir les maladies par la manipulation génétique(Albert,2005).

● Industriel

L'utilisation de micro-organismes dans la production de produits chimiques, la conception et la production de nouveaux matériaux à usage quotidien (matières plastiques, textiles ...) et le développement de nouvelles sources d'énergie durables comme les biocarburants (Gilbert,2000).

● Agricole

les applications comprennent la création de nouvelles variétés végétales d'intérêt agricole, la production de biofertilisant et de biopesticides, en utilisant des cultures *in vitro* et des plantes de clonage. La production de variétés végétales modifiées est basée presque exclusivement sur la transgénèse (Catherine et al.,2001).

Tableau 1 : exemples de quelques microorganismes utiliser dans les différents domaines biotechnologiques(newman et al,2000)

Catégorie de microorganisme	Nom précis du microorganisme	Rôle utile dans les domaine de la biotechnologie
BACTERIES	<i>Lactobacillus sp</i>	-Ce sont des ferments lactiques qui permettent la fabrication des yaourts « cailler » de lait
	<i>Streptomyces griseus</i>	- la streptomycine produite par cette bactérie et utilisé comme traitement contre la tuberculose
	<i>Bacillus tuthuringiensis</i>	-Lutte biologique (bioinsecticide)
CHAMPIGNONS	<i>Penicillium notatum</i>	- Production de pénicilline (antibiotiques bêta-lactamines)
	<i>Trichoderma viride</i>	-Un champignon et un bio-fongicide. Il est utilisé pour le traitement des semences de diverses maladies causées par des agents pathogènes fongiques
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-Son rôle dans la fabrication de plusieurs aliments, notamment le pain

2. Lesmétabolites d'origine microbiens

Toutes fois les essais portés sur l'utilisation des micro organisme sont encouragés par la recherche, et l'étude de ces derniers afin de connaître leurs compositions chimiques,leurs caractères morphologiques qui offrent aux chercheurs une pisteprometteuse pourla découverte de formulesadéquatesnotamment des composés secondaires, qui sont souvent considérés comme étant des molécules d'intérêt.

2.1. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires sont des composés associés ou liés à la synthèse des cellulesmicrobienne, donc de type associé à la croissance. Ils sont synthétisés pendant la phaseexponentielle (trophophase). Les voies de biosynthèse sont, en général, simples. Parmi cesmétabolites on trouve : les acides aminés, les acides organiques, les enzymes, l'alcool, lesvitamines,lespolysaccharides,lessolvants,lescarburants,etles lipides(Leghlimi,2020).

2.2 Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules non essentielles au métabolisme basique des êtres vivants. Ces composés sont synthétisés dans des conditions particulières, et s'accumulent pendant la phase suivante : la phase stationnaire de croissance ou en idiophase

Ces produits n'ont pas de relation directe avec la synthèse des matières cellulaires et la croissance normale, ils sont donc, de type non associé à la croissance. On trouve dans ce groupe : les antibiotiques, les toxines, les vaccins, les insecticides, les arômes, les colorants et autres (Leghlimi, 2020).

2.3 Les classes des métabolites secondaires

À première vue, les structures des métabolites secondaires peuvent paraître diverses. Cependant, la majorité de ces composés appartient à une même famille, et ont des caractéristiques structurales particulières issues de leur voie de biosynthèse. Les classes des métabolites secondaires sont (Johanning, et al., 2002).

- Les polykétides et les acides gras
- Les terpenoïdes et les stéroïdes
- Les propanoïdes phényles
- Les alcaloïdes

2.4 Condition de production de métabolites secondaires

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

3. Métabolites secondaires fongiques

Les métabolites secondaires chez les mycètes sont des composés spécifiques à une ou deux espèces alors que d'autres peuvent être produits par différents genres, ces métabolites, sont des dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques, Les enzymes responsables de la

synthèse des métabolites secondaires sont très diversifiées suite à l'évolution de gènes impliquées, à l'origine, dans les fonctions métaboliques fondamentales (Adams, 2002).

3.1. Importances des métabolites secondaires fongiques

Les métabolites secondaires fongiques occupent une grande variété de molécules, qui jouent un rôle très important en raison de leurs activités biologiques. Ces molécules complexes peuvent être des composés à activités biologiques, entre autres : antibactériens, anti-tumoraux, antifongiques, antiviraux et inhibiteurs d'enzymes (Zain *et al.*, 2014). Ces activités donnent des intérêts et ouvrent à ces molécules d'intéressantes applications, en agriculture par exemple les métabolites secondaires affectent surtout les agents sp à travers leur pouvoir antagonistes hytopathogène comme les champignons, les bactéries et même les virus qui menacent les cultures, (Devi *et al.*, 2020). Ils assurent aux espèces fongiques eux-mêmes plusieurs fonctions, par exemple ils jouent un rôle d'armes de compétition contre d'autres champignons, bactéries, protozoaires et plantes ; mais aussi comme des agents de transport de métaux, et agents de symbiose entre les micro-organismes et les plantes, les nématodes, les insectes et les animaux supérieurs. Comme médiateur pour la communication (Zain *et al.*, 2014).

3.2. Principaux groupes fongiques producteurs de métabolites secondaires

D'après les évaluations il y a environ 1.5 millions d'espèces fongiques, dont environ 150 000 espèces ont été décrites (Agrios, 2005). Ces espèces ont une grande importance, pas seulement en ce qui concerne la santé et l'industrie mais aussi du point de vue économique et agricole grâce à leurs activités et propriétés métaboliques (Awad, 2005). En effet, environ 33 500 métabolites microbiens bio-actifs ont été décrits, sur ces métabolites presque 47% (15 600) sont d'origine fongique. Le taux de découverte de nouveaux métabolites fongiques a considérablement augmenté au cours des deux dernières décennies. Ces métabolites secondaires sont complexes, riches et très développés chez les champignons filamenteux (Billset Gloer, 2017).

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

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

4. Généralité sur les *Trichoderma*

4.1 Historique et taxonomie de *Trichoderma*

Le terme « *Trichoderma* » a été utilisé pour la première fois par le mycologue sud-africain Christiaan Hendrik Persoon en 1794. C'est le premier qui a décrit le genre *Trichoderma* à partir des échantillons collectés en Allemagne. Qui ont été considéré comme des décomposeurs de matière organique (Persoon, 1794).

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 (Vining, 1990).

En 1825, Elias Fries a décrit pour la première fois la forme parfaite « *Hypocrea* » comme étant une espèce avec des ascospores hyalines (Chaverri et Samuels, 2004). En 1865, les frères Tulasne ont suggéré que *Hypocrea rufa* est le téléomorphe de *Trichoderma viride* Pers. Brefeld (1891) a pu obtenir une culture de *T. viride* à partir d'une seule ascospore de *Hypocrea rufa* (Samuels, 2006).

Le genre *Trichoderma* (téléomorphe : *Hypocrea*) appartient au sous embranchement des Ascomycètes, la famille des Hypocreaceae (Chaverri et al., 2015), (**Tableau 2**). De 1939 à 1969, toute espèce fongique à spores vertes appartenant au genre *Trichoderma* était considérée comme étant l'unique espèce : *Trichoderma viride* (Bisby, 1939),

Tableau 2 : La position taxonomique de genre *Trichoderma* (person 1794)

Sous embranchement	Ascomycotina
Classe	Sordariomycète
Ordre	Hypocreales
Famille	Hypocreales
Genre	<i>Trichoderma</i>

Ces mécanismes, indirects et directs dépendent de la souche de *Trichoderma*, le champignon phytopathogène ciblé, de la culture envisagée et des conditions environnementales. L'activation de chaque mécanisme implique la production de composés et métabolites spécifiques, comme des facteurs stimulateurs de croissance des plantes (Lorito, 1998). Selon Bissett (2004) ; la position taxonomique du genre *Trichoderma* se présente comme suit :

4.2. Approche Morphologique

Selon les auteurs, les espèces du genre *Trichoderma* ont été initialement définies sur la base de caractères morphologiques.

D'après Rifai (1969), la notion « d'espèces agrégées », basée sur les caractères microscopiques anamorphes. Une espèce agrégée est une entité composée de groupement d'espèces très similaires, difficiles à séparer. Rifai a créé neuf espèces agrégées de *Trichoderma*: *T. aureoviride* Rifai, *T. hamatum* (Bonord.) Bain., *T. harzianum* Rifai, *T. koningii* Oudem., *ongibrachiatum* Rifai. *T. piluliferum* Rifai, *T. polysporum* (Link: Fr.) Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai et *T. viride* (Rifai, 1969). Ce système semble le plus facilement utilisable par la communauté scientifique. Les sections *Trichoderma* décrites par Bissett (1991a), sont présentées ci-dessous (**Fig.2**).

➤ Section *Trichoderma*

Les espèces de cette section ont des conidiophores étroits et flexueux avec des branches et des phialides de forme subulée (effilée, en forme d'alène) ou lagéniforme (en forme de bouteille, renflé à la base et restreint en col vers le sommet), peu nombreuses, fréquemment en paires, et possèdent rarement plus de trois éléments dans le verticille. Nous pouvons citer comme exemple les espèces suivantes : *T. aureoviride*, *T. koningii*, *T. viride* et *T. atroviride* P. Karst. Ces deux dernières espèces sont caractérisées par la production d'une odeur de noix de coco caractéristique de l'antibiotique volatil 6-pentyl- α -pyrone (Dodd et al., 2003).

➤ Section *Longibrachiatum* Bissett

Caractérisée par des conidiophores peu ramifiés, ayant un grand nombre de phialides solitaires et disposées irrégulièrement, leur forme varie d'ampoule à lagéniforme ou cylindrique. Les espèces de cette section sont caractérisées par une croissance très rapide et

la production d'un pigment jaune vert sur milieu PDA. Dans cette section on peut citer les deux espèces *T. longibrachiatum* et *T. pseudokoningii*.

➤ **Section *Saturnisporum* Doi et al.**

Les espèces de cette section possèdent un système de ramification similaire à celui de *T. viride* avec des ramifications et des phialides peu nombreuses et fréquemment en paires, mais avec des phialides gonflées et des pustules conidiennes comme ceux de la section *Pachybasium*; elles se différencient par les ornements de leur conidie. Cette section a été proposée par Doi et al. (1987) comprenant les deux espèces *T. saturnisporum* Hamill et *T. ghanense* Doi, Abe et Sugiyama. Cependant, les travaux de Kuhls et al. (1997) et Turner et al. (1997) ont permis de classer ces deux espèces dans la section *Longibrachiatum*,

En se basant sur le séquençage de la région nucléotidique des espaces internes transcrits, (ITS1 et ITS2) de l'ADN ribosomal.

➤ **Section *Pachybasium* Sacc.**

Cette section inclut des espèces possédant des conidiophores fortement ramifiés qui sont regroupés en fascicules ou en pustules compactes, et possédant des branches relativement courtes et trapues portant des phialides gonflées en verticilles denses. Nous pouvons citer comme exemple : *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. virens* Miller, Giddens et Foster.

➤ **La section *Hypocrea* sect. nov.**

Cette section accueille les *Trichoderma*, formes anamorphes des *Hypocrea* qui ont une conidiogénèse diffuse, des conidiophores faiblement branchés, et des phialides cylindriques à subulées. Les sections *Longibrachiatum* et *Saturnisporum* ont été créées et décrites par Bissett (1984) et Doi et al. (1987) respectivement.

La forme téléomorphe des espèces de *Trichoderma* appartient à l'ordre des *Hypocreales*, au genre *Hypocrea*, mais certaines espèces de *Trichoderma* ont été rattachées au genre *Podostroma* P. Karst. et Sara waku Boedijn. Depuis 1860 plusieurs espèces du genre *Hypocrea* ont été cultivées et leur anamorphe *Trichoderma* sont décrits (Samuels, 1996).

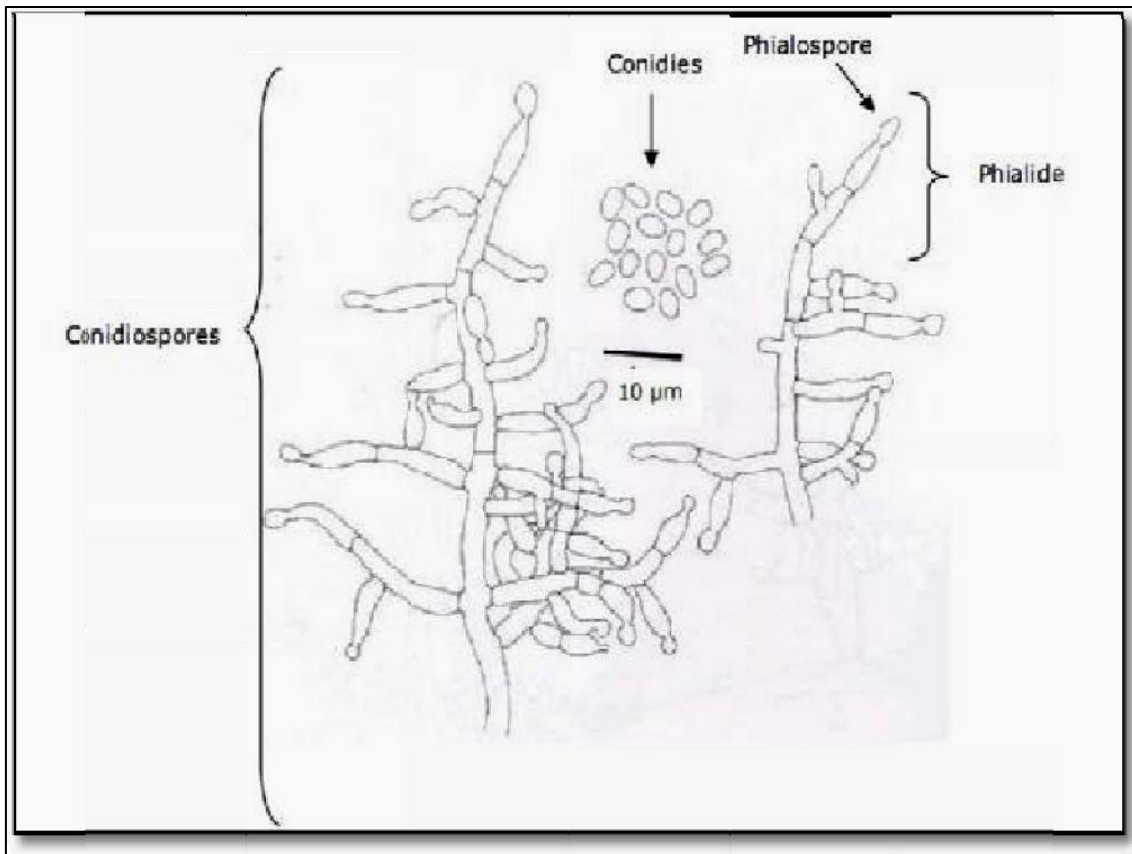


Figure 2 : Aspect morphologique d'un conidiophore de *Trichoderma longibrachiatum* (Samuels, 2004).

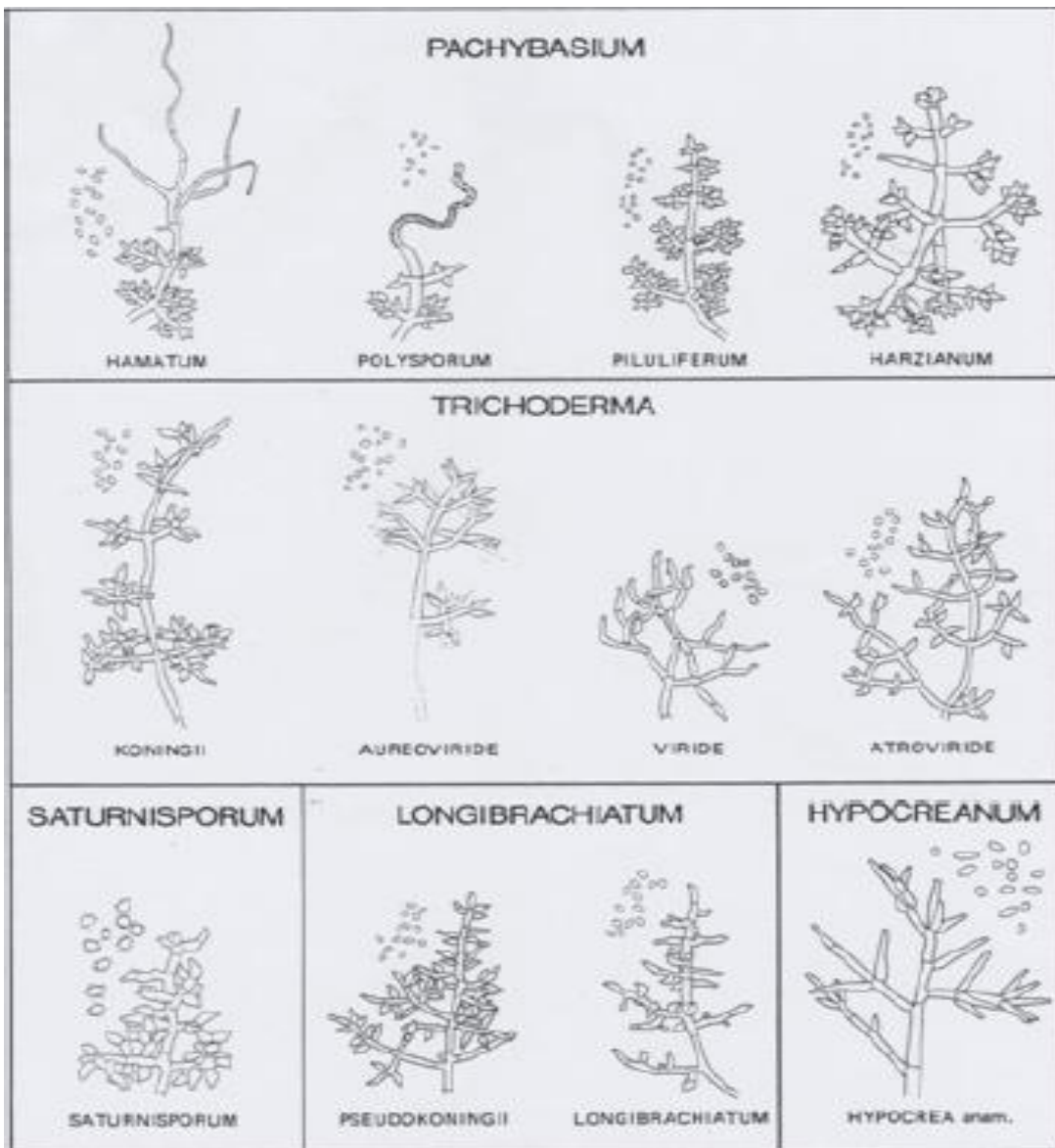


Figure 3: Les cinq sections de *Trichoderma* reconnues par Bissett (1991).

4.3. Approche moléculaire

Bissett (1991b) considère que la détermination des espèces chez le genre *Trichoderma* ne peut être résolue sans une intégration des études morphologiques, moléculaires et le cycle de vie du champignon. L'intégration de ces méthodes est accomplie pour la première fois par Samuels et al, (1998) pour résoudre l'identification des 10 espèces de la section *Longibrachiatum* basée sur la morphologie des teleomorphes et l'anamorphe et (ITS) de l'ADN ribosomal.

Le développement de nouvelles méthodes et des techniques d'analyse phylogénétique des séquences a permis d'identifier des nombreuses espèces de *Trichoderma* sur la base de gènes multiples. Kullnig-Gradinger et al. (2002) ont élaboré la première classification phylogénétique

« multigène » de *Trichoderma*, basée sur la région ITS1/ITS2, le gène endochitinase 42 (ECH42) et le gène du facteur d'élongation de la traduction (*tef1*) Elle a été portée sur 47 espèces distinctes de *Trichoderma*. Samuels et al. (2002) ont utilisé la région ITS de l'ADNr et le gène *tef1* pour étudier la systématique de deux espèces très proches, *T. harzianum* et *T. aggressivum* Samuels & W. Gams.

En 2005, le nombre des espèces d'*Hypocrea* / *Trichoderma* s'affiche à 88 espèces distinctes, dont 14 sont reconnues comme des holomorphes, 49 téléomorphes et 25 anamorphes (Druzhinina et Kubicek, 2005). En 2006, le genre est déjà composé de plus de 100 espèces définies phylogénétiquement (Druzhinina et al., 2006). Bisset et al. (2015), ont publié une liste de 256 noms acceptés d'espèces de *Trichoderma* contre lesquels ils doivent être protégés.

4.4 Ecologie et habitat

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin (Roquebert, 1996 ; Esposito et Silva, 1998), ceci peut être attribuable à la nature concurrentielle des espèces de *Trichoderma* et à la possibilité de production de divers métabolites (Gams et Bissett 1998).

Les espèces de *Trichoderma* sont considérées comme un élément majeur de la biodiversité des sols et qui sont principalement associées aux racines des plantes. Cependant, des études récentes ont révélé que les espèces *Trichoderma*, non seulement sont associées aux racines des plantes, mais elles persistent également à l'intérieur des tissus racinaires (Xia et al., 2011 ; Mulaw et al., 2013 ; Cummings et al., 2016).

Trichoderma se retrouve couramment dans le sol, sur le bois et sur les débris des végétaux (Dubos, 1986). Les espèces de *Trichoderma* sont favorisées par la présence d'un grand nombre de racines, qu'elles colonisent aisément. Presque tous les sols tempérés et tropicaux contiennent 101-103 propagules de *Trichoderma*/g du sol (Harman et al., 2004).

Davet (1983) a trouvé que le taux de propagules le plus faible est observé dans le cas des teneurs en eau les plus basses. Mais ce phénomène est réversible, si le sol est déshydraté, le taux de propagules revient à sa valeur d'origine. La température n'a aucun effet sur les populations du *Trichoderma* dans le sol, si la teneur en eau est maintenue constante.

Les *Trichoderma* sont omniprésents dans le sol, très remarquable par des besoins nutritionnels minimaux, une croissance rapide, une sporulation abondante et une capacité d'utiliser divers substrats. Les *Trichoderma* jouent un rôle important dans la décomposition de la matière organique, d'origine naturelle et xénobiotique, en attribuant une biofertilisation aux sols. Ils sont bien connus pour leur production d'enzymes de dégradation comme les Chitinases et cellulases impliquées dans la lyse du mycélium de nombreux champignons. Avec de telles qualités, les *Trichoderma* sont des agents de lutte biologique et stimulateurs de la croissance des plantes (Klein et Eveleigh, 1998).

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

L'utilisation d'une méthode de lutte biologique ne cherche pas à prévenir une éradication totale de l'espèce envahissante mais son objectif est d'en réduire suffisamment et durablement les effectifs pour les amener en dessous d'un seuil de nuisibilité, écologiquement et/ou économiquement acceptable. L'objectif principal est donc de rétablir un équilibre durable entre l'agent de lutte biologique et l'agent pathogène (Suty, 2010).

La capacité de *Trichoderma spp.* à contrôler des agent phytopathogènes du sol est connue depuis le début du XXIème siècle, mais ce n'est qu'à partir de 1990 que ce champignon a été commercialisé sous forme de biopesticide, ce qui indique la somme considérable de connaissances qu'il faut acquérir avant de permettre l'utilisation pratique d'une telle méthode de lutte(Lepoivre, 2003).

En sus, *Trichoderma spp.* Est utilisé commercialement pour la production des cellulases et d'autres enzymes qui dégradent les polysaccharides complexes. Il est fréquemment employé dans les industries alimentaires et textiles (Harman, 2006).

Les travaux de Baker (1988) ont montré que certaines souches de *Trichoderma* semblaient exercer une action stimulatrice sur la croissance de certaines plantes, selon ce contexte, Lynch et al. (1991) ont étudié l'effet de *Trichoderma* sur la croissance de la laitue et son aptitude à lutter contre *Rhizoctonia solani*Kühn et *Pythium ultimum* Trow.Ils ont aussi démontré l'effet de certaines souches de *Trichoderma* sur la croissance de la laitue et la germination des graines en absence de tout agent pathogène.

En 1952, Wood signalait l'efficacité de *Trichoderma viride* pour contrôler *Botrytis cinerea* sur la laitue (Caron, 2002).

Son antagonisme se manifeste généralement soit par une compétition, un mycoparasitisme, ou par une antibiose. Ces mécanismes peuvent intervenir seuls, en association ou (Lepoivre, 2003).

3.3. Mode d'action de *Trichoderma* sp

3.3.1. Antibiose

Chez les espèces de *Trichoderma*, l'antagonisme par antibiose est un mode d'action très répandu qui repose sur la production de métabolites secondaires de nature diverse, exerçant un effet inhibiteur voire létal sur l'agent pathogène (Vinale et al., 2007).

La production des métabolites secondaires par les espèces de *Trichoderma* est d'environ 180 métabolites appartenant à différentes classes de composés chimiques (Gams et Bisset 1998; Reino et al. 2008). Ces composés ont été caractérisés et qui peuvent être classés en trois catégories : des composés volatiles, des composés diffusibles et des peptaïboles (Ghisalberti et Sivasithamparam 1991). L'antibiotique 6-pentyl- α -pyrone (6PAP) qui appartient au groupe métabolites volatiles est produit par certaines espèces de *Trichoderma*, à savoir *T. viride*, *T. harzianum* et *T. koningii*, qui jouant un rôle dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* et *Fusarium oxysporum* (Jeleń et al. 2013). Les enzymes hydrolytiques dégradant la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes, comme les chitinases, β -1,3-glucanases, cellulases, protéases et autres hydrolases, sont parmi les métabolites diffusibles impliqués dans le mécanisme d'antibiose exercé par *Trichoderma* (Howell, 2003 ; Harman et al., 2004 ; Eziashi et al., 2006; De Castro et al., 2010).

Les *Trichoderma* peuvent aussi secréter des peptaïboles (polypeptides) ayant des effets antifongiques, antibactériens (Gram +) et antiviraux. Les composés appartenant à cette classe comprennent : les viridines, trichotoxines A et B, trichorovines (synthétisées par *T. viride*) ; trichorzianines A et B, trichorzines (synthétisés par *T. harzianum*) ; koningine, acide koningique, trichokonines (synthétisés par *T. koningii*) ; longibrachines (synthétisé par *T. longibrachiatum*) et autres (Vinale et al. 2006 ; Reino et al., 2008 ; Andrabi et al., 2011).

3.3.2. Compétition

La compétition pour les éléments nutritifs et l'espace est un des mécanismes impliqués dans le contrôle biologique des agents phytopathogènes (Tronsmo et Hjeljord, 1998).

La fixation de *Trichoderma* sur les racines des plantes favorise l'absorption et la concentration de quelques éléments nutritifs (cuivre, fer, phosphore, manganèse et le sodium) à partir de la solution du sol (Yedidia et al., 2001). Sivan et Chet (1989) ont démontré que la compétition pour les nutriments est le principal mécanisme utilisé par *T. harzianum* pour contrôler *Fusarium Oxysporum f. sp. melonis*.

3.3.3. Induction de la résistance systémique (ISR)

L'induction de la résistance systémique (Fig.4), dans les plantes par la synthèse de substances chimiques par *Trichoderma* a été démontré dans les années 90s (Elad, 1996 ; Enkerli et al., 1999).

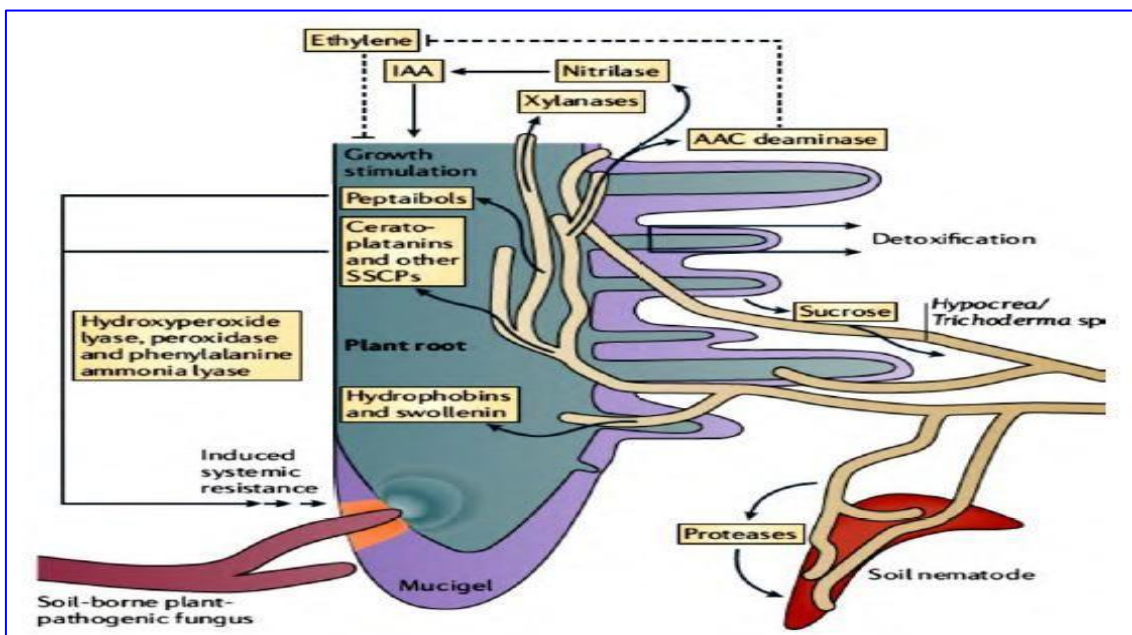


Figure 4: Les mécanismes d'induction de la résistance systémique par les souches de *Trichoderma* (Irina et al., 2011)

Cette résistance est soit localisée ou systémique. La reconnaissance entre la plante et le *Trichoderma* aboutit à la synthèse des phytoalexines (molécules fongitoxiques) (Howell, 2003; Shores et al., 2005).

Les *Trichoderma* sont capables d'éliciter les mécanismes de défense de la plante par la synthèse de l'enzyme ACC désaminase (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) et la phytohormone AIA (acide indole-3-acétique). La biosynthèse de l'éthylène (hormone végétale) augmente en réponse à l'ACC désaminase. Le développement et le système de défense de la plante sont liés entre eux par un réseau de voies de signalisations hormonales dont les acteurs centraux dans la défense sont l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène (Viterbo et al., 2010 ; Hermosa et al., 2012).

Les *Trichoderma* sont des opportunistes qui vivent en association bénéfique avec des plantes. Certaines souches établissent une colonisation au niveau des surfaces racinaires et pénètrent jusqu'à l'épiderme ce qui améliore la croissance racinaire, la productivité et la résistance au stress biotique et abiotique ainsi que l'assimilation et l'utilisation des nutriments (Harman et al., 2004).

Les *Trichoderma* influencent sur la croissance des plantes en synthétisant des phytohormones comme l'AIA et en améliorant le contenu du sol en nutriments par la solubilisation du phosphate et d'autres éléments nutritifs comme le Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} et Zn qui peuvent être non disponibles dans certains sols ou bien existent sous forme non assimilable pour les plantes (Altomare et al., 1999 ; Gravel et al., 2007).

3.3.4. Le mycoparasitisme

Le mycoparasitisme implique comme une première étape une reconnaissance de l'agent pathogène par l'agent de lutte (**Fig.5**). Le *Trichoderma* perçoit la présence de son hôte et commence à développer des hyphes en direction de ceux du pathogène par chimiotropisme. La reconnaissance se manifeste par une adhésion de *Trichoderma* aux parois de son hôte suivie par l'enroulement des hyphes du mycoparasite sur ceux de l'agent phytopathogène. Par la suite, une pénétration à l'intérieur des hyphes du pathogène se fait suite à des sécrétions d'enzymes de dégradation de la paroi de l'hôte comme les chitinases et les glucanases. Ce phénomène est suivi par une dissolution du cytoplasme. Le contenu cellulaire de l'hôte est rapidement lysé par la mise en jeu d'enzymes extracellulaires telles que la protéase et la lipase (Howell, 2003 ; Harman et al., 2004 ; Dubey et al., 2007)

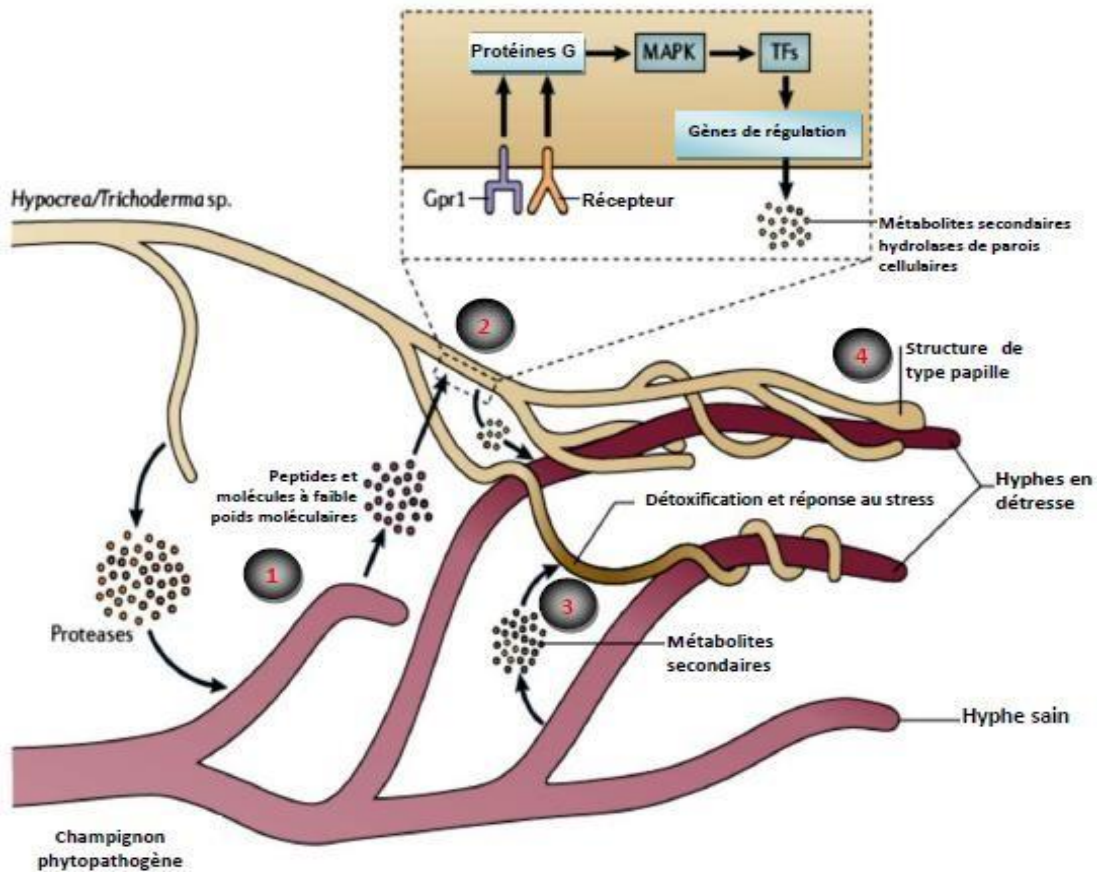


Figure.5: Mécanisme de mycoparasitisme de *Trichoderma* (Druzhinina et al., 2011)

4. Métabolites secondaires de *Trichoderma*

Le succès de ces espèces fongiques en tant qu'agents de lutte biologique contre divers micro-organismes phytopathogènes, est associée à la production d'un nombre excessif de composés et de métabolites bio-actifs, y compris les métabolites secondaires (Li et al., 2018).

Legende

Trichoderma

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

Les espèces de *Trichoderma* sécrètent divers composés volatils et non volatils (**Tableau 03**) tels que les alkylpyrones, peptaibols, polycétides, stéroïdes, isonitriles, sesquiterpènes, dicétopipérazines et d'autres. Ces composés impliquent une très grande variété d'action car ils inhibent

la croissance des bactéries et les champignons phytopathogènes. Par ailleurs, leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique (Liet al., 2019).

Les travaux menés par Moutassem *et al.*, (2020) montre que les métabolites secondaires extraits à partir de cinq espèces de *Trichoderma* ont montré une réduction significative de la croissance mycélienne allant de 6 à 75%. Cependant, l'efficacité augmente significativement avec l'augmentation de la dose. Néanmoins, les métabolites secondaires de *T. harzianum* et *T. viride* étaient les plus efficaces pour inhiber la croissance du mycélium. Cependant, la variation observée de l'activité fongicide chez les cinq espèces de *Trichoderma* pourrait être attribuée aux différents types de composés chimiques produits par les différentes espèces (Moutassem *et al.*, 2020). Le travail de Moutassem *et al.*, (2020) montre une nette augmentation des taux de polyphénols et de flavonoïdes chez toutes les plantes traitées avec des métabolites secondaires de différentes espèces de *Trichoderma*. L'analyse biochimique a indiqué une forte accumulation de polyphénols et de flavonoïdes dans les plantes traitées avec les espèces de *Trichoderma* avec des fréquences variables entre 51.15 et 69.54 mg g⁻¹, ainsi qu'entre 37.44 et 72.4 mg g⁻¹ chez les plantules traitées par les extraits fongiques. Cela peut également expliquer l'effet positif des espèces de *Trichoderma* dans la réduction de la gravité de la maladie causée par le flétrissement du pois chiche (Liet al., 2019).

Tableau 03: Certains métabolites volatiles et non volatiles secrétés par *Trichoderma*

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

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie du département des Biotechnologies et Agro-écologie de l'Université de Blida1. L'intérêt de cette étude c'est : la caractérisation de quelques métabolites d'intérêt de *Trichoderma sp.*

materiel

1. Matériel biologique

1.1. Souche fongique

Une souche de *Trichoderma sp* (TAF2018) fournie par le laboratoire de mycologie (Université -Blida-1-). Nous avons testé une espèce fongique qui a subi une caractérisation morphologique et culturale suivi par analyse moléculaire en utilisant des amorces universelles : Internal Transcribed spacer (ITS 1 et α TF).

2. matériels non biologiques

Milieux de culture

Deux types de milieux de culture sont mis en œuvre, par rapport aux besoins expérimentaux, Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Rappilly, 1968) et Milieu PDB (Potato Dextrose Broth) (**Voir annexe I**)

methodes

3. Purification des champignons

La purification de ces champignons a été réalisée après plusieurs repiquages par des transplantations successives des disques mycéliens de la souche testée sur le milieu de culture (PDA). L'incubation des cultures fongiques a été effectuée à une température de 25°C pendant 7 jours.

4. Extraction des métabolites secondaires

4.1 Fermentation

Le mot fermentation présente deux significations différentes pour les biochimistes et les microbiologistes industriels. En biochimie, les fermentations sont des voies cataboliques anaérobies au cours desquelles des composés organiques servent à la fois de donneurs et d'accepteurs d'électrons, la synthèse d'énergie étant réalisée par phosphorylation au niveau du substrat. En microbiologie industrielle, le terme de fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture

de micro-organismes. Ainsi, contrairement au sens biochimique, le terme de fermentation industrielle ne se réfère pas au métabolisme du micro-organisme. Ce terme s'applique en industrie pour des métabolismes aérobies et anaérobies. La production des métabolites

secondaires fongiques bruts (MSFB) est effectuée par la fermentation fongique en milieu liquide PDB.

Les cultures pures de *Trichoderma sp.*, ont été ensemencées dans des boîtes de pétri contenant un milieu le PDA à 28°C pendant 7 jours, deux à trois pièces (0.5 x 0.5 cm) ont été inoculées dans un Erlenmeyer de 250ml, contient 200 ml de PDB déjà stérilisé 1 seul fois à 120 °C pendant 20 minutes (Xiaoling *et al.*, 2010). Le col des Erlenmeyers ont été fermés par du coton cardé et recouvert d'une feuille de papier aluminium pour éviter toute sorte de contamination, les erlenmeyers sont incubés dans un incubateur /agitateur à 120 rpm et à une température de 30±2°C pendant 14 jours (**Figure 6**). (cour génie microbiologie M2)

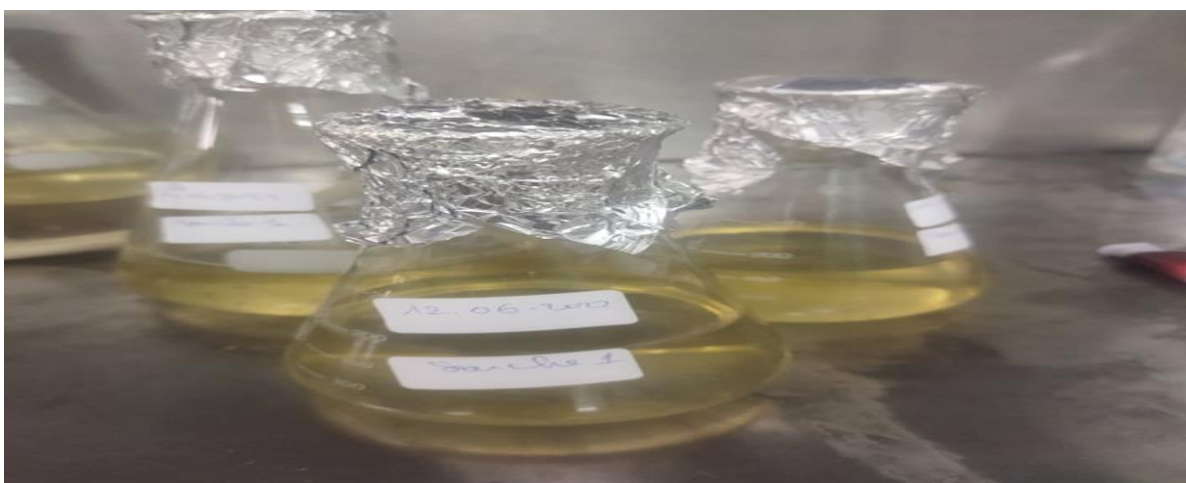


Figure 6: Fermentation en milieu liquide de sisolats fongiques.

1.2. Procédure d'extraction

Après la période optimale de 14 jours, le milieu a été filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman stérile N°01 pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat ; qui est par la suite centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 minutes. Le surnageant a été récupéré et additionné par le même volume d'Acétate d'Ethyle (AcEt) selon la technique utilisée par Badjil *et al.*, (2005) ; Gogoi *et al.*, (2008) et Qin *et al.*, (2009). Le mélange est agité à 120 tours/min pendant 1 heure à l'aide d'un agitateur magnétique à une température de 40°C, puis laissé dans une ampoule de décantation pour séparer la phase aqueuse de la phase

organique pendant 24h. L'extraction a été faite par (AcEt) à chaque filtrat, on rajoute un volume égal de solvant et on le met sous agitation pendant deux heures, la solution est ensuite mise en repos dans des ampoules à décantation pour séparer les deux phases, la phase organique a été récupérée pour être concentrée sous pression par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C (Figure 7) (Xiaoling *et al.*, 2010). On pèse les résidus, et on les dilue au Diméthyle de Sulfoxyde 20% (DMSO) pour obtenir l'extrait brut à une concentration de solution mère 10 mg/ml à conserver à 4°C jusqu'à leur utilisation. Enfin, on a conclu par la procédure d'extraction ; l'extrait brut des métabolites secondaires fongiques MSFB.



Figure 7 : A gauche un évaporateur rotatif «l'appareil d'extraction »et à droite une ampoule à décantation.

2. Analyse chimique des extraits de filtrat de culture de *Trichoderma* sp par FTIR (Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy)

Pour détecter les groupes fonctionnels des métabolites secondaires, une analyse spectrale FTIR, La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (Ou FTIR: Fourier Transformed Infra Red Spectroscopy) ; elle est réalisée à partir de filtrats de *Trichoderma* sp. En utilisant le logiciel Opus de TENSOR II/BRUKER.

Cette technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans l'échantillon.

Le TENSOR II est un spectromètre compact optimisé pour un haut rendement énergétique combiné à un grand compartiment échantillon.

Caractérisation par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse

«CG/SM»

Chromatographie en phase gazeuse:

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour la caractérisation des huiles.

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : injecteur, colonne capillaire dans le four et un détecteur. Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en Split ou avec division en flux. Il est utilisé pour l'analyse de solution concentrée. L'injection se fait à haute température. L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur ou il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur (hélium). Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. Ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante de flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne et évitant de saturer la phase stationnaire (Bouchonnet et Libong, 2008).

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique, la colonne analytique. Elle peut être de 2 types : colonne remplie ou capillaire. Les substances de l'échantillon traversent la totalité de la colonne ou est placée la phase stationnaire (Bouchonnet et Libong, 2008).

Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire. De leur volatilité si cette dernière est apolaire. Leur différence de propriétés physicochimiques leur confère des vitesses d'élution et ils sont donc séparés en fonction du temps. Ils arrivent à l'extrémité de la colonne, ils sont alors détectés et enregistrés. La CPG permet donc de séparer un mélange gazeux complexe par succession continue d'équilibre entre phase mobile, gazeuse et phase stationnaire (Bessombre, 2008).

Spectrométrie de masse (SM):

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux spectromètres de masses ; tous ont en commun trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. Encouplage avec la CPG, les composés sont élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à ionisation électronique (IE) ou à ionisation chimique (IC). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250°C) pour éviter la condensation des substances (Bouchonnet et Libong, 2008).

Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Dans le spectromètre de masse, les ions sont séparés selon leur rapport « masse/charge » à l'aide d'un champ magnétique ou électrique (Bessombre, 2008). Le faisceau d'ion ayant traversé l'analyseur de masse est détecté et transformé en un signal utilisable.

2.1. Couplage chromatographe gazeuse/spectrométrie de masse

L'analyse chromatographique a été réalisée au niveau du laboratoire de chromatographie au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico – Chimiques à Bou Ismaïl (Tipaza) (CRAPC).

Le couplage CG/SM est aujourd'hui une des techniques parmi les plus utilisées de la chimie analytique. L'association des deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant. La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression. En effet, la SM requiert un niveau de pression très bas, alors que la CG se déroule à un niveau de pression plus élevé (Cavalli et al., 2002). Le bombardement de substance par un faisceau d'électrons d'énergie de l'ordre de 70 eV provoque leur ionisation et leur fragmentation. Les fragments ioniques positifs forment alors le spectre de masse caractéristique du composé. Les spectres de masses ainsi obtenus sont ainsi comparés avec ceux des produits de références contenus dans des bibliothèques informatisées contenant plusieurs milliers de spectres (Bouchonnet et al., 2002).

2.2. Appareillage et conditions de chromatographie

La séparation des hydrocarbures et d'autres composés volatils a été déterminée avec un GC (Shimadzu, Japon) équipé d'un détecteur sélectif de masse QP5050A MSD. Les analyses GC-MS ont été effectuées avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

L'identification putative des métabolites volatils a été effectuée par trois cycles chromatographiques différents en utilisant trois colonnes capillaires différentes avec des phases stationnaires différentes. Pour la colonne non polaire (BP1), 30 m × 0,25 mm × 0,25 mm, le programme du four avait une température initiale de 60°C pendant 1 min, puis une course de 108°C/min jusqu'à 300°C avec un maintien final à 300°C (5 min) ; la température de l'injecteur était maintenue à 300°C (sans division) et la température du détecteur était à 320°C. Pour la colonne moyennement polaire (BP10), 50 m × 0,33 mm × 0,25 mm, le programme du four avait une température initiale de 60°C pendant 2 min, puis une course de 108°C/min pour 260°C, avec un maintien final à 260°C (5 min) ; la température de l'injecteur a été maintenue à 260°C (sans division) et la température du détecteur à 280°C. Pour la colonne polaire haute (BPX70), 30 m × 0,25 mm × 0,25 mm, le programme du four avait une température de 50°C pendant 0,5 min, puis une course de 108°C/min jusqu'à 245°C, avec un maintien final à 245°C (5 min); la température de l'injecteur était maintenue à 240°C (sans division) et la température du détecteur était de 260°C. Trois répliques avaient fini avec chaque colonne dans ces expériences. Le gaz porteur est de l'azote (N₂) à un débit linéaire de 25 cm/s. Le détecteur MS a fonctionné à 194°C la plage de balayage était de 35 à 450 m/z à une vitesse de balayage de 0,50 balayage/s. Le délai de solvant était de 15 minutes. Pour vérifier la pureté de chaque pic GC, MS a été prise à différentes parties de chaque pic. Les hydrocarbures saturés normaux (C₇-C₃₀), le cyclohexane, le cyclopentane, les acides gras, l'alcool, les dérivés du benzène et d'autres composés ont été putativement identifiés par une recherche dans la base de données spectrale de masse (NIST/EPA/NIH) suivie d'une mise en correspondance des données MS. Tous les composés volatils présentant des spectres de masse avec des facteurs d'appariement de 90 % ont été placés sur une liste positive de métabolites provisoirement identifiés.

Réactif

L'acétate d'éthyle, le n-butanol, le n-hexane et le méthanol (haute pureté 99,99 %) ont été obtenus auprès de Baker (USA) et vérifiés par GC-MS avant l'analyse des métabolites volatils..

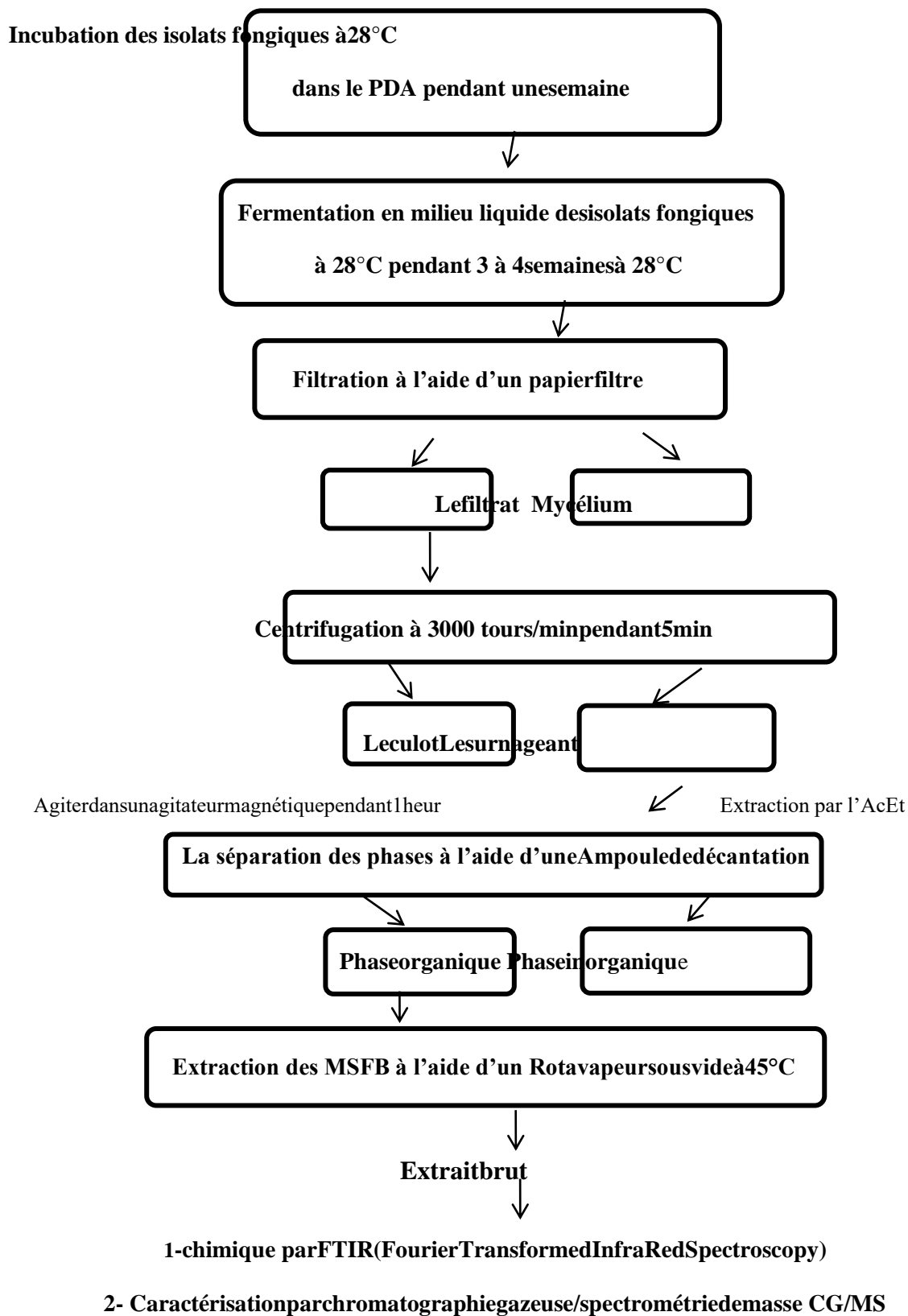


Figure 8 : Les procédures de fermentation et de l'extraction des métabolites secondaires du *Trichoderma* avec l'acétate d'éthyle (Barik *et al.*, 2010 ; Xiaoling *et al.*, 2010).

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus dans notre étude seront présenter comme suit : à La caractérisation macroscopique et microscopique, les groupes fonctionnels présents chez la souche fongique étudiée et le profil chimique des métabolites secondaires de cette souche.

1. La caractérisation macroscopique et microscopique

Après 7 jours d'incubation, le *Trichoderma* a montré un bon développement avec une bonne sporulation sur le milieu PDA.

1.1. Caractérisation macroscopique :

Trichoderma a poussé sous forme de cercles concentriques réguliers, les colonies sont compactées en touffe. Un mycélium aérien, blanc se forme d'un cercle, très abondant, vigoureux, épais et dense. Trois jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite (**Figure 9**) ces résultats ont été cités dans les travaux de: (Boukerchaoui, 2018) et (Hamrouni, 2019).

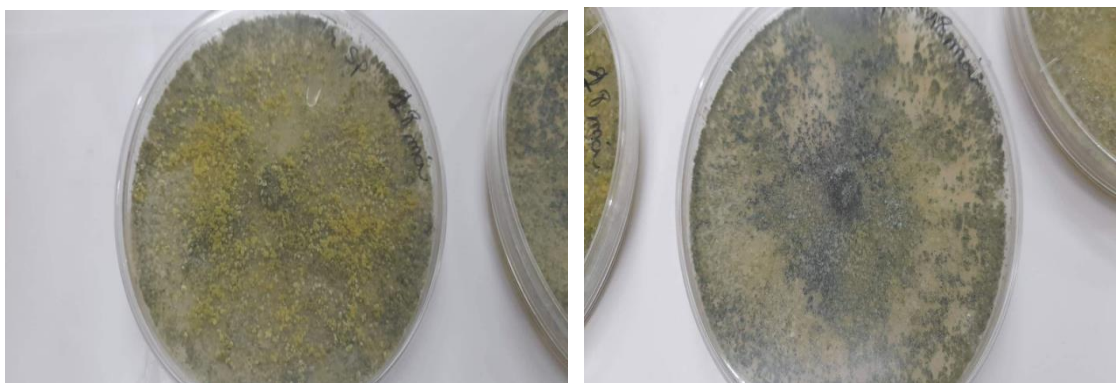


Figure 9 : Aspect macroscopique de *Trichoderma* sp

1.2. Caractérisation microscopique:

L'observation microscopique de *Trichoderma* (Gx40) a montré un mycélium composé d'hyphes septés (**Figure 10**), ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (10.D) ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés et ils portent des phialides (10.C). Ces derniers portent des conidies (10.E). Notre résultat est en accord avec les résultats de (Boukerchaoui, 2018).

Figure 10: Aspect microscopique (C, D, E) de *Trichoderma sp.*, C : phialides contenant des phialospores (x40) D : conidiophore (x40) E : spores.

2. Analyse chimique d'extrait de filtrat de culture de *Trichoderma sp.* par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (Ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed Spectroscopy).

L'analyse spectrale de *Trichoderma* par FTIR a montré la présence des plusieurs pics d'absorption et de Transmittance (Voir Annexe II) et 12 groupes chimiques identifiés selon les bandes d'absorption à partir de l'extrait de filtrat de culture de *Trichoderma sp.* de la phase organique. (Tableau 4) et (tableau 5).

Tableau 4: Les groupes fonctionnels identifiés à partir de l'extrait de filtrat de culture de *Trichoderma* de la phase aqueuse.

Groupes chimiques	Longueurs d'ondes (bandes d'absorption)	Types de Liaisons chimiques
Alcanes	3000-2840	C-H
Alcènes	1667-1640	C=C
Alcynes	2260-2100 1370-1220	C≡C
Aromatiques mononucléaires	600-420 900-675 1300-1000 1500-1400 2000-1650	C-H
Hydrocarbures aromatiques monocycliques	1300-1000 1500-1400 600-420	C-H
Alcoolsetphénols	3550-3200 1390-1330 1200-1000 1420-1330 769-650	C-O, O-H
Alcools secondaires	1124-1087	C-O

Ethers Vinyliques	1225-1200	C-O
Cétones	1870-1540	C=O
Acides carboxyliques	1720-1706	C=O
Acides carboxyliques	3300-2500	O-H
Esters	1300-1000	C-O
Esters aliphatiques saturés	1730-1715	C=O
Anhydrides cycliques	952-909 1299-1176	C-O
Amides	3350-3180	N-H
Amides tertiaires	1680-1630	C=O
Lactames	1750-1700	C=O
Lactames	800-700	N-H
Amines primaires aliphatiques (pures)	3400-3300	N-H
Amines aromatiques	1342-1266	C-N
Isonitriles (RNC)	2280-2000	R-N \equiv C

Tableau 5: Les groupes fonctionnels identifiés à partir de l'extrait de filtrat de culture de *Trichoderma sp* de la phase organique.

Groupes chimiques	Longueurs d'ondes (bandes d'absorption)	Type de Liaisons chimiques
Alcynes	2260-2100	C≡C
Aromatiques mononucléaires	600-420 1300-1000 1500-1400	C-H
Alcool et phénols	3550-3200 1200-1000	C-O, O-H
Cétones	1870-1540	C=O
Hydrocarbures aromatiques monocycliques	1300-1000 1500-1400 600-420	C-H
Esters	1300-1000	C-O
Amides	3350-3180	N-H
Amides tertiaires	1680-1630	C=O
Amines primaires aliphatiques (pures)	3400-3300	N-H
Isonitriles (RNC)	2280-2000	R-N≡C
Nitrates (RONO ₂)	1660-1625 870-833	N-O
Composé silicium	3700-3200	Si-O-H

3. Analyse de l'extrait de filtrat de *Trichoderma* ssp par CG/SM

Les résultats obtenus de l'analyse d'extrait de filtrat de *Trichoderma sp* par CG/MS au niveau de centre de recherche CRAPC, à Bou-Issmail (Tipaza), a montré que cette souche est très riche en molécules bioactives, 42 composés sont enregistrés avec des différentes valeurs en temps de rétention et en pourcentages.

Les molécules majoritaires ou chymotypes trouvées de la souche testée sont : 12-Hydroxy-4-méthyl-3-nitropyridine (17.94%), alpha-Phellandrene (7.74%), Morphine (6.92%), Cyclopentane-1,2-diol (4.39%) et trois composés minoritaires sont aussi identifiés tels que Benzèneéthanol, 4-hydroxy- (3,15%), 2-(4-Méthoxyphényl) éthanol (1,22%), N-Amino pyrrolidine (3,17%).

Discussion générale

L'objectif de cette étude était de développer une méthode simple et fiable pour l'étude des métabolites volatils excrétés par le *Trichoderma sp* cultivé (sous des solvants typiques) ; certains paramètres ont été choisis lors du développement de la méthode. La culture du champignon a été réalisée sous incubation pour éviter la limitation d'oxygène pendant la croissance du champignon et pour permettre l'extraction de l'échantillon, la séparation chromatographique et la détection MS. Afin de réduire le risque de variations des mélanges par manipulation manuelle, des procédures d'extraction ont été effectuées avant le mélange chimique et l'analyse GC-MS. Les données GC-MS ont été déconvoluées à l'aide du logiciel NIST et les spectres de masse mesurés ont été appariés aux entrées de la bibliothèque de composés. Les résultats de l'analyse chimique réalisée par la méthode FTIR a mis en évidence la présence environ 25 groupes chimiques selon les bandes d'absorption. Les bandes les plus importantes, et les plus riches en information, dans les spectres de composés aromatiques apparaissent dans la plage des basses fréquences entre 900 et 675 cm^{-1} . Ces fortes bandes d'absorption proviennent des déformations angulaires hors du plan, des liaisons C-H du cycle. La vibration de déformation dans le plan de la liaison O-H apparaît globalement entre 1420 et 1330 cm^{-1} . Dans les alcools primaires et secondaires, la déformation de la liaison O-H dans le plan est couplée avec les vibrations de balancement de la liaison pour donner deux bandes : le premier absorbe vers 1420 cm^{-1} , l'autre vers 1330 cm^{-1} . Ces bandes ne sont que peu caractéristiques. Les alcools tertiaires, pour lesquels aucun couplage ne peut avoir lieu, présentent une bande unique dans cette région, la position de celle-ci dépend du degré de formation des liaisons hydrogène. Les spectres des alcools et des phénols pris à l'état liquide,

présentent une large bande d'absorption entre 769 et 650 cm^{-1} due à la déformation hors du plan du groupe O-H lié. Les anhydrides cycliques affichent des bandes vers 952- 909 et 1299- 1 176 cm^{-1} . Les bandes d'absorption des nitrites sont parmi les plus fortes que l'on puisse observer dans les spectres IR.

Notre étude a mis en évidence la présence des vibrations d'élongation C-O : Les cétones, les aldéhydes, les acides carboxyliques, les esters carboxyliques, les lactones, les halogénures d'acides, les anhydrides, les amides et les lactames qui présentent une forte bande d'absorption pour l'élongation du groupe entre 500 et 3300 cm^{-1} . Sa position relativement constante, sa forte intensité et son indépendance relative vis-à-vis des bandes interférentes font d'elle une des bandes les plus faciles à reconnaître dans les spectres IR. Par référence à d'autres résultats, Won Chew et al 2012 a montré que l'analyse infrarouge de transformation de Fourier (FTIR) réalisée de *Trichoderma sp.* a révélé que *Trichoderma sp.* possède des groupes fonctionnels tels que des groupes amino et hydroxyle.

Les bandes caractéristiques principales enregistrées comprenaient : une large bande de vibration d'élongation O-H et N-H obtenue autour de 3413 cm^{-1} pour la liaison intermoléculaire d'hydrogène (groupes OH liés à H) attribuée à des groupes phénoliques. Les hydrogènes de méthylène (-CH₂-) ont donné naissance à deux bandes d'élongation aliphatiques C-H. Un pic prononcé à 1652 cm^{-1} pourrait être attribué à C=C aromatique, C=O et/ou C=O de cétones conjuguées ou à une élongation C=N d'amide. La déformation C-H asymétrique de méthyle a été observée à 1458 et 1053 et 1034 cm^{-1} pourraient être attribués à l'élongation C-O d'alcool, de sulfoxydes, de glucides ou de substances similaires aux polysaccharides. L'étude de Wei Li et al 2015, a prouvé dans Les spectres IR la présence des signaux de carbonyle (-C = O) visibles à 1 655,07 cm^{-1} ; vibrations d'élongation de la liaison C-H dans -CH₃ visible à 2 966,75 cm^{-1} , 2,871,14 cm^{-1} et 3,005,30 cm^{-1} ; Une vibration de déformation de la liaison C-H dans -CH₃ à 1 364,34 cm^{-1} , 1, 311. 12 cm^{-1} et 1 244,07 cm^{-1} ; Et des vibrations de déformation de la liaison C-H d'hydrocarbures oléfines à 921,47 cm^{-1} et 878,69 cm^{-1} . La séparation des composés isolés de *Trichoderma sp* a été réalisée avec trois colonnes capillaires différentes. La première colonne (BP1) a permis une rétention raisonnable des métabolites peu volatils, mais les autres composants n'ont pas été séparés et sont passés dans la deuxième colonne (BP10) et la troisième colonne (BPX70) tandis que les métabolites volatils ont été détectés. La séparation sur colonne de nombreux composés, y compris certains isomères cis et trans du 1-éthyl-4-

méthyl-cyclopentane et du 1-méthyl-2-(4-méthylpentyl) cyclopentane et d'autres composés volatils, a pu être identifiée dans différentes groupes en utilisant trois colonnes capillaires différentes de GC-MS en fonction de leur structure chimique, telles que les métabolites aromatiques simples, les terpènes, les métabolites d'isociano, certains polycétides, les buténolides et les pyrones. Plus de 42 composés volatils ont été identifiés au cours de l'expérience. 2-Hydroxy-4-méthyl-3-nitropyridine (17.94%), alpha-Phellandrene (7.74%), Morphine (6.92%), Cyclopentane-1,2-diol (4.39%). (Sivasithamparam et Ghisalberti, 1998) ont rapporté que les espèces de *Trichoderma* étaient connues pour produire plus de 40 métabolites différents qui contribuaient à leurs actions mycoparasites et antibiotiques. qui a été identifié dans cette étude était la 6-pentyl-alpha-pyrone (6-PP), qui a été caractérisée à l'origine par Collins et Halim et identifiée comme l'un des composés bioactifs clés de plusieurs espèces, par exemple *T. harzianum* et *T. koningii* tel qu'examiné par Hanson (Hanson, 2005). Il s'agit du composé volatil le plus important obtenu à partir de la pyrone. Ce composé est un agent aromatisant non toxique qui a été synthétisé chimiquement à des fins industrielles avant sa découverte en tant que produit naturel. La 2-nonanone et la 2-undécane ont été décrites comme étant produites par *T. aureoviride* IMI 91968 (Bruce, 2000); 3-octanone, 3-octanol, bêta-sesquiphellandrène, 2-pentylfurane et 1-octène-3-ol ont été détectés dans des cultures de *T. atroviride* CCM F-536 (anciennement classé comme *T. viride*) et *T. atroviride* I2 (Viden et al., 2008) La 2-heptanone a déjà été signalée pour *T. viride* (isolat T60) (Wherthley, 1997); l'alcool phényléthylique serait produit par *T. harzianum* 201 (Fidler, 2001).

les effets biologiques du 6-PP sont nombreux : il a été démontré qu'il réduit la production de la mycotoxine déoxynivalénol par *Fusarium graminearum* (Vinal et al., 2008), et qu'il exerce des propriétés antifongiques en réduisant le taux de croissance mycélienne de *Rhizoctonia solani* et *F. oxysporum* f. sp. lycopersici (Scarsellitti, 1994). Depuis Vinal et al (2008) ont rapporté que le 6-PP a un effet régulateur sur les semis de blé (favorise la croissance à de faibles concentrations et inhibe la croissance à de fortes concentrations de 6-PP). Par rapport aux plantes témoins, les plants de tomates se sont développés plus vigoureusement et ont eu un système racinaire plus étendu après que leurs feuilles aient été aspergées de 6-PP (Scarsellitti, 1994).

À notre connaissance, il s'agit de la première application utilisant trois colonnes capillaires différentes via trois types de solvants (non polaires, moyennement polaires et hautement

polaires) pour identifier de manière supposée un nombre massif de composés volatils du champignon filamenteux *Trichoderma sp*, obtenant quelques molécules moléculaires et des composés volatils tels que des composés aromatiques simples, certains polycétides tels que les pyrones et les buténolides, des terpènes volatils et des métabolites d'isocyanate. Ce sont toutes des substances relativement apolaires et moyennement polaires avec une pression de vapeur significative. Les métabolites polaires ont un poids moléculaire élevé, ce qui, comme les peptides, permet une séparation réussie en utilisant des phases stationnaires BPX70 à colonne polaire élevée.

Ces substances volatiles produites pourraient diffuser facilement et inhiber la croissance de l'agent pathogène *in vitro* et *in situ*. Nous concluons que la souche de *Trichoderma sp* peut servir comme agent de lutte biologique efficace.

Conclusion et perspective

L'agriculture intensive, en utilisant des quantités importantes de pesticides chimiques, occasionne de multiples dommages sur la biodiversité, alors que des solutions alternatives plus écologiques peuvent être envisagées. Actuellement les recherches s'orientent vers l'exploitation des ressources naturelles de la biodiversité pour sa protection et sa conservation comme élément des services écosystémiques de production.

Au terme de ce travail consacré essentiellement à caractériser les molécules d'intérêt d'une souche fongique, il nous a paru intéressant de dégager des conclusions auxquelles nous avons abouti. La caractérisation à travers le FTIR de *Trichoderma* a montré la présence de plusieurs pics d'absorption et de Transmittance et 12 groupes chimiques tels que : les cétones, les aldéhydes, les acides carboxyliques, les esters carboxyliques, les lactones, les halogénures d'acides, les anhydrides, les amides et les lactames, identifiés selon les bandes d'absorption à partir de l'extrait de filtrat de culture de la phase organique.

Les résultats de l'analyse GC/MS de *Trichoderma sp* ont montré la présence de 42 molécules et qui sont enregistrées avec des différentes valeurs en temps de rétention et en pourcentages. Les molécules majoritaires ou chymotypes de la souche testée sont : 12-Hydroxy-4-méthyl-3-nitropyridine (17.94%), alpha Phellandrene (7.74%), Morphine (6.92%), Cyclopentane-1,2-diol (4.39%), trois composés minoritaires sont aussi identifiés tels que Benzèneéthanol, 4-hydroxy- (3,15%), 2-(4-Méthoxyphényl) éthanol (1,22%), N-Amino pyrrolidine (3,17%). Ce qui montre que notre souche a la capacité de produire des métabolites secondaires volatils et non volatils, la nature chimique de ces métabolites offre la possibilité de l'utilisation de cette souche dans la lutte biologique dans les actions de biocontrôle, de phytostimulation et phytoremédiation.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives parmi lesquelles :

- ❖ Criblage des métabolites secondaires d'intérêt.
- ❖ Tester et exploiter ces métabolites dans les traitements biologiques (*in vitro et in situ*).
- ❖ Tester et exploiter ces métabolites dans la phytostimulation (*in vitro et in situ*).

- ❖ Étudier le mécanisme d'action: induction du système de la résistance de la plante (ISR).

Références bibliographiques.

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

Aiteche H., & Benzid K., (2018). Activité antagoniste de la souche *Trichoderma asperellum* (T34) sur demi-tubercules.

Allison, D.G., Gilbert, P., Lappin-Scott, H.M. and Wilson, M. eds .,(2000) Community Structure and Co-operation in Biofilms, Fifty-ninth symposium of the Society for General Microbiology held at the University of Exeter September 2000, Cambridge University Press, Cambridge.

Ann Won Chew , Nik Norulaini Nik Ab Rahman , Mohd Omar Ab Kadir and C.C.Chen.,(2012) International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE vol.30

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

Beegle C.C & Yamamoto T(1992) History of *Bacillus thuringiensis* berliner Research and Development. Canadian Entomologist 124 : 587-616 Biosynthèse, fonction et métabolique ingénierie de plante volatil

Bissett J., Gams W., Jaklitsch W., and Samuels G.J., 2015. Accepted *Trichoderma*

Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum*.

Bouchonnet S., Libong D., "Le couplage chromatographie en phase gazeuse spectrométrie de masse", Département de chimie, Laboratoire des mécanismes réactionnels, Ecoles polytechnique, Palaiseau CEDEX., (2002).

Bovin, G., (2001). Parasitoids et lutte Biologique : paradigme ou panacée. Centre de recherche et de développement en Horticulture, Agriculture et Agrolimentaire. Canada. Vol 2N2.

Bruce, A., Wheatley, R.E., Humphris, S.N., Hackett, C.A., Florence, M.E.J.; Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi; *Holzforschung*, (2000); 54: 481– 486.

Cambridge.,(1994). *Zentralblatt Für Bakteriologie* 1995 4 ;282(3) :337-8.

Carboué Q., Perraud-Gaime I., Tranier M.S., Roussos S.,(2017). Production of Microbial Enzymes by Solid State Fermentation for Food Applications. In : Ray, R.C., Rosell, C.M. (eds.) *Microbial Enzyme Technology for Food Applications*, pp. 437-451. CRC Press, Boca Raton.composés organiques. *Nouvelle Phytologie*198 (1) : 16 - 32

Collins, R.P., Halim, A.F.; Characterisation of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma virens* (Pers.); *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1972); 20: 437 – 438.

Cooney, J.M., Lauren, D.R., Di Menna, M.E.; Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2001); 49: 522– 526.

De la Cruz Quiroz R., Roussos S., Hernández D., Rodríguez R., Castillo F., Aguilar C.N.,(2015). Challenges and opportunities of the biopesticides production by solid-state fermentation : filamentous fungi as a model. *Critical Reviews in Biotechnology*. 35, 326-333.

Doudareva N, Klempien UN, Mühlemann JK, Kaplan., (2013).enzymes. Thèse de doctorat d'état, Reims.expenditures by children in foster care. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*.

Dubos B., 1986. L'utilisation des *Trichoderma* comme agent de lutte biologique à l'égard de deux parasites aériens : *Chondrostereum purpureum* (Pers.ex Fr) Pouzar(Plomb des arbres fruitiers) et *Botrytis cinerea* Pers.(pourriture grise de la vigne). In : INRA Publ.,Eds. L'emploi d'ennemis naturels dans la protection des cultures. Les colloques de l'INRA, N°34. 10 janvier 1985. Versailles (France), pp 37-49.

Fiedler, K., Schu'tz, E., Geh, S.; Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials; International Journal of Hygiene and Environmental Health, (2001); 204: 111 – 121.

Gams W, Bissett J. 1998. Morphology and Identification of *Trichoderma* . In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London : Taylor and Francis Ltd. pp. 3–34.

Glazer, A.N. and Nikaido, H.,

(1995) *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*, W.H. Freeman, New York

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

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

Hanson, J.R.; The chemistry of the bio-control agent, *Trichoderma harzianum*; *Science Progress*, (2005); 88: 237 – 248.

Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., & Lorito M.,
(2004). *Trichoderma*

Harman G.E. (2011). Trichoderma spp not just for biocontrol any more.
Pytoparasitica

Harman G.E. et Kubicek C.P., (1998). Trichoderma and Gliocladium. Basic
Biology, Taxonomy and Genetics1. Ed.Taylor &Francis, London. 278 p.

Harman G.E., (2006). Overview of mechanis and uses of Trichoderma spp.
Phytopathology, 96: 190–194.

Harman G.E., (2006). Overview of mechanis and uses of Trichoderma spp.

Harman J. S., Childs G. E., & Kelleher K. J.,(2000). Mental health care
utilization and

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. et Lorito, M., (2004).
Trichodermahe Society for General Microbiology held at the University of
Exeter September .,(2000), Cambridge University Press, Cambridge.

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

Howell C.R.,(2003). Mecanismos employed by Trichodema. Species in the
biological control of plant diseases: the history and evolution of current
concepts. Plant diHulse JH. Biotechnologies : Past history, present state and
future prospects. Trends Food Sci Technol .,(2004) 1;15(1):3-18.

Howell C.R., (2003).Mechanisms employed by Trichoderma species in the
biological control of plant diseases: the history and evolution of current
concepts. Plant Disease. (1), 87, 4-10.

Hulse JH. Biotechnologies: Past history, present state and future prospects.
Trends Food Sci Technol .,(2004)1;15(1):3-18.

Immunologie et microbiologie laboratoire de pasteur algerie.

J. M. Bruno-Bárcena, F. Siñeriz.,(2000) -- Industrial Biotechnology

Jaklitsch, Walter M.; Samuels, Gary J.; Dodd, Sarah L.; Lu, Bing-Sheng; Druzhinina, Irina S., (2006). "Hypocrea rufa/Trichoderma viride: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia". *Studies in Mycology*. 56: 135–177. Kühler W. The uses of life. A history of biotechnology, robert bud. cambridge universitypress,

Kumar, A., Asthana, M., Gupta, A., Nigam, D., Mahajan, S., (2018). Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of Penicillium, in: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. pp. 47–68.

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

Leghlimi H. (2013). Cellulase de souches fongiques issues du sol d'un milieu extrême

Leghlimi H., (2013). Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Doctorat en Sciences Microbiologie. Option : Biotechnologie et Génie Microbiologique. Université Constantine 1. Doctorat de l'université de Reims Champagne Ardenne. Discipline Microbiologie-Biotechnologie. Ecole Doctorale Sciences, Technologie, Santé. Section CNU 64-Biochimie et Biologie Moléculaire. 150 p.

Leghlimi H., (2020). Biotechnologie fongique 1. Polycopié de Cours. Département Microbiologie. Université Mentouri Constantine 1. Algérie.

Lewandowski I., Härdtlein M., Kaltschmitt M., (1999). Sustainable crop production : definition and methodological approach for assessing and implementing sustainability. *Crop Science*. 39, 184- 193.

Li, M.-F., Li, G.-H., & Zhang, K.-Q., (2019). Non-Volatile Metabolites from *Trichoderma* spp. Metabolites, National Library of medicine(3),58.

Li, Y.T., Hwang, S.G., Huang, Y.M., Huang, C.H.,(2018). Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. Crop Protection, 110 : 275–282.

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

M.Daniel.,1991.les application des biotechnologies dans l'agriculture et l'industrie alimentaire.N148

Magan, N., Evans, P.; Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoil- age; Journal of Stored Products Research, (2000); 36: 319 – 340.

Martinez -Padrron Hadassa. Y. López-Santillán José Alberto, Estrada-Drouaillet Benigno et Osorio-Hernández Eduardo.,(2013)institut d'Ecologie AppliquéeVol. 17(37), p.1162-1171,12.

Martins S., Mussatto S.I., Martínez-Avila G., Montañez-Saenz J., Aguilar C.N., Teixeira J.A.,(2011). Bioactive phenolic compounds : Production and extraction by solid-state fermentation. A review. Biotechnology Advances. 29, 365-373.

Mathivanan, N., Prabavathy, V.R., Vijayanandraj, V.R., (2008). The effect of fungal secondary metabolites on bacterial and fungal pathogens, in: Secondary Metabolites in Soil Ecology. Springer, pp. 129–140. Micro element concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant Soil 235, 235–242.

Moutassem Dahou, Lakhdar Belabid et Yuva Bellik., (2020). Efficiency of secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Fusarium* wilt in chickpea. *J. Crop Prot.*,(2020), 9 (2): 217-231.

names in the year 2015. *IMA FUNGUS*, 6(2): 263–295. doi:10.5598/ima fungus.

Newman, David J.; Cragg, Gordon M.; Snader, Kenneth M. (2000). "The influence of natural products upon drug discovery (Antiquity to late 1999).

Parker M.W. & Feil S.C. (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 88 : 91-142.

Perry J., Staley J. et Lory S., *Microbiologie, Dunod.*, (2004) *Phytopathology*, 96 :190–194.

Roussos S., Lonsane B.K., Raimbault M., Viniegra Gonzalez G., (1997). *Advances in solid state fermentation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.* 631 pp.

Samuels G.J., (2006) *Trichoderma : Systematics, the sexual state, and ecology.* *Phytopathology*, 96 :195 -206.

Samuels G.J., Chaverri P., Farr D.F., Mc Cray E.B., (2004) : *Trichoderma Online. Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA.* Retrieved August 31, 2004, from

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

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlenry, L. A. and Petrin, O., (2002) Scarselletti, R., Faull, J.L.; In vitro activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; *Mycological Research*, (1994); 98: 1207 – 1209.

Schnu`rer, J., Olsson, J., Bo`rjesson, T.;Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage; Fungal Genetics and Biology, (1999); 27: 209 – 217.sec.nov. Canadian Journal of Botany 62: 924-931.

Shelton, T., (1997). Trichoderma for Biocontrol of Plant Pathogens: From Basic Research to commercialized products.Cornell-NYSAESGeneva.species - opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews 2, 43-56. species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature reviews microbiology, 2(1) : 43.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Woo S. L., Nigro M., Marra R., Vizcaino, J.A. ; Sanz, L. ; Cardoza, R.E. ; Monte, E. & Gutierrez, S., (2005). Detection of putative peptide synthetase genes in Trichoderma species: Application of

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.

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

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00003-X> Consulté le:5/09/2022.

<https://doi.org/10.3390/metabo9030058>. Consulté le:18/06/2022.

<http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.8>. Consulté le :01/09/2021.

<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/bcconf/talks/harman.htm>). Consulté le:28/06/2022.

<https://polytech.univ-amu.fr> Consulté le :30/6/2022

<http://www.musee-afrappier.qc.ca/fr/index.php?pageid=2300&page=2300-visite-> Consulté le :2 /07/ 2022

<https://jardinage.ooreka.fr/consulte> 05 /07/ 2022

Annexes

Annexe I

Milieux de culture utilisés

- **Milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Rapilly, 1968)**

Pomme de terre 200g

Glucose 20g

Agar 20g

Eau distillée 1000ml

Le milieu est par la suite autoclavé pendant 20 min à 120°C

- **Milieu PDB (*Potato Dextrose Broth*) (Rapilly, 1968)**

Pomme de terre 200g

Glucose 20g

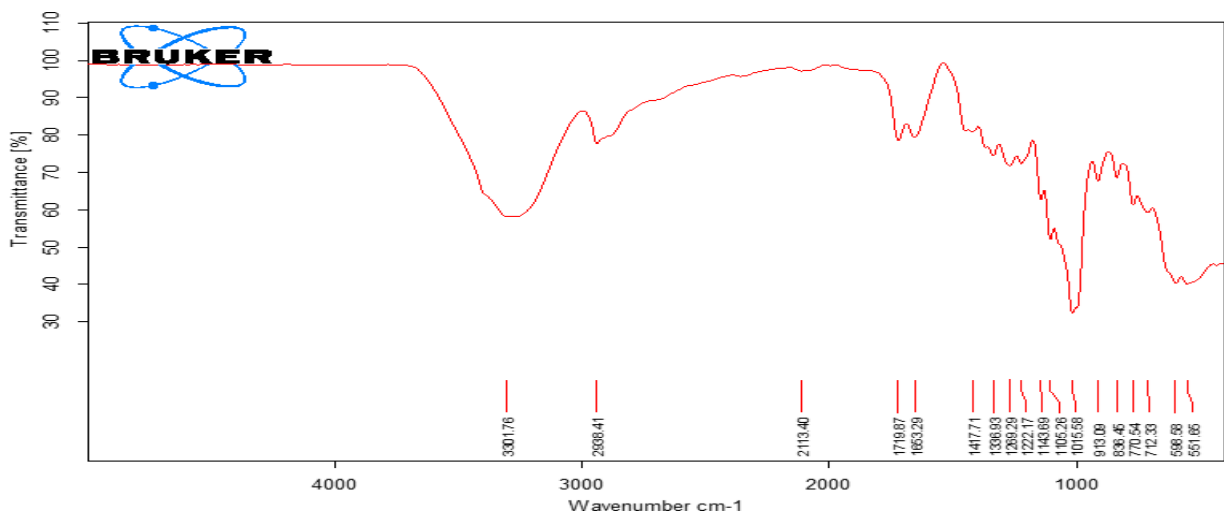
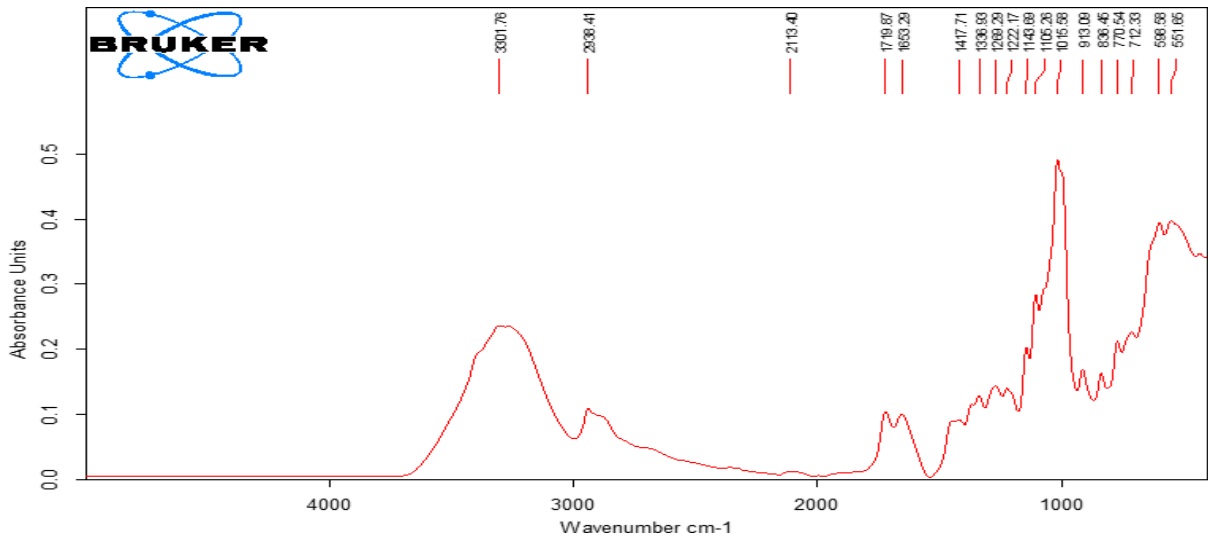
Eau distillée 1000ml

Le milieu est par la suite autoclavé pendant 20 min à 120°C.

AnnexeII

Spectres obtenues par l'analyse FTIR de *Trichoderma sp*

Spectreobtenusparl'analyseFTIRdelaphaseaqueusede l'isolat
Trichoderma sp



Spectre obtenu par l'analyse FTIR de la phase organique de l'isolat de *Trichoderma sp.*

