



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Nour El Houda SAHRAOUI

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème

Mise en évidence des activités hydrolytiques et antagonistes de l'isolat *Trichoderma atroviride* S2

Jury :

Mlle. Mouna GUEROUI	MCB	Université de Biskra	Président
Mme. Wassila DENDOUGA	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mlle. Hassina GHITI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon ALLAH ﷻ qui m'a donné la Volonté d'achever ce travail et le courage durant ces longues années d'étude.

Je remercie ma famille et surtout mes parents pour leur soutien moral, et Encouragements durant les étapes difficiles de la réalisation de ce travail.

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Dr. **DANDOGA Wassila** qui a guidée, suivie le déroulement et l'exécution du travail.*

Je vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Je remercie les ingénieurs de laboratoire de biologie «Al-Hadjeb» et de «L'agronomie».

*Enfin, je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, en particulier **Khaoula, Nadia, Sara** pour ses précieux conseils.*

Très grande merci pour toutes les personnes de tous les étudiants de MICROBIOLOGIE.

Dédicaces

Je commence ma dédicace au mon dieu et le salut sur Mohamed le messager de Dieu

Je dédie ce travail modeste :

*A ma très chère mère **FOUZIA** quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A mon très cher père **TIDJANI** tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*


*A mon grand-père **BACHIR** et ma grande mère **OURIDA** qui m'est très chère, Dieu la bénisse et demeure au paradis.*

*A ma grand-mère **ZOHRA**, je vous souhaite une longue vie et une bonne santé.*

*À mes chers frères, **ABD ERRAHMANE**, **IMADE EDDINE** et **AYMEN** et mes belles sœurs **ROUMAÏSSA**, **KHAOULA**, **SABRINA**, dieu vous donne la santé, le bonheur, le courage et surtout le succès.*

*Mon oncle **ABD EL DJALIL LAKHAL** et son épouse **HANIFA** et ses fils **ZAKARIA**, **MOUHAMED AMINE**, **CHOUAIB**, **IBRAHIM**. Et ses filles **AMIRA**, **MANEL** et **MARIA**.*

Et toute ma famille.

Houda


Sommaire

Liste des Tableaux.....	I
Liste des Figures.....	II
Liste des abréviations	IV
Introduction générale.....	1

Première partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. *FUSARIUM GRAMINEARUM ET TRICHODERMA ATROVIRIDE*

1.1. <i>Fusarium graminearum</i>	2
1.1.1. Généralité	2
1.1.2. Caractérisation morphologique de la souche de <i>F. graminearum</i>	2
1.1.2.1. Caractérisation macroscopique.....	2
1.1.2.2. Caractérisation microscopique	3
1.1.3. Taxonomie.....	4
1.2. Généralité sur <i>T. atroviride</i>	4
1.2.1. Définition.....	4
1.2.2. Morphologie	5
1.2.2.1. Aspect macroscopique.....	5
1.2.2.2. Aspect microscopiques	5
1.2.3. Taxonomie.....	6
1.2.4. Pouvoir antagoniste de <i>T. atroviride</i>	6
1.2.5. Interaction <i>Trichoderma</i> -Pathogènes	6

Chapitre 2. HYDROLASES

2.1. Généralité	8
2.2. Hydrolases	8
2.2.1. Protéases	8
2.2.2. α -amylases.....	8
2.2.3. Lipases.....	9
2.2.4. Pectinases	9
2.2.5. Cellulases.....	9

Deuxième partie : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Présentation de la région d'étude	10
3.1.1. Le sol.....	11
3.2. Echantillonnage	11
3.3. Analyse physico-chimique du sol	11
3.3.1. Mesure du pH.....	11
3.3.2. Mesure d'humidité.....	12
3.3.3. Mesure de la conductivité électrique (CE)	12
3.3.4. Mesure des éléments minéraux	12
3.3.4.1. Dosage de Na ⁺	12
3.3.4.2. Dosage de potassium	12
3.3.4.3. Dosage de Chlorure	13
3.3.4.4. Mesure de la matière organique	14
3.4. Isolement à partir du sol	14
3.4.1. Les suspensions-dilutions.....	14
3.5. Méthode de dénombrement	15
3.6. Purification	15
3.7. Conservation	15
3.8. Identification des isolats champignons filamenteux	16
3.8.1. Identification macroscopique	16
3.8.2. Identification microscopique	16
3.9. Test d'antagonisme	16
3.9.1. Matériel fongique (l'agent antagoniste et l'agent pathogène).....	17
3.9.2. Teste de confrontation directe	17
3.9.3. Test de confrontation à distance	18
3.10. Identification des activités hydrolytiques de <i>T. atroviride</i> sur des milieux gélosés	19
3.10.1. Principe.....	19
3.10.2. Préparation des milieux gélosés	19
3.10.2.1. Identification de caséinase (Activité protéolytique).....	19
3.10.2.2. Identification de gélatinase (activité protéolytique)	20
3.10.2.3. Identification de lipase (activité lipolytique).....	20
3.10.2.4. Identification de pectinase (activité pectinolytique).....	20

3.10.2.5. Identification de l'activité amylolytique.....	20
3.10.2.6. Identification de l'activité cellulolytique.....	21

Chapitre 4. RESULTATS ET DISCUSSIONS

4.1. Analyses physico chimiques du sol.....	23
4.2. Isolement et dénombrement des champignons filamenteux.....	25
4.3. Obtention des souches fongiques pures.....	25
4.4. Identification des isolats de moisissures.....	29
4.5. Les tests antagonismes.....	35
4.5.1. Test de confrontation directe.....	35
4.5.2. Test de confrontation à distance.....	36
4.6. Test de l'activité protéolytique.....	40
4.6.1. Caséiase.....	40
4.6.2. gélatinase.....	38
4.6.3. Mise en évidence de l'activité lipolytique.....	39
4.6.4. Mise en évidence de l'activité pectinolytique.....	40
4.6.5. Mise en évidence de l'activité amylolytique.....	41
4.6.6. Mise en évidence d'activité cellulosique.....	42
Conclusion.....	47
Références bibliographiques.....	48
Annexes	
Résumés	

Liste des Tableaux

Tableau 1. Analyse physico chimiques des échantillons du sol	23
Tableau 2. Type de sol en fonction de la salure et de la conductivité électrique	24
Tableau 3. Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol de sur PDA.....	26
Tableau 4. Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol de sur TSM.....	27
Tableau 5. Aspects macroscopiques des moisissures isolées.....	29
Tableau 6. Aspects microscopiques des moisissures isolées.....	32
Tableau 7. Mise en évidence de l'activité protéolytique de <i>T. atroviride</i> sur le LG à 30%.....	38
Tableau 8. Mise en évidence de l'activité protéolytique <i>T. atroviride</i> sur gélose gélatinée.....	39
Tableau 9. Mise en évidence de l'activité lipolytique de <i>T. atroviride</i> sur gélose à base de tween 1%. 40	
Tableau 10. Mise en évidence de l'activité pectinolytique de <i>T. atroviride</i> sur un milieu gélosé à base de pectine.....	40
Tableau 11. Mise en évidence de l'activité amylolytique de <i>T. atroviride</i>	41
Tableau 12. Mise en évidence de l'activité cellulolique de <i>T. atroviride</i>	42

Liste des Figures

Figure 1. Le blé infecté par <i>F. graminearum</i>	2
Figure 2. Croissance de <i>F. graminearum</i> sur milieu PDA.	3
Figure 3. Macroconidies produites par <i>F. graminearum</i>	4
Figure 4. Aspect macroscopique de <i>T. atroviride</i>	5
Figure 5. Culture sur lame de <i>T. atroviride</i> . A: Verticilles de phialides en forme de bouteille (x 400). B: Conidies sub-globuleuses à paroi lisse (X 1000).	6
Figure 6. Carte de situation géographique de la wilaya de Biskra.	10
Figure 7. Confrontation entre le pathogène et l'antagoniste par contact direct sur milieu gélosé.	18
Figure 8. Confrontation entre le pathogène et l'antagoniste par contact indirect sur milieu gélosé.	19
Figure 9. Densité des champignons dans les sols collectés de la région de Biskra.	25
Figure 10. (A) Confrontation directe entre <i>T. atroviride</i> (position à droite) et <i>F. graminearum</i> (position à gauche) à température 28°C. (B) Témoin.	35
Figure 11. Inhibition de la croissance de <i>F. graminearum</i> en présence et en absence de <i>T. atroviride</i> (Test direct).	36
Figure 12. Test d'antagonisme par confrontation à distance.	37
Figure 13. Test d'antagonisme par confrontation à distance.	37
Figure 14. Mise en évidence de l'activité protéolytique de <i>T. atroviride</i> sur lait gélosé à 30%.	38
Figure 15. Mise en évidence de l'activité protéolytique de <i>T. atroviride</i> sur gélose gélatinée.	39
Figure 16. Mise en évidence de l'activité lipolytique de <i>T. atroviride</i> sur milieu gélose à base de tween 1 %	40
Figure 17. Mise en évidence de l'activité pectinolytique : (A) Recto de la boîte de pétri, (B) Verso de la boîte de pétri.	41
Figure 18. Mise en évidence de l'activité amylolytique de <i>T. atroviride</i>	42
Figure 19. Mise en évidence de l'activité cellulolytique de <i>T. atroviride</i>	43

Liste des abréviations

B: Blé.

CE: Conductivité Electrique.

CMC: CarboxyMethylCellulose.

F: Fusarium.

H %: pourcentage d'humidité.

j: jours.

MO: Matière Organique.

O: Olivier.

P: Palmier d'attier.

PDA: Potato Dextrose Agar.

p/v: poids par volume.

Sp: Espèce.

T:Trichoderma.

TSM: *Trichoderma* Sélective Medium

UFC: Unité Formant Colonie.

V: Volume.

v/v: volume par volume.

Introduction

Introduction

Les surfaces des plantes sont colonisées par des microorganismes pathogènes et saprophytes qui interagissent entre eux. L'utilisation de ces derniers permet de réduire l'incidence des maladies phytopathogènes (Whipps, 1992). C'est un moyen de lutte biologique permettant un contrôle acceptable de la maladie ou une réduction des populations pathogènes (Cook et Baker, 1983). Cette alternative qui assure une protection phytosanitaire performante constitue une solution de substitution à l'emploi de produits chimiques nuisibles à l'équilibre naturel des écosystèmes (Jensen *et al.*, 1996). Des microorganismes antagonistes capables d'inhiber les différentes séquences biologiques du pathogène ont été recherchés. Ils doivent pouvoir survivre dans l'habitat où ils seront appliqués (Andrews, 1992). De nombreux travaux ont démontré que les *Trichoderma* ont un potentiel de lutte intéressant contre divers agents pathogènes (Larkin et Fravel, 1998).

Une vingtaine d'espèces appartenant au genre *Fusarium* avec d'autre appartenant au genre *Microdochium* sont impliquées dans le complexe provoquant les différentes fusarioses de blé, mais l'agent principal reste *F. graminearum* (Arseniuk *et al.*, 1999).

Les *Trichoderma* spp. sont parmi les champignons du sol qui ont un potentiel antagoniste significatif contre une large gamme de champignons phytopathogènes. Les *Trichoderma* sont déjà commercialisés pour le contrôle biologique de nombreux agents pathogènes des plantes. Ils sont caractérisés par une croissance rapide, une aptitude importante à la compétition et à la stimulation des systèmes de défense. Ils sont capables de persister dans le sol et de coloniser les racines dans des plantes (Verma *et al.*, 2007).

T. atroviride est l'un des mycoparasites connus comme agent de lutte biologique (Kubicek et Harman, 1998). L'effet antagoniste de *T. atroviride* se manifeste par un enroulement des hyphes autour des filaments du champignon pathogène (Elad *et al.*, 1990). S'ensuit une lyse grâce à la production d'enzymes, telles que la β -1,3-glucanase et la chitinase (Cruz *et al.*, 1995).

Dans ce contexte, la présente étude est effectuée, dont l'objectif principale est d'isoler des souches de *Trichoderma* et de tester leur activité antagoniste vis-à-vis de *F. graminearum*, ainsi que la mise en évidence de leur activité hydrolytique sur des milieux sélectifs.

Première partie

Partie
Bibliographique

Chapitre 1

F. graminearum
et *T. atroviride*

1.1. *Fusarium graminearum*

1.1.1. Généralité

F. graminearum est un champignon cosmopolite, saprophyte facultatif qui vit et complète son cycle évolutif autant sur les tissus vivants que sur les débris de végétaux. Ainsi, les spores produites sur les résidus restés à la surface du sol peuvent être transportées par le vent ou amenées d'une feuille à l'autre jusqu'aux épis par les éclaboussures de pluie (Parry *et al.*, 1995).

La fusariose (*Fusarium graminearum*) est l'une des maladies provoquée par *F. graminearum* où les symptômes sont décelables peu après la floraison. Le champignon peut s'attaquer à la totalité ou à une partie de l'épi. Le blanchiment des épis où la fusariose apparaît de 3 à 5 jours après l'infection (Figure1) (Difallah, 2009).



Figure 1. Le blé infecté par *F. graminearum* (Leplat, 2012).

1.1.2. Caractérisation morphologique de la souche de *F. graminearum*

1.1.2.1. Caractérisation macroscopique

Sur milieu PDA la croissance de la souche est rapide (boîte de pétri de 9cm de diamètre recouverte en 10 jours) avec la production d'un mycélium dense et aérien (cotonneux). Le mycélium est blanc au recto (mycélium aérien) et d'une couleur jaune à fauve au verso (mycélium en contact avec le milieu) quand la culture est jeune. La couleur du verso tourne au rouge carmin lorsque la culture est plus âgée (Figure 2) (Leplat, 2012).

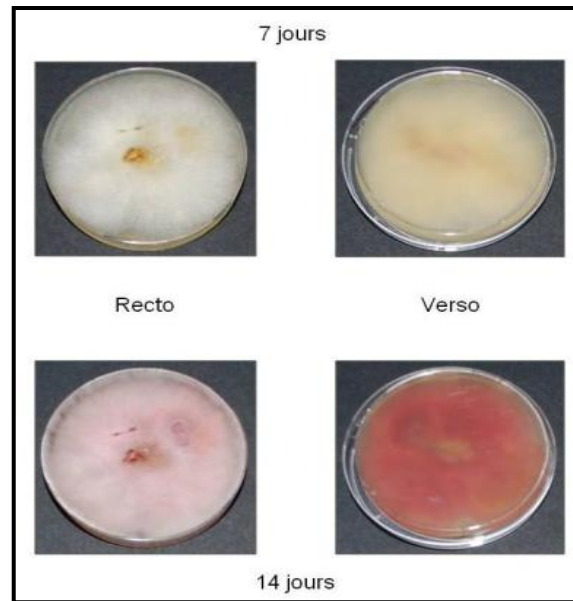


Figure 2. Croissance de *F. graminearum* sur milieu PDA (Leplat, 2012).

1.1.2.2. Caractérisation microscopique

La souche ne produit pas de microconidie. La production de macroconidies par les conidiophores de type monophialide, ramifiée ou non, est importante (Figure3). Les macroconidies sont divisées en 6 à 7 loges. Elles sont peu incurvées et leur face dorsale est plus incurvée que leur face ventrale. La cellule basale a distinctement une forme de pied. La cellule apicale a une forme de crochet (Figure 3).L'apparition de la forme parfaite de la souche exige des conditions particulières, elle n'a pas été observée. Elle se caractérise par la production d'ascospores à l'intérieur de périthèces (Leplat, 2012).

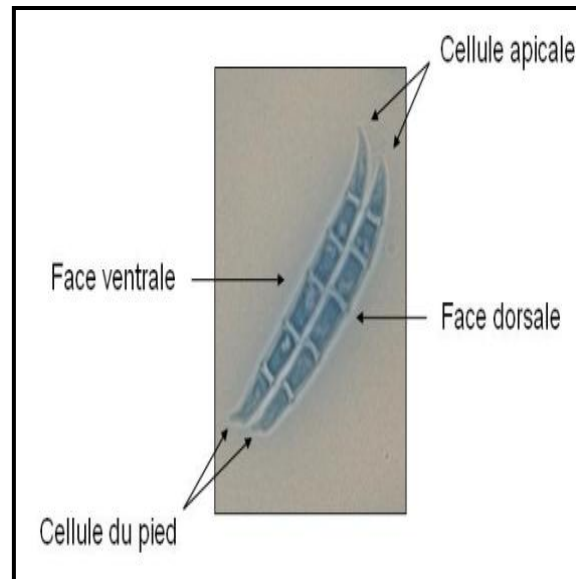


Figure 3. Macroconidies produites par *F. graminearum* (Leplat, 2012).

1.1.3. Taxonomie

La position taxonomique actuelle des *F. graminearum* représente comme suit :

Règne : Fungi.

Embranchement : Ascomycota.

Classe : Sordariomycetes.

Ordre : Hypocreales.

Famille : Nectriaceae.

Genre : *Gibberella*.

1.2. Généralité sur *T. atroviride*

1.2.1. Définition

T. atroviride est un champignon filamenteux que l'on trouve couramment dans sol présentant des capacités de lutte biologique contre plusieurs de champignons phytopathogènes, notamment *Rhizoctonia solani* et *Botrytis cinerea* (Chet, 1987 ; Papavizas, 1985). Ces champignons sont des parasites connus de centaines de plantes, notamment les tomates, les haricots, le concombre, les fraises, le coton et les raisins (Prins *et al.*, 2000). Les propriétés de *T. atroviride* lui permettent de protéger les cultures en libérant, par exemple, des enzymes dégradant les parois cellulaires et des antibiotiques (Lorito

et al., 1996 ; Schirmbock *et al.*, 1994) lorsqu'ils sont mis au défi par des espèces pathogènes de champignons. La paroi cellulaire de la majorité des champignons filamenteux est principalement composée de chitine, de β -glucanes et de protéines (Gooday, 1995).

1.2.2. Morphologie

1.2.2.1. Aspect macroscopique

Les caractéristiques macroscopiques étaient des colonies denses et laineuses qui se développaient en cinq jours, initialement blanchâtres, devenant rapidement vert foncé (Figure 4) (Ranque *et al.*, 2008).

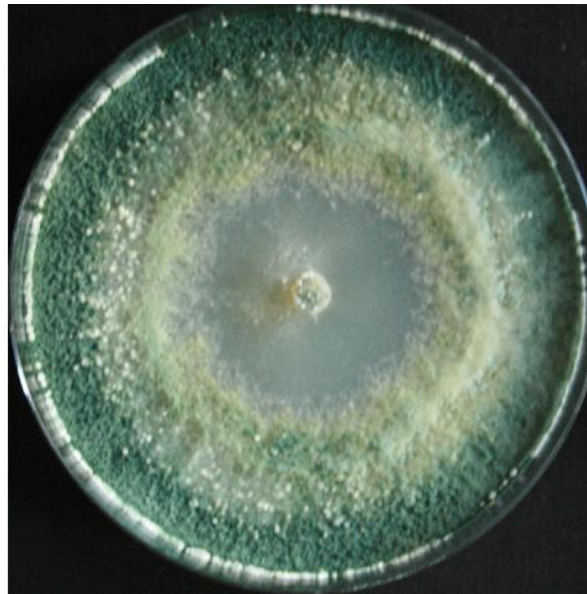


Figure 4. Aspect macroscopique de *T. atroviride* (Ranque *et al.*, 2008).

1.2.2.2. Aspect microscopiques

Les conidiophores avec ramification motif à angles droits; phialides (8-10 μm x 2 μm), en forme de flasque souvent courbées en spires de deux, trois ou quatre verticillées; conidies (3,5 μm x 4 μm) sous-globuleuses vert foncé, courtes ellipsoïdales, à paroi lisse; des chlamydospores étaient présentes (Figure 5) (Ranque *et al.*, 2008).

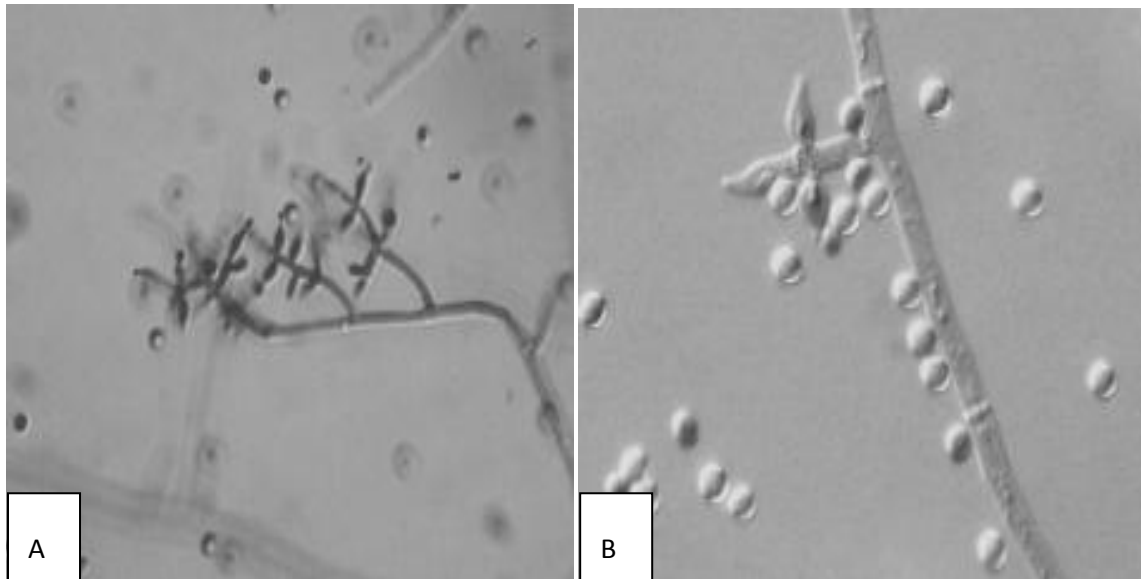


Figure 5. Culture sur lame de *T. atroviride*. **A:** Verticilles de phialides en forme de bouteille (x 400). **B:** Conidies sub-globuleuses à paroi lisse (X 1000) (Ranque *et al.*, 2008).

1.2.3. Taxonomie

Les travaux et les techniques de la biologie moléculaire, permet révéler une classification pour le genre de *T. atroviride* comme suit selon (Bissett,1984):

Règne : Fungi.

Division : Ascomycota.

Classe : Sordariomycetes.

Ordre : Hypocreales.

Famille : Hypocraceae.

Genre : *Trichoderma*.

Espèce : *Trichoderma atroviride*.

1.2.4. Pouvoir antagoniste de *T. atroviride*

En effet, ce champignon secrète de multiples enzymes, antibiotiques, hormones qui sont utiles pour la croissance des plantes et leur confèrent une protection contre les pathogènes. Il en résulte aussi une amélioration du contenu du sol en nutriments. La présence de *T. atroviride* dans le sol joue à la fois un rôle préventif et curatif (Singh *et al.*, 2009).

Le genre *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. Le même effet est observé lorsqu'il est utilisé en pulvérisation aérienne. Une fois installée, *Trichoderma* peut avoir un effet stimulant pour la plante en absence de champignons pathogènes (Caron., 2002).

Chapitre 2

Hydrolases

2.1. Généralité

Les enzymes, catalyseurs biologiques ou biocatalyseurs, sont des molécules permettant d'accélérer jusqu'à des millions de fois les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu cellulaire ou extracellulaire, elles agissent à de faibles concentrations et se retrouvent intactes en fin de réaction (Jarrar, 2001). Ces biocatalyseurs jouent un rôle important, du fait qu'ils sont responsables des transformations biochimiques des molécules du vivant (McAuliffe, 2012).

2.2. Hydrolases

Les enzymes hydrolases ce sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, des peroxydes, ...etc. Il est très difficile de les classer. Le plus simple est d'étudier leur action sur quelques groupes de molécules. Généralement les hydrolases, sont produites par les champignons. Il s'agit d'enzymes endocellulaires (catalase, lactase et invertase) ou exocellulaires (amylases, cellulases, pectinases et protéases) (Bornscheuer, 2002).

2.2.1. Protéases

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires ou extracellulaires. Les protéases se différencient également selon leur mode d'action en : endopeptidases et exopeptidases (Kalisz, 1988).

2.2.2. α -amylases

L' α -amylase, comme toute enzyme, est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est d'hydrolyser l'amidon. L' α -amylase [α -(1-4)-D-glucanoglucanohydrolase] est une endoamylase qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques de (1-4) l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et de du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes (Keating *et al.*, 1998).

2.2.3. Lipases

Les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxylique, leur rôle physiologique est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides monoglycérides, et acides gras et glycérol (Chaib et Slimane, 2013). Toutes les lipases connues à ce jour présentent une organisation tridimensionnelle commune composée d'un feuillet bêta centrale formée de huit brins parallèles connectés entre eux par des hélices alpha (Najjar, 2010).

2.2.4. Pectinases

Les enzymes pectiques ou pectinases sont un groupe d'enzymes estérases, polygalacturonases et lyases qui agissent sur les substrats pectiques. Les polygalacturonases et les lyases dépolymérisent les substances pectiques pour donner des oligomères de faible masse moléculaire. Les microorganismes (bactéries, champignons, levures) sont la source essentielle de production de polysaccharidases (Larpen-Gourgand et Sangleer, 1992).

2.2.5. Cellulases

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucanohydrolase] elles sont produites typiquement par des bactéries, levures, les moisissures, et des protozoaires (Schamburg et Salzman, 1991). se rapportent à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (Kader *et al.*, 1999). Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases. C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes: Endo β (1-4)-glucanase ou endocellulase, Exo β (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase, β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (Xu, 2002).

Deuxième partie

Partie

Expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1. Présentation de la région d'étude

La wilaya de Biskra se situe au Sud Est de l'Algérie, elle occupe une superficie de 21671 km², son altitude est de 128 mètres au niveau de la mer. Elle est caractérisée par un climat froid en hiver, chaud et sec en été.

La wilaya de Biskra (Figure 6) est limitée par :

- Le Nord : Wilaya de Batna et M'sila.
- Le Sud : Wilaya d'Ouargla. Et El-Oued.
- L'Est : Wilaya de Khenchela.
- L'Ouest : Wilaya de Djelfa (Bouchamal et Achour, 2015)

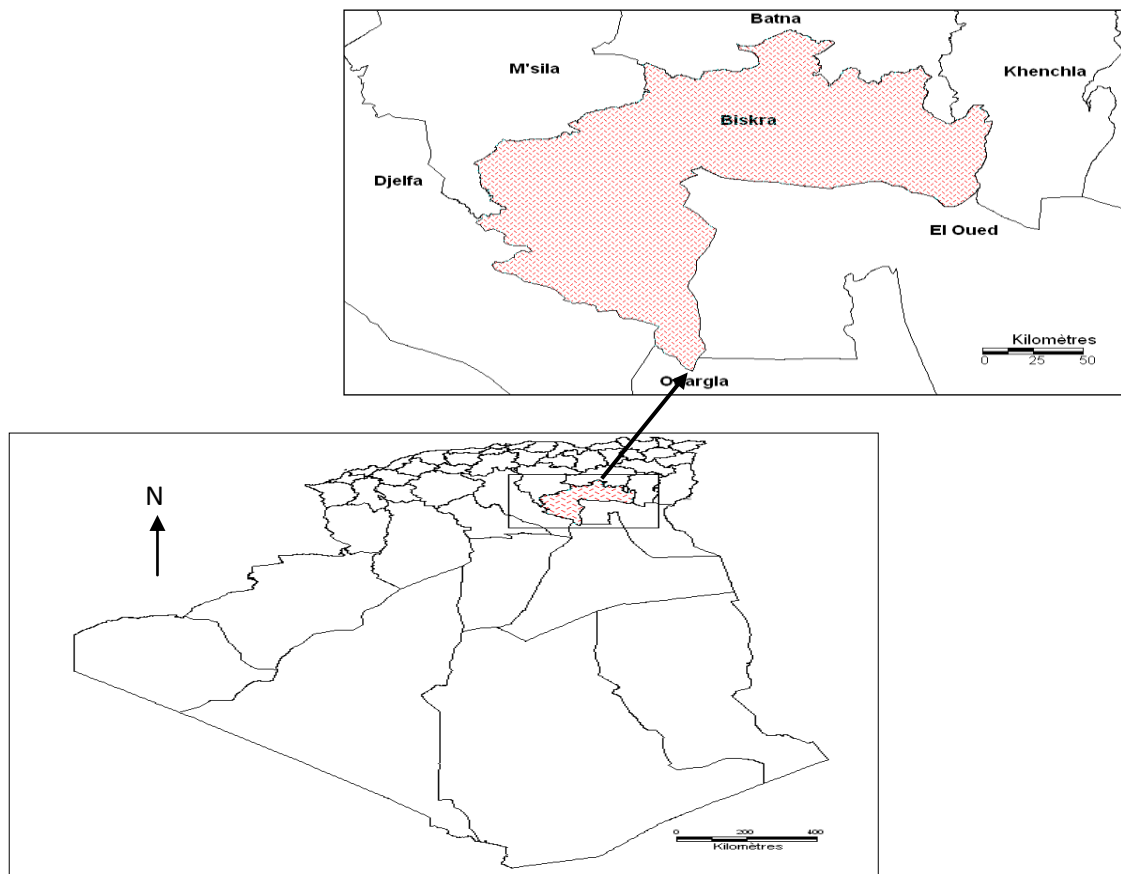


Figure 6. Carte de situation géographique de la wilaya de Biskra (Laamari *et al.*, 2010).

3.1.1. Le sol

L'étude morpho analytique des sols de la région de Biskra montre l'existence de plusieurs types de sols. D'après des études pédologiques réalisées par Khechai (2001), les sols de la wilaya de Biskra présentent les caractéristiques suivantes:

- Les régions Sud, sont surtout caractérisées par les accumulations salées, gypseuses et calcaires.
- Les régions Est, sont définies par les sols alluvionnaires et les sols argileux fertiles.
- Les zones du Nord (ou zones de montagne) sont le siège de la formation des sols peu-évolués et peu fertiles.

Enfin, la plaine située au Nord-ouest de Biskra où les sols argileux-sodiques irrigués par les eaux fortement minéralisées constituent le caractère de la pédogenèse de cette région.

3.2. Echantillonnage

L'échantillonnage est une phase essentielle puisque de sa bonne réalisation va dépendre la fiabilité des résultats, qu'il s'agisse d'isolements à partir du sol ou à partir d'un végétal (Davet et Rouxel, 1997).

Dans l'horizon de 10 cm d'épaisseur que l'on recherche généralement les champignons du sol (Davet et Rouxel, 1997). Les prélèvements sont pratiqués à l'aide d'une spatule, en prenant les précautions d'usage de désinfection des outils (flambage à l'alcool éthylique à 90 %) pour éviter tout risque de contamination entre échantillons. Les échantillons, recueillis dans des flacons en verre stérile, se conservent dans un endroit frais (4-6°C). S'ils peuvent être ainsi maintenus plusieurs mois avant analyse, il est toutefois préférable de les traiter le plus rapidement possible. Avant l'analyse proprement dite, les échantillons peuvent être broyés et calibrés (Rouxel et Bouhot, 1971).

3.3. Analyse physico-chimique du sol

3.3.1. Mesure du pH

Les mesures du pH des échantillons du sol nécessitent au début la préparation d'une suspension du sol (20 g du sol avec 100 ml d'eau distillée). Une agitation pendant 45 min a permis l'obtention d'une suspension homogène, puis on a prolongé l'électrode du pH mètre, et on a noté la valeur du pH (Aubert, 1978).

3.3.2. Mesure d'humidité

La méthode décrite par Denis (1988) consiste à sécher 1g du sol pendant 2 jours dans un dessiccateur à 105°C, jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule suivante:

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

H % : pourcentage d'humidité.

pH : poids humide.

PS : poids sec.

3.3.3. Mesure de la conductivité électrique (CE)

Une quantité de 20 g du sol de chaque échantillon est diluée dans 100 ml d'eau distillée. Puis une agitation rigoureuse pendant 1h à l'aide d'un agitateur magnétique permet l'obtention d'un homogénat du sol. La suspension est laissée pendant 30 min à une température ambiante ensuite la conductivité électrique est mesurée à l'aide d'un conductivimètre (Aubert, 1978).

3.3.4. Mesure des éléments minéraux

3.3.4.1. Dosage de Na⁺

Le sodium a été dosé (Annexe 1) selon la méthode Aubert (1978) après la préparation d'une suspension du sol (50g du sol dans 50ml d'eau distillée stérile) et son agitation pendant 2h, le filtrat est passé au spectrophotomètre à flamme à 260 nm.

Les concentrations du sodium dans nos échantillons ont été déterminées selon la courbe d'étalonnage (Annexe 1).

3.3.4.2. Dosage de potassium

Le potassium a été dosé (Annexe 2) selon la même méthode décrite préalablement pour le sodium. Les concentrations du potassium dans nos échantillons ont été déterminées selon la courbe d'étalonnage (Annexe 2).

3.3.4.3. Dosage de Chlorure

Le chlorure a été dosé selon la méthode Aubert (1978) décrété au dessous :

- Préparation des solutions
- ❖ Chromate de potassium (5%): diluer 5g de $K_2 CrO_4$ dans 100 ml d'eau distillée; puis agiter pendant 10 min.
- ❖ Nitrate d'argent (0.1N): diluer 17g d' $AgNO_3$ dans 1 L d'eau distillée, agité pendant 5 à 10 min, puis couvrirai avec un papier aluminium ou sachet noir contre la lumière.
- Mode opératoire

Prendre 10g du sol, ajouter 50ml d'eau distillée et agiter pendant 10 min, laissé reposer puis filtrer et Prendre 5ml du filtrat dans un bécher et rajouter 3 gouttes de $K_2 CrO_4$, agiter jusqu'à l'obtention d'une couleur verte. Titrage avec $AgNO_3$ (0.1N) qui va donner une couleur rouge brique, (mesurer le volume (V)).

Pour la préparation du témoin: prendre 5 ml d'eau distillée; rajouter 3 gouttes de $K_2 CrO_4$ avec agitation, puis titrer avec $AgNO_3$. La concentration du chlore est déterminée selon la formule suivante :

$$Cl \text{ (méq/l)} = [(V*N*1000)/A]*D$$

V : volume d' $AgNO_3$ 0.01 N utilisé pour la titration de l'échantillon en ml.

A : Volume de la prise d'essai ml.

N : normalité de la solution d' $AgNO_3$.

D : dilution (x10).

$$N(AgNO_3) = (10*N(NaCl))/V(AgNO_3)$$

$N(\text{AgNO}_3)$: normalité de la solution d' AgNO_3^- .

$V(\text{AgNO}_3)$: volume d' AgNO_3^- utilisé (ml).

$N(\text{NaCl})$: normalité de la solution de NaCl.

3.3.4.4. Mesure de la matière organique

La matière organique est dosée selon la méthode décrite par Aubert (1978). A un de 1g du sol représentant l'échantillon à analyser, on a ajouté à l'aide d'une pipette avec poire 10ml de $\text{K}_2 \text{Cr}_2 \text{O}_7$, et ajouter a l'aide d'une éprouvette 20 ml de $\text{H}_2 \text{SO}_4$ (attention réaction dangereuse : tenir le ballon loin du visage) et agiter doucement puis laisser le mélange refroidir pendant environ 30 min. Après le refroidissement ajouter doucement 150 ml d'eau distillée et 10 ml d'acide phosphorique et 1 ml d'indicateur.

Le titrage s'effectue à l'aide de la solution de $\text{F}_2 \text{SO}_4$ jusqu'à l'obtention d'une couleur vert brillant.

Les pourcentages de MO sont calculés selon la relation suivante :

$$\text{MO (\%)} = (\text{A}-\text{B})/\text{A}. 6,896$$

- ❖ Soit **B** le volume de la solution consommée.
- ❖ Soit **A** le volume de la solution consommée par le témoin réalisé dans les mêmes conditions mais sans l'échantillon.

3.4. Isolement à partir du sol

3.4.1. Les suspensions-dilutions

Le principe consiste à mètrele sol en suspension dans l'eau stérile, puis à incorporer les différentes dilutions de cette suspension dans le milieu d'isolement. Cette technique comprend plusieurs étapes, allant de la préparation des dilutions jusqu'à l'interprétation des résultats (Rapilly, 1968).

La préparation des dilutions consiste, tout d'abord, à préparer la solution mère du sol. Une quantité de 10 g de sol est suspendu dans 90 ml d'eau distillée stérile et homogénéisée pendant 10 min à l'aide d'un vortex. Cette dilution représente la solution mère à partir de

laquelle d'autre dilution sont préparées jusqu'à 10^{-3} . Un volume de 1 ml de chaque suspension est étalé dans des boîtes de Pétri contenant les milieux PDA (Annexe 3) ou TSM (Annexe 4). Les préparations sont incubées à 28 – 30°C jusqu'au développement apparent de colonies. Les milieux géloses sont additionnés d'un antibiotique, la gentamicine 50 ppm pour inhiber la croissance bactériennes (Botton *et al.*, 1990).

3.5. Méthode de dénombrement

Le dénombrement consiste à compter les colonies présentes sur les boîtes en Unité Formant Colonie (UFC). Le comptage se fait macroscopiquement. En tenant compte des caractéristiques des colonies sur son milieu approprié, seules les boîtes ayant 30 à 300 UFC sont retenues. Le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) est déterminé selon la formule (Mouria *et al.*, 2013) :

$$\text{UFC} = \frac{\text{Nombre de colonies} \times \text{Facteur de dilution finale}}{\text{Poids sec du sol}}$$

3.6. Purification

Les boîtes issues d'isolement comprennent plusieurs colonies d'aspects, de couleurs et de texture différentes. La technique consiste à prélever quelques spores ou une petite bouture mycélienne à la marge du thalle à repiquer, à l'aide d'une anse de platine stérile et la transférer aseptiquement dans une autre boîte de pétri Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte (Botton *et al.*, 1990).

3.7. Conservation

Les isolats de champignons filamenteux pures obtenues sont repiquées par des stries d'épuisement parallèles dans des tubes à vis contenant le milieu PDA ou TSM incliné de manière à avoir des colonies abondantes. L'incubation à 30°C jusqu'à une bonne sporulation. les tubes de collection sont conservées à 4°C en évitant le plus possible tout risque de contamination (Botton *et al.*, 1990).

3.8. Identification des isolats champignons filamenteux

3.8.1. Identification macroscopique

Elle repose sur la détermination de :

L'aspect des colonies représente un critère d'identification, les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses, parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien).

- ❖ **Le relief des colonies :** peut être très variable en fonction des genres fongiques, petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*) bombées.
- ❖ **La couleur des colonies :** est un élément très important d'identification, les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleu, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture comme le cas des *Fusarium* (Botton *et al.*, 1990).

3.8.2. Identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Lactophénol-bleu coton (Annexe 5). Généralement, un examen à l'**objectif x40** est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

3.9. Test d'antagonisme

Le test de l'activité antifongique de notre isolat de *Trichoderma* dans les résultats consiste à rechercher son effet antagoniste sur le développement de l'isolat pathogène de *F. graminearum* isolé par Dr Abderrahmane encadré par monsieur Moussi Abdelhamid en utilisant deux méthodes à savoir : la confrontation par contact directe et la confrontation à distance.

3.9.1. Matériel fongique (l'agent antagoniste et l'agent pathogène)

Notre isolat de *T. atroviride* examiné dans cette étude comme être un agent antagoniste et la souche *F. graminearum* comme agent pathogène.

Dans notre travail aussi je isolée à partir des tissus végétaux de la tomate naturellement infectés sont immergés pendant 2 min dans 50 ml de NaCl à 2% pour éliminer la flore saprophyte superficielle puis rincés trois fois dans de l'eau distillée stérile. Les tissus végétaux sont ensuite séchés sur du papier filtre stérile avant d'être placés dans des boites de pétri supplémentées du milieu PDA (15 ml par boite), les boites sont incubées à 25 °C. Après 4 à 5 jours d'incubation (Benhamou *et al.*, 1997), les boites sont examinées sous la loupe binoculaire (grossissement **x40**), l'identification des colonies développées à partir des fragments infectés est basée sur la morphologie des spores. À l'aide d'anse les colonies sont transférés individuellement sur une nouvelle boite de du milieu PDA. Les cultures représentant des contaminations bactériennes sont transférées sur milieu amendé avec 50 ppm de Gentamycine (Botton *et al.*, 1990).

3.9.2. Teste de confrontation directe

Cette technique consiste à placer, dans la même boite de pétri contenant le PDA, deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre), l'une portant l'antagoniste et l'autre le pathogène. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 4 cm et à équidistance du centre de la boite (Figure 11), les repiquages sont effectués en même temps. Le témoin représente un repiquage du pathogène au centre de la boite. L'incubation est réalisée à 28 °C pendant six jours (Hibar *et al.*, 2004).

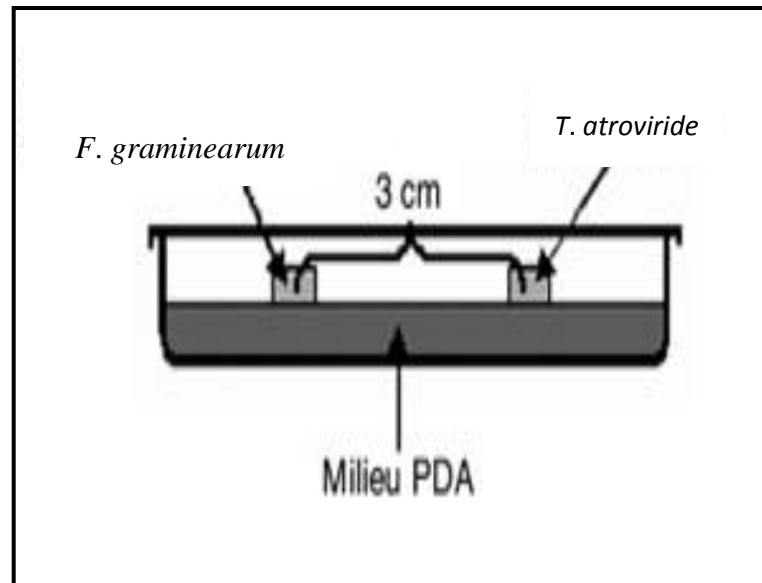


Figure 7. Confrontation entre le pathogène et l'antagoniste par contact direct sur milieu gélosé (Bouregghda, 2009).

La croissance mycélienne du pathogène seul (témoin) et en présence de l'antagoniste est évaluée tous les jours pendant 6 jours.

L'évaluation de l'inhibition exercée par les antagonistes est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du pathogène selon la formule suivante:

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

DT : Croissance diamétrale du témoin.

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

IC%: Inhibition de la croissance.

Des observations microscopiques relatives à l'effet direct de l'agent antagoniste sur l'état du mycélium du pathogène ont été effectuées (Dendouga *et al.*, 2016).

3.9.3. Test de confrontation à distance

Cette méthode consiste à repiquer l'antagoniste et le pathogène dans deux boîtes séparées, par la suite, un assemblage est réalisé par superposition des deux boîtes, l'antagoniste en bas et le pathogène en haut (Figure 12). La jonction entre les deux boîtes est

assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute déperdition des substances volatiles (Daami-Remadi, El Mahjoub, 2001). Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct.

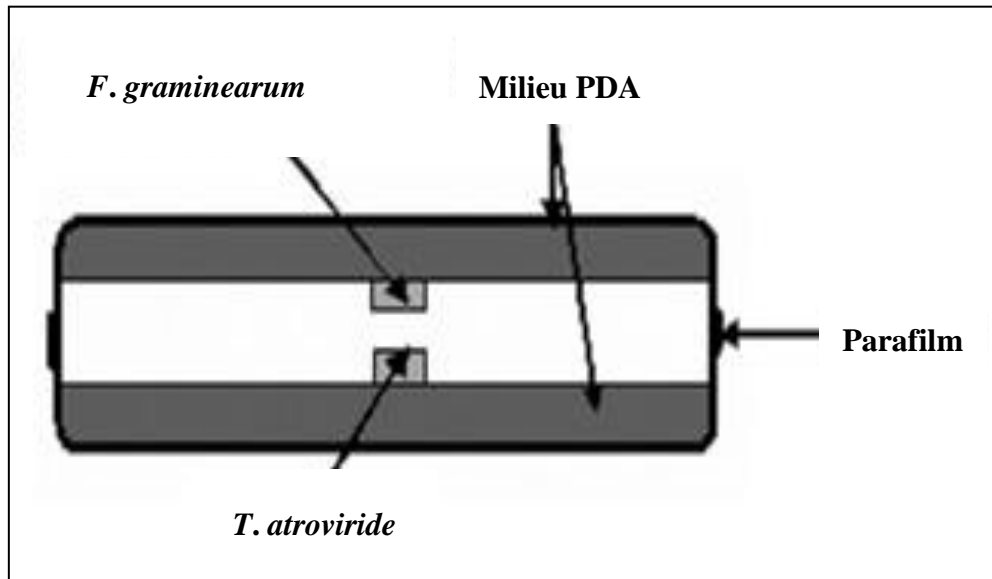


Figure 8. Confrontation entre le pathogène et l'antagoniste par contact indirect sur milieu gélosé (Bouregghda, 2009).

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la même formule décrite préalablement dans le test de confrontation directe.

3.10. Identification des activités hydrolytiques de *T. atroviride* sur des milieux gélosés

3.10.1. Principe

Le principe de la détection des activités hydrolytiques repose sur l'ensemencement d'un disque gélose (5mm) de la culture de *T. atroviride* sur des milieux gélosés sélectifs, dont le substrat de l'enzyme recherchée est la seule source de carbone et d'énergie (Sohail *et al.*, 2009).

3.10.2. Préparation des milieux gélosés

3.10.2.1. Identification de caséinase (Activité protéolytique)

Cette activité a été détectée sur le lait gélosé à 30 % (Annexe6) le pH du milieu est ajusté par l'addition de l'acide lactique à 6. La détection de caséinase extracellulaire est

indiquée par la présence d'un halo transparent autour de la colonie productrice (Dendouga, 2006).

3.10.2.2. Identification de gélatinase (activité protéolytique)

Ce teste a été fait sur milieu gélosé de base supplémenté de 0.4% (p/v) de gélatine (Annexe 7), le développement des colonies témoins indique la présence d'une gélatinase (Gutiérrez et Gonzalez, 1972).

3.10.2.3. Identification de lipase (activité lipolytique)

La recherche de lipase est effectuée par le test d'hydrolyse de Tween 20. Cette activité est recherchée sur milieu de base contenant 1% (v/v) de Tween 20 (Annexe 8) (Gutierrez *et al.*, 1978).

3.10.2.4. Identification de pectinase (activité pectinolytique)

Le milieu utilisé pour la détection de l'activité pectinolytique est Pectine Agar (Annexe 9).Après incubation à 30°C pendant 7jours, les boites sont inondées par une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 7.5 % (Annexe 10) pendant 10 minutes. L'acétate de cuivre donne une couleur bleu claire sur la gélose qui contient la pectine non dégradée l'activité pectinolytique se manifeste par l'apparition d'un halo blanc autour de colonie productrice (Stratilova *et al.*, 1993).

3.10.2.5. Identification de l'activité amylolytique

La détection est effectuée sur milieu PDA additionné d'amidon soluble à 1%. Après incubation (30°C/ 7j), une solution de lugol (Annexe 11) dilué est vaporisée sur la surface de la boite pendant 30 secondes, suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée. L'eau iodée contenant l'iode qui se complexe avec l'amidon et donne un précipité bleu sombre. La souche à halo clair sur le pourtour, est considérée comme productrice d'amylase (Tatsinkou *et al.*, 2005).

3.10.2.6. Identification de l'activité cellulolytique

La mise en évidence de l'activité cellulolytique est effectuée sur milieu CMC-agar (Annexe 12) à pH 5, additionné de 2 % de carboxyméthylcellulose. La boîte est incubée à 30°C pendant 5 à 7 jours. Après croissance, la boîte est colorée avec une solution au rouge Congo (0.1 %) (Annexe13) qui se fixe sélectivement sur les polymères de cellulose. Après 30 min de réaction, la boîte est lavée avec une solution de NaCl (1M) pendant 1heure. Le «rouge Congo», ce qui permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie productrice de cellulase (Korish, 2003).

Chapitre 4

Résultats et discussions

4.1. Analyses physico chimiques du sol

Le Tableau 1 représente les résultats d'analyse physico-chimiques du sol cultivées de collectés de la région de Biskra

Tableau 1. Analyse physico chimiques des échantillons du sol

Paramètres		H(%)	pH	CE (ms/cm)	Cl ⁻ (%)	Na ⁺ (mg/l)	K ⁺ (mg/l)	MO
Sites								
culture	P1	12.03	7.95	1.9	28	35	37	10.85
Palmier dattier	P2	13.03	8.68	0.5	19	72	50	9.45
	P3	11.05	8.62	0.8	23	30	80	9.66
	P4	18.23	8.18	1.1	29	55	63	9.45
	P5	24.22	8.45	0.9	26	26	28	10.75
Blé	B1	15.10	8.12	1.8	33	28	78	8.25
	B2	11.34	8.54	2.3	53	90	36	9.36
	B3	12.67	8.1	2.2	23	21	42	8.62
	B4	11.57	8.38	2.1	44	21	49	9.65
	B5	14.16	7.98	1.9	30	27	46	9.25
olivier	O1	15.53	8.33	0.89	24	33	83	10.45
	O2	16.55	8.00	1.05	29	56	54	10.09
	O3	16.63	8.23	1.02	34	68	39	9.36
	O4	18.55	7.92	0.82	22	75	87	9.54
	O5	14.56	8.12	0.78	31	44	45	9.85

Selon la classification de Morand, (2001) nos échantillons sont considérés comme légèrement alcalin (basique). Cette alcalinité peut être attribuée à la présence des carbonates. Des études similaires ont montré que les sols ayant des valeurs de pH très élevées présentent de fortes teneurs en carbonates, favorisant ainsi l'ensemble des modes de fixation des métaux (Chiou et Shoup, 1985). Le pH est un élément clé de la composition chimique du sol et détermine la disponibilité des éléments nutritifs pour les plantes et les microorganismes du sol (Borah et al., 2010). Le pH fait partie d'une des plus importantes caractéristiques physicochimiques des sols, car la spéciation, la mobilité et la disponibilité des éléments de traces métalliques sont liées à la valeur du pH (Hlavackova, 2005).

L'évaluation des valeurs de la conductivité électrique dans nos échantillons du sol (Tableau 1) a été effectuée selon Richards (1969) et Aubert (1978), cette évaluation est présentée dans le tableau 2 :

Tableau 2. Type de sol en fonction de la salure et de la conductivité électrique (Richards, 1969 ; Aubert, 1978)

	Types de sol				
	Non salé	Peu salé	salé	Très salé	Extrêmement salé
mS/cm	< 0.6	0.6- 1.2	1.2 – 2.4	2.4 – 6	> 6

En se basant sur les résultats de la conductivité électrique obtenus et d'après l'échelle de salure, nous avons pu classer nos échantillons de sol comme peu salé.

Lee et Hwang (2002), le taux d'humidité d'un sol est considéré comme faible si le pourcentage d'humidité est compris entre 2.0 et 9.0, modéré dans le cas où le pourcentage d'humidité varie de 9.1 à 13.0 et élevé si les valeurs sont comprises entre 13.1 et 20.0. Selon cette classification, le sol de nos échantillons présente un taux d'humidité élevée (compris entre 13.1 % et 20.0 %).

L'eau joue un rôle essentiel dans tous les phénomènes physiques, chimiques et biologiques qui se produisent dans le sol. Elle pourra entrer en compétition avec les molécules organiques pour l'adsorption sur les matériaux solide, entraînant une baisse de l'adsorption des polluants lorsque le taux d'humidité du sol augmente (Sayyad *et al.*, 2010).

La concentration en chlorure dans nos échantillons varie entre 19% et 53%. A cet effet, les pourcentages des échantillons de sol est faible.

et Hwang (2002) ont rapporté que le taux de matière organique (%) dans un sol est considéré comme : faible (4.0 – 7.0), modéré (7.1 – 9.0), élevé (9.1 – 11.0), très élevé (> 11.0). Selon cette référence le sol de nos échantillons présente un taux important en matière organique.

Selon Hubert et Schaub (2011), la matière organique joue un rôle physique dans le sol pour la cohésion, la structure, la porosité, la rétention ou le stockage de l'eau, etc.... Elle assure aussi un rôle biologique dans la stimulation de l'activité biologique (vers de terre, la biomasse microbienne). En plus, elle joue un rôle chimique dans la nutrition des plantes à travers des actions de dégradation, minéralisation, etc....La matière organique permet à la fois l'alimentation des plantes en libérant les éléments minéraux adsorbés et le stockage de ces

éléments. Par conséquent, elle empêche le lessivage des éléments minéraux en raison de la capacité très faible d'adsorption des colloïdes minéraux. Elle constitue l'un des principaux moteurs de l'amélioration de la fertilité du sol (Akanza *et al.*, 2002).

Les valeurs de nos échantillons varient entre 28 mg/l et 87 mg/l. A cet effet, les grandeurs des échantillons de sol sont modérées.

4.2. Isolement et dénombrement des champignons filamenteux

La figure 5 indique la densité des populations de moisissures analysées dans les échantillons de sol examinés. Le dénombrement des champignons montre que la densité des moisissures sur PDA ($29,84 \cdot 10^5$ UFC/g sol) est nettement supérieure à celle obtenue sur le milieu sélectif TSM ($18,33 \cdot 10^5$ UFC/g sol).

L'isolement des champignons de sol cultivés sur les deux milieux gélosés PDA et TSM, est une étape indispensable car elle permet, d'une part, d'effectuer un dénombrement des champignons par comptage des colonies isolées, et d'autre part, de vérifier la pureté des isolats pour réaliser des identifications.

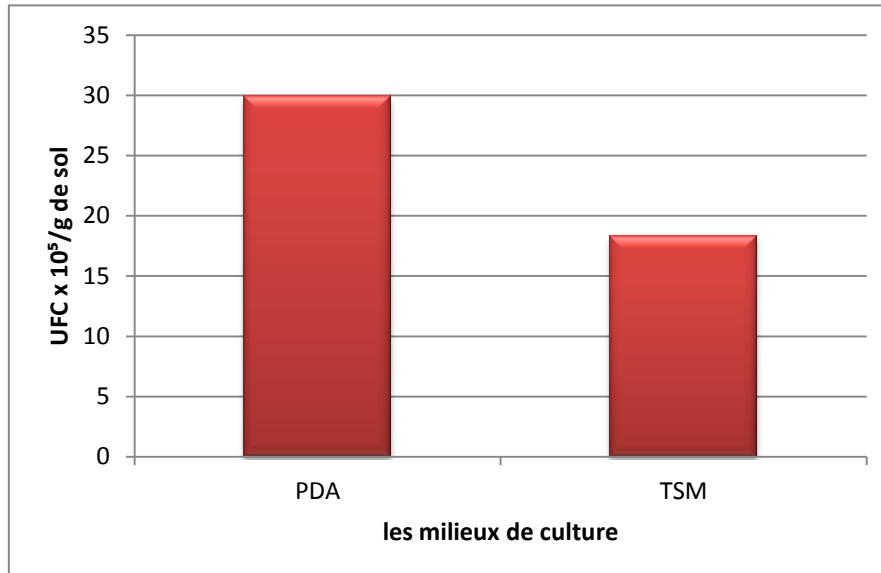


Figure 9. Densité des champignons dans les sols collectés de la région de Biskra.

4.3. Obtention des souches fongiques pures

Les cultures des suspensions du sol diluées sur milieux PDA et TSM ont permis l'obtention de 11 isolats différents de champignons filamenteux. Les résultats sont rassemblés

dans les tableaux 3 et 4, ils font apparaître la répartition des souches de moisissures apparues dans chaque échantillon.

Tableau 3. Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol de sur PDA.

Echantillon	dilution	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
P1	SM	-	-	-	-	-	-	-
P1	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	+	+
P1	10 ⁻²	-	-	-	+	+	++	++
P1	10 ⁻³	-	-	+	+	++	+++	+++
P2	SM	-	-	-	-	-	-	-
P2	10 ⁻¹	-	-	+	+	+	+	+
P2	10 ⁻²	-	-	+	++	++	++	+++
P2	10 ⁻³	-	-	+	+	++	++	++
P3	SM	-	-	-	-	-	-	-
P3	10 ⁻¹	-	+	+	++	++	++	++
P3	10 ⁻²	-	-	+	+	++	++	++
P3	10 ⁻³	-	-	+	+	+	++	++
P4	SM	-	-	-	-	-	-	-
P4	10 ⁻¹	-	-	+	++	++	+++	+++
P4	10 ⁻²	-	-	+	+	+	++	++
P4	10 ⁻³	-	-	+	+	+	++	++
P5	SM	-	-	-	-	-	-	-
P5	10 ⁻¹	-	+	+	++	++	+++	+++
P5	10 ⁻²	-	+	+	+	+	+	+
P5	10 ⁻³	-	-	+	+	+	+	+
O1	SM	-	-	-	-	-	-	-
O1	10 ⁻¹	-	-	+	+	+	++	++
O1	10 ⁻²	-	+	+	++	++	+++	+++
O1	10 ⁻³	-	+	+	+	+	+	+
O2	SM	-	-	-	-	-	-	-
O2	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	+	+
O2	10 ⁻²	-	+	+	+	+	+	+
O2	10 ⁻³	-	+	+	+	+	+	+
O3	SM	-	-	-	-	-	-	-
O3	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	+	+
O3	10 ⁻²	-	+	++	++	+++	+++	+++
O3	10 ⁻³	-	+	++	+++	+++	+++	+++
O4	SM	-	-	-	-	-	-	-
O4	10 ⁻¹	-	-	+	+	++	++	++
O4	10 ⁻²	-	-	-	+	+	+	+
O4	10 ⁻³	-	+	+	++	+++	+++	+++
O5	SM	-	-	-	-	-	-	-
O5	10 ⁻¹	-	+	+	+	+	++	++
O5	10 ⁻²	-	+	+	+	+	+	+
O5	10 ⁻³	-	+	+	+	++	++	++
B1	SM	-	-	-	-	-	-	-

B1	10⁻¹	-	+	++	++	++	++	++
B1	10⁻²	-	+	+	++	++	+++	+++
B1	10⁻³	-	+	+	+	++	++	++
B2	SM	-	-	-	-	-	-	-
B2	10⁻¹	-	-	+	+	+	++	++
B2	10⁻²	-	+	+	+	++	++	++
B2	10⁻³	-	-	-	+	+	+	+
B3	SM	-	-	-	-	-	-	-
B3	10⁻¹	-	+	+	+	+	+	+
B3	10⁻²	-	+	+	++	++	+++	+++
B3	10⁻³	-	-	-	+	+	+	+
B4	SM	-	-	-	-	-	-	-
B4	10⁻¹	-	-	+	+	+	+	+
B4	10⁻²	-	+	+	++	++	+++	+++
B4	10⁻³	-	+	+	+	+	+	+
BB5	SM	-	-	-	-	-	-	-
B5	10⁻¹	-	+	+	+	+	+	+
B5	10⁻²	-	-	-	+	+	+	+
B5	10⁻³	-	+	+	++	++	++	++

J: jour. - : absence des colonies. +: Nombre de colonie des moisissures entre 01 et 10.

++ : Nombre de colonie des moisissures entre 10 et 30. +++ : Nombre de colonie des moisissures >30.

Tableau 4. Observations quotidiennes de l'ensemencement des différentes dilutions du sol de sur TSM.

Echantillon	dilution	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8
P1	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
P1	10⁻¹	-	-	+	+	+	+	+	+
P1	10⁻²	-	+	+	+	+	+	+	+
P1	10⁻³	-	+	+	+	++	++	++	++
P2	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	10⁻¹	-	-	+	+	+	+	+	+
P2	10⁻²	-	+	-	+	+	+	+	+
P2	10⁻³	-	-	+	+	+	+	+	+
P3	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
P3	10⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+
P3	10⁻²	-	-	+	+	+	+	+	+
P3	10⁻³	-	+	+	+	++	++	++	++
P4	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
P4	10⁻¹	-	-	+	++	++	++	++	++
P4	10⁻²	-	+	+	+	+	+	+	+
P4	10⁻³	-	+	+	+	++	++	+++	+++
P5	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
P5	10⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+
P5	10⁻²	-	-	+	+	+	+	+	+

P5	10⁻³	-	+	+	+	+	+	+	+
O1	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
O1	10⁻¹	-	-	+	+	+	+	+	+
O1	10⁻²	-	+	+	+	+	++	++	++
O1	10⁻³	-	+	+	++	++	+++	+++	+++
O2	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
O2	10⁻¹	-	-	+	+	+	+	+	+
O2	10⁻²	-	-	+	+	+	+	+	+
O2	10⁻³	-	-	+	+	+	++	++	++
O3	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
O3	10⁻¹	-	+	+	+	+	++	++	++
O3	10⁻²	-	+	+	+	+	+	+	+
O3	10⁻³	-	+	+	++	++	++	++	++
O4	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
O4	10⁻¹	-	-	+	+	+	+	+	+
O4	10⁻²	-	+	+	+	+	++	++	++
O4	10⁻³	-	+	+	+	++	++	+++	+++
O5	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
O5	10⁻¹	-	-	+	+	+	+	+	+
O5	10⁻²	-	+	+	+	++	++	++	++
O5	10⁻³	-	+	+	+	++	++	++	++
B1	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	10⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+
B1	10⁻²	-	+	+	++	++	+++	+++	+++
B1	10⁻³	-	+	+	++	++	+++	+++	+++
B2	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	10⁻¹	-	+	+	+	+	++	++	++
B2	10⁻²	-	+	+	+	+	++	++	++
B2	10⁻³	-	+	+	+	+	+	+	+
B3	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	10⁻¹	-	-	+	+	+	+	+	+
B3	10⁻²	-	+	+	+	+	+	+	+
B3	10⁻³	-	+	+	+	++	++	++	++
B4	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	10⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+
B4	10⁻²	-	+	+	+	+	++	++	++
B4	10⁻³	-	+	+	+	+	+	+	+
BB5	SM	-	-	-	-	-	-	-	-
B5	10⁻¹	-	+	+	+	+	+	+	+
B5	10⁻²	-	+	+	+	++	++	++	++
B5	10⁻³	-	+	+	+	+	++	++	++

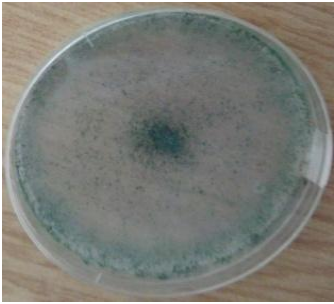
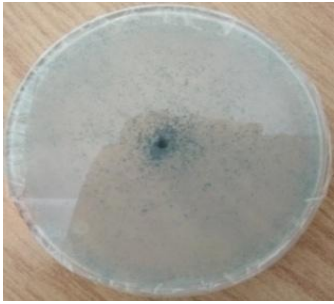
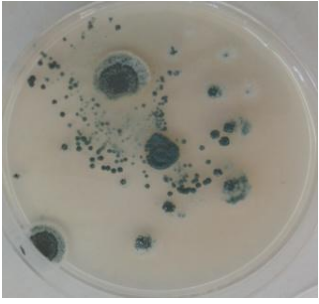
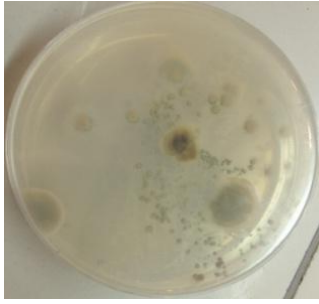
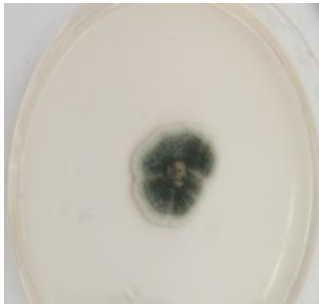

J: jour. - : absence des colonies. +: Nombre de colonie des moisissures entre 01 et 10.

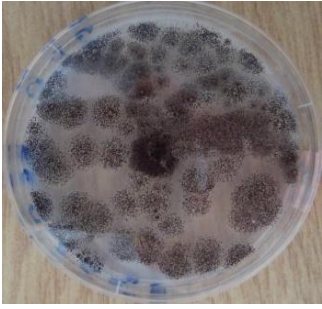



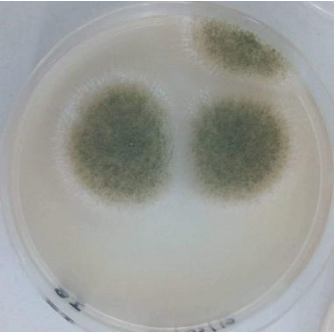
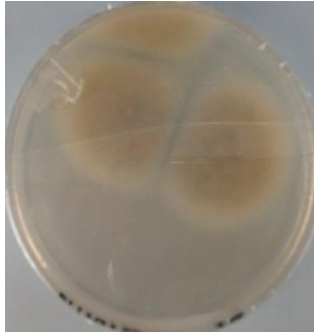

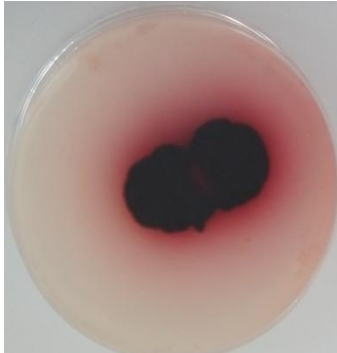
++ : Nombre de colonie des moisissures entre 10 et 30. +++ : Nombre de colonie des moisissures >30.

4.4. Identification des isolats de moisissures

Dans le but de déterminer le genre et même l'espèce de nos isolats de moisissures, des observations macroscopique et microscopique au grossissement $\times 40$ sont effectuées. Cette étude est suivie par une comparaison de nos résultats aux références Sanier *et al.* (1966) et Nguyen (2007) et St-Germain (2012). Les résultats trouvés sont rassemblés dans le tableau 5 pour l'observation macroscopique, et tableau 6 pour l'observation microscopique.

Tableau 5. Aspects macroscopiques des moisissures isolées.

N°	Recto	Caractères macroscopiques	Verso
1		<p><i>Trichoderma atroviride</i></p> <p>Recto et verso : colonie de couleur vert foncé. Croissance : rapide et extensive. Aspect : laineux. Relief de la colonie : plat. Colonies : denses.</p>	
2		<p><i>Penicillium sp.</i></p> <p>Recto : colonie de couleur vert sombre. Verso : vert jaunâtre. Croissance : moyenne. Aspect : poudreux. Relief de la colonie : colonie avec un centre bombé.</p>	
3		<p><i>Trichoderma sp.</i></p> <p>Recto et verso : colonie de couleur verte au centre et blanc au bord. Croissance : très lente. Aspect : laineux. Relief de la colonie : plat.</p>	

4		<p><i>Aspergillus niger</i></p> <p>Recto : colonie de couleur noire. Verso : incolore. Croissance : très rapide. Aspect : colonie granuleuse. Relief de la colonie : plat.</p>	
5		<p><i>Alternaria sp.</i></p> <p>Recto : colonie brun-foncé. Verso : incolore. Croissance : très rapide. Aspect : velouté à laineux. Relief de la colonie : plat.</p>	
6		<p><i>Aspergillus sp.01</i></p> <p>Recto : colonie de couleur verte au centre et blanc au bord. Verso : incolore. Croissance : rapide. Aspect : colonie granuleuse. Relief de la colonie : plat. Pigment : dans certains milieux existe un pigment jaune.</p>	
7		<p><i>Fusarium sp.</i></p> <p>Recto et verso : colonie de couleur noire au centre et rouge au bord. Croissance : moyenne. Aspect : poudreux Relief de la colonie : plat Pigment : rouge.</p>	



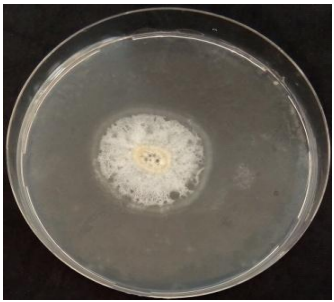

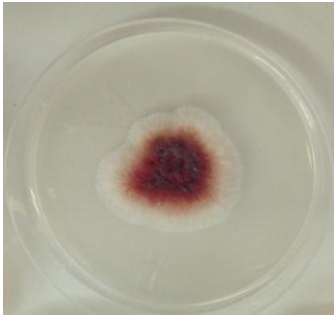
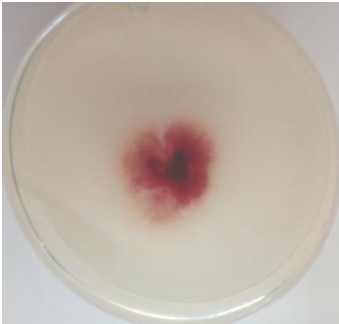
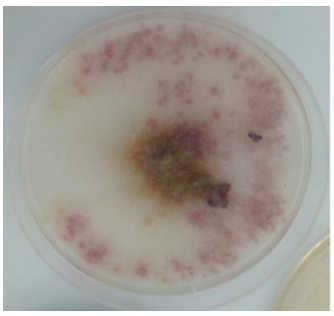
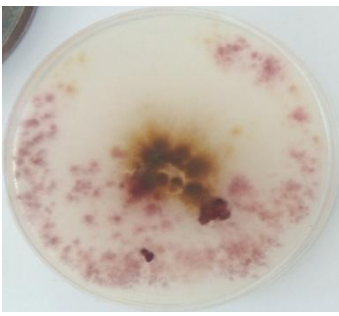
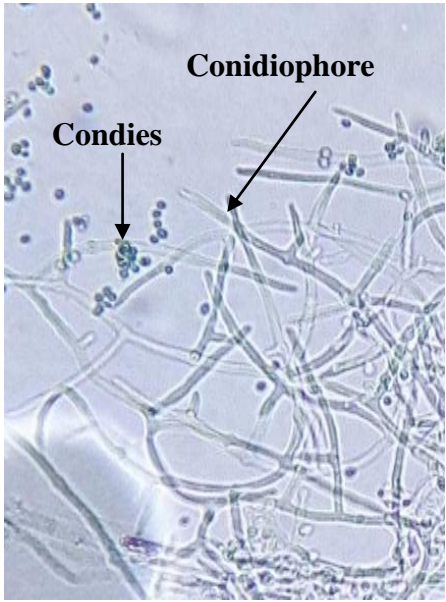
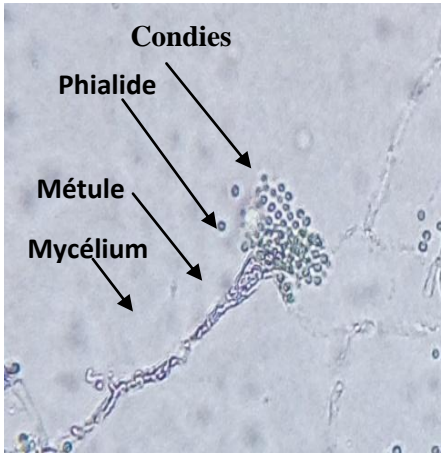
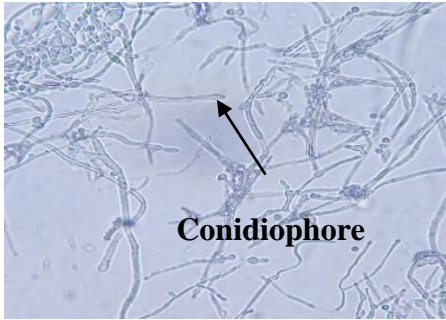

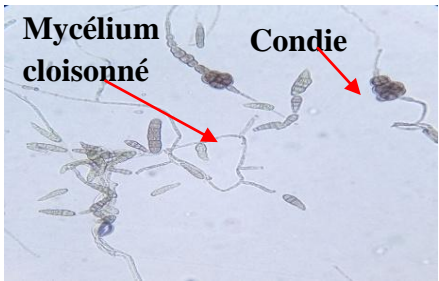
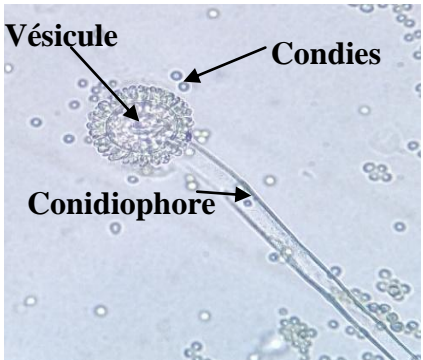
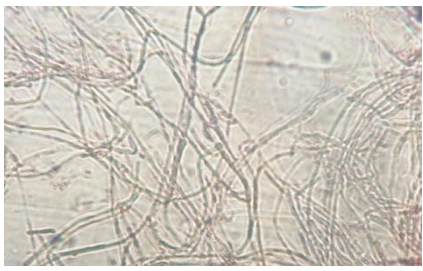
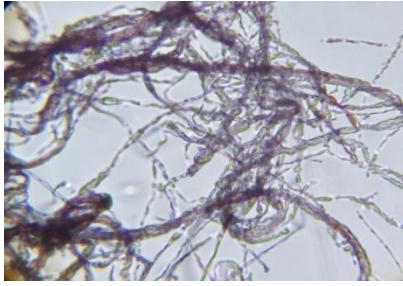
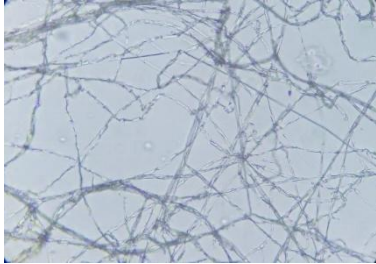
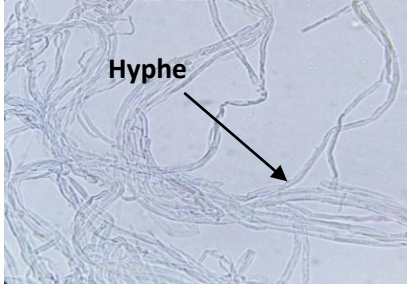
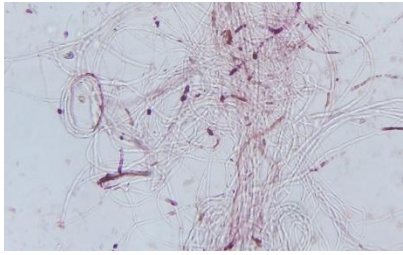
8		<p style="text-align: center;"><i>Souche 8</i></p> <p>Recto : noire. Verso : noire. Croissance : rapide. Aspect : poudreux Relief de la colonie : plat Pigment : noire.</p>	
9		<p style="text-align: center;"><i>Mycélium stérile</i></p> <p>Recto : colonie d'abord transparente puis blanche et jaune au centre. Verso : incolore. Croissance: rapide. Aspect : duveteux. Relief de la colonie : colonie plat.</p>	
10		<p style="text-align: center;"><i>F. graminearum</i></p> <p>Recto et Verso : colonies de couleur rouge au centre et blanche au bord. Croissance : rapide. Aspect : duveteux. Relief de la colonie : colonie plat avec la présence du mycélium aérien.</p>	
11		<p style="text-align: center;"><i>F. graminearum</i></p> <p>Recto et Verso : colonies de couleur rouge au centre et blanche au bord. Croissance : rapide. Aspect : duveteux. Relief de la colonie : colonie plat avec la présence du mycélium aérien.</p>	

Tableau 6. Aspects microscopiques des moisissures isolées.

N °	Les caractères microscopiques	Aspect microscopique (X 40)
1	<p>Les conidiophores : avec ramification motif à angles droits.</p> <p>Phialides : en forme de flasque souvent courbées en spires de deux, trois ou quatre verticillées.</p> <p>Conidies : sous-globuleuses vert foncé, courtes ellipsoïdales, à paroi lisse; des chlamydo-spores étaient présentes.</p> <p>➤ Il s'agit probablement de la souche <i>Trichoderma atroviride</i>.</p>	 <p>Microscopic image showing conidiophores (ramified structures) and conidia (small, dark, ellipsoidal spores). Labels: Conidiophore, Conidies.</p>
2	<p>Hyphes : septés, hyalines.</p> <p>Conidiophores : sont triverticillés et régulièrement ramifiés.</p> <p>Métules : portent les phialides qui forment les longues chaînes de conidies.</p> <p>Phialides : sont serrées les unes contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau</p> <p>Conidies : sont rondes, hyalines, lisses.</p> <p>➤ Cette souche appartient au genre <i>Penicillium</i>.</p>	 <p>Microscopic image showing a brush-like structure of conidia (small, round, hyaline spores) attached to a phialide, which is part of a metula, and the entire structure is supported by mycelium. Labels: Conidies, Phialide, Métule, Mycélium.</p>
3	<p>Les conidiophores : ramifiées.</p> <p>➤ Il s'agit probablement de la souche <i>Trichoderma sp.</i></p>	 <p>Microscopic image showing branched conidiophores. Label: Conidiophore.</p>

4	<p>Conidiophore: lisse, hyalin, très long. Vésicule: globuleuse. Phialides: insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposés sur tout le pourtour de la vésicule. Conidies: globuleuses, brunes, échinulées, souvent disposées en chaînes. Tête aspergillaire: bisériée radiée, noire à maturité.</p> <p>➤ Il s'agit probablement de la souche <i>Aspergillus niger</i>.</p>	
5	<p>Conidies : brunes, lisses en forme de mures, produites en chaînes, en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement. Conidiospores : septés, lisses, droits.</p> <p>➤ Cette souche appartient au genre <i>Alternaria</i>.</p>	
6	<p>Conidiophore : lisse, jaunâtre, généralement longue. Vésicule: ovale. Phialides: portées par des métules insérés sur tout le pourtour de la vésicule. Conidies: globuleuses, échinulées, Tête aspergillaire: bisériée, radiée</p> <p>➤ Il s'agit probablement de la souche <i>Aspergillus versicolor</i></p>	
7	<p>Hyphes : sont septés et hyalins. Phialides (monophialide) sont longues et fines. Conidies : macroconidies sont de forme fusiforme.</p> <p>➤ Cette souche appartient au genre <i>Fusarium</i>.</p>	

8	<p>Hyphes : séptés. Spores : absentes</p>	
9	<p>Hyphes : séptés. Spores : absentes. → Il s'agit du <i>Mycélium stérile</i></p>	
10	<p>Hyphes : sont septés et hyalins. Spores : absentes. ➤ Cette souche appartient au genre <i>Fusarium</i>.</p>	
11	<p>Hyphes : sont septés et hyalins. Spores : absentes. Cette souche appartient au genre <i>Fusarium</i>.</p>	

4.5. Les tests antagonismes

4.5.1. Test de confrontation directe

Le résultat obtenu du test de confrontation directe est présenté dans la figure suivante :

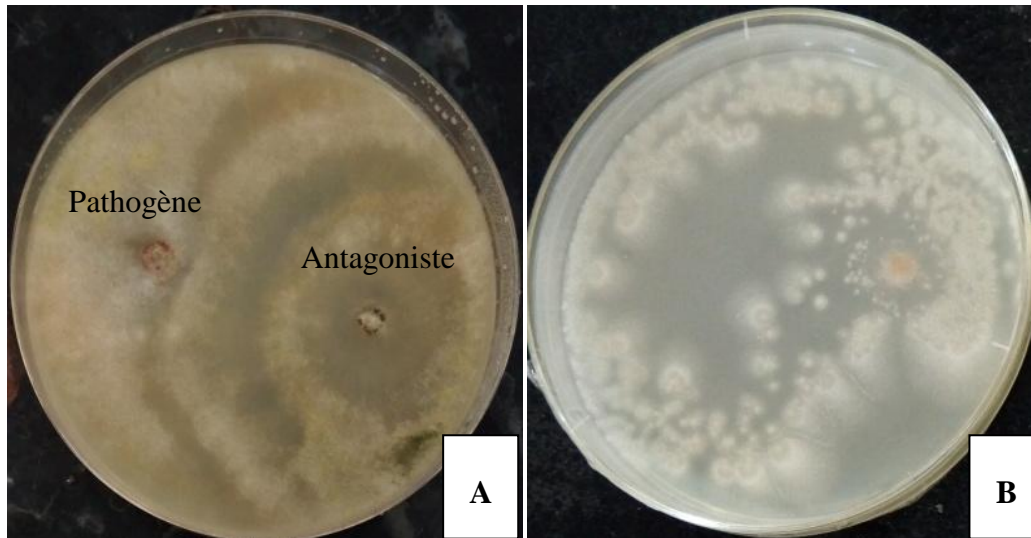


Figure 10. (A) Confrontation directe entre *T. atroviride* (position à droite) et *F. graminearum* (position à gauche) à température 28°C. (B) Témoin.

Ce résultat montre que la croissance mycélienne de la souche témoin *F. graminearum* est plus importante en comparaison à celle obtenus avec la confrontation (Pathogène-Antagoniste). Après 7 jours d'incubation à 28°C, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste, et une action inhibitrice a été observée avec une vitesse de croissance remarquable (Figure 20), cette action est exercée par *T. atroviride*, alors que la croissance mycélienne de pathogène *F. graminearum*, n'occupe qu'une surface de 19 mm de diamètre ce qui correspond à un taux d'inhibition compris entre 0 % et 68.33 %.

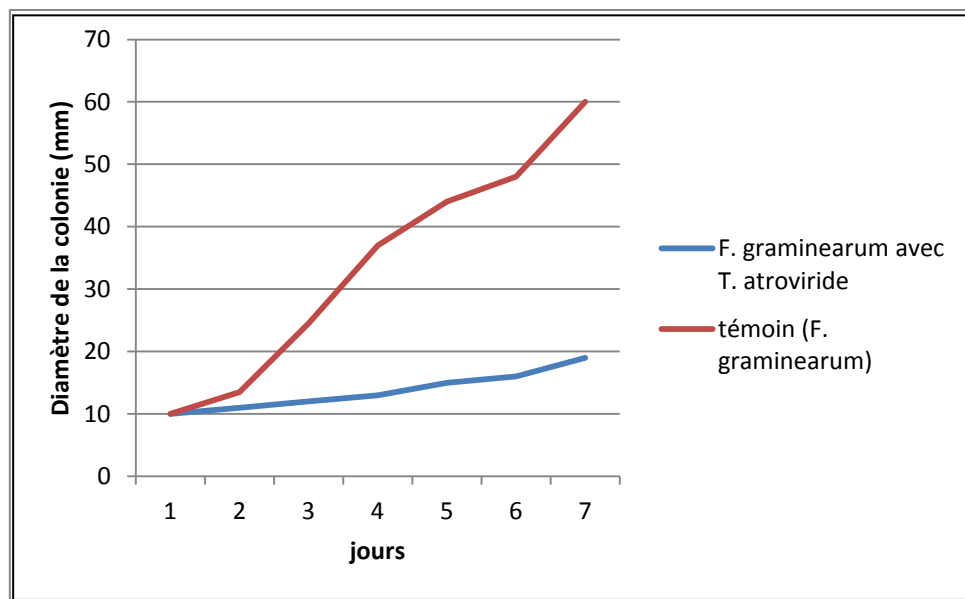


Figure 11. Inhibition de la croissance de *F. graminearum* en présence et en absence de *T. atroviride* (Test direct).

D'après les résultats obtenus par Kurt (2005) qui a montré que l'antagonisme *T. atroviride* testé contre *R. solani*, a pu après seulement 5 jours, de sporuler sur le bord opposé de la plaque. Berber *et al.*, (2009) ont rapporté que les conidies de *T. atroviride* testés à l'égard de *R. solani* ont inhibé la germination des conidies des agents pathogènes, une interaction hyphale importante avec un enroulement intense dans la zone de contact sont observées.

4.5.2. Test de confrontation à distance

Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur à distance de l'isolat *T. atroviride* à l'égard de *F. graminearum* (Figure 21 et 22).

Le résultat obtenu montre un ralentissement de la croissance mycélienne de la souche pathogène exercée par *T. atroviride* comparativement au témoin et on a remarqué que la croissance mycélienne de témoin *F. graminearum* continue avec le temps. Malgré l'absence d'un contact direct entre l'agent pathogène et la souche antagoniste, il y'a un effet inhibiteur exercé par *T. atroviride* sur le développement de la colonie de pathogène (*F. graminearum*).



Figure 12. Test d'antagonisme par confrontation à distance.

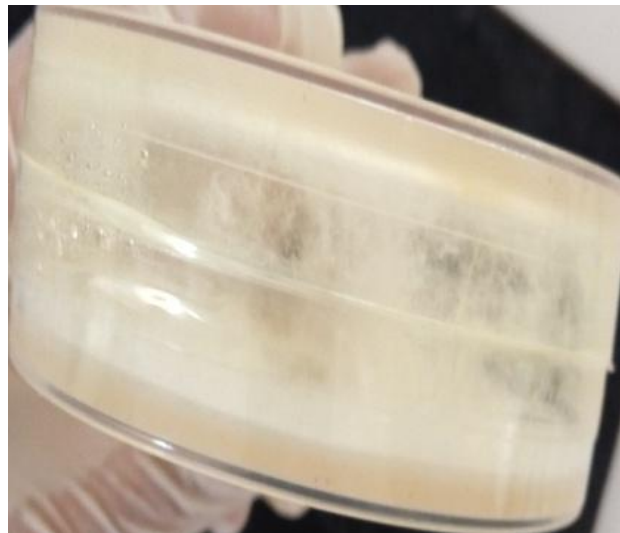


Figure 13. Test d'antagonisme par confrontation à distance.

D'après ce résultat *Trichoderma* sp. a la capacité de produire des substances volatiles qui sont capable de limiter et même de stopper le développement de l'agent pathogène, cette action inhibitrice est due à des substances de nature chimique libérées par les souches de *Trichoderma* sp. (Harman, 2006).

4.6. Test de l'activité protéolytique

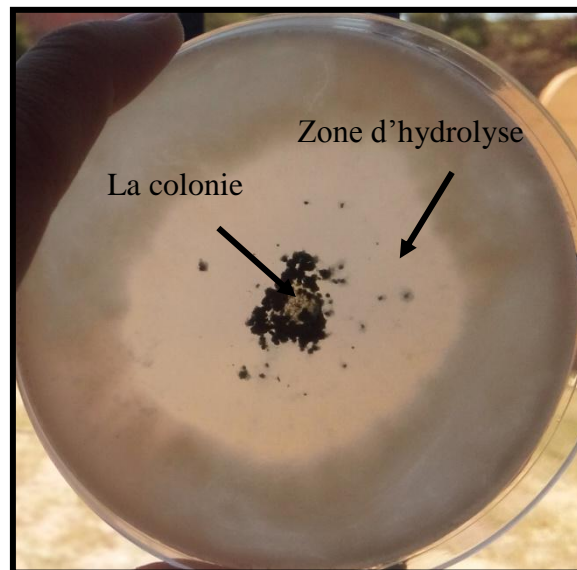
4.6.1. Caséinase

L'isolat *T. atrovide* a été ensemencé sur le milieu LG à 30%. Les mesures de diamètres de la zone de lyse effectuées pendant une semaine sont résumées dans le tableau ci-après.

Tableau 7. Mise en évidence de l'activité protéolytique de *T. atoviride* sur le LG à 30%.

Les jours	1j	4j	7j
Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm)	0	4	8

Nos résultats permettent de considérer l'isolat *T. atoviride* comme une moisissure productrice de protéases exocellulaires capable de dégrader la caséine du lait comme substrat (Figure 23).

**Figure 14.** Mise en évidence de l'activité protéolytique de *T. atoviride* sur lait gélifié à 30%.

Plusieurs travaux ont rapporté que l'espèce *T. atoviride* est un bon producteur de protéase (Mata *et al.*, 2001 ; Elad et Kapat, 1998). Les protéases fongiques jouent un rôle important dans la lyse de la paroi cellulaire des agents pathogènes, en catalysant le clivage des liaisons peptidiques dans les protéines.

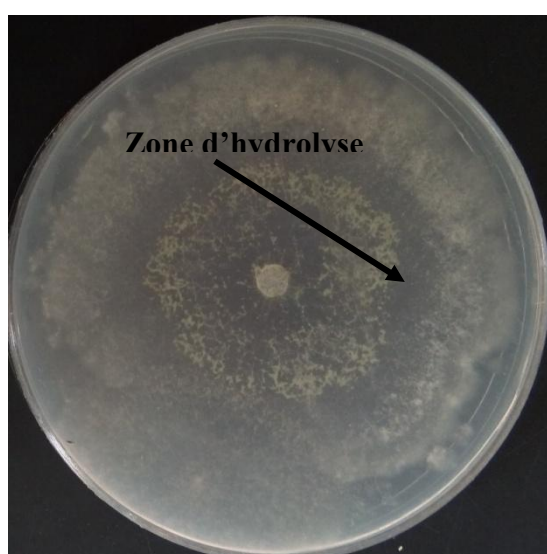
4.6.2. gélatinase

Le résultat de l'ensemencement de l'isolat *T. atoviride* sur gélose gélatinée est résumé dans le tableau 8.

Tableau 8. Mise en évidence de l'activité protéolytique *T. atroviride* sur gélose gélatinée.

Les jours	1j	4j	7j
Diamètre d'hydrolyse (mm)	0	0	4.3

Ces résultats permettent de considérer l'isolat *T. atroviride* comme productrice de gélatinase exocellulaire capable de dégrader la gélatine (Figure 24).

**Figure 15.** Mise en évidence de l'activité protéolytique de *T. atroviride* sur gélose gélatinée.

La capacité de l'espèce *T. atroviride* à produire de la protéase extracellulaire dégradant la gélatine comme seule source de carbone et d'énergie a été rapportée par Geremia *et al.* (1993)

4.6.3. Mise en évidence de l'activité lipolytique

Le tableau 9 présente le résultat des mesures de la zone de lyse de *T. atroviride* sur milieu gélosé à base de tween à 1 %. La zone de lyse observée sur ce milieu est présentée dans la figure 25.

Tableau 9. Mise en évidence de l'activité lipolytique de *T. atroviride* sur gélose à base de tween 1%.

jours	1j	4j	7j
Diamètre d'hydrolyse (mm)	0	2.1	2.1

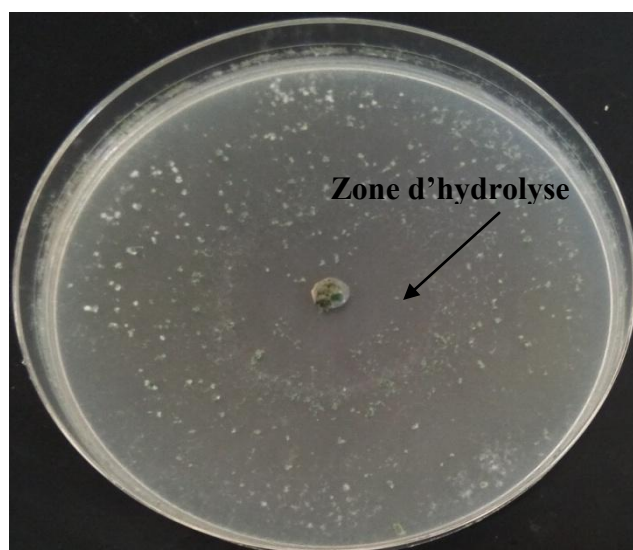


Figure 16. Mise en évidence de l'activité lipolytique de *T. atroviride* sur milieu gélose à base de tween 1 %.

4.6.4. Mise en évidence de l'activité pectinolytique

Le test de l'activité pectinolytique a été réalisé sur un milieu gélosé à base de pectine, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 10.

Tableau 10. Mise en évidence de l'activité pectinolytique de *T. atroviride* sur un milieu gélosé à base de pectine.

jours	1j	4j	7j
Activité	-	++	+++

(-) : Activité absente, (++) : Activité enzymatique moyenne, (+++): Activité enzymatique forte.

Les résultats présentés dans la figure 26, permettent de considérer l'isolat *T. atroviride* comme moisissure pectinolytique, utilisant la pectine comme seule source de carbone et d'énergie.

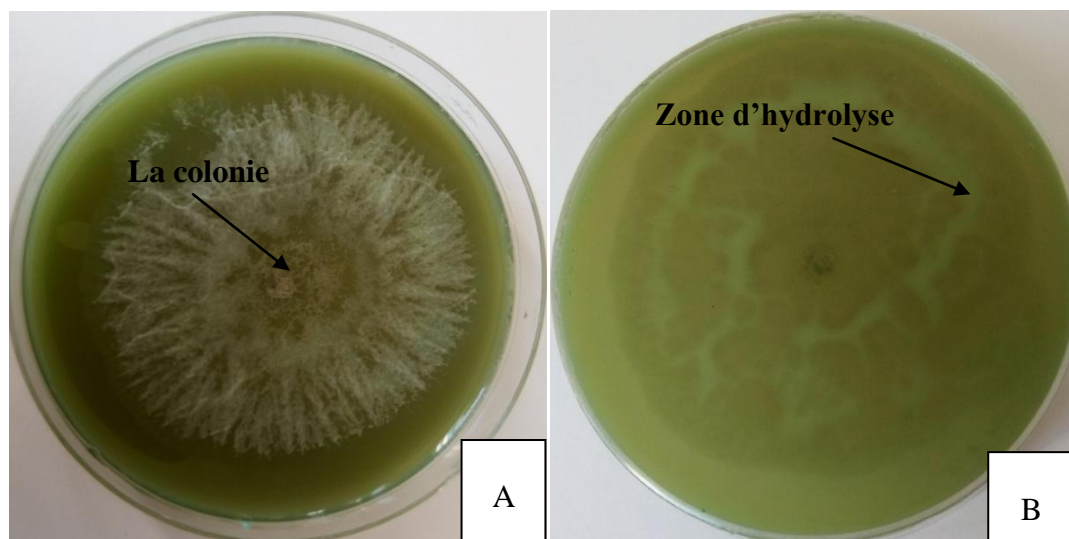


Figure 17. Mise en évidence de l'activité pectinolytique : (A) Recto de la boîte de pétri, (B) verso de la boîte de pétri.

Un résultat similaire est rapporté par Emma et Simeon. (2008) qui ont testé la sécrétion des hydrolases d'une souche de l'espèce *T. atroviride* sur milieux gélosés. La souche a présenté notamment une bonne activité pectinolytique par rapport aux autres activités.

4.6.5. Mise en évidence de l'activité amylolytique

L'activité amylolytique de l'isolat *T. atroviride* est testée sur milieu PDA à 1% d'amidon. L'hydrolyse de ce dernier a été révélée par l'addition de lugol. Les résultats de ce test sont mentionnés dans le tableau ci-après.

Tableau 11. Mise en évidence de l'activité amylolytique de *T. atroviride*.

Jours	1j	4j	7j
Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm)	0	5.7	8

L'hydrolyse d'amidon a été révélée par l'addition de lugol (iodure de potassium). L'amidon donne avec l'iode un composé bleu violacé, dont la zone contenant le résultat d'hydrolyse d'amidon reste claire (Leuchtenberger *et al.*, 1989). Dans la présente étude, l'apparition de cette zone confirme la sécrétion d'amylase extracellulaire par notre isolat *T. atroviride* (Figure 27).

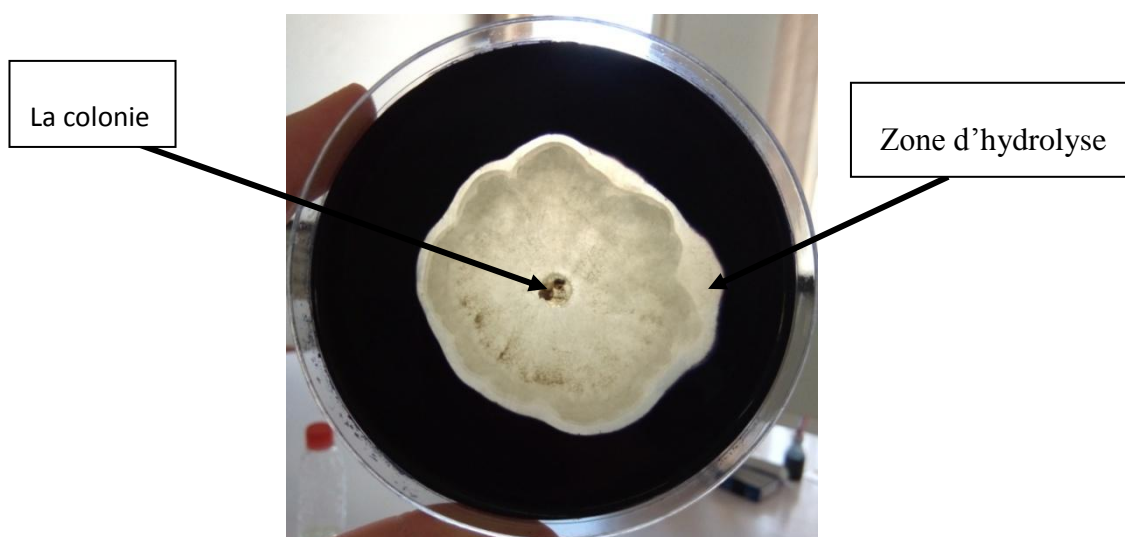


Figure 18. Mise en évidence de l'activité amylolytique de *T. atroviride*.

Un résultat similaire est décrit par Aline *et al.*(2000), qui ont rapporté que six souches de l'espèce *T. atroviride* ont présenté une bonne production d'amylase sur milieu liquide avec une différence significative intra-espèce.

4.6.6. Mise en évidence d'activité cellulosique

Le résultat du test de l'activité cellulolytique est résumé dans le tableau 12. La figure 28 permet d'observer clairement la zone de lyse.

Tableau 12. Mise en évidence de l'activité cellulosique de *T. atroviride*.

jours	4j	7j
Activité	+	+

(+) : Activité enzymatique moyenne

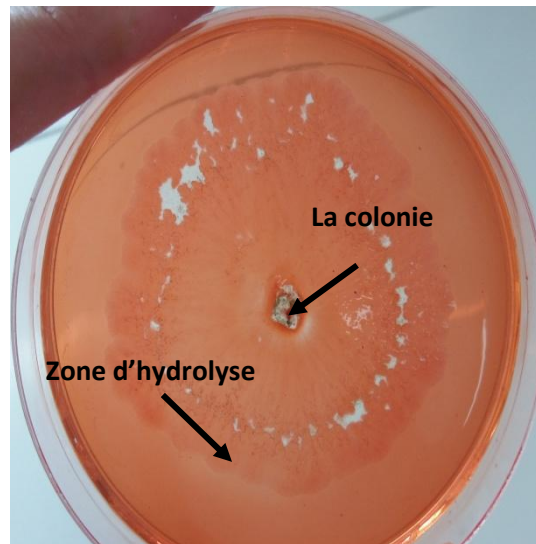


Figure 19. Mise en évidence de l'activité cellulosique de *T. atroviride*.

Ce résultat permet de considérer notre isolat *T. atroviride* comme cellulolytique. Des résultats similaires sur la même espèce sont rapportés par plusieurs travaux (Jaleed et Ralph, 1986 ; Nevalainen et Penttila, 1995 ; Anita *et al.*, 2012)

Conclusion

Conclusion

Après l'isolement et la purification des moisissures sur milieu PDA et TSM, des études macroscopiques et microscopiques ont été effectuées pour identifier les souches mycéliennes isolées. Ces études ont permis d'identifier 11 isolats différents appartenant à cinq genres, qui sont ; *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*.

L'activité antagoniste de notre isolat *T. atroviride* contre l'agent pathogène provoquant la fusariose de blé, *F. graminearum*, a été étudiée selon deux méthodes, confrontation directe et indirecte. Les résultats de ces tests nous ont permis de confirmer et de préciser l'importance de *T. atroviride* comme agent antagoniste à l'égard de *F. graminearum*. Ce test peut servir à une éventuelle application après un test *in vivo* pour l'exploitation des propriétés antagonistes de notre isolat en biocontrôle.

L'utilisation des milieux gélosés sélectifs contenant le substrat de l'enzyme comme inducteur et source de carbone ont permis la mise en évidence de six activités hydrolytiques extracellulaires chez notre isolat *T. atroviride*, à savoir ; l'activité amylolytique, cellulolytique, protéolytique (gélatinase et caséinase), pectinolytique et lipolytique. Ces résultats confirment le résultat du potentiel antagoniste de l'isolat *T. atroviride*, dont cette espèce est connue par son pouvoir mycoparasitaire impliquant, en particulier des enzymes hydrolytiques pour la dégradation de la paroi cellulaire de l'agent pathogène.

Références

Références

- Akanza P., N'zue B., Anguete K. 2002. influence de la fumure minerale et de la litière de volaille sur la production du manioc (*Manihot esculenta* Crantz) en Cote d'Ivoire. *Agronomie africaine* 14:pp. 79-89.
- Aline M. C., Janice L., Carlos R. F. 2000. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *FEMS Microbiology letters* 188:pp. 171-175.
- Anita S., Ponmurugan P., Ganesh Babu R. 2012. Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichoderma atroviride* isolates for the biological control of Phomopsis canker disease. *African Journal of Biotechnology* 11(45):pp. 10350-10357
- Arseniuk E., Foremska E., Goral T., Chelkowski J. 1999. *Fusarium* head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. *J. Phytopathol. Phytopathol. Z* 147:pp. 577-590.
- Atev A. P., Spassov S. D., Panayotov H. A., Bakalova N. G. 1983. Screening of micromycetes strains synthesizing cellulose enzymes. *Comptes rendes de l'Academie bulgare des Sciences* 36 (4):pp. 533-536.
- Aubert G. 1978. Méthodes d'analyses des sols. FAO, France, p. 191.
- Benhamou N., Chet I., 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Appl. Environ. Microbiol* 63:pp. 2095–2099.
- Berber F., Ouazzani A., Badoc A., Douira A. 2009. Antagonisme *in vitro* et *in vivo* de deux *Trichoderma* a l'égard de quatre espèces de *bipolaris* pathogènes sur le sorgho, *bull. soc. Pharm. bordeaux*, 148:pp. 93-114.
- Bissett J. A. 1984. Revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot* 69:pp. 2373-2417.
- Bornscheuer T. 2002. Microbial carboxylesterases. classification, properties, and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* pp. 73-81.

- Borah K. K., Bhuyan B., Sarma H. P. 2010. Lead, arsenic, fluoride, and iron contamination of drinking water in the tea garden belt of Darrang district, Assam, India. *Environmental monitoring and assessment* 169:pp. 347-352.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Guy P. H., Larpent J. P., Reyond P., Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P. 1990. *Moisissures utiles nuisibles importance industrielle*. 2 ème Edition Masson. Collection biotechnologie. p :34-428.
- Bouchamal F., Achour S. 2015. Qualité physico-chimique et paramètre de pollution des eaux souterraines de la région de Biskra. *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680, n°22: pp. 197-212.
- Bouregghda H. 2009. Recherche de l'effet antagoniste de *Trichoderma spp.* A l'égard de *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris (Padwick) Matuo et K. Sato (Foc), agent du flétrissement du pois chiche. Thèse de doctorat, institut National Agronomique, El Harrach, 143 p.
- Cahagnier B., Richard-Molard D. 1998. *Analyses mycologiques les moisissures des aliments peu hydratés*. tec et doc, paris. p.152.
- Caron. 2002. *Phytopathologiste horti-protection inc.conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.champignons phytopathogènes du sol*.bull.soc.pharm 144:pp. 211-224.
- Chaib R., Slimane H. N. 2013. Etude des paramètres influant la production de lipases par deux souches leuvurienne. Mémoire Master en Microbiologie, Université Constantine 1, Algérie, p. 56
- Chet I. 1987. *Trichoderma: application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi*. Innovative approaches to plant disease control, Wiley, New York. pp. 137-160.
- Chiou C. T., Shoup T. D. 1985. Soil Sorption of organic vapors et Effects of Humidity on sorptive mechanism et capacity, vol. 18, *Env. Sci. Technol.* pp. 4-10.
- Cook R. J., Baker K. F. 1983. *The nature and practice of biological control of plants pathogens*. St Paul, MN: APS Press, 539 p.

- Cruz J., Pintor-Toro J. A., Benítez T., Llobell A., Romero L. C. 1995. A novel endo β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol* 177(23):pp. 6937-6945.
- Daami- Remadi M., El Mahjoub M. 2001. Lutte biologique contre la pourriture aqueuse des tubercules de pomme de terre par *Trichoderma harzianum*. *Ann. l'INRAT* 74:pp. 167–186.
- Davet P., Rouxel F. 1997. Détection et isolement des champignons du sol. volume 147. Techniques et pratiques. Paris. 203 p.
- Dendouga W. 2006. Isolement et identification de moisissures productrices de protéase à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Thèse de magistère, Université Mentouri. Constantine, p.120.
- Dendouga w., Boureghda H., Belhamra M. 2016. Edaphic factors affecting distribution of soil fungi in Algeria desert. *Courrier du savoir* 19: 147-152.
- Denis B. 1988. Guide des analyses courantes en pédologie. INRA, Paris, p. 20.
- Difallah S. 2009. Etudes bibliographique de la génétique de résistance *drechslerateres*. Mémoire, Université Mohamed Boudiaf de M'sila, Algérie, pp.6-7
- Eduardo F., Daniel H., Gabriel G. M., Raúl R., Francisco C. 2011. *In-vitro* behavior of *Trichoderma* sp. against *Phytophthora capsici* Leonian. *Afr. J. Agric. Res* 6:pp. 4594-4600.
- Elad Y., Kapat A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 105:pp. 177-189.
- Emma W. G., Simeon O. K. 2008. The use of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* as Potential biocontrol agents against peanut microflora and their effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. *Biotechnology* 7:pp. 439-447.
- Gooday G. W. 1995. The growing fungus. Chapman et Hall, London, pp. 43–66.
- Gutiérrez C., Gonzalez C. 1972. Methods for simultaneous detection of proteinase and esterase in extremely halophilic bacteria. *Appl Microbiol* 24:pp. 516–517.
- Gutierrez C., Gonzalez C., Ramirez C. 1978. *Halobacterium vallismortis* sp. nov. An amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 24:pp. 710–715.

- Harman G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:pp. 190-194.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H., El Mahjoub M. 2004. Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum f. sp. radicislycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 9 (3):pp. 163–171.
- Hlavackova P. 2005. Evaluation du comportement du cuivre et du zinc dans une matrice de type sol à l'aide de différentes méthodologies. Thèse de Doctorat, L'Institut National des Sciences Appliquées, Lyon, 207p.
- Hubert G., Schaub C. 2011. La fertilisants des sols. L'importance des matières organiques. Chambre d'Agriculture, BasRhin. Service Environnement-Innovation, 46 p.
- Jaleed S., Ahmad., Ralph Baker A. 1986. Competitive Saprophytic Ability and Cellulolytic Activity of Rhizosphere-Competent Mutants of *Trichoderma harzianum*. *Ecology and Epidemiology* 77:pp. 358-362
- Jarrar H. 2001. Bioélectrodes enzymatiques pour application en biocapteurs et en biopiles. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure de chimie, Montpellier, 163 p.
- Jensen B., Knudsen I., Jensen D., Hockenhull J. 1996. Application of antagonistic micro-organism to seeds to control fungal plantpathogens. *Combined Proceeding Plant Propagators Society*, 46p.
- Kader A. J., Omar O., Feng L. S. 1999. Isolation of cellulolytic fungi from the bario Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. *Review of Biodiversity and Environmental Conservation*.
- Kalisz H. M. 1988. Microbial proteinases. *Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnol* 36:pp. 14-65.
- Keating L., Kelly C., Forgraty W. 1998. Mechanism of action and the substrate dependant pH maximum shift of the- amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research* pp. 311-318.
- Khechai S. 2001. Contribution à l'étude du comportement hydro physiques des soles des périmètres d'I.T.D.A.S, plaine de l'Outaya. Thèse Magister., Ins. Agro. Université de Batna, 223 p.

-
- Korish M. 2003. Production, purification, properties and application of the cellulose from a wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes gutenberg-University, mainz, germany.
 - Kubicek C. P., Harman G. E. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* - Basic Biology, Vol. 1, Taxonomy and Genetics, London. 278 p.
 - Kurt B., Susanne Z., Rosalia C., Sheridian L. W., Matteo L., Christian P. K., Robert L. M. 2005. Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* To Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. *Applied and environmental microbiology* 71(7):pp.3959–3965
 - Laamari M., Jousselin E., Coeur D’acier A. 2010. Assessment of aphid diversity (Hemiptera: Aphididae) in Algeria: a fourteen-year investigation. *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology* 62 (2):pp. 73-87.
 - Larkin R. P., Fravel D. R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Dis* 82(9):pp. 1022-1028.
 - Larpent-Gourgaud M., Sangleer J. J. 1992. *Biotechnologies : principes et méthodes*. Collection Biosciences et techniques. Ed. Doin, Paris. 571:pp. 61-64.
 - Lee J. Y., Hwang B. K. 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48:pp. 407-417.
 - Leplat J. 2012. Développement saprotrophe de *Fusarium graminearum* : rôle respectif de différents habitats naturels du champignon dans le processus d'infection du blé en Bourgogne ; recherche d'indicateurs prédictifs du risque de fusariose. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, France, 303 p.
 - Leuchtenberger A., Liese F., Ruttloff H. 1989. Synthesis of Variable Enzymes Spectrum by Immobilised Mycelium of *Aspergillus niger*. *Zentrabl Microbiol.* pp. 139-149.
 - Lorito M., Farkas V., Rebuffat S., Bodo B., Kubicek C.P. 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* 178:pp. 6382-6385.

-
- Mata E., Magaldi S., Hartung D., Capriles C., Dedis L., Verde G., Perez C., Capriles C. 2001. *In vitro* antifungal activity of protease inhibitors. *Mycopathologia* 152:pp. 135-142.
 - McAuliffe. 2012. Industrial enzymes and biocatalysis handbook of industrial chemistry and biotechnology.
 - Morand T. 2001. Soil landscapes of the wood burn 1: 1000 000 sheet, departement of land water conservation, Sydney. pp. 203-224.
 - Mouria B., Ouazzani-Touhami A., Douira A. 2013. Isolement et identification de la mycoflore du compost des déchets urbains solides. Revue « Nature et Technologie ». C- Sciences de l'Environnement 09:pp. 13-28.
 - Najjar A. 2010. Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse de doctorat, Université de la méditerranée, Aix Marseille II, 132 p.
 - Nevalainen H., Penttilä M. 1995. Molecular biology of cellulolytic fungi In: The Mycota II. Genetics and Biotechnology. Küster U (ed.). Springer-Verlag, Berlin pp. 303-319.
 - Nguyen Minh T. M., 2007. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxine dans le riz commercialisé de cinq provinces de la région centrale du Vietnam- études des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. thèse de Doctorat, l'institut national polytechnique de Toulouse, Paris, 101 p.
 - Papavizas G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu Rev Phytopathol* 23:pp. 23-54.
 - Parry D. W., Jenkinson P., McLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - A review. *Plant Pathology* 44(2):pp. 207-238.
 - Prins T. W., Tudzynski P., Von Tiedemann A., Tudzynski B., Ten Have A., Hansen ME., Tenberge K., Van Kan J.A.L. 2000. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. *Fungal pathology*, Kluwer, Dordrecht, pp. 33-64.

- Ranque S., Garcia-Hermoso D., Michel-Nguyen A., Dumon H. 2008. Isolement de *Trichoderma atroviride* à partir d'un greffon hépatique. Journal de Mycologie Médicale 18:pp. 234-236.
- Rapilly F. 1968 . Les techniques de mycologie en pathologie végétale. INRA, Paris. pp. 102-115.
- Richards L. A. 1969. Diagnostic and improvement of saline and alkaline soils. Agricultural Handbook. p. 60.
- Geremia R. A., Goldman G. H., Ardtes D. W., Vila S. B., Montagu M. V., Herrera E. A. 1993. Molecular Microbiology 8(3):pp. 603-613
- Rouxel F., Bouhot D. 1971. Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. IV. Nouvelles mises au point concernant l'analyse sélective et quantitative des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* dans le sol. Ann. Phytopathol 3:pp. 171 - 188.
- Sanier Y. R., Adelbery A., doudoroff M. 1966. Microbiologie générale, Masson éditeur, Paris.p. 89.
- Sayyad G., Afyuni M., Mousavi S. F., Abbaspour K. C., Richards B. K., Schulin R. 2010. Transport of Cd, Cu, Pb and Zn in a calcareous soil under wheat and safflower cultivation column study. Geoderma 154:pp. 311-320.
- Schamburg D. and Salzmann M. G. B. F. 1991. Cellulase.Enzyme Hand book, Vol.66, action on cello-oligosaccharides. Carbohyd, Res. pp.207-213.
- Schirmbock M., Lorito M., Wang Y. L., Hayes C. K., Arisan-Atac I., Scala F., Harman G. E., Kubicek C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Appl Environ Microbiol 60:pp. 4364-4370.
- Serdar U., Arzu O., Ahmet C., Şengul A. K. 2011. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. Turk J Biol 35 :pp. 543-550

-
- Singh D. P., Backhouse D., Kristiansen P. 2009. Interactions of temperature and water potential in displacement of *Fusarium pseudo graminearum* from cereal residues by fungal antagonists. *Biol Control* 48:pp. 188-195.
 - Sohail M., Naseeb S., Sherwani S. K., Shahida S., Sabiha A., Saleem S., Aqeel A., Shakeel A. K. 2009. Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. *Pak. J. Bot* 41(5):pp. 2567-2582.
 - St-Germain G. 2012. Identification des champignons d'importance médicale. Québec, Canada. 57 p.
 - Stratilova E., Markovic O., Skrovinova D., Rexova-Benkova L., Jornvall H. 1993. Pectinase *Aspergillus*. sp. polygalacturonase: multiplicity, divergence and structural patterns linking fungal, bacterial and plant polygalacturonases. *Journal of protein chemistry* 12:pp. 15-22.
 - Tatsinkou F. B., Taveai F. Ndjouenkeui R. 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of biotechnology* 4(1):pp. 14-18.
 - Verma M. 2007. Développement d'un processus d'obtention d'agents biologiques à base de *Trichoderma* spp en utilisant des eaux usées ou des boues d'épuration comme substrats de fermentation. Thèse de doctorat, Université du Québec, Canada, 424p.
 - Xu B. 2002. Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*: Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Thèse de doctorat, Uppsala University, Sweden, 196 p.
 - Zhihe C. Qingping W., Mifflong X. 1998. Advance of biocontrol of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *J. Microbiol* 25(5):pp. 284-286.

Annexes

Annexes

Annexe 01 : Dosage de sodium

1. Préparation de réactif chlorure de sodium (1000 ppm)

Chlorure de sodium (NaCl).....2.54 g

Eau distillée.....500 ml

2. Préparation des solutions fille

Dans une fiole jaugée de 100 ml diluer respectivement 1, 2, 4, 6, 8 et 10 ml de la solution mère (NaCl) avec de l'eau déminéralisée, ces solution contiennent respectivement 10, 20, 40, 60, 80, et 100 ppm. Ajuster au volume avec de l'eau distillée. Homogénéiser.

Tableau 1 : Gamme de sodium Na.

ppm	10	20	40	60	80	100
A	21	36	55	71	85	100

La courbe d'étalonnage de Na⁺:

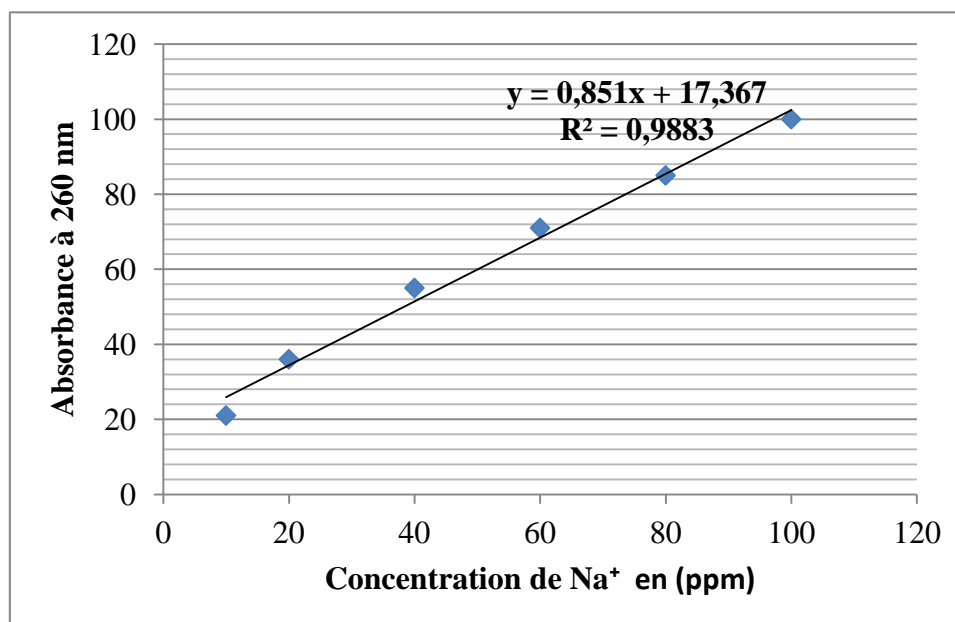


Figure 1. Courbe d'étalonnage de Na⁺ .

Annexe 02 : Dosage de potassium

1. Préparation de réactif chlorure de potassium (1000 ppm)

Chlorure de potassium (Kcl).....1.90 g

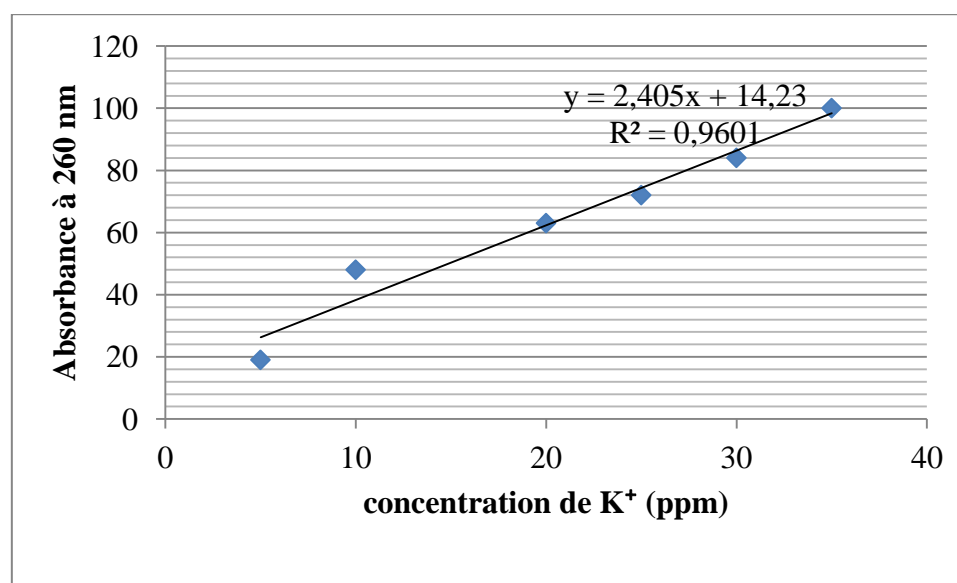
Eau distillée.....500 ml

2. Préparation des solutions fille

Dans une fiole jaugée de 100 ml dilué respectivement 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 et 3.5 ml de la solution mère (Kcl) avec de l'eau déminéralisée, ces solutions contiennent respectivement 5, 10, 15, 20, 25, 30 et 35 ppm. Ajuster au volume avec de l'eau distillée. Homogénéiser.

Tableau 2 : Gamme de potassium K.

ppm	5	10	20	25	30	35
A	19	48	63	72	84	100

La courbe d'étalonnage de K⁺:**Figure 2.** Courbe d'étalonnage de K⁺ .**Annexe 3 : Milieu PDA à amidon 1%**

Extrait de pomme de terre.....1000 ml

Amidon.....10 g

Glucose.....20 g

Agar.....20 g

pH = 5

stérilisation à 110 °C pendant 30 minutes.

1. Préparation de l'extrait pomme de terre

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

2. Préparation de milieu de culture

L'agar et le glucose et l'amidon dissous à chaud dans l'extrait, compléter à 1Ld'eau distillée.

Annexe 4 : Milieu TSM

MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.2g
KH ₂ -PO ₄	0.9g
KCl.....	0.15g
NH ₄ NO ₃	1g
Glucose.....	3g
Agar-agar.....	20g
Rose bangal.....	0.03g

Annexe 5 : Lactophénol-bleu coton

Phénol en cristaux	20 g
Acide lactique.....	20 g
Glycérine.....	40 g
Eau distillée.....	20 g
Bleu de méthylène.....	0.5 g

Annexe 6 : Milieu lait gélosé à 30 %

Agar.....	15 g
Lait écrémé.....	30 ml
Eau distillée.....	1000 ml

Annexe 7 : Milieu gélose gélatinée

Gélatine.....	2 g
Agar.....	9 g

Eau distillée.....500 ml

Annexe 8 : milieu à base de tween 1 %

Agar.....9 g

Tween.....5 ml

Eau distillée.....500 ml

Annexe 9 : Milieu Pectine-agar

Pectine.....5g

Extrait de levure.....5g

Agar20g

Eau distillé.....1000ml

pH =5

stérilisation à 110°C pendant 30 minutes.

Annexe 10 :Acétate de cuivre à 7.5%

Acétate de cuivre7.5g

Eau distillée100ml

Annexe 11 : Eau iodée (Lugol)

Iode1g

Iodure de potassium2g

Eau distillé100 ml

Annexe12: Milieu (CMC-agar)

CMC20 g

Extrait de levure5g

Agar.....15g

Eau distillé.....1000ml

Gentamycine.....50 ppm

pH=5

stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

Annexe 13 : Rouge congo à 0.1%

Rouge congo.....0.1g

Eau distillé.....100 ml

ملخص

في سياق عزل سلالات *Trichoderma* واختبار نشاطها العدائي ضد *Fusarium graminearum* الذي يسبب مرض القمح، يتم أخذ عينات من التربة. العزل المنفذ بطريقة suspension-dilution على اثنين من الوسائط PDA و TSM يسمح للحصول على 11 عزلات من العفن. التعرف المورفولوجي (المجهري والمرئي) جعل من الممكن تحديد جنس وحتى أنواع بعض العزلات. أظهر النشاط المضاد الذي تم اختياره عن طريق المواجهة المباشرة وغير المباشرة القدرة التعددية لعزل *T. atroviride* ضد *F. graminearum* ، مع نسبة تثبيط تصل إلى 0% و 68.33%. الكشف عن النشاط التحليلي ل *T. atroviride* الذي تم فحصه على الوسائط الانتقائية قدرتها على إنتاج جميع الإنزيمات المختبرة.

الكلمات المفتاحية : *Trichoderma atroviride*، عدو، *Fusarium*، hydrolase، عزل.

Résumés

Dans le cadre d'isoler des souches de *Trichoderma* et de tester leur activité antagoniste à l'égard de *Fusarium graminearum* provoquant la fusariose de blé, des prélèvements du sol sont effectués. L'isolement effectué par la méthode de suspension-dilution sur deux milieux gélosés PDA et TSM a permis l'obtention de 11 isolats de moisissures. L'identification morphologique (microscopique et macroscopique) a permis de déterminer le genre et même l'espèce de certains des isolats. L'activité antagoniste testée par confrontation directe et indirecte a montré le potentiel antagoniste de notre isolat *T. atroviride* à l'égard de *F. graminearum*, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 0% et 68.33%. La mise en évidence de l'activité hydrolytique de *T. atroviride* examinée sur milieux sélectifs a montré sa capacité à produire toutes les enzymes testées.

Mot clé: *Trichoderma atroviride*, antagoniste, *Fusarium*, hydrolase, isolement.

Abstract

In the context of isolating *Trichoderma* strains and testing their antagonistic activity against *Fusarium graminearum* causing *Fusarium* wilt, soil samples are taken. Isolation carried out by the suspension-dilution method on two agar media PDA and TSM allowed to obtain 11 mold isolates. Morphological identification (microscopic and macroscopic) made it possible to determine the genus and even the species of some of the isolates. The antagonist activity tested by direct and indirect confrontation showed the antagonistic potential of our *T. atroviride* isolate against *F. graminearum*, with a percentage inhibition of the order of 0% and 68.33%. Demonstration of the hydrolytic activity of *T. atroviride* examined on selective media showed its ability to produce all the enzymes tested.

Key word: *Trichoderma atroviride*, antagonist, *Fusarium*, hydrolase, isolation.