



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la
nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2018

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté et soutenu par :
BAHMANE Haddiya

Le : dimanche 11 juillet 2021

Caractérisation approfondie de *Trichoderma harzianum*
l'utilité de ses extraits enzymatiques (CWDE) dans la lutte
biologique

Jury :

Titre	1er membre du jury	Grade	Université	Statut
Dr.	DENDOUGA Wassila	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Titre	3e membre du jury	Grade	Université	Statut

Année universitaire : 2020 - 2021

Remerciement

Ce travail est le résultat des efforts conjugués de nombreuses personnes. Tout d'abord je remercie Dieu Tout-Puissant qui par sa grâce m'a permis d'arriver au bout de mes efforts en me donnant santé, force et courage et en me faisant m'entourer de personnes merveilleuses que je tiens à remercier. je remercie Chef du département de biologie, le professeur Mokrani djamila, pour ses conseils et les efforts qu'elle et son équipe déploient pour assurer la qualité de l'enseignement.

Mon superviseur, Dendougawassila, est un moyen de son encadrement et rigueur dans le travail, et ses divers conseils et orientations

Le comité d'évaluation et tous les enseignants de la Faculté de Biologie El Hajeb Biskra, pour la qualité de l'enseignement et leurs conseils qui nous ont permis de poursuivre notre cheminement académique jusqu'à présent ;

Et notre estimé professeur de la Wilayat d'Adrar, le maître Abakhti Abdel kader, pour son aide et ses nombreux encouragements ;

Tous ceux qui ont directement ou indirectement contribué à la réalisation de cet ouvrage.

Merci beaucoup

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mon père BAHMANE Mebarék et ma mère BAHMANE Meriam pour leur amour inestimable, leurs sacrifices, leur confiance, leur soutien et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.

A mes sœurs et mes frères Khaira et Fatiha Abdel Hamid, Abdel Rahim, Abdel Aziz, Abdel Fattah, Abdel Qayyum, Abdel Hafeez et Abdel Salam pour leur tendresse, leur complicité et leur présence malgré la distance qui nous sépare.

A ma tante Jamaa, mon oncle Mebarék, ma cousine Zahraa, et surtout ma tante Mabrouka pour leurs mots d'encouragement et leur gentillesse.

A mes amis de la Wilaya d'Adrar, Aya, Ahlam, Amina, Djelloula, Abdel Ghani, Abdel Moumen et Youssef, les plus grandes sources de mon bonheur, ainsi que mes amis de la Wilaya de Biskra.

Haddiya

Table des matières

Liste des tableaux.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Introduction.....	1

Partie 1: Partie bibliographie

Chapitre 1 : *Trichoderma harzianum*

1.1. Généralités.....	2
1.2. Taxonomie.....	2
1.3. Ecologie.....	3
1.4. Morphologie.....	3
1.4.1. Aspect macroscopique.....	3
1.4.2. Aspect microscopique.....	4
1.5. Reproduction.....	4
1.5.1. Reproduction asexuée.....	4
1.5.2. Reproduction sexuée.....	5
1.6. Mode d'action de <i>Trichoderma</i> dans la lutte biologique.....	5
1.6.1. Antibiose.....	5
1.6.2. Mycoparasitisme.....	6
1.6.3. Compétition.....	8

Partie 2: Partie expérimentale

Chapitre 02: Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique.....	9
2.1.1. Organismes et conditions de culture.....	9
2.2. Méthodes.....	9
2.2.1. Induction de l'activité enzymatique par différents substrats.....	9
2.2.2. Essai d'activité antibiotique.....	10
2.2.3. Extraction à l'acétate d'éthyle.....	11
2.2.4. Analyse chimique des agents antifongiques	11

2.2.5.	Spectrométrie ultra-violette.....	11
2.2.6.	Mesure des activités enzymatiques.....	11
2.2.7.	Production et purification des enzymes.....	12
2.2.8.	Détermination de la concentration en protéines	

Chapitre 03 : Résultat et discussion

3.1.	Antibiotiques.....	14
3.2.	Les Enzymes.....	16
3.3.	Effets des antibiotiques et des enzymes sur T.molitor.....	21
3.4.	Activité antagoniste in vitro du T. harzianum.....	22
	Conclusion.....	30

Référence bibliographique

Résumé

Liste des tableaux

Tableau 1. Taxonomie de <i>Trichoderma harzianum</i>	2
Tableau 2. Essai d'activité antibiotique volatile de souches de <i>Trichoderma harzianum</i>	14
Tableau3. Spectre d'activité des antibiotiques non volatils de <i>Trichoderma harzianum</i> 101645 et 206040.....	15
Tableau 4. Induction de la chitinase et de la protéase de <i>Trichoderma harzianum</i> 101645 et 206040 par différents suppléments.	18
Tableau 5. Purification de la chitinase et de la protéase basique de <i>Trichoderma harzianum</i>	19

Liste des figures

Figure 1. Aspect macroscopique de la colonie de <i>Trichoderma harzianum</i> sur milieu PDA.....	4
Figure 2. Aspect microscopique de <i>Trichoderma harzianum</i>	4
Figure 3. Multiplication végétative de <i>Trichoderma harzianum</i>	5
Figure 4. Quelques molécules bioactives en antibiose sécrétées par <i>Trichoderma harzianum</i> ; 1 : 6PP ; 2 : Harzianopyridone ; 3 : Koninginins A ; 4 : acide Harziamique ; 5 : Hazrianolide.....	6
Figure 5. Mécanisme de mycoparasitisme exercé par <i>Trichoderma</i>	7
Figure 6. Test de confrontation directe.....	12
Figure 7. Test de confrontation indirecte.....	13
Figure 8. Cinétique de la production d'antibiotiques par <i>Trichoderma harzianum</i> 101645 et 206040.....	16
Figure 9. Cinétique de la production de protéase totale par <i>Trichoderma harzianum</i> 101645 et 206040.....	17
Figure 10. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide des enzymes brutes et purifiées. Les préparations d'enzymes brutes et purifiées ont été soumises à une SDS-PAGE sur des gels à gradient de 12%.....	19
Figure 11. Effets des spores et des enzymes et antibiotiques purifiés de <i>Trichoderma harzianum</i> sur les larves de <i>T. molitor</i>	22
Figure 12. Diamètre de colonies de <i>F. oxysporum</i> f.sp .radicis-lycopersicium présence de <i>T. harzianum</i> après.....	23
Figure 13. Effet inhibiteur à distance exercé par <i>T.harzianum</i> sur les isolats de <i>F. oxysporum</i> f. sp.	24

Liste des abréviations

PDA : Potato Dextrose Agar

ATP : Adenosine triphosphate

PH : Potentiel d'Hydrogène

UI : Unité International

CCM : Chromatographie sur couche mince

PEG : Polyéthylène glycol

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis

CD : Cadmium

ml : Millilitre

Mg : Milligramme

T.harzianum: *Trichoderma harzianum*

T.molitor: *Tenebrio molitor*

CWDE: Cell Wall Degrading Enzymes

NaOH : Hydroxyde de Sodium.

sp : espèce non précisée

Spp : plusieurs espèces non précises

FORL: *F. oxysporum* f. sp. *Radices- lycopersici*

F: *Fusarium*.

rpm : round per minute.

Introduction

Introduction

Les champignons du genre *Trichoderma* sont connus depuis 1887 pour leurs propriétés antagonistes, et ils sont considérés comme les agents de biocontrôle les plus utilisés dans la lutte biologique contre un large spectre de phytopathogènes (Btissam., 2008). La lutte biologique est une alternative très prometteuse, à cause de l'ubiquité naturelle des organismes antagonistes dans les écosystèmes et parmi eux les microorganismes. Ces derniers se caractérisent par leur grande biodiversité, leur dissémination facile, leur spécificité d'action, ainsi que leur persistance dans l'environnement (De Kouassi, 2001). De ce fait, pour une lutte biologique efficace contre les différents agents phytopathogènes, le choix des microorganismes antagonistes est crucial (M'zahem et Mihoubi 2017).

Les différentes espèces de *Trichoderma* ont prouvé leur efficacité en biocontrôle contre de nombreux agents phytopathogènes. 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 des plantes (Verma et al., 2007 ; Vinale et al., 2008). *Trichoderma harzianum* est l'un des champignons les plus couramment utilisés dans la lutte biologique.

Sa capacité à lutter contre les agents phytopathogènes, l'est renforcée par la production d'une panoplie d'enzymes hydrolytiques extrêmement riches et efficaces. Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire et les substances volatiles de *Trichoderma harzianum* jouent un rôle potentiel dans l'efficacité de ce champignon, ils agissent comme deux mécanismes collectifs menant à la dégradation de la paroi cellulaire de l'agent pathogène et à l'inhibition de sa croissance fongique (Fatima et al., 2016).

Dans ce contexte, s'inscrit l'objectif de notre travail qui se dirige vers " l'utilité de *Trichoderma harzianum* avec son système hydrolytique dans la lutte biologique". Le présent document est une synthèse d'articles scientifiques, dont la première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux champignons d'une manière générale, présentation des agents phytopathogènes. La deuxième partie elle-même est divisée en deux chapitres, matériel et méthodes dans lequel on a décrit les principales méthodes qu'on peut les suivre pour tester le pouvoir antagoniste et produire les enzymes hydrolytiques. Dans le chapitre résultats et discussion, on a essayé de comparer les différents travaux qui ont la même thématique que le présent travail et les discuter.

Partie 1

Partie bibliographie

Chapitre 1

Trichoderma harzianum

1.1. Généralités

Le genre *Trichoderma* regroupe un ensemble de champignons imparfaits saprophytes qui se retrouvent couramment dans le sol, sur le bois mort, les débris végétaux et les organes aériens des plantes. Il est reconnu facilement en culture grâce à la couleur généralement verdâtre de ses spores et le port typique de ses phialides (en forme de quilles) (Caron, 2002).

Trichoderma harzianum (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) est l'espèce la plus fréquente dans le genre *Trichoderma* (Santos-Vaz, 2010)

A cause de ses effets antagonistes puissants de ce microorganisme, il est considéré actuellement comme le champignon le plus utilisé en lutte biologique contre les différentes phytopathogènes. Il produit en outre des antibiotiques nouveaux contenus dans la spore. Cela est dû à la capacité des souches appartenant à cette espèce à produire une large gamme d'antibiotiques volatiles et non volatiles.

1.2. Taxonomie

Dans le règne vivant les limites de « l'espèce » reposent sur la possibilité de croisement entre individus. La division du genre *Trichoderma* en espèces a fait l'objet de nombreuses études. La forme sexuée (télomorphe) de *T. harzianum* est : *Hypocrealixii*. Actuellement, l'identification des *Trichoderma* spp. se base sur les aspects culturels et la morphologie des organes de fructification, ainsi que sur le matériel génétique en s'appuyant sur des techniques de biologie moléculaire (De Respini et al., 2010). La position taxonomique du genre *Trichoderma* (télomorphe : *Hypocrea*) est représentée dans le tableau 1

Tableau 1. Taxonomie de *Trichoderma harzianum* (Mivbgheliet al., 2009).

Embranchement	Amastigomycota
Sous embranchement	Ascomycètes
Classe	Sordariomycètes
Ordre	Hypocréales
Famille	Hypocreacea
Genre	<i>Trichoderma</i>
Espèce	<i>Trichoderma harzianum</i>

1.3. Ecologie

Les espèces de *Trichoderma* sont généralement abondantes sur le bois en décomposition et dans le sol. En raison de leur succès dans diverses interactions hétérotrophes, dont la décomposition, le parasitisme, et même l'endophytisme opportuniste (Irina *et al.*, 2006). En effet, l'abondance de *Trichoderma harzianum* dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Benkada, 2006).

Les souches appartenant à l'espèce *T. harzianum* ont été isolées du sol, de matériel végétal en décomposition. Récemment, cette espèce est considérée comme l'une des espèces les plus communément isolées comme endophytes dans la sève des arbres, isolée comme endophytes dans l'aubier des arbres tropicaux. Bien qu'il existe aussi des rapports occasionnels sur *T. harzianum* considéré comme un saprobo végétal (Chaverri *et al.* 2015).

1.4. Morphologie

L'identification des espèces de *Trichoderma* commence toujours par une caractérisation morphologique réalisée par observation macroscopiques sur les différents milieux de culture et des caractères microscopiques. L'aspect macroscopique est examiné souvent sur différents milieux gélosés (Mouria *et al.* 2012).

1.4.1. Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des *Trichoderma* spp. est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides (Benkada M. M. 2006) *T. harzianum* forme des colonies concentriques avec des formes irrégulières.

Avec une croissance sur un milieu solide PDA blanc pendant les premiers jours, puis jaune ou vert pratiquement à partir du 4^{ème} jour (Figure 1).

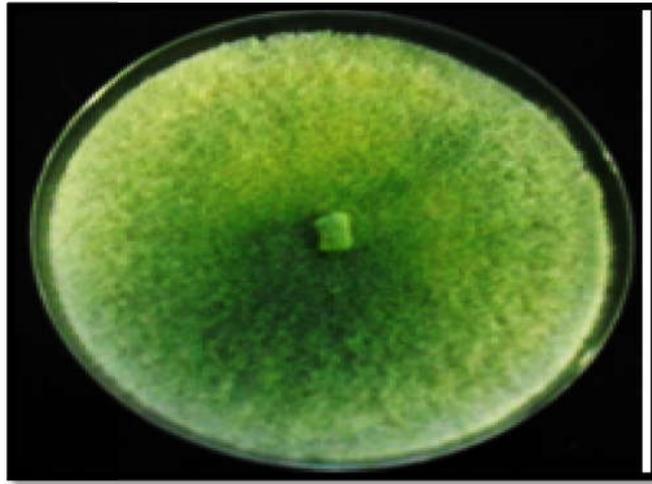


Figure 1. Aspect macroscopique de la colonie de *Trichoderma harzianum* sur milieu PDA (Vaz, 2010).

1.4.2. Aspect microscopique

Microscopiquement le mycélium est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores (Figure 2) ont une forme conique ou pyramidale très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (MOHAMED, 2006).

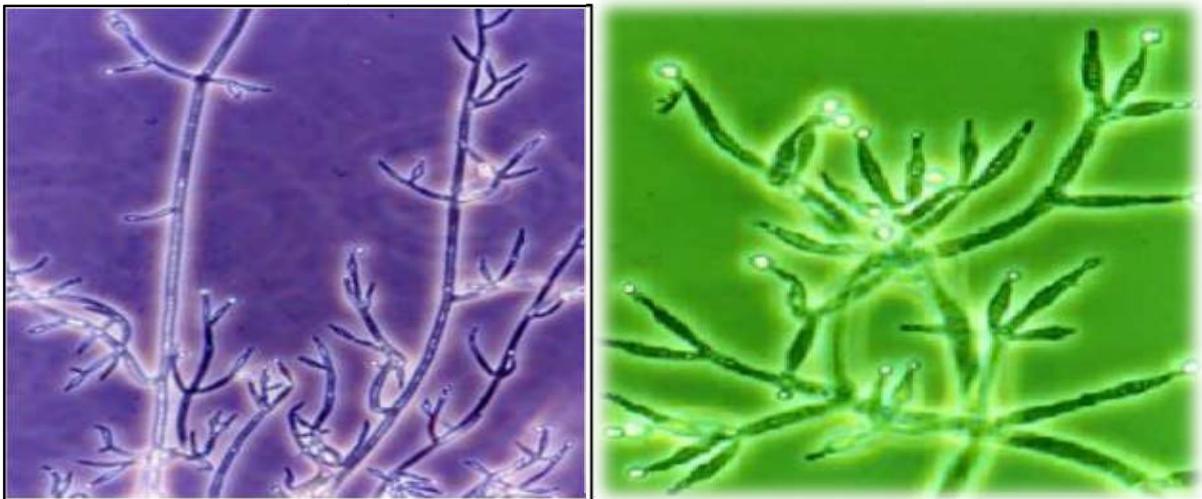


Figure 2. Aspect microscopique de *Trichoderma harzianum* (Rahman, 2011).

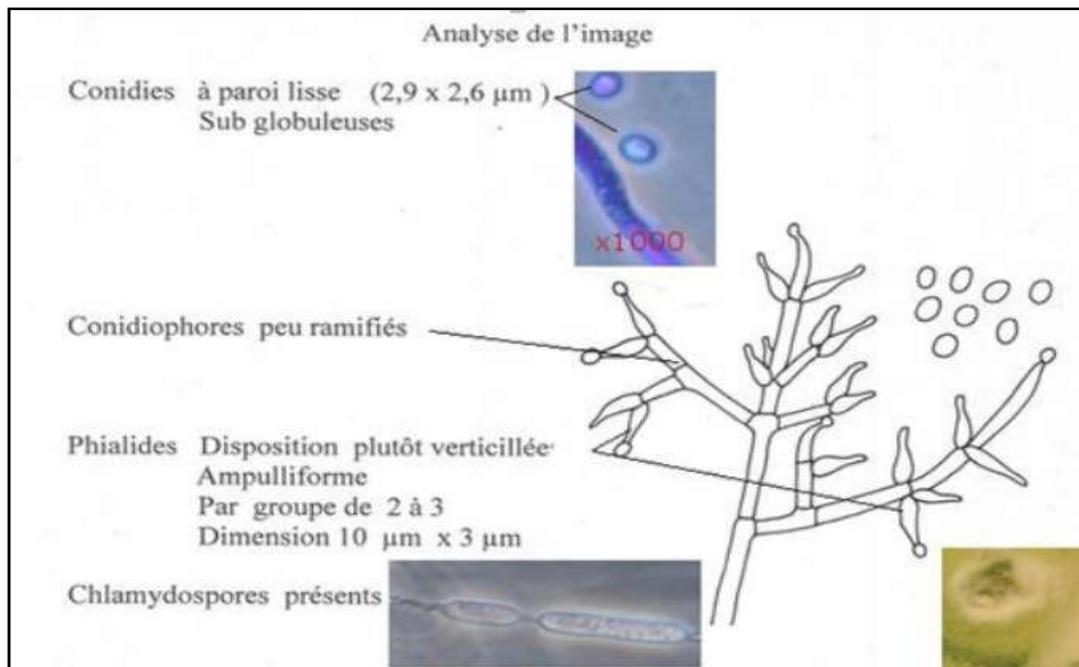
1.5. Reproduction

1.5.1. Reproduction asexuée

La forme végétative ou anamorphe s'effectue par la production des spores exogènes (les conidies), où après leur germination donnent le mycélium. Cette forme est appelée *Trichoderma harzianum* (Figure 3) (Druzhinina et al., 2010).

1.5.2. Reproduction sexuée

La forme parfaite ou telomorphe *Hypocrealixii* est rarement observable, elle s'effectue par la production des spores endogènes (ascospore) (Chaverri et al., 2002 ; Samuels, 2006 ; Druzhinina et al., 2010).



1.6. Mode d'action de *Trichoderma* dans la lutte biologique

Les mécanismes employés par *Trichoderma* pour contrôler les phytopathogènes sont : l'antibiose, le mycoparasitisme, la compétition et l'induction de la résistance systémique chez la plante.

1.6.1. Antibiose

Plus de 100 métabolites secondaires avec des activités antibiotiques, sont produits par les différentes souches du genre *Trichoderma*. La production des antibiotiques dépend des paramètres environnementales tels que ; le substrat colonisé, le pH, la température... Ces antibiotiques, peuvent être classés en trois groupes : des composés volatiles, des composés solubles dans l'eau (substances non volatiles) et les peptaïboles qui agissent avec la membrane plasmique. Néanmoins, les mécanismes avec lesquels agissent certains antibiotiques restent insuffisamment connus. (ALMI, 2015)

En effet, les deux premiers groupes d'antibiotiques sont dérivés de plusieurs voies métaboliques. Par contre, le troisième groupe : les peptaïboles ; Les peptaïboles forment le plus important groupe d'antibiotiques ; regroupant plus de 300 molécules, dont 54 molécules sont

isolées à partir de *Trichoderma harzianum* (PeptaibolDatabase, 2007). Parmi les molécules bioactives en antibiose (Figure 13) en cite : 6-pentyl-2 α -Pyron-2-one (6PP), les Koninginins (A, B, D, E et G), l'acide harzianique, Trichodermine, Harziamine, Trichodermal, Harzianolide (ALMI, 2015).

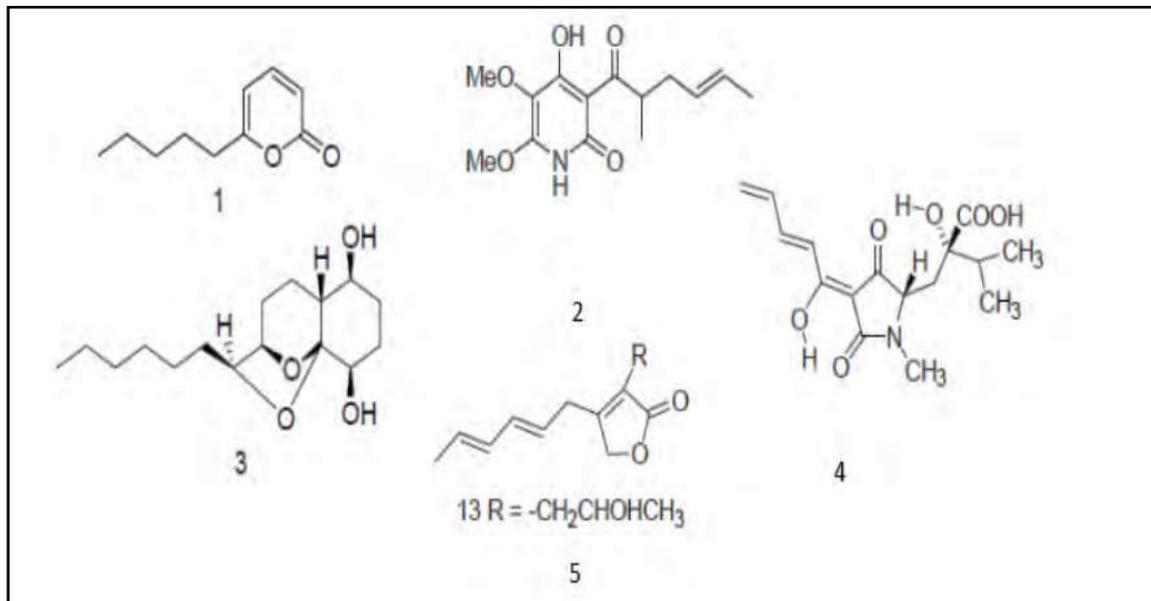


Figure 4. Quelques molécules bioactives en antibiose sécrétées par *Trichoderma harzianum*; 1 : 6PP ; 2 : Harzianopyridone ; 3 : Koninginins A ; 4 : acide Harzianique ; 5 : Harzianolide (ALMI, 2015)

1.6.2. Mycoparasitisme

Le mycoparasitisme est considéré comme l'attaque directe d'un champignon par un autre dans un but nutritionnel. L'activité mycoparasitaire de *T.harzianum* est l'un des principaux mécanismes proposés pour expliquer leur activité antagoniste à l'égard des champignons phytopathogènes telluriques. Ce type d'antagonisme direct représente un phénomène complexe qui se déroule en plusieurs étapes séquentielles. La première étape est appelée stimulation chimiotropisme, dans laquelle l'antagoniste perçoit la présence de son hôte suite à sa sécrétion d'un stimulus chimique, ce qui dirige les hyphes du mycoparasitaire directement vers lui. La deuxième étape est la reconnaissance spécifique, où le champignon antagoniste identifie la surface cellulaire de l'agent pathogène. Elle se manifeste par une adhésion du mycoparasite aux parois de son hôte, l'attachement est dû à la présence des lectines sur le mycélium des champignons pathogènes qui se lient à des sucres spécifiques présents sur les parois cellulaires de l'antagoniste (liaison d'une agglutinine). La troisième étape peut impliquer deux processus distincts. L'un est l'enroulement, où les hyphes de *T.harzianum* entourent son hôte. Alors que, le deuxième processus implique une interaction

intime des hyphes, où les hyphes de *T.harzianum* poussent parallèlement le long des hyphes du pathogène. Le contact au pathogène est renforcé par la formation des appressoriums par l'antagoniste, d'haustoria ou de structures en forme de crochet. Dans la quatrième étape et lorsque cette interaction survient, la pénétration de *T.harzianum* peut se produire, et qui conduit à une granulation et une vacuolisation cytoplasmique, une perforation de la paroi cellulaire, une perte de turgescence et finalement la lyse cellulaire. Il a été rapporté que la dégradation de la paroi cellulaire du pathogène suit la production des enzymes lytiques extracellulaires et les peptaiboles, ce qui facilite à la fois l'entrée des hyphes de *T.harzianum* dans les hyphes du champignon hôte et l'assimilation de son contenu. Les interactions *T.harzianum*-pathogène ne comportent pas nécessairement toutes ces étapes, comme par exemple l'enroulement et la pénétration dans les hyphes du pathogène ne sont pas toujours observées. En outre, l'éclatement et l'effondrement des structures mycéliens peuvent avoir lieu suite à une sécrétion des enzymes lytiques ou des métabolites secondaires ayant une activité antibiotique même sans contact directe entre *T.harzianum* et le pathogène (Figure 5) (Dendouga, 2017)

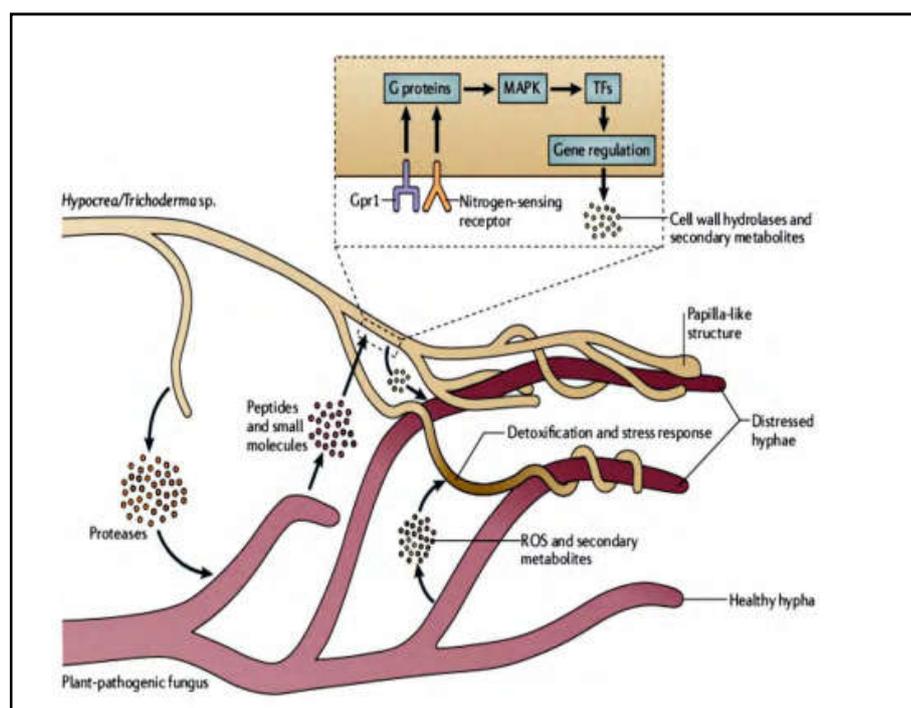


Figure 5. Mécanisme de mycoparasitisme exercé par *Trichoderma* (ALMI ,2015).

1.6.3. Compétition

Les souches de *Trichoderma*, sont des biodégradeurs et compétiteurs avec les agents pathogènes dans leurs phases saprophytique, surtout lorsque les nutriments est le facteur

Chapitre 1 *Trichoderma harzianum*

limitant. En effet, pour qu'une espèce de *Trichoderma* soit compétente, elle doit coloniser la rhizosphère à une distance au-delà de 2 cm de profondeur de la graine Baker. Une fois installé, *Trichoderma* établit une zone d'interaction dans la partie cortex des racines et sécrète des molécules tels que les sidérophores qui absorbent le fer et arrêtent la croissance du pathogène. Pour cette raison, la composition du sol influe sur l'efficacité de l'agent antagoniste. L'utilisation efficace des nutriments disponibles par les souches de *Trichoderma*, est basée sur la capacité de *Trichoderma* d'obtenir l'ATP à partir du métabolisme de différents sucres, tels que les dérivés de polymères (ALMI,2015).

Partie 2

Partie expérimentale

Chapitre 02

Matériel et méthodes

En raison des conditions sanitaires que nous avons rencontrées cette année (Covid 19), et qui nous ont empêché de réaliser partie pratique, le présent document est un synthèse des articles .Dans cette partie «matériel et méthodes » nous avons basé sur deux articles intitulés :

- ❖ Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects.
- ❖ Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichodermaharzianum* sur *Fusarium oxysporum f. sp. radicislycopersici*

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Organismes et conditions de culture

Pour la production d'enzymes extracellulaires, Les champignons filamenteux de l'espèce *Trichodermaharzianum* ont été cultivés dans le milieu Czapek Dox liquide, incubés à 25 °C, puis conservées à 5 °C. La culture cellulaire a été réalisée à l'aide d'un bioréacteur. Le milieu a été inoculé avec 400 ml d'un épréculture de *T. harzianum* âgée de 3 jours incubée sur un agitateur orbital à 25 °C et 180 rpm dans le même milieu. Le pH est contrôlé à 6,0 pour la production de protéinase en utilisant du NaOH 0,1N et du HCl 0,1N. Le surnageant a été conservé à 5 °C pour l'extraction des enzymes. (Shakeriet al., 2006).

2.2. Méthodes

2.2.1. Induction de l'activité enzymatique par différents substrats

Dans des flacons d'Ehrlenmeyer (250 ml) contenant 150 ml de CD avec 1% de différentes sources de carbone (glucose, chitine de cuticule de crabe, caséine, poudre de cuticule de criquet) et une préparation de paroi cellulaire cultivée dans du CD pendant 3 jours. La récupération de l'extrait enzymatique intracellulaire est réalisée par filtration simple, la biomasse est lavée ensuite trois fois avec de l'eau distillée, séchée et broyée dans un pilon et un mortier pour obtenir une poudre fine .Le PH est ajusté à pH 6,8, autoclaves, inoculées avec des disques de 5 mm de diamètre d'une culture de *T. harzianum* âgée de 3 jours et incubés à 25 °C. Enfin, Les échantillons ont été prélevés après 7 jours et analysés pour l'activité enzymatique et les concentrations de protéines. (Shakeriet al., 2006) .

2.2.2. Mesure des activités enzymatiques

1.1.2.1. Protéase

L'activité protéolytique est dosé selon la méthode de l'azur de poudre de cuir (HPA ; Rinderknecht et *al*) en utilisant la caséine comme substrat. Une quantité de (20 mg) du substrat a été mise en suspension dans 4,5 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,4 . Un volume de 0,5 ml de solution enzymatique a été ajouté. Les tubes sont incubés ensuite à 37 °C pendant 1 h avec une agitation occasionnelle. Le mélange a est filtré par papier Whatman . Une courbe d'étalonnage avec de la trypsine(0-12mg)est préparée préalablement. Une unité d'activité enzymatique est définie comme l'équivalent à 1 mg de substrat hydrolysé par ml d'échantillon dans une heure à 37 °C(Shakeriet *al.*, 2006).

1.1.2.2. Chitinase

L'activité Chitinolique est mesurée selon la méthode de l'azur de poudre de cuir (HPA ; Rinderknecht et *al.*, 1968) décrite dans . Une suspension colloïdale de chitine (5 mg ml^{-1}) dans 50 mM à (pH 6,30 : 2 ml) a été mélangée doucement avec 1 ml de chitinase purifiée et complétée jusqu'au volume final de 5 ml avec du tampon phosphate. La turbidité du mélange est mesurée à 420 nm immédiatement et après incubation à 37 °C pendant 20 minutes. Une unité d'activité chitinase c'est la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer(de 0,01 % de la valeur optique de l'échantillon de densité optique par minute) (Shakeriet *al.*, 2006).

2.2.3. Production et purification des enzymes

Les fractions actives sont recueillies et concentrées dans un tube de dialyse et immergés dans une solution aqueuse de polyéthylène glycol 6000 à 70 %. Les échantillons sont ensuite déposés sur une colonne de Sephadex G200 et élués avec un tampon. Les fractions actives ont de nouveau été recueillies et concentrées à l'aide de (PEG). Les échantillons sont ensuite passés par une chromatographie échangeuse d'ions à pression moyenne a ensuite été réalisée à l'aide d'un tube de 10 mm (HPLC). Des échantillons provenant de la dialyse ont été chargés sur la colonne et élués avec un gradient de NaCl 0-0,5 M dans 20 mM bis-Tris propane HCl pH 7. Les fractions ont été recueillies et analysées pour l'activité enzymatique. Les fractions actives ont été regroupées et appliquées sur une colonne de Sephadex G-25. La colonne a été éluee avec de l'eau à un débit de 10 ml/h. Les fractions actives de chaque pic ont été recueillies, puis concentrées en utilisant du PEG 6000 aqueux à 70 % dans un tube de dialyse et conservées à -20 °C.(Shakeriet *al*).

2.2.4. Détermination de la concentration des protéines totales

La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford. L'albumine de sérumbovin (Sigma) a été utilisée comme contrôle. (Shakeriet *al.*, 2006).

2.2.5. Focalisation isoélectrique et électrophorèse SDS

Les protéines purifiées ont été séparées sur un gel à focalisation isoélectrique selon les instructions du fabricant avec de l'amyloglucosidase, 3,5 ; du rouge de méthyle, 3,75 ; de l'inhibiteur de trypsine 4,55 ; -lactoglobuline A, 5,2 ; anhydrase carbonique B bovine, 5,85 ; anhydrase carbonique B humaine, 6,55 ; myoglobine de cheval bande acide, 6,85 ; myoglobine de cheval, 7,35 ; lectine de lentille, 8,15 ; lectine de lentille, 8,45 ; lectine de lentille, 8,65 ; trypsinogène, 9,3. Le SDS PAGE a été réalisé selon la méthode de (Laemmli, 1970) en utilisant des gels de polyacrylamide à 12%. Les protéines utilisées comme marqueurs étaient : albumine bovine, 66 000 ; ovalbumine, 45 000 ; glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, 36 000 ; anhydrase carbonique, 29 000 ; trypsinogène, 24 000 ; inhibiteur de trypsine du soja, 20 000. inhibiteur de trypsine, 20 100 ; -lactalbume, 14 200. Les gels ont été colorés avec du bleu de Coomassie. (Shakeriet *al.*, 2006).

2.2.6. Sensibilité de la protéinase aux inhibiteurs

La sensibilité de la protéinase basique de la souche de *T. harzianum* aux inhibiteurs a été caractérisée par l'incubation d'une solution enzymatique (500l, 1 mg ml^{-1}). (mg ml^{-1} dans du PB) avec 500l d'inhibiteur (fluorure de phénylméthylsulfonyl, 1g ml^{-1} dans du méthanol ; 1,10-phosphore, 1g ml^{-1} dans du méthanol). (méthanol ; 1,10-phénanthroline, 5g ml^{-1} dans l'éthanol ; pepstatine, 15g ml^{-1} dans le méthanol) jusqu'à un volume final de 3 ml avec du PB pendant 30 min à 37 °C. L'activité hydrolitique de la protéinase basique a été ensuite mesurée selon le même protocole décrit ci-dessus. (shakeriet *al.*, 2006).

2.2.7. Détermination du pH optimal

L'effet du pH sur l'activité de l'enzyme a été déterminé par l'utilisation de différents tampons dans une gamme comprise entre 3,0 et 12,0 (citrate trisodique/acide citrique pour un pH de 3-4, acétate de sodium/acide acétique pour un pH de 4,5-6,5, dihydrogéné-orthophosphate de sodium/disodium pour pH 7-9 et Tris-HCl pour pH 10,11 et 12, tous à 50 mml^{-1}). Des enzymes partiellement purifiés (2 ml de 1 mg ml^{-1}) ont été ajoutés à 3 ml des

différents tampons .L'activité enzymatique protéolytique et chitinolitique sont déterminées selon les mêmes méthode décrites préalablement(shakeriet *al.*,2006).

2.2.8. Activité antagoniste invitro du *T. harzianum*

1.1.11.1. Confrontation par contact direct sur milieu de culture

Cette technique consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant un milieu PDA, deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre), l'une portant le *T.harzianum* et l'autre l'agent pathogène. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte ; les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 25 °C pendant six jours. Des notations concernant l'inhibition de la croissance diamétrale des colonies d'agent pathogène et leur envahissement par le mycélium du *T. harzianum* sont effectuées tous les deux jours.

Le témoin est constitué du pathogène seul, repiqué au centre de la boîte().Le test de confrontation direct est présenté dans la figure 06 .

(KhaledHibaret *al.*,2006).

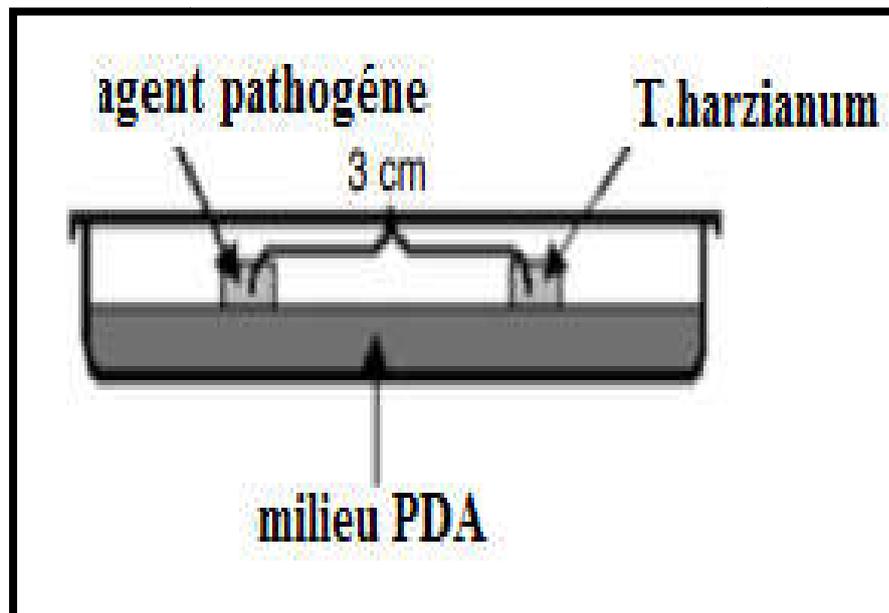


Figure 6. Test de confrontation direct (Khaled Hibaret *al* 2006)

1.1.11.2. Confrontation à distance

SelonHibaret*al.*(2006),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, le *Trichoderma* en bas et l'agent pathogène en haut. La jonction entre les deux boîtes est assurée par des couches de parafilm afin d'éviter toute perte des substances volatiles. Les conditions de culture sont identiques à celles de la confrontation par contact direct sur milieu de culture.

Le témoin est formé par superposition de deux boîtes, celle du haut contenant une pastille de l'agent pathogène alors que celle du bas ne contient que le milieu PDA (Figure 07).

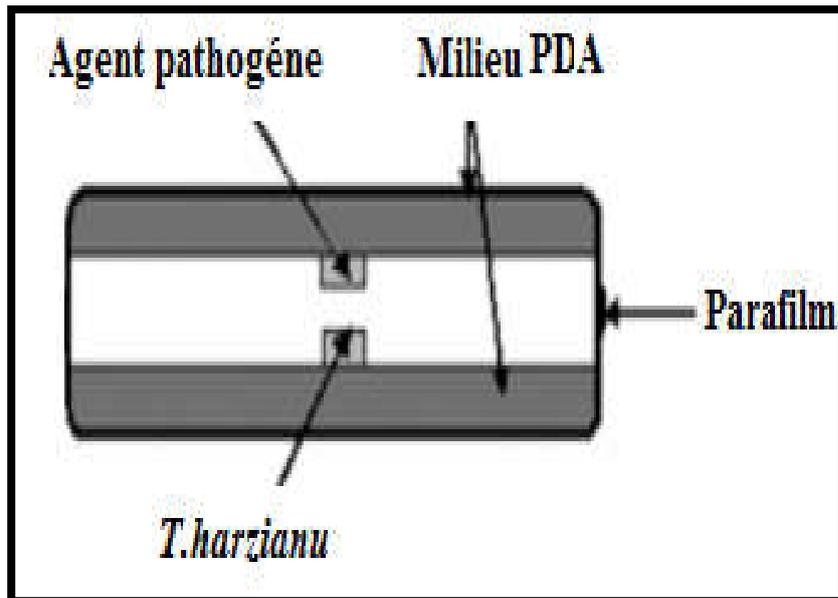


Figure 07. Test de confrontation indirecte (Hibaret *al.*, 2006).

Chapitre 03

Résultat et discussion

3.1. Antibiotiques

Malgré l'importance des enzymes hydrolytiques dans l'efficacité du pouvoir antagoniste des différentes espèces de *Trichoderma*, mais on ne peut pas négliger le rôle des antibiotiques. Plusieurs travaux ont prouvé que l'efficacité écologique de *Trichoderma* dans la lutte biologique est due à la combinaison de ses différents mécanismes d'action à savoir ; la production des enzymes hydrolytiques et l'antibiose, exercée par les substances volatiles et non volatiles.

Dans l'étude de Shakeri et Howard.,(2006),il a été prouvé que les antibiotiques volatiles et non volatiles jouent un rôle très important dans l'inhibition de la croissance de l'agent pathogène(Tableau2).

Tableau 2.Essai d'activité antibiotique volatile de souches de *Trichodermaharzianum*(Shakeri et Howard., 2006).

Tester le champignon	pourcentage d'inhibition de la croissance radiale avec la souche <i>T. harzianum</i>			
	101645		206040	
	3 d	7 d	3 d	7 d
<i>Penicillium notatum</i>	87.5	86.5	91.2	89.7
<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	90.3	93	95.9	95.7
<i>Botrytis cinerea</i>	97.4	97.1	97.9	98.3
<i>Thanophorus cucumeris</i>	97.4	97.4	97.9	98.0
<i>Fusarium culmuriium</i>	80.5	77.0	86.5	64.5

Shakeri et Howard.,2006 ont testés deux souches de *T. harzianum* contre un certain nombre de champignons pour produire des antibiotiques volatils en utilisant la méthode de confrontation indirect. Les résultats obtenus ont montré l'efficacité des deux souches testées ;*T. harzianum*, 206040 et *T.harzianum* 101645 utilisées comme agent de biocontrôle. Il a été rapportée dans la même référence que les deux souches ont produit desantibiotiques volatiles qui sont classés comme des peptaibols, quicontiennent des acides aminés, des amino-alcools et de l'Aib.Egalement,Les auteurs ont rapporté que l'activité spécifique de l'antibiotique produit par la souche 206040 était plus élevée que celle de la souche 101645.Alors que l'activité spécifique de la protéinase basique de la souche 101645 était la

plus élevée . Les toxicités relatives des deux antibiotiques contre les insectes restent à déterminer. Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 0 2.

De la même étude, on peut constater que *Fusarium culmorum* était moins sensible que les autres champignons testés. Des extraits bruts de cultures flottantes ont été testés pour leur activité antibiotique et antifongique contre une gamme de bactéries et de champignons gram-positif et gram-négatif. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3. Spectre d'activité des antibiotiques non volatils de *Trichoderma harzianum* 101645 et 206040

Organisme d'essai	Zone d'inhibition (mm) avec la souche <i>T.harzianum</i>	
	101645	206040
<i>Botrytis cinerea</i> 448	25	35
<i>Botrytis cinerea</i> 452	15	15
<i>Ophiostoma ulmi</i>	20	25
<i>Fusarium culmorum</i>	25	35
<i>Thanophorus cucumeris</i>	35	40
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>Chromobacterium lividum</i>	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0
Ethyl acetate control	0	0

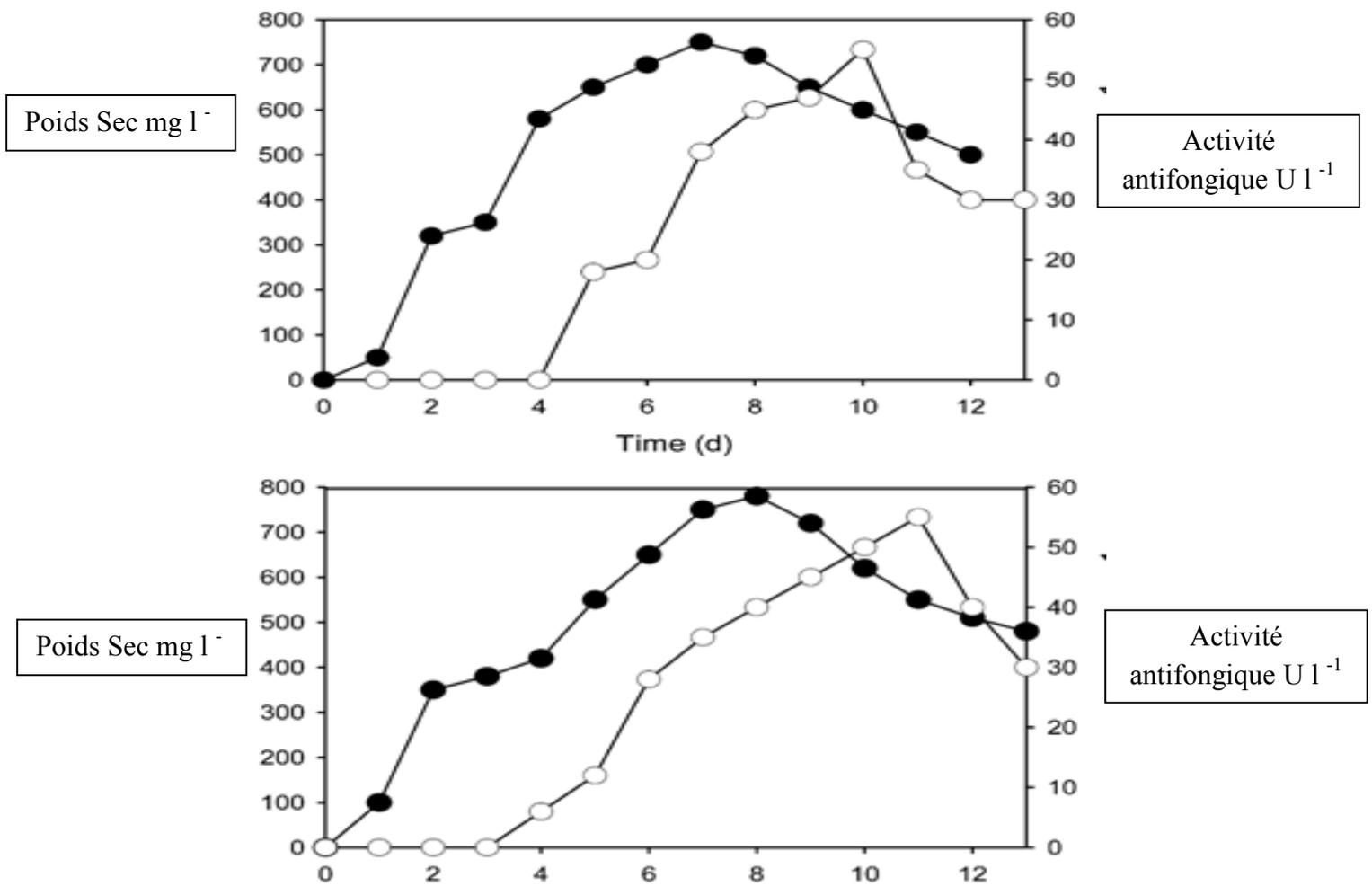


Figure 8. Cinétique de la production d'antibiotiques par *Trichoderma harzianum* 101645 et 206040.

3.2. Enzymes hydrolytiques

La même étude présentant l'efficacité des antibiotiques des deux souches de *T.harzianum* 206040 et 101645 a prouvé le rôle important de leurs enzymes hydrolytiques dans le phénomène mycoparasitaire et la destruction de l'agent pathogène. Les résultats obtenus ont montré que les deux souches de *T.harzianum* testées produisaient des protéinases et chitinases basiques participant dans l'activité antagoniste des deux souches. Les activités antifongiques et entomopathogènes globales sont donc probablement dues à la combinaison de plusieurs enzymes hydrolytiques. La production de l'activité protéolytique totale au centre du CD est représentée sur la figure 9.

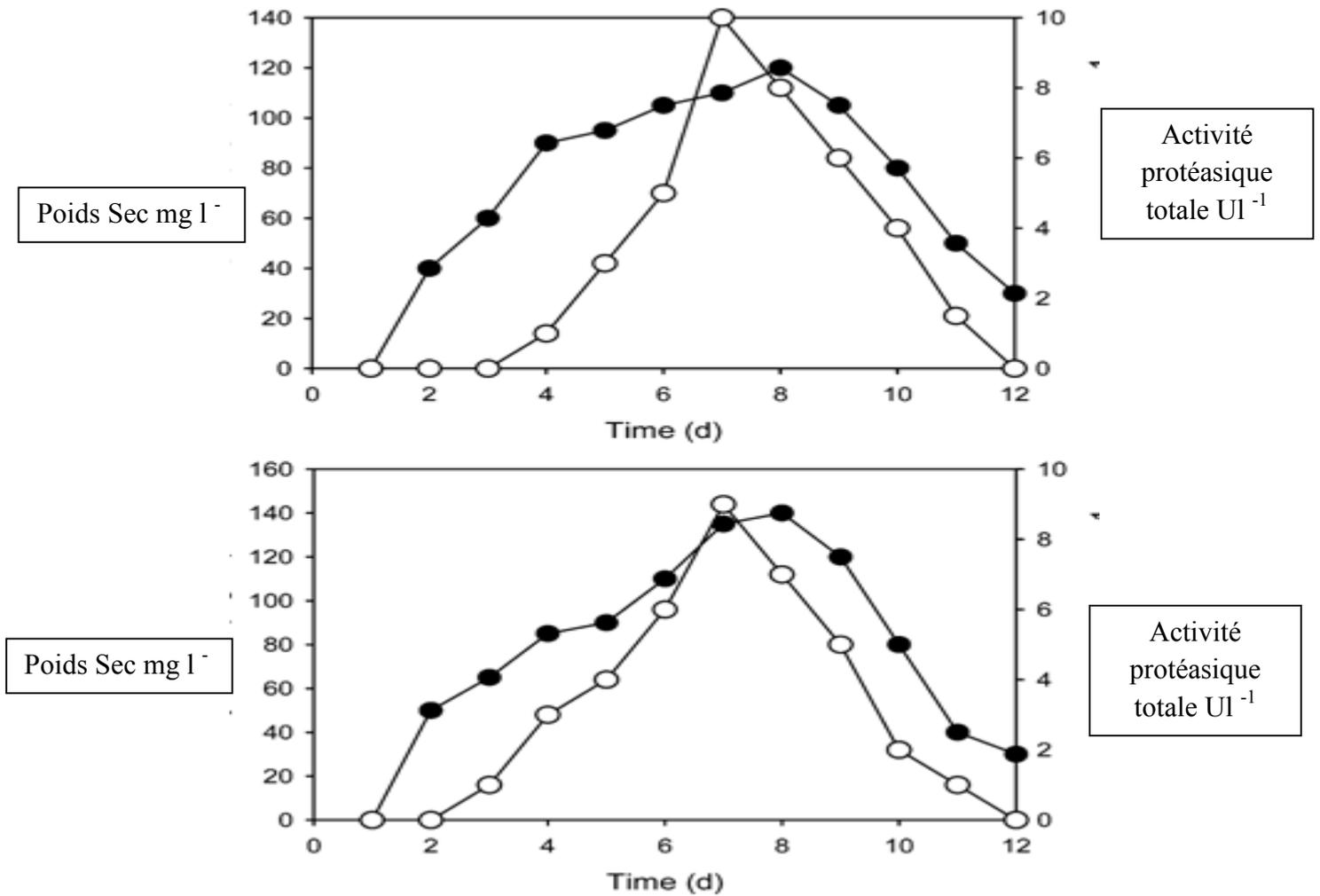


Figure 9. Cinétique de la production de protéase totale par *Trichoderma harzianum* 101645 et 206040.

Huit litres de milieu Czapek-Dox ont été inoculés et incubés . Des échantillons ont été prélevés et le poids sec des cellules et l'activité protéolytique totale ont été déterminés. *T. harzianum* 101645 (a) et 206040 (b). Clé : (●) poids sec et (○) activité antibiotique.

Les deux souches ont produit des enzymes dans la phase exponentielle et ont atteint un maximum au début de la phase stationnaire. La souche 206040 avait une activité protéase totale plus élevée que celle de la souche 101645.

L'activité protéolytique dans des milieux supplémentés avec différents substrats est présentée dans le tableau 4.

Tableau 4. Induction de la chitinase et de la protéase de *Trichoderma harzianum* 101645 et 206040 par différents suppléments.

supplément 1% (p/v)	101645			206040		
	protéase totale	Protéase basique	chitinase	protéase totale	protéase basique	chitinase
Glucose	0.3	1.7	-	0.3	0.87	-
Chitin powder (crab)	6.2	24.8	25.5	4.0	18.5	28.50
<i>B. cinerea</i> (mycelial) powder	8.3	33	26.4	6.2	26.8	24.2
Casein	8.4	68.2	6.3	11.3	54.5	5.5
Locust cuticle powder	1.28	205	-	1.2	194	0.2
None	0.25	2.5	-	0.2	1.14	-

Les résultats ont montré que l'activité de la protéinase basique était plus élevée dans le milieu complété par de la poudre de cuticule de criquet et que l'activité de la chitinase était plus élevée en présence de chitine. Les activités les plus élevées de protéinase totale, de chitinase et de protéinase basique ont été produites avec la caséine et la poudre de mycélium de *B. cinerea*. La PAGE a montré des bandes uniques à 31 et 44 kDa pour la protéinase basique et la chitinase purifiées respectivement (Figure.10)

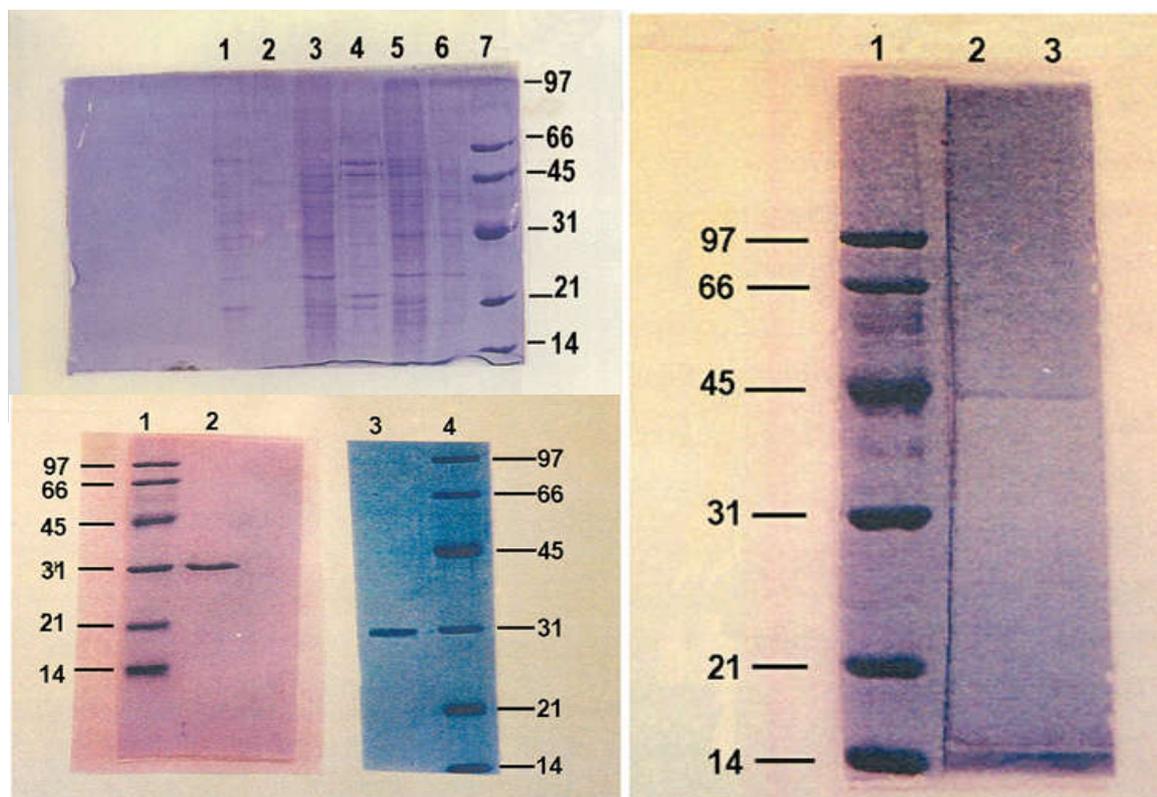


Figure 10. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide de l'extrait enzymatique brute et purifié. Les préparations d'enzymes brutes et purifiées ont été soumises à une SDS-PAGE sur des gels à gradient de 12%. 6 *T.*

harzianum 206040. 1 + 4 : milieu supplémenté en chitine de crabe, 2 + 6 : un milieu avec du glucose et les voies 3 + 5 d'un milieu supplémenté en cuticule de criquet. (b) Protéase basique purifiée de la souche 101645 (puit2) et 206040 (puit3). (c) Chitinase purifiée de la souche 101645 (puit 2) et 206040 (puit 3).

Les enzymes ont été purifiées par une combinaison de chromatographie sur Sephadex et FPLC pour donner des préparations ayant des activités spécifiques d'environ 100 U mg⁻¹ pour les protéases et les enzymes.

Avec des activités spécifiques d'environ 100 U mg⁻¹ pour la protéase et de 14U mg⁻¹ pour la chitinase (Tableau 5).

Tableau 5. Purification de la chitinase et de la protéase basique de *Trichodermaharzianum*

	<i>T. harzianum</i> 101645		<i>T. harzianum</i> 206040	
	U mg ⁻¹	Rendement %	U mg ⁻¹	Rendement %
Protease				
Extraction brute	8	100	10	100
G100	25.6	32	24.2	24.8
G200	41	20.5	38.8	15.5
FPLC	102.5	12.8	97	9.7
Chitinase				
Extraction brute	0.9	100	1.5	100
G100	3.3	36.7	3.5	23.3
G200	5.3	23.6	5.7	15.2
FPLC	13.2	14.6	14.2	9.5

Dans d'autre étude, leschercheur expliquent la production d'enzymes dégradant la paroi cellulaire (CWDE) et de peptaiboles ,et avec des analyses plus poussées ont montré de la capacité d'enroulement de l' agent antagoniste sur l'agent pathogène et comment se fait la dégradation de la paroi cellulaire ,ainsi que des analyses de facteurs tels que la tolérance à la température, la viabilité dans des conditions de stress, le taux de croissance et la sélection de la formulation, permettront la production d'un meilleur agent de biocontrôle *Trichoderma*(Fausto *et al.*,2007).

En plus, dansl'étude de Manuel *et al.* ,(2005),la même méthode de purification des protéines a été utilisée maisidentifier de nouvelles enzymes produites par *T. harzianum*, qui se produit également dans les interactions mycoparasitismes.

La protéase produite par l'isolat 1051 de *Trichodermaharzianum* purifiée profondément dégradé complètement la paroi cellulaire du phytopathogène *C. perniciososa* .En plus, une analyse a montré que l'enzyme était présente dans le surnageant de culture 24 heures après le début de la croissance du *Trichoderma* dans un milieu liquide contenant de la caséine. La capacité de la protéase produite par *Trichoderma harzianum* à hydrolyser la paroi cellulaire de *C. perniciososa*indique que cette enzyme peut être impliquée dans le processus antagoniste entre les deux champignonsà laquelle l'enzymeilya une capacité de contrôle biologique supérieure et pour le développement de plantes transgéniques ayant une résistance élevée aux pathogènes. (Janis *et Carlos.*, 2002).

Dans une autre étude similaire que le précédant étude deShakeri *et Howard.*, (2006), la souche ALL42 de *T. harzianuma* la capacité de produire et sécréter des enzymes dégradant les parois cellulaires. L'analyse a montré que*T.harzianum* ALL42 était capable de s'enrouler et de dégrader le mycélium de *R. solani* et de *M. phaseolina*. Les résultats indiquent qu'il existe différents modèles de production de CWDE(Cell Wall Degrading Enzyme) par cette souche pendant le mycoparasitisme .La même étude a montré que cette souche a une activité élevée d'endochitinase, protéase, de la β -glucosidase et de la phosphatase en l'absence ou en présence de paroi cellulaire purifiée de phytopathogènes incubés seuls dans le milieu TLE. Le rôle des phosphatases dans les interactions plante-champignon au cours du cycle de croissance restent mal connues (Valdirene*et al.*,2010).

L'étude de Shaily*etal.* , (2020)révélé que la sécrétion des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire par les espèces de *Trichoderma* est un facteur clé de la réussite dans la lutte biologique contre les phytopathogènes. L'activité de la β -1,3-glucanase a été significativement

augmentée par l'addition de Sglucan ou de chitine colloïdale. L'activité maximale de β -1,3-glucanase et de la chitinase a été atteinte lorsque la chitine colloïdale a été ajoutée. Dans la même étude, il a été signalé que la chitine est une source vitale pour l'induction de l'activité antifongique. L'addition de chitine colloïdale a amélioré les enzymes dégradant la paroi cellulaire.

3.3. Effets des antibiotiques et des enzymes sur *T.molitor*

Des larves de *Tenebriomolitor* ont été inoculées avec une suspension de spores 3D provenant d'une culture purifiée de *T. harzianum*, en plus on a inoculé les larves de *T. molitor* avec 40 l d'une suspension de spores de *T. harzianum* de 3 jours, ou 40 l d'un mélange de 500 ml (10 ml ml^{-1}) d'enzymes purifiées et 1 ml (10 mg ml^{-1}) d'antibiotique purifié. Ils séparément ou sous forme de mélange d'enzyme et d'antibiotique contenant une protéinase essentielle. Les larves ont commencé à mourir après 3 jours. Une croissance fongique plus importante est observée autour de la bouche que sur d'autres parties du corps lorsque la suspension de spores est utilisée. Les antibiotiques purifiés ont tué les larves lorsqu'elles ont été mélangées à de la nourriture. Les résultats ont montré que toutes les larves sont mortes après 15 et 17 jours. Aucune mortalité n'a été observée jusqu'à 15 jours avec l'application d'enzymes purifiées ou d'antibiotiques provenant de la souche seule ou dans le groupe témoin (Figure 11).

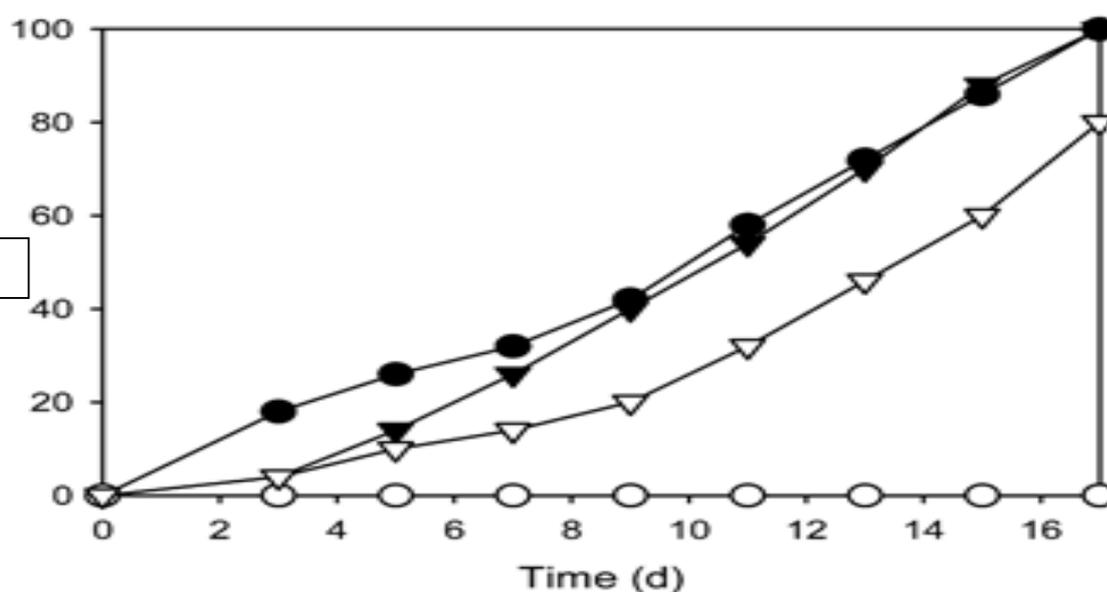
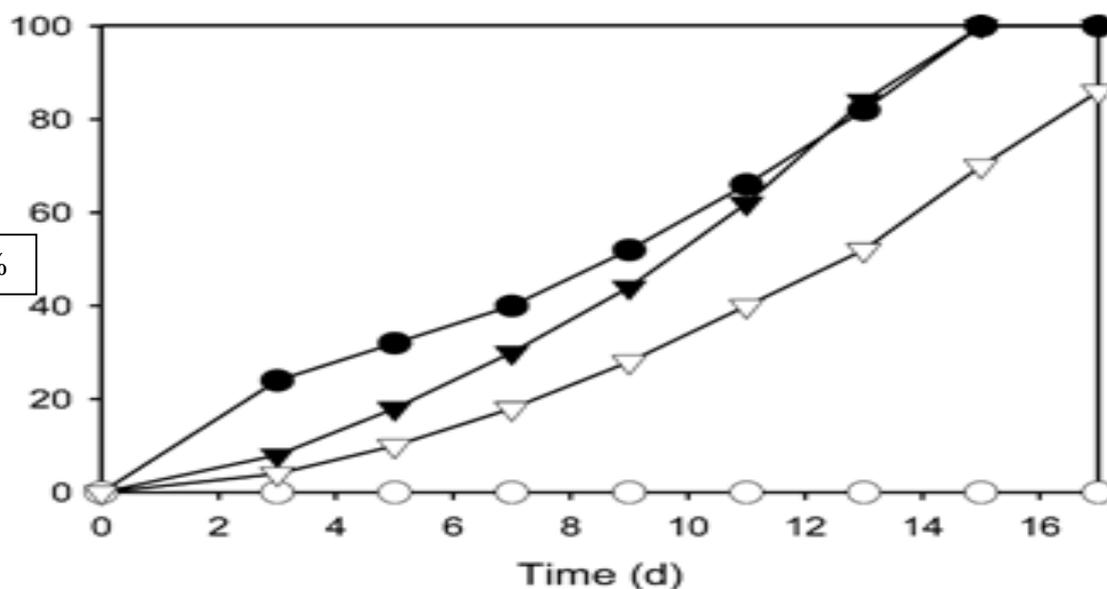


Figure 11. Effets des spores des enzymes et des antibiotiques purifiés de *Trichoderma harzianum* sur les larves de *Tenebrio molitor*.

Clé : (D) Antibiotique mélangé à la nourriture, (O) inoculation cuticulaire, enzyme ou antibiotique seul et témoins, (●) inoculation cuticulaire, suspension de spores, (7) inoculation cuticulaire, mélange d'enzymes et d'antibiotique.

3.4. Activité antagoniste *in vitro* du *T. harzianum*

La confrontation directe entre *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* et *T. harzianum*

A montré une croissance plus rapide de *T. harzianum* que par rapport aux isolats de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Au bout de quatre jours d'incubation, la boîte est totalement envahie par l'antagoniste, alors que les isolats de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* occupent qu'une surface de 20 mm de diamètre; ce qui correspond à une inhibition de la croissance mycélienne supérieure à 65%. Le témoin *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* cultivé seul occupe une surface d'environ 50 mm de diamètre (Figure 12).

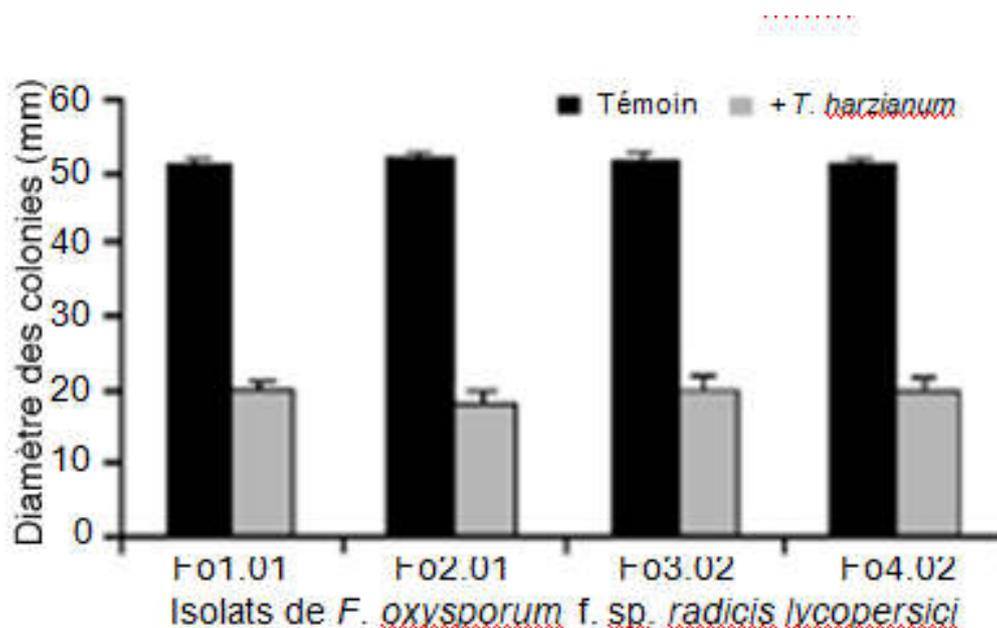


Figure 12. Diamètre de colonies de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en présence de *T. harzianum* après

Quatre jours d'incubation à 25°C comparativement au témoin non traité. Diamètre de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* colonies en présence de *T. harzianum* quatre jours après l'incubation à 25°C par rapport au témoin non traité.

3.3. Confrontation indirecte entre FORL et *T. harzianum*

La technique de confrontation à distance (indirect) nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur du *T. harzianum* exercé sur les isolats de *F. oxysporum* même à distance. Une lyse plus ou moins importante est observée au niveau des filaments mycéliens du *Pythium* spp. Il ressort que, malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats de *Fusarium* testés et *T. harzianum*, ce dernier a pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en présence de *T. harzianum*. Les observations microscopiques de la zone de contact des deux champignons ont

révélé la présence d'une lyse importante et une transformation en cordons du mycélium du pathogène et ce comparativement au témoin non traité(Figeur13).

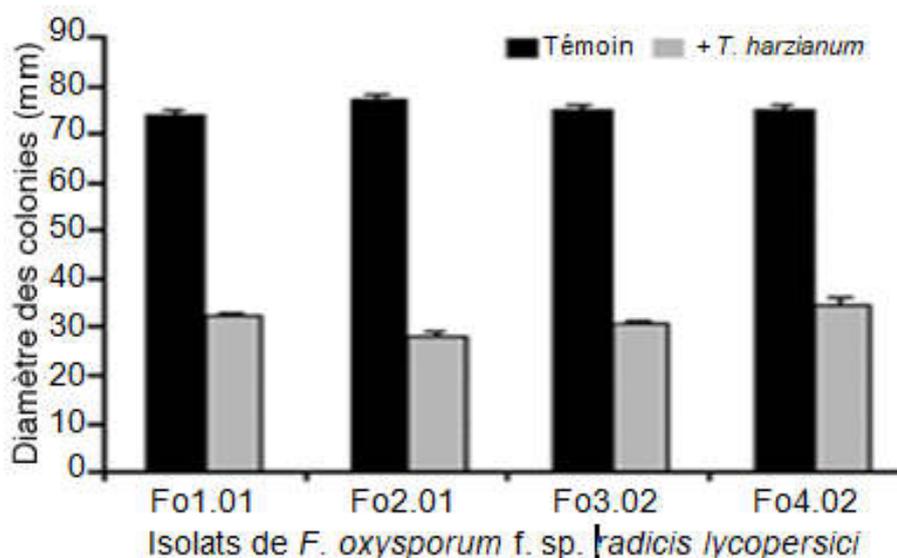


Figure 13. Effet inhibiteur à distance exercé par *T.harzianum* sur les isolats de *F. oxysporum* f. sp.

L'étude de Fatima *et al.* (2005), l'application des espèces de *Trichoderma* peut contrôler un grand nombre de champignons foliaires et du sol, à savoir *Fusarium* spp, *R. solani*, *Pythium*spp, *S. sclerotium*, et *S. rolfsii* .Les *Trichoderma*spp ont attribué à l'inhibition ou la destruction des mycéliums des pathogènes. D'autres études mentionnent que l'inhibition de la croissance mycélienne de *P. capsici* par les composés volatils produits par les souches de *Trichoderma* varie entre 4,3 et 48,8%. Ont déclaré que *Trichoderma*spp trouvé dans *Phytophthora nicotianae* une inhibition de la croissance mycélienne causée par les souches antagonistes de *Trichoderma*spp. Les racines inoculées à la fois avec des isolats de *phytophthora* et de *Trichoderma* présentaient une décoloration moins que le témoin.

Bendahmane *et al.*, (2012) ont testé par confrontation directe l'inhibition de la croissance fongique des colonies de *Botrytis* face aux souches de *Trichoderma*, qui a montré une diminution de la croissance par rapport au témoin. Le parasite fongique pénètre alors dans les cellules de l'hôte et utilise le contenu du cytoplasme. Dans le test de Confrontation indirecte et après 5 jours d'incubation, le diamètre moyen des colonies de *Botrytis* en présence des antagonistes était significativement inférieur à celui du témoin .L'analyse statistique des

Chapitre 03 Résultat et discussion

données a révélé une différence significative entre les quatre isolats. Il semble que malgré l'absence d'un contact direct entre *Trichodermasp* et les isolats de *Botrytis*, Cette étude a montré clairement l'effet des trois souches antagonistes de *Trichoderma* sur les isolats de *Botrytis* responsables de la maladie.

L'étude de Shaily et *al.* (2020) a montré également la capacité d'inhibition de sept isolats de *Trichodermasp* sur la croissance mycélienne des pathogènes, L'inhibition maximale par ThL-1, ThL-4 et 5593 respectivement, a été observée et les isolats ayant une activité inhibitrice prometteuse contre un pathogène se sont avérés avoir une activité intermédiaire sur l'autre pathogène. La potentialité inhérente des isolats de *Trichodermasp* pour s'adapter aux conditions introduites pourrait être l'explication possible de leur comportement variable d'inhibition.

Conclusion

Conclusion

Cette étude qui est une synthèse d'articles scientifiques consiste à étudier les caractéristiques du champignon *T.harzianum*, leurs extraits enzymatiques et leur rôle dans le biocontrôle contre les phytopathogènes. On peut conclure que les antibiotiques produits ont un potentiel dans la lutte contre ces phytopathogènes. En plus, les enzymes produites qui dégradent les parois cellulaires (CWDE) sont efficaces et de bons agents du biocontrôle. Enfin, l'action mycoparasitaire de *T.harzianum* qui a été testée par confrontation directe et indirecte, cet antagoniste produit des substances volatiles qui inhibent l'agent pathogène.

Enfin, en tenant compte de toutes les informations dans ce domaine, l'utilisation des espèces de *Trichoderma harzianum* devrait être promue comme alternative viable aux pesticides à l'ère de l'économie verte qui vise à promouvoir la santé humaine et la sauvegarde de l'environnement.

Référence bibliographique

- Çiğdem, K., & Merih, K. (2008). Mycoparasitism in the biological control of *Gibberella zeae* and *Aspergillus ustus* by *Trichoderma harzianum* Strains. *Journal of Agricultural Technology*, pp 49-55.
- Caron J. 2002. Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma*. Phytopathologiste Hhorti-Protection inc.Conferenceprésentée lors des journées horticoles regionales à St-rémi, p. 1.
- Chaverri P., Branco-Rocha F., Jaklitsch W., Gazis R., Degenkolb T., Samuels G.J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum*species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. in press at *Mycologia* 10: 1-74.
- Chaverri P., Castlebury L. A., Samuels G. J., Geisera D. M. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrealixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 302–313.
- Dendouga, W. (2017, 02 12). Impact des facteurs écologiques sur les moisissures antagonistes et productrices des enzymes hydrolytiques2017. Sétif, MICROBIOLOGIE, Algerie.
- Fatima, K., Karkach, N., Henni, Eddine, J., & Kihal, M. (2015). BIOLOGICAL CONTROL OF FUSARIUM CROWN AND ROOT ROT DISEASE OF TOMATO BY TRICHODERMA HARZIANUM IN THE WEST OF ALGERIA. *International journal of science and nature*, pp 2278 – 9103.
- Fausto, B. d., Almeida, Æ. F., Menezes, C. Æ., Roberto, d. N., Silva, Æ. C., Jose, U. Æ., & Lima, L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *ORIGINAL RESEARCH PAPER*, p5.
- Janice, L. D., & Carlos, R. F. (2002). Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BMC Biochemistry*, PP 1471-2091.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H., El Mahjoub M. 2005. Effetinhibiteurin vitro et *in vivodu* *Trichodermaharzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 9(3):163-171

- Khaled, H., Mejda, D.-R., Haifa, K., & Mohamed, E. M. (2005). Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, PP 163–171.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 1970;224:680-5.
- Manuel, M., Luis, S., Manuel, R., Enrique, M., & Antonio, L. (2005). BGN16.3, a novel acidic b-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *FEBS Journal*, PP 3441-3448.
- Roussos S. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulase. Thèse de doctorat, université de Provence, Paris, 187p.
- Rinderknecht H, Gekas MC, Silverman P, Haverback BJ. A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin Chim Acta* 1968;21:197–203.
- shakeri, J., & foster, H. .. (2007). Proteolytic activity and antibiotic production by *trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. *Enzyme and microbial technology*, pp 961. 968.
- Santos-Vaz M.S. 2010. Caracterização do gene lip2 de *Trichoderma harzianum*. Thèse de doctorat, Escola Superior Agrária de Bragança, 67p.
- Vinal, F., Ghisalbert, E., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., & Lorito, S. W. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology ISSN*, pp 0266-8254.
- Vinale, F., R. Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2005). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, pp 0266-8254.
- Zahem, R., & Mihoubi, r. (2017). Activités antifongiques des métabolites secondaires de *Trichoderma harzianum* vis à vis de quelques champignons phytopathogènes. Constantine, Department de microbiologie.

Résumé

Résumé

Cette étude analytique est basée sur 15 articles publiés relatifs à des études sur des enzymes extraites du fongique *Trichoderma harzianum* utilisées en lutte biologique pour la protection des plantes. Ces enzymes ont été extraites par plusieurs méthodes et purifiées par d'autres méthodes telles que le CCM. HPLC Enfin, l'activité biologique de ces enzymes est mesurée et comparée à l'effet des antibiotiques qui ont un effet positif sur l'élimination des champignons pathogènes (confrontation biologique). La lecture des résultats a montré une similitude dans l'effet de chacun des antibiotiques et l'effet positif des enzymes dans la confrontation biologique

Mots clé : *Trichoderma harzianum*, la lutte biologique, antibiotiques , enzymes .

ملخص

تستند هذه الدراسة التحليلية الى 15 مقالة منشورة تتعلق بالدراسات على الانزيمات المستخرجة من الفطريات *Trichoderma harzianum* المستخدمة في مكافحة البيولوجية لوقاية النبات. تم استخراج هذه الانزيمات بعد عدة طرق وتنقيتها بطرق أخرى مثل HPLC. TLC. وأخيرا يتم قياس النشاط البيولوجي لهذه الانزيمات و مقارنتها بتاثير المضادات الحيوية التي لها تاثير ايجابي على القضاء على الفطريات المسببة للأمراض (المواجهة البيولوجية).

الكلمات المفتاحية: *Trichoderma harzianum*، مكافحة البيولوجية، المضادات الحيوية، الانزيمات .

Abstract

This analytical review is based on 15 published articles related to studies on enzymes extracted from the fungus *Trichoderma harzianum* used in biological control for plant protection. These enzymes were extracted by several methods and purified by other methods such as TLC. HPLC Finally, the biological activity of these enzymes was measured and compared to the effect of antibiotics which have a positive effect on the elimination of pathogenic fungi (biological confrontation). The reading of the results showed a similarity in the effect of each of the antibiotics and the positive effect of the enzymes in the biological confrontation

Key words: *Trichoderma harzianum*, biological control, antibiotics , Enzymes.