

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش الجزائر
Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach Alger

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de master

Département : Botanique

Master : Protection des végétaux

Option : Phytopathologie

THEME

**Production, purification et analyse de l'activité
antagoniste de quelques métabolites secondaires de
Trichoderma atroviride P. Karsten à l'égard de
quelques champignons phytopathogènes**

Réalisé par : Mlle AMEUR Ouerdia

Soutenu le : 25/ 10 /2016.

Devant le jury:

Président : M. Bouznad Zouaoui

Professeur (E.N.S.A)

Promoteur : Mlle Boureghda Houda

Maître de conférences (E.N.S.A)

Examineur : Mlle Zermane Nadjia

Professeur (E.N.S.A)

Mlle Lassouane Nassima

Chargée de cours (E.N.S.A)

Promotion : 2011 / 2016.

SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	I
Liste des Figures	II
Liste des Tableaux	VI
Introduction.....	1
I.1 La lutte biologique.....	4
I.1.1 Définition de la lutte biologique.....	4
I.1.2 Historique	4
I.1.3 Les avantages et les limites de la lutte biologique.....	5
I.2 L'utilisation de <i>Trichoderma</i> spp. dans la lutte biologique.....	6
I.2.1 Description.....	6
I.2.2 Historique	8
I.2.3 Position systématique	9
I.2.4 L'évolution de la taxonomie de <i>Trichoderma</i>	9
I.2.5 Biologie et mode de survie	12
I.2.6 Application	13
I.2.7 <i>Trichoderma</i> spp. dans l'agriculture.....	14
I.3 Les relations antagonistes et les modes d'action.....	15
I.3.1 Introduction	15
I.3.2 Les modes d'action directes	16
I.3.2.1 La compétition pour les éléments nutritifs	16
I.3.2.2 La colonisation des racines de la plante	17
I.3.2.3 La modification de la rhizosphère	18
I.3.2.4 L'antibiose	18
I.3.2.5 Le mycoparasitisme.....	18
I.3.3 Le mode d'action indirect.....	20

I.3.3.1	La stimulation des mécanismes de défense de la plante.....	20
I.3.4	La biofertilisation	22
I.4	Les métabolites secondaires de <i>Trichoderma</i> spp :	23
I.4.1	Introduction	23
I.4.2	Définition des métabolites secondaires	23
I.4.3	Historique des métabolites secondaires de <i>Trichoderma</i>	24
I.4.4	les différentes classes des métabolites secondaires chez <i>Trichoderma</i> spp. .	24
I.4.4.2	Les Peptaiboles.....	24
I.4.4.3	Les diketopipérazines.....	25
I.4.4.4	Les polyketides.....	25
I.4.4.5	Les pyrones	26
I.4.4.6	Les terpènes.....	27
I.4.4.7	Les Koninginines.....	27
I.4.4.9	Les Composés Hétérocycliques Azotés	28
I.4.4.10	Les azaphylones	29
I.4.4.11	Buténolides et Hydroxy-Lactones.....	29
I.4.4.12	Métabolites isocyano.....	29
I.4.5	L'activité biologique des métabolites secondaires :	30
II.1	Matériel	32
II.1.1	Matériel fongique	32
II.1.1.1	L'agent antagoniste	32
II.1.1.2	Les agents pathogènes.....	32
II.1.2	Matériel végétal.....	32
II.2	Méthodes	33
II.2.1	Evaluation de l'activité antagoniste de l'isolat Ta.13 vis-à-vis de quelques agents pathogènes	33
II.2.1.1	La confrontation directe	33

II.2.1.2	La confrontation indirecte	33
II.2.2	Production des métabolites secondaires de l'isolat <i>T. atroviride</i> (Ta.13)..	35
II.2.2.1	Culture liquide de l'isolat Ta.13.....	35
II.2.3	Extraction, isolement et purification des métabolites secondaires de Ta.13	35
II.2.4	Fractionnement de l'extrait brut.....	38
II.2.4.1	Chromatographie sur colonne	39
II.2.4.2	La chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque en verre : ..	40
II.2.5	Mise en évidence et purification du 6-pentyl-a-pyrone (6pp).....	42
II.2.6	Evaluation de l'activité antifongique de l'extrait brut du filtrat de culture de l'isolat Ta.13 <i>in vitro</i>	43
II.2.7	Etude de l'effet des métabolites secondaires purifiés sur le développement des plantes.....	43
II.2.8	Etude de l'effet <i>in vitro</i> du métabolite secondaire « A » sur la croissance du blé :.....	43
II.2.9	Etude de l'effet du métabolite 6PP purifié sur la croissance de la tomate <i>in vitro</i> :.....	45
II.2.10	Etude de l'effet des métabolites 6pp et « B » purifiés sur le développement de la tomate <i>in vivo</i>	45
II.2.11	Etude de l'effet des métabolites secondaires « 6PP » et « A » sur la protection des plants de blé à l'égard de <i>F. culmorum</i> agent de la pourriture racinaire.....	46
II.2.11.1	Inoculation des plants de blé par <i>F. culmorum</i>	46
II.2.12	Les analyses statistiques.....	47
III.1	Résultats :.....	48
III.1.1	Action <i>in vitro</i> de l'isolat Ta.13 sur la croissance mycélienne des quatre agents pathogènes	48
III.1.1.1	La confrontation directe.....	48
III.1.1.2	La confrontation indirecte :.....	49
III.1.2	Extraction, fractionnement et purification des métabolites secondaires de l'isolat Ta.13	53

III.1.2.1	Extraction des métabolites secondaires	53
III.1.3	Fractionnement et purification des métabolites secondaires de l'isolat Ta.13 ainsi que la détection et la récupération du 6-pentyl-a-pyrone (6pp):	55
III.1.4	Action <i>in vitro</i> de l'extrait brute du filtrat de culture de l'isolat Ta.13 sur la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes.....	60
III.1.5	Comparaison de l'effet de T.a 13 sur la croissance mycélienne des agents pathogènes dans le cas de la confrontation directe indirecte et sous l'effet du filtrat de culture brut	63
III.1.6	L'effet <i>in vitro</i> des métabolites secondaire purifiés de l'isolat Ta.13 sur la croissance du blé dur et de la tomate	66
III.1.7	L'effet <i>in vivo</i> des métabolites secondaires purifiés de l'isolat Ta.13 sur le développement des plants de tomate.....	69
III.1.8	L'effet <i>in vivo</i> des métabolites secondaires sur la protection des plants de blé à l'égard de <i>F. culmorum</i>	72
III.2	Discussion :	75
	Conclusion	83
	Annexes.....	94
	RESUME	111

RESUME

Le genre *Trichoderma* comprend un grand nombre d'espèces qui agissent comme agent de lutte biologique. Les tests effectués *in vitro* sur l'analyse des propriétés antagonistes de l'isolat Ta.13 montre que cette dernière réduit la croissance mycélienne de l'*A. solani*, *B. cinerea*, *F. culmorum* et de *R. solani* ainsi que la production des sclérotés chez ce dernier. Par ailleurs, cet isolat produit de grandes quantités de métabolites secondaires qui réduisent la croissance mycélienne de ces pathogènes. Parmi ces produits, le 6pp et deux autres métabolites non identifiés (A et B) ont été testés. Le 6pp a montré une amélioration au niveau du poids frais des plants de tomate (*in vivo*), réduit les symptômes de la maladie chez les plants de blé inoculés avec *F. culmorum* mais il a causé une phytotoxicité chez la tomate (*in vivo*) lorsqu'il est appliqué à une concentration de 10^6 M. Le métabolite non identifié «A» a aussi montré une réduction de la maladie chez les plants de blé inoculés avec *F. culmorum* mais à 10 mg/L de ce métabolite réduit le développement des deux premières feuilles de blé traité *in vitro*. Le dernier métabolite testé «B» a montré, lui aussi une amélioration au niveau du poids frais des plants de tomate traités avec *in vivo*.

Mots clés: *Trichoderma*; *atroviride*; Métabolite secondaire; 6PP; Biocontrôle; Croissance végétale.

ABSTRACT

The genus *Trichoderma* comprises a great number of fungal strains that act as biological control agents. *in vitro* tests of antagonistic ability of Ta.13 show that this strain reduce the mycelium growth of *A. solani*, *B. cinerea*, *F. culmorum* and *R. solani* and sclerotia production from the last one. In another hand, this strain produces many secondary metabolites which reduce the mycelium growth of these funguses. Among of these products, the 6pp and two others not yet identified metabolites (A and B) are tested. The 6pp improves the fresh weight of tomato (*in vivo*), reduce the disease on wheat inoculated with *F. culmorum* s but it causes a phytotoxicity response on tomato (*in vivo*) whent it was applied at 10^6 M. The other metabolite (A) shows also a reduction of disease on wheat inoculated with *F. culmorum* (*in vivo*) but applied at 10 mg/L this metabolite reduce the growth of the two first leaves of wheat (*in vitro*). The last metabolite tested (B) shows an improvement on fresh weight of tomato (*in vivo*).

Keys words : *Trichoderma* ; *atroviride*; secondary metabolit; 6PP; Biocontrol ; Plant growth.

ملخص

تعتبر الفطريات التي تنتمي الي نوع *Trichoderma* من أهم الأجسام الدقيقة المستعملة في مكافحة الحيوية. إن التجارب التي أقيمت في المختبر لتحليل الخصائص التضادية للسلالة أثبتت أن هذه الأخيرة تكبح نمو كل من الفطريات الضارة للنبات التالية *A. solani*, *B. cinerea*, *F. culmorum* و *R. solani* إلي جانب هذا تنتج كميات معتبرة من المركبات الثانوية التي تم اختبار بعضها منها و من بين هذه المواد ال 6pp و آخرين لم يتم تشخيصهما بعد (A) (B) الذين أظهرت تحسن في الوزن الرطب للطماطم، انخفاض في حده أعراض المرض عند القمح الملقح ب *F. culmorum* و لكنه سبب في أعراض التسمم عند الطماطم المعالجة به، أما المادة الأخرى (A) هي أيضا خفضت في أعراض المرض عند القمح الملقح ب *F. culmorum* و لكن 10مغ/ل من هذه المادة قد سببت في انخفاض نمو الورقتين الأوليتين عند القمح. المادة الأخير (B) هي أيضا سببت تحسن في الوزن الرطب عند الطماطم.

كلمة مفتاح: *Trichoderma* ; *atroviride*; المركبات الثانوية; 6PP; مكافحة الحيوية; نمو النبات.