

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID
- TLEMCEN -

INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

THESE

Pour l'obtention du

DIPLÔME DE MAGISTER

en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option: Microbiologie

Par : Melle DENNOUNI Nouria

M73/02

MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ANTIBACTERIENNES ET
ANTIFONGIQUES CHEZ DEUX ESPECES
DE TERFEZ D'ALGERIE (*TIRMANIA NIVEA* ET *TIRMANIA PINOYI*)

JURY:

Mr. D. CHABANE SARI
Mr. Z. FORTAS
Mr. N.KARAM
Mr. A. AOUES
Mr. K. BOUCHERIT

Président
Promoteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur

UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAID- TLEMCEN-
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

THESE

مكتبة كلية العلوم
ملحقه البيولوجيا

Pour l'obtention du

DIPLOME DE MAGISTER

en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Microbiologie

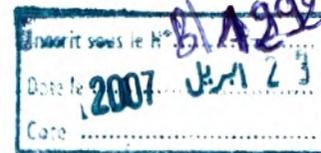
Par : Melle DENNOUNI Nouria

MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES ANTIBACTERIENNES ET
ANTIFONGIQUES CHEZ DEUX ESPECES
DE TERFEZ D'ALGERIE (*TIRMANIA NIVEA* ET *TIRMANIA PINOYI*)

JURY :

Mr. D. CHABANE SARI
Melle Z. FORTAS
Mr. N. KARAM
Mr. A. AOUES
Mr. K. BOUCHERIT

Président
Directrice
Examineur
Examineur
Examineur



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de l'institut des Sciences de la Nature de Tlemcen ainsi qu'au Laboratoire de Microbiologie - Phytopathologie de l'Université d'Es-Senia (Oran) sous la direction de M^{elle} Z. FORTAS, Maître de conférences.

Elle a suivi régulièrement ce travail, prodigué sans cesse ses encouragements. Sa présence, ses précieux conseils ont permis de surmonter au moment opportun les difficultés rencontrées.

Puisse cet exposé témoigner de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

Mes remerciements les plus vifs vont à Monsieur D. CHABANE - SARI, Maître de conférences à l'institut des Sciences de la Nature de Tlemcen qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur N. KARAM, Maître de conférences à l'institut de Biologie d'Es-Senia (Oran) pour sa disponibilité à juger ce travail.

Que Monsieur A. AOUES, Maître de conférences à l'institut de biologie d'Es-Senia (Oran) trouve ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

J'associe à ces remerciements Monsieur K. BOUCHERIT, chargé de cours à l'institut des Sciences de la Nature de Tlemcen qui me fait l'honneur de siéger parmi les membres du jury.

J'adresse une pensée particulière à Madame A. DJAFRI, Maître de conférences à l'institut de Chimie à l'Université d'Es-Senia (Oran) dont l'aide technique et les conseils m'ont été précieux.

Mes remerciements vont également à Monsieur ILIKTI, responsable du Laboratoire de Chimie Industrielle à l'USTO (Université des Sciences et de la Technologie d'Oran) pour son aide dans la réalisation de la partie chromatographique de ce travail, ainsi qu'à M^{elle} N. DALI YUCEF, assistante en Chimie à l'institut de Biologie de Tlemcen pour ses précieux conseils.

Enfin, j'exprime ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont apporté aide et soutien et que je ne puis citer individuellement

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES TERFEZ.....	4
1.1. Répartition géographique.....	4
1.2. Position taxonomique.....	4
1.3. Ecologie.....	7
1.4. Composition chimique.....	9
1.5. Caractéristiques de la germination des ascospores et du mycélium en culture	11
1.6. Associations mycorhiziennes à terfez.....	11
2. LES MYCORHIZES.....	12
2.1. Cytologie des mycorhizes.....	12
2.1.1. Les ectomycorhizes.....	15
2.1.2. Les endomycorhizes.....	15
2.1.3. Les ectendomycorhizes.....	16
2.2. Mycorhizes et protection des plantes.....	16
2.2.1. Effet des mycorhizes sur les agents pathogènes.....	17
2.2.2. Les conditions de l'expression du phénomène de protection contre les agents pathogènes.....	18
2.2.3. Mécanismes contribuant à la protection.....	20

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL	23
1.1. Espèces fongiques	23
1.1.1. Espèces du genre <i>Tirmania</i>	23
1.1.2. Espèces fongiques à tester	23
1.2. Espèces bactériennes	23
1.3. Milieux de cultures.....	26
2. METHODES	27
2.1. Conservation des cultures	27
2.2. Isolement des mycéliums des deux espèces de <i>Tirmania</i>	27
2.3. Préparation des précultures mycéliennes en milieu solide.....	28
2.4. Cultures mycéliennes de terfez en milieu liquide	28
2.4.1. Obtention des filtrats de culture des deux espèces de <i>Tirmania</i>	28

2.5. Méthodes d'extraction des substances antibactériennes et antifongiques.....	30
2.5.1. Extraits de gléba des deux espèces de <i>Tirmania</i>	30
2.5.1.1. Extraction par contact gléba -solvants, selon la méthode de ROUGIEUX (1963).....	30
2.5.1.2. Extraction par le soxhlet.....	30
2.5.2. Extraits des filtrats de culture des deux espèces de <i>Tirmania</i>	32
2.5.3. Extraction à partir du mycélium	32
2.6. Tests d'activité des filtrats et des différents extraits.....	33
2.6.1. Tests avec les filtrats de culture des deux espèces de <i>Tirmania</i>	33
2.6.1.1. Test antibactérien par la méthode de diffusion en milieu solide.....	33
2.6.1.2. Tests antifongiques	33
2.6.2. Tests avec les différents extraits	34
2.6.2.1. Test antibactérien par la méthode de diffusion en milieu solide	34
2.6.2.2. Tests antifongiques.....	35
2.7. Tests d'antagonisme <i>in vitro</i> entre les <i>Tirmania</i> et les champignons phytopathogènes.....	35
2.7.1. Méthode de confrontation des espèces fongiques en boîte de Pétri.....	35
2.7.2. Méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) modifiée.....	35
2.7.3. Méthode de double couche (in BELLAHCENE, 1990).....	36
2.7.4. Recherche des substances antifongiques volatiles chez <i>T.nivea</i> et <i>T.pinoyi</i>	36
2.8. Méthodes de mesure	38
2.8.1. Test antibactérien.....	38
2.8.2. Tests antifongiques	38
2.9. Méthodes analytiques des divers extraits	39
2.9.1. Analyse par chromatographie en couche mince.....	39
2.9.2. Fractionnement de l'extrait du filtrat de culture de <i>T.nivea</i>	41
2.9.3. Analyse de la fraction active par HPLC.....	42

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Morphologie des ascocarpes des deux espèces de <i>Tirmania</i>	45
2. Caractéristiques de la germination des ascospores et obtention du mycélium	45
2.1. Discussion.....	45
3. Description des cultures mycéliennes des deux espèces de <i>Tirmania</i>	54
4. Activité des filtrats de culture mycélienne de <i>T.nivea</i> et <i>T.pinoyi</i> sur la croissance des micro-organismes testés.....	54
4.1. Sur la croissance des espèces bactériennes et levuriformes par la méthode de diffusion en milieu solide.....	54
4.2. Sur la croissance des champignons phytopathogènes	54

4.2.1. Selon la méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) avec le filtrat n°1.....	54
4.2.2. Par incorporation des filtrats n°2 au milieu de culture des champignons phytopathogènes.....	54
4.3. Discussion.....	58
5. Activité des divers extraits sur la croissance des micro-organismes testés.....	61
5.1. Extraits obtenus par contact gléba -solvant	61
5.1.1. Sur la croissance des espèces bactériennes	61
5.1.2. sur la croissance des espèces fongiques.....	61
5.2. Extraits de gléba obtenus à l'aide du soxhlet.....	61
5.2.1. Espèces bactériennes.....	61
5.2.2. Espèces fongiques	64
5.3. Extraits des filtrats de culture.....	64
5.3.1. Espèces bactériennes.....	64
5.3.2. Espèces fongiques	64
5.4. Extrait du mycélium	66
5.5. Discussion	66
6. Pouvoir antagoniste	78
6.1. Méthode de confrontation.....	78
6.2. Méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) modifiée, essai double couche.....	78
6.3. Test des inhibiteurs volatils.....	83
6.4. Discussion.....	83
7. Analyse des divers extraits.....	87
7.1. Analyse par C.C.M.....	87
7.1.1. Extraits de gléba de <i>T.nivea</i> et de <i>T.pinoyi</i>	87
7.1.2. Extrait du filtrat de culture de <i>T.nivea</i>	87
7.1.3. Bioautographie des chromatoplaques.....	87
7.2. Fractionnement et analyse par HPLC.....	87
7.3. Discussion.....	95

QUATRIEME PARTIE

CONCLUSION GENERALE.....	98
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	101

INTRODUCTION

Les terfez ou truffes du désert sont des champignons hypogés mycorhiziens, comestibles très appréciés par certaines populations des zones arides et semi-arides d'Algérie.

Compte tenu de leur fréquence à l'état sauvage et de leur importance alimentaire et économique, de nombreuses recherches sont actuellement entreprises dans certains pays du Maghreb (Algérie, Libye, Maroc) et du Moyen Orient (Koweït, Syrie, Iraq, Arabie Saoudite) pour mettre en valeur cette richesse naturelle, et surtout afin de la domestiquer tout comme la truffe d'Europe.

Outre leur importance alimentaire, les terfez, de tout temps ont été utilisés en médecine humaine. Certains hadiths religieux évoquent leurs propriétés guérissantes :

في فتح الباري شرح البخاري لأحمد بن حجر العسقلاني ، نجد الحديث التالي عن النبي صلى الله عليه و سلم يقول " الكمأة من المن و ماؤها شفاء للعين "

HALOUBI (1988) rapporte que le suc de l'ascocarpe utilisé comme khol est efficace, il purifie la vue et peut même guérir la pelade. ROUGIEUX (1963) a d'ailleurs mis en évidence leur activité stimulante et faiblement inhibitrice sur certaines bactéries.

D'un autre côté de nombreux champignons mycorhiziens et principalement ectomycorhiziens présentent une aptitude prophylactique certaine vis à vis de nombreux agents phytopathogènes par la production d'antibiotiques.

Aussi, dans le but de rechercher une activité antibactérienne ou antifongique chez les terfez, avons nous axé nos recherches sur les points suivants :

- L'isolement du mycélium de deux espèces de terfez du genre *Tirmania*.
- Mise en évidence des activités antibactériennes et antifongiques des extraits de filtrat de culture et de gléba.
- La recherche du phénomène d'antagonisme *in vitro* entre les deux espèces de terfez et les champignons phytopathogènes .
- L'analyse par chromatographie des extraits actifs obtenus.

PREMIERE PARTIE
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES TERFEZ :

1.1. Répartition géographique :

Les terfez sont répartis un peu, partout dans le monde. Les genres *Terfezia*, représenté par douze espèces (TRAPPE, 1979) et *Tirmania* par deux espèces (FORTAS, 1990) se situent essentiellement sur le pourtour du bassin méditerranéen, mais leurs zones de prédilection se trouvent au Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie, Libye) (CHATIN, 1892; MATTIROLO, 1906; TRAPPE, 1988; FORTAS, 1990) et au Moyen Orient (Syrie, Palestine, Iran, Koweït, Iraq, Arabie Saoudite) (FALLAHYAN , 1973; ALSHEIKH et TRAPPE, 1983; BOKHARY *et al.* 1987).

Le genre *Tuber*, largement répandu en Europe n'a en Afrique du Nord que quelques rares représentants : *Tuber albidum*, *T. asa*, *T. excavatum*, *T. rufum*, *T. uncinatum* (MALENCON, 1973) .

Quelques rares espèces de *Terfezia* sont connues dans les zones semi - arides d'Europe; *Terfezia leptoderma* Tul., a été signalée par DONADINI (1979) en France, *T. claveryi* Chatin; *T. leptoderma* Tul., ainsi que *T. arenaria* (Moris) Trappe ont été signalées en Italie (Sardaigne) et en Espagne (CHATIN, 1892; MORENO *et al.* 1986; JANEX- FAVRE *et al.* 1988; ALVAREZ *et al.* 1992)

En Algérie, quelques espèces sont connues dans les zones arides et semi - arides (Biskra, Barika, Bechar, Aricha, Timimoun, Bou Saâda), il s'agit de : *T. arenaria* (Moris) Trappe, *Terfezia boudieri* Chatin, *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon, *Tirmania nivea* (Desf ex Fr) Trappe (CHATIN, 1892; ALSHEIKH et TRAPPE, 1983; FORTAS et CHEVALIER, 1988 ; FORTAS, 1990 ; FORTAS et CHEVALIER, 1992 a et b).

D'autres espèces ont été signalées hors des régions méditerranéennes : *Terfezia decaryi* à Madagascar (HEIM, 1934) ; *Terfezia pfeilii* Henn au Damaraland (HEIM, 1934) et dans la province du Cap (MARASAS et TRAPPE, 1973) *Terfezia spinosa* Hark en région subdésertique d'Amérique du Nord (HEIM , 1934; GILKEY, 1939); *Terfezia gigantea* Imai au Japon (IMAI, 1933) et au Sud de l'Amérique du Nord (TRAPPE et SUNDBERG, 1977).

1.2. Position taxonomique:

De nombreux auteurs se sont intéressés essentiellement à la position taxonomique des terfez (CHATIN, 1892 ; MAIRE, 1906 ; IMAI, 1933 ; GILKEY, 1947 ; TRAPPE, 1971 ; MARASAS et TRAPPE, 1973 ; MALENCON, 1973 ; TRAPPE et SUNDBERG, 1977 ; DONADINI, 1979 ; TRAPPE , 1979 ; TRAPPE et MOLINA , 1986 ; MORENO *et al.* 1986) .

MALENCON (1938) en étudiant les truffes françaises a montré que les genres *Terfezia* et *Tirmania* dérivait des discomycètes operculés ; tout comme FISHER (1897), il a classé ces deux genres dans l'ordre des Tubérales.

En 1971, TRAPPE a remarqué que les asques du genre *Tirmania*, contrairement à ceux de *Terfezia* se colorent en bleu avec le réactif de Melzer.

CHATIN (1892) a montré que le genre *Terfezia* diffère du genre *Tirmania* par deux caractères : les spores sont rondes et alvéolées ou relevées de verrues chez les *Terfezia*, elles sont rondes ou ovales à surfaces lisses chez les *Tirmania*.

L'espèce *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon diffère de l'espèce *Tirmania nivea* (Desf ex Fr) Trappe par la morphologie des spores, qui sont rondes et lisses chez la première et elliptiques et toujours lisses chez la seconde.

KORF (1973) pense que les Pézizales et les Tubérales sont très proches et que les premières deviennent des truffes par perte de l'opercule fonctionnel.

TRAPPE (1979) a transféré le genre *Tirmania* de la famille des Terféziacées à celle des Pézizacées. Il a par ailleurs rejeté l'ordre des Tubérales et a rattaché les Terféziacées et les Tubéracées à l'ordre des Pézizales avec sept autres familles (Fig .1). Cette position a été adoptée par DONADINI (1983) et par ERICKSSON (1984) (in FORTAS, 1990).

L'ordre des Tubérales a été maintenu par JANEX-FAVRE et PARGUEY-LEDUC (1985) et JANEX-FAVRE *et al.* (1988). Selon ces auteurs, cet ordre présente une ressemblance certaine avec les Pézizales. Ils dériveraient probablement d'une forme ancestrale commune (PARGUEY-LEDUC *et al.* 1987).

Selon JANEX-FAVRE et PARGUEY - LEDUC (1985), les caractères suivants se retrouvent conjointement dans le genre *Tuber* et chez le *Terfezia claveryi* :

- Les asques formés sur des dangeardies ascogènes, deviennent plus ou moins globuleux à l'état adulte.
- L'ascosporogénèse se déroule dans la partie sommitale de l'asque, peu après leur formation, les ascospores migrent et se répartissent dans tout le volume ascéal.
- les ascospores adultes ont une paroi ornementée.

FORTAS (1990) a mis en évidence certains caractères communs entre les terfez et les autres Ascomycètes, mais aussi la présence d'une formation septale qui pourrait différencier les terfez des *Tuber*.

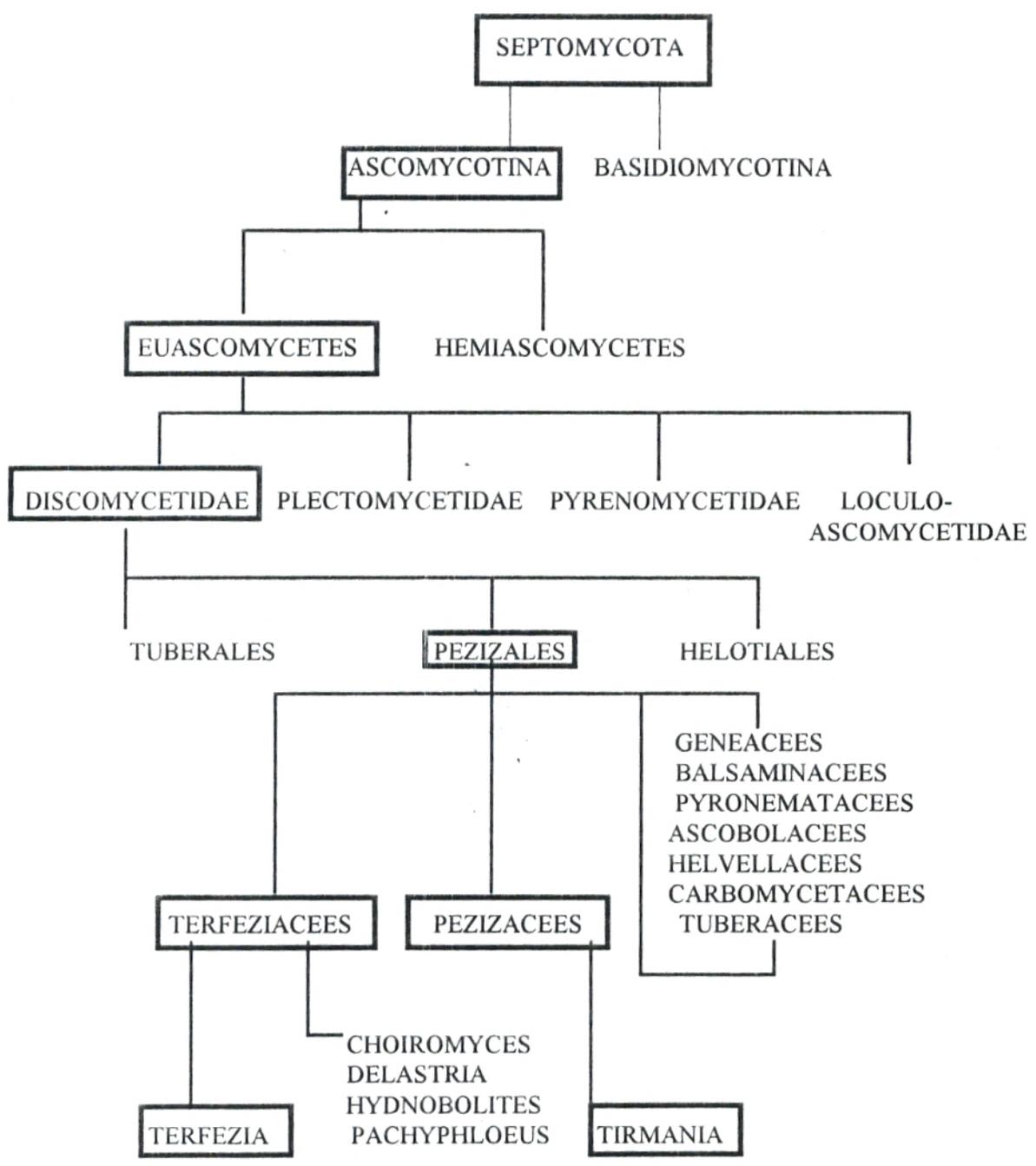


Fig .1: Place des terzez dans la classification des Ascomycètes (d'après TRAPPE, 1979 ; DELMAS, 1989)

1.3. Ecologie

Les terfez ou « truffes du désert » se développent en climat chaud. Cependant, le climat désertique, de par ses étés brûlants, sa sécheresse, pose un problème de survie à ces champignons. Problème résolu par les refuges mycorhiziens (MALENÇON, 1973). Ces champignons se développent au voisinage de petites plantes herbacées annuelles ou arbustives de la famille des Cistacées; il s'agit d'*Helianthemum guttatum*, en Algérie, au Maroc, en Sardaigne et en Espagne (CHATIN, 1892 ; PIROTTA et ALBINI, 1900 ; TRAPPE, 1971 ; MORENO *et al.* 1986 ; JANEX-FAVRE *et al.* 1988 ; FORTAS, 1990).

Au Koweït, *Helianthemum ledifolium* Mill et *H. salicifolium* Mill sont les plantes hôtes du genre *Tirmania* (AWAMEH *et al.* 1979 ; ALSHEIKH et TRAPPE, 1983)

CHATIN (1892) signale que les pins et les cèdres abritent des terfezières au Nord et dans les montagnes de l'Algérie, il s'agit de l'espèce *Terfezia leptoderma* Tul. Cette même espèce a été signalée en France sous chêne et pin d'Alep (DONADINI, 1979; CHEVALIER *et al.* 1984).

Selon ALSHEIKH et TRAPPE (1983), les terfez exigent des hivers pluvieux. Un minimum de 180 mm distribué d'octobre à mars est nécessaire pour la croissance des plantes hôtes, donc pour la formation des mycorhizes.

D'après BOUCHAREB (1994), il semble que la fructification de la plupart des espèces n'a lieu que si la quantité et la répartition des pluies sont telles qu'elles permettent d'abord une bonne croissance du mycélium (attribuée aux pluies d'automne), ensuite qu'elles favorisent l'initiation fructifère (pluies d'hiver), enfin qu'elles assurent le grossissement et la maturation du carpophore (pluies de printemps).

En Algérie, selon FORTAS (1990) : « Les terfez se développent dans les zones arides ou semi-arides, sur un sol sablonneux, calcaire, relativement pauvre en matière organique, riche en magnésium, bien pourvu en potassium, pauvre en phosphore... (Tableau 1) ».

AWAMEH et ALSHEIKH (1979 a) ont étudié en détail l'écologie et l'habitat du genre *Tirmania* du Koweït. Ces champignons se développent sur des sols gypseux ou graveleux - gypseux salés.

L'habitat d'une même espèce varie d'une station à une autre. Le *Terfezia leptoderma* qui se développe en terrain sablonneux en France (DONADINI, 1979), voit son habitat changer en Sardaigne : sol acide, pelouse à strate herbacée, où arbres et arbustes sont absents (JANEX-FAVRE *et al.* 1988).

La récolte des terfez a lieu dès janvier dans les zones arides et de mars à avril dans les zones semi - arides. Le sol desséché se craquèle et les terfez très superficiellement placés (de 1 à 5 cm de profondeur) soulèvent le sol en petites taupinières et le percent. Leur cueillette se fait facilement à la main ou à l'aide d'un petit râteau.

Tableau 1 : Analyse physico -chimique de terres provenant de deux stations à terfez d'Algérie (d'après FORTAS, 1990).

	SAIDA (Zeriguët)	SAIDA(Djebel Ben Kaddour)
Argile < 2 m p 1000	88,0	120,0
Limons fins P 1000	121,0	112,0
Limons grossiers p 1000	86,0	109,0
Sable fin p 1000	570,0	517,0
Sable grossier p 1000	135,0	142,0
Carbone p 1000	12,5	8,4
Azote organique p 1000	1,35	0,83
Rapport C/N	9,25	10,12
Matières organiques totales p 1000	21,5	14,14
pH eau	> 7,0	8,3
Calcaire totale p 1000		231,0
Calcium échangeable meq / 100		30,0
Magnésium échangeable meq /100		4,54
Potassium échangeable meq / 100		0,70
Bore soluble eau bouillante ppm		0,55
Cuivre total H.F. ppm		10,5
Manganèse total H.F. ppm		219,0
Zinc total H.F. ppm		40,0
Phosphore assimilable p 205 J H p 1000	0,12	
Acide phosphorique H.F. p 100		0,06
Potasse échangeable K 20 p 1000	0,53	

H.F. : acide fluorhydrique

J.H. : méthode Joret -Hébert.

1.4- Composition chimique

La composition chimique du genre *Tirmania* a été étudiée par CHATIN (1892), mais ses méthodes d'analyse étaient fort simples et les résultats obtenus ont été réexaminés.

AL-DELAIMY et ALI (1970) ont étudié les conditions de stockage de deux espèces de terfez d'Iraq : *Terfezia claveryi* et *Terfezia hafizi* ; ils ont mis en évidence leur richesse en protéines.

Leur teneur en acides aminés a été analysée par AL-DELAIMY (1977) et celle en lipides et stérols par AL- SHABIBI *et al.* (1982).

ACKERMAN *et al.* (1975) ont montré la teneur élevée en vitamines d'une espèce de terfez du désert de Kalahari : *Terfezia pfeilli*.

ABDELLAH *et al.* (1979) ont étudié la composition minérale de deux espèces saoudiennes de terfez non identifiées. Ils ont mis en évidence leur richesse en protéines, sucres, acide ascorbique et riboflavine.

La composition chimique de trois autres espèces d'Arabie Saoudite (*Tirmania nivea*, *T. pinoyi*, *Terfezia boudieri*) a été étudiée par BOKHARY *et al.* (1987) . Ces espèces sont riches en glucides, en protéines et en éléments minéraux (Tableau 2). Leur composition en acides gras a été donnée par BOKHARY *et al.* (1989).

EWAZE et AL-NAAMA (1989) ont montré la teneur élevée en urée des genres *Tirmania* et *Terfezia*.

Il ressort de toutes ces études que ces champignons sont très riches en carbohydrates, en protéines, en acides aminés. Ils constituent une source alimentaire non négligeable.

Tableau 2 : Teneur en protéines et en éléments minéraux de trois espèces de Terpez (mg / g de matière sèche)
(d'après BOKHARY *et al.* 1987).

	Protéines	Eléments minéraux								
		Mn	Cu	Na	Ca	K	Fe	Mg	P	Co
<i>T. nivea</i>	3,28± 0,64	0,33±0,03	0,19±0,05	0,68±0,00	0,83±0,11	12,7±1,91	1,30± 0,35	1,90±0,40	2,74±0,23	1,71±0,26
<i>T. pinoyi</i>	6,18± 0,63	0,44 ±0,03	0,05 ±0,02	0,55 ±0,22	1,07±0,13	11,89±0,83	2,16±0,05	1,47±0,10	2,70 ±0,07	0,57±0,16
<i>T. boudieri</i>	4,57± 0,56	0,39 ± 0,07	0,09 ±0,01	0,60 ±0,11	1,41±0,13	9,63 ± 0,04	2,44±0,28	1,61±0,01	2,85±0,55	0,76±0,08

1.5. Caractéristiques de la germination des ascospores et du mycélium en culture :

AWAMEH et ALSHEIKH (1979 a et b) sont les premiers à étudier les caractéristiques de la germination des ascospores de quatre espèces de terfez du Koweït (*Terfezia claveryi*, *Terfezia boudieri*, *Tirmania pinoyi*, *Tirmania nivea*).

En Algérie FORTAS (1990) et FORTAS et CHEVALIER (1992 b) ont étudié les caractéristiques de la germination des ascospores de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe, *T. claveryi* Chatin et *T. pinoyi* (Maire) Malençon. Ils ont remarqué que ces ascospores sont caractérisées par un taux de germination faible et une phase de latence qui dépend du milieu de culture.

BOUSSIR (1992) a étudié au microscope électronique à balayage la morphologie des ascospores de trois espèces de terfez : *T. nivea*, *T. pinoyi* et *T. claveryi*. Il a montré que la germination peut être réalisée *in vitro* mais qu'elle était caractérisée par une dormance des ascospores d'origine inconnue. BESSAIH (1994) est arrivé à la même conclusion en étudiant la germination de 3 espèces de terfez : *T. pinoyi*, *T. nivea* et *Terfezia arenaria*.

La possibilité de cultiver le mycélium de *Terfezia arenaria*, *Terfezia claveryi* et *Tirmania pinoyi* sur des milieux gélosés ou liquides a permis de réaliser les premières études ultrastructurales des hyphes en culture et d'identifier leurs caractères cytologiques particuliers (FORTAS, 1990).

L'étude des exigences nutritives du mycélium de cinq espèces de terfez ; quatre espèces du Koweït (*Terfezia boudieri* Tul., *T. claveryi* Chatin, *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon, *Tirmania nivea* (Desf. ex Fr)Trappe) et une espèce française (*Terfezia leptoderma* Tul) réalisée par RAVOLANIRINA (1986) lui a permis de sélectionner un milieu favorable à la croissance mycélienne de ces espèces et de déterminer les conditions physico-chimiques optimales : (température = 25°C, pH = 6,5), les meilleurs sources carbonées (glucose et surtout saccharose) et les éléments minéraux indispensables (phosphore, calcium, magnésium, cuivre et fer).

1.6- Associations mycorhiziennes à terfez:

AWAMEH *et al.* (1979) ont réussi les premières synthèses mycorhiziennes entre 4 espèces de terfez Koweïtiennes et 2 plantes hôtes (*Helianthemum salicifolium*, *Helianthemum ledifolium*) . Ces associations s'avèrent être des endomycorhizes.

CHEVALIER *et al.* (1984) ont réalisé la synthèse mycorhizienne en conditions gnotoxéniques entre *T. leptoderma* et diverses Cistacées (Cistes et Hélianthèmes). Ils ont obtenu des ectomycorhizes avec un réseau de Hartig mais sans manteau. Ils en ont déduit que la morphologie des mycorhizes à terfez variait selon l'espèce du champignon impliqué.

FORTAS et CHEVALIER (1988 ; 1992 a) et FORTAS (1990) ont étudié l'effet des conditions de culture en conditions gnotoxéniques et axéniques sur la

mycorhization d'*Helianthemum guttatum* par 3 espèces de terfez algériennes des genres *Tirmania* et *Terfezia*. Ils ont montré que l'hélianthème est apte à former deux types de mycorhizes selon la nature du substrat : une ectomycorhize, sans manteau ou une ectendomycorhize également sans manteau. Ils en ont déduit que le caractère ecto ou ectendomycorhizien peut être déterminé par les conditions de culture en particulier par l'alimentation minérale : La carence en phosphore induisant la formation d'ectendomycorhizes.

DEXHEIMER *et al.* (1985), LEDUC *et al.* (1986) ont effectué les premières études ultrastructurales des associations symbiotiques mycorhiziennes entre *Terfezia claveryi* et *Helianthemum salicifolium* d'une part ; *Terfezia leptoderma*, *Helianthemum salicifolium*, *Cistus albidus* et *Cistus salviaefolius* d'autre part . Ils ont remarqué que *T. claveryi* forme des endomycorhizes, alors que *T. leptoderma* forme une ectomycorhize sans manteau.

FORTAS (1990) a également étudié l'ultrastructure des mycorhizes entre *H. guttatum* et 3 espèces de terfez, et a suivi les différentes phases de la mycorhization, depuis l'infection jusqu'à la destruction de l'association : Le premier stade fait intervenir des phénomènes de reconnaissance entre les 2 partenaires qui sont fondamentaux pour la mise en place de la mycorhization. Il semble qu'il y ait accrochage du champignon sur la racine par des fibrilles de nature polysaccharidique et protéique qui sont observées entre les hyphes et la surface des racines. La seconde étape correspond à la formation de la mycorhize proprement dite, sa morphologie varie selon la nature du substrat. La troisième étape correspond au début de la destruction de l'association ; l'interaction entre les deux partenaires se termine rapidement et le champignon, encore vivant, n'occupe plus que les cellules hôtes désorganisées. L'étape finale se traduit par la dégénérescence des cellules hôtes, puis par la lyse du champignon.

2. LES MYCORHIZES :

Dans la nature, quelques espèces végétales seulement vivent sans associations mycorhiziennes. Hormis quelques exceptions comme la betterave et le colza, toutes les autres espèces sauvages ou cultivées sont associées par leurs racines à une, ou à plusieurs espèces fongiques. Dans les conditions naturelles, l'état de mycorhization est la règle, celui de non mycorhization, l'exception (MALENÇON, 1973). Les champignons filamenteux impliqués appartiennent aux Basidiomycètes (bolets, lactaires, russules...) aux Ascomycètes (truffes, terfez, pezizes...) ou aux Zygomycètes (*Glomus*, *Gigaspora*...).

2.1. Cytologie des mycorhizes :

On distingue trois types de mycorhizes selon leurs caractères morphologiques et physiologiques (READ, 1974) : les ectomycorhizes, les endomycorhizes et les ectendomycorhize, (Tableau 3, Fig.2).

Tableau 3 : Les différents types de mycorhizes (ENSAA- INRA- INRAP, 1985).

Mycorhizes	=	Plantes	+	Champignons
Ectomycorhizes		Espèces ligneuses exclusivement, surtout des forêts de zones tempérées et boréales : Pinacées (pins, sapins, épicéas, cèdres, mélèzes...) Fagacées (hêtres, chênes, châtaigniers...) Étulangées (bouleaux, charmes...) Salicacées (saules, peupliers...) Myrtacées (eucalyptus).		Basidiomycètes : <i>Boletus</i> (Bolet) <i>Laccaria</i> (Laccaire) <i>Amanita</i> (Amanite) <i>Lactarius</i> (Lactaire) <i>Russula</i> (Russule) Ascomycètes : <i>Tuber</i> (Truffe) <i>Elaphomyces</i> (truffe de cerf) Zygomycètes : <i>Endogone</i> .
Endomycorhizes -orchidoides -éricoides -à vésicules et arbuscules (V.A)		Orchidacées (goodyera, vanille, ophrys) Ericacées (callune, myrtille, rhododendron, azalée) Empétracées Epacridacées Ptéridophytes Gymnospermes Angiospermes		Basidiomycètes : <i>Ceratobasidium</i> <i>Armillaria</i> (Armillaire) <i>Thanatephorus</i> <i>Tulasnella</i> Ascomycètes : <i>Pezizella ericae</i> (Pezizelle des Ericacées) Zygomycètes <i>Glomus</i> <i>Gigaspora</i> <i>Acaulospora</i> <i>Sclerocystis</i> .
Ectendomycorhizes -arbutoides -monotropoides		Arbutacées (arbousier) Pyrolacées (pyrole) Monotropacées (monotrape)		Basidiomycètes (la plupart des genres suivants formant aussi des ectomycorhizes) <i>Boletus</i> (Bolet) <i>Laccaria</i> (Laccaire) <i>Cortinarius</i> (Cortinaire)...

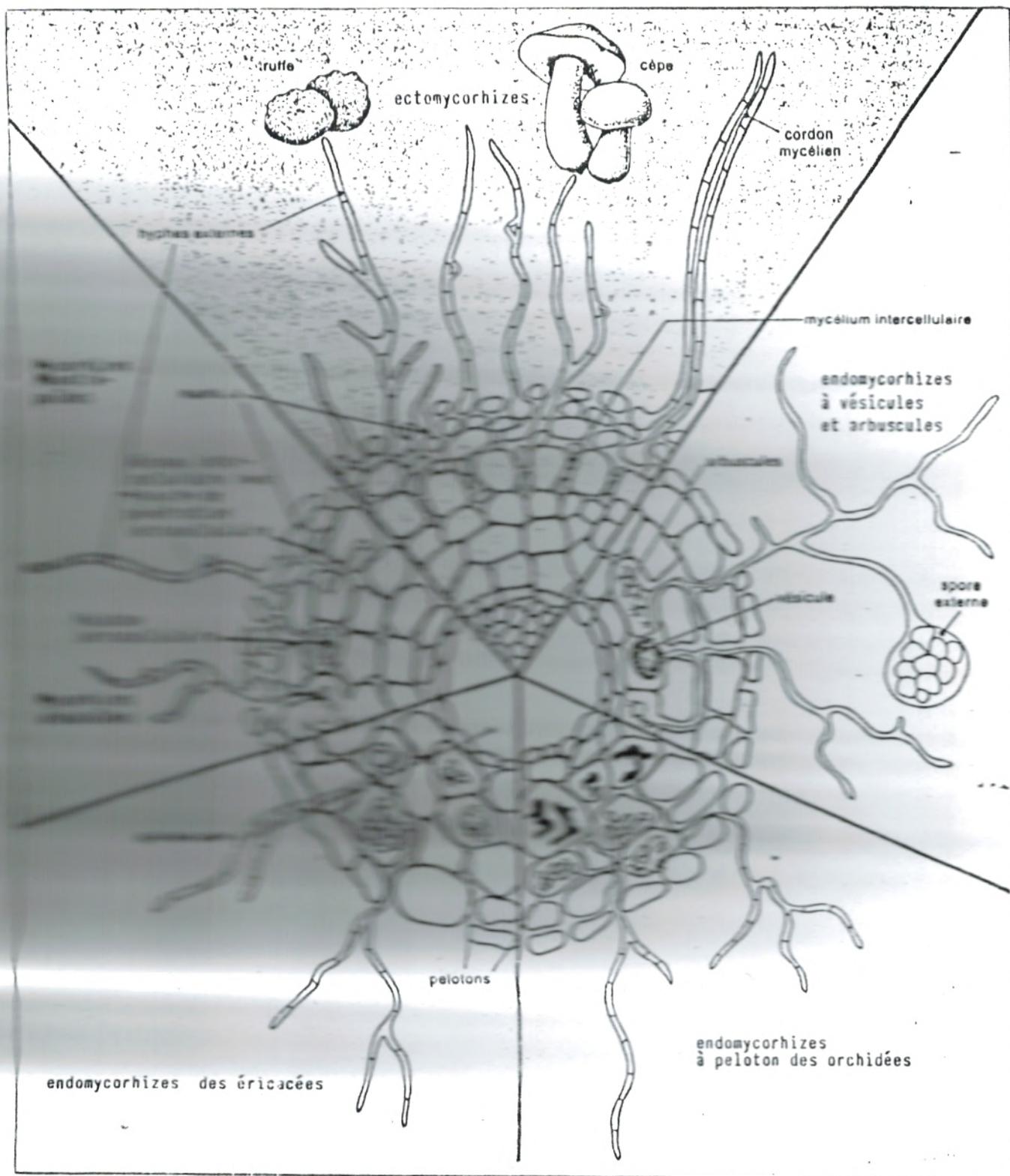


Fig . 2 : Principales formes de mycorhizes , associées aux racines des plantes supérieures (ENSA - INRA - INRAP , 1985) .

2.1.1. Les ectomycorhizes :

La cytologie de ces mycorhizes a été étudiée par plusieurs auteurs MARKS et FOSTER (1973), STRULLU et GOURRET (1974), STRULLU (1976), LEI et DEXHEIMER (1986), LETACON et BOUCHARD (1990). Ces mycorhizes représentent 3 à 5% des espèces végétales et se rencontrent presque exclusivement chez les essences forestières croissant en régions tempérées.

Dans cette association, le champignon qui est soit un Basidiomycète (*Amanita*, *Boletus*) ou un Ascomycète (*Tuber*) reste à l'extérieur des cellules, il développe un manchon mycélien ou manteau fongique autour des racines à l'exception de *Terfezia*. L'épaisseur de ce manchon peut atteindre 40 μ m (BOUGHDAOUI, 1984). Vers l'intérieur, quelques hyphes pénètrent dans la zone corticale externe par les espaces intercellulaires, formant le réseau de Hartig. Vers l'extérieur, les hyphes partent du manteau et se propagent dans le sol. Ces cordons mycéliens assurent les échanges entre la plante et le champignon (BOUGHDAOUI, 1984).

2.1.2. Les endomycorhizes :

On distingue trois types d'endomycorhizes (SCANNERINI et BONFANTE - FASOLO, 1982; STRULLU, 1985; BONFANTE-FASOLO *et al.* 1986; TRAPPE, 1988) :

Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules
Les endomycorhizes des Orchidées
Les endomycorhizes des Ericacées.

*Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA) :

Plusieurs auteurs se sont intéressés à ces types d'association. On peut citer STRULLU (1978); SCANNERINI et BONFANTE -FASOLO (1982).

Dans ce cas, le champignon pénètre entre les cellules du parenchyme cortical et développe à l'intérieur même des cellules de nombreuses invaginations. On distingue quatre types d'organisation :

-des pelotons intracellulaires parfois présents dans les cellules corticales les plus externes.

-des hyphes intercellulaires : des arbuscules (hyphes intracellulaires très ramifiés).

-des vésicules intra ou intercellulaires (SCANNERINI et BONFANTE - FASOLO, 1982)

*Les endomycorhizes des Orchidées :

La cytologie des mycorhizes des Orchidées a été bien étudiée surtout par HADLEY (1975); STRULLU et GOURRET (1980); SERRIGNY et DEXHEIMER (1986). Elles sont constituées par des Basidiomycètes. L'infection est seulement intracellulaire et elle est limitée aux cellules épidermiques et corticales de l'hôte où les hyphes de diamètre homogène forment des pelotons.

*Les endomycorhizes des Ericacées :

Les mycorhizes éricoïdes sont maintenant bien connues grâce à la contribution de plusieurs auteurs (READ, 1974; SCANNERINI et BONFANTE - FASOLO, 1982; STRULLU, 1985).

Elles sont formées par des Ascomycètes de la famille des Pezizacées. Les mycéliums extraradiculaires forment un réseau d'hyphes vivant dans le sol et dans le « mucigel » de la racine, mais le mycélium intraradiculaire est la partie la plus importante du symbiote fongique. Il est en grande partie intracellulaire.

L'interaction se déroule très vite dans chaque cellule. Le champignon survit à son hôte et colonise en saprophyte les cellules mortes de l'hôte.

2.1.3. Les ectendomycorhizes :

Ces mycorhizes ont fait l'objet de plusieurs études, parmi lesquelles on peut rappeler celles de HARLEY (1969); ZAK (1974); SCANNERINI *et al.*(1975) et STRULLU (1991).

On les rencontre chez les Arbutacées et certains jeunes plants forestiers résineux en pépinières. Les champignons impliqués sont des Basidiomycètes appartenant aux genres *Amanita*, *Boletus*, *Laccaria*.

Comme leur nom l'indique, ces champignons développent aussi bien un manchon fongique et un réseau de Hartig à l'extérieur des racines que des formations endocellulaires. On distingue les mycorhizes monotropoïdes et les mycorhizes arbutoïdes. Chez les mycorhizes monotropoïdes, les hyphes pénétrants sont courts, chez les mycorhizes arbutoïdes les pénétrations intracellulaires sont en pelotons ou ramifiées.

2.2. Mycorhizes et protection des plantes :

De nombreux auteurs (HARLEY, 1969; DEHNE, 1982; GIANINAZZI - PEARSON et GIANINAZZI, 1986 ; MARX et CORDELL, 1989) se sont intéressés à la nutrition des plantes mycorhizées. Il ressort de tous leurs travaux que la croissance des plantes hôtes est meilleure que celles des plantes non mycorhizées, ceci en raison des bons échanges nutritifs qui s'établissent entre les deux symbiotes, en particulier les éléments minéraux tels que le phosphore et l'azote. Le réseau absorbant des filaments mycéliens permet à la plante de récupérer une quantité importante de phosphate assimilable.

Ces associations favorisent également l'absorption de certains ions métalliques. Ceci est particulièrement important pour les arbres fruitiers sensibles aux carences en cuivre et en zinc.

D'un autre côté, la mycorhization constitue pour la plante un moyen écologique d'adaptation à des conditions difficiles ; à savoir, une période de sécheresse, stress hydrique ou pollution aux métaux lourds, c'est précisément dans ces moments là que les mycorhizes expriment au mieux leur capacité (SCHEROMM, 1994).

Outre ces rôles bénéfiques aujourd'hui bien connus, de nombreux chercheurs (MARX, 1968, 1969, 1972; SCHENCK, 1981; STRULLU, 1991; SHAW *et al.* 1995) pensent que la plante mycorhizée présente une meilleure protection contre les agents pathogènes. Toutefois ce phénomène de protection dépend de plusieurs facteurs à savoir le génotype de la plante hôte (ROSS, 1972) ainsi que celui du champignon mycorhizien. Il s'exprime différemment selon les agents pathogènes mis en cause.

2.2.1. Effet des mycorhizes sur les agents pathogènes :

*Sur les virus :

Dans tous les cas étudiés, on constate un accroissement de la maladie chez la plante mycorhizée (STRULLU, 1991). Il s'agit probablement là d'une interaction d'un type particulier liée à l'activité métabolique intense, en particulier pour le phosphore. Dans les cellules contenant des arbuscules, la microscopie électronique révèle l'accumulation de particules virales dans ces cellules (BONDOUX et PERRIN, 1982)

*Sur les nématodes :

Le plus souvent la pénétration des nématodes du sol dans les racines mycorhizées est diminuée, leur développement à l'intérieur des tissus est retardé ou bien les dégâts causés à la plante sont atténués (DEHNE, 1982; BONDOUX et PERRIN, 1982)

*Sur les bactéries :

Il y'a très peu de travaux sur les interactions mycorhizes-bactéries. Pourtant la plupart des études concluent à une réduction des dommages causés par *Pseudomonas solanacearum*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Erwinia carotovora* sous l'effet de la mycorhization (STRULLU, 1991).

*Sur les champignons :

Le plus grand nombre d'observations a été effectué sur les champignons . De nombreuses études montrent que les endomycorhizes permettent une réduction de la gravité des pourritures racinaires produites par *Phytophthora sp.* (SCHONBECK, 1979; DEHNE, 1982).

D'un autre côté , les travaux de MARX (1969) démontrent que l'effet protecteur est une aptitude fréquente chez les endomycorhizes. Les racines de *Pinus taeda* mycorhizées par *Laccaria laccata*, *Leucopaxillus cerealis var piceana*, *Suillus leuteus*, échappent totalement à l'infection par *Phytophthora cinnamomi* (Tableau 4).

2.2.2. Les conditions de l'expression du phénomène de protection contre les agents pathogènes :

*Influence de la nature de l'hôte:

Selon ROSS (1972) l'influence de la mycorhization dépend du génotype de la plante hôte .

PERRIN et GIANINAZZI - PEARSON (1984) ont montré que l'ampleur de la réduction du potentiel infectieux d'un substrat infesté par *Pythium sp*, sous l'influence de la mycorhization par diverses espèces de *Glomus*, dépend du clone du merisier.

*Influence de la nature du champignon mycorhizien.

L'aptitude prophylactique de la mycorhize varie également avec le génome du partenaire fongique. Différentes études aboutissent à des résultats contradictoires concernant la même espèce mycorhizienne. Tel est le cas de l'antagonisme manifesté *in vitro* par différentes souches d'un même champignon symbiotique (STRULLU, 1991)

Les observations de MARX (1969) montrent que ni *Laccaria laccata*, ni *Pisolithus tinctorius* ne sont capables d'inhiber la croissance de *F.oxysporum*, alors que SYLVIA et SINCLAIR (1983) établissent clairement l'action inhibitrice de *L. laccata* à l'égard de *F. oxysporum*.

Tableau 4 : Influence de différentes espèces mycorhiziennes sur quelques agents pathogènes *in vitro* (d'après MARX, 1969)

Agents pathogènes	<i>Laccaria laccata</i>	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Leucopaxillus cerealis</i> <i>var piceana</i>	<i>Pisolithus tinctorius</i>	<i>Suillus luteus</i>
<i>Fomes annosus</i>	O	O	M	O	O
<i>Fusarium oxysporum</i>	O	O	O	O	M
<i>Phytophthora cinnamoni</i>	O	F	T.F	O	F
<i>Pythium aphanidermatum</i>	F	O	M	O	F
<i>Pythium ultimum</i>	O	O	F	O	M
<i>Rhizoctonia solani</i>	O	O	O	O	O

O = Pas d'inhibition

f = Inhibition faible

M = Inhibition modérée

F = Inhibition forte

T.F = Inhibition très forte

2.2.3. Mécanismes contribuant à la protection :

Les interactions mycorhizes - pathogènes peuvent varier selon le type de mycorhize : Chez les ectomycorhizes, ZAK (1969) et MARX (1969) ont proposé différents mécanismes de résistance des plantes ectomycorhizées aux agents pathogènes. Il peut s'agir soit d'une protection par le manteau fongique, soit par des inhibiteurs chimiques produits par la plante, ou tout simplement par production d'antibiotique.

* Production d'antibiotique ou antibiose:

Le phénomène qui nous intéresse de plus près est celui de l'antibiose, en effet, de nombreux auteurs ont mis en évidence la production d'antibiotique par les champignons ectomycorhiziens, soit à partir d'une culture pure (TRAPPE, 1962; SASEK et MUSILEK, 1968 ; MARX, 1969, 1972, 1973; DUCHESNE *et al.* 1988; KOPE et FORTIN 1989) ou bien à partir du carpophore (WILKINS et HARRIS, 1944 ; ROUGIEUX, 1963) ou encore à partir de l'association mycorhizienne (KRYWOLAP *et al.* 1964 ; MARX, 1969).

Depuis l'identification et la caractérisation de la mycorhizine A et la chloromycorhizine A à partir de *Monotropa hypopitys* par TROFAST et WICKBERG (1977) (in STRULLU, 1991) la capacité d'un champignon mycorhizien à produire des antibiotiques a été définitivement démontrée.

Selon certains auteurs (SYLVIA et SINCLAIR , 1983 ; DUCHESNE *et al.* 1987) la confrontation directe sur boîte de champignons mycorhiziens à diverses espèces pathogènes, ne rend pas compte de ce qui se passe réellement dans la nature, en effet, la production d'antibiotique peut dépendre des conditions expérimentales ou nécessiter une stimulation par des substances produites par la plante.

On doit à MARX (1969) la seule démonstration probante du rôle de l'antibiose *in situ* dans la protection assurée par *Leucopaxillus cerealis var piceana* à l'encontre de *Phytophthora cinnamomi* chez certains pins; L'antibiotique a été identifié, il s'agit du diatrétine nitrile . Sa présence est signalée non seulement au niveau de la mycorhize formée avec *Pinus echinata* mais également dans la mycorhizosphère correspondante.

Bien que la production d'antibiotique ait été démontrée pour de très nombreux champignons mycorhiziens, l'antibiose à elle seule ne peut justifier l'aptitude prophylactique de toutes les associations mycorhiziennes (STROBEL et SINCLAIR, 1992).

*Inhibiteurs chimiques produits par la plante :

La plupart des plantes élaborent différentes substances inhibitrices en réponse aux attaques des agents pathogènes. On peut citer les phénols, quinones,

phytoalexines. Différentes études ont montré une élévation de l'accumulation de ces composés dans les racines mycorhizées (STRULLU, 1991).

*Le manteau fongique : une barrière mécanique :

Les travaux de MARX (1969) et MARX et DAVEY (1969) montrent que les mycorhizes de *Pinus taeda* et de *Pinus echinata* formant un manteau complet assurent une protection infranchissable pour *Phytophthora cinnamomi* par rapport à celles qui ne forment qu'un manteau incomplet et un réseau de Hartig interrompu.

*L'hyperparasitisme :

Ce phénomène a été mentionné par des chercheurs chinois (ZHAO ZHIPENG *et al.* 1989). Ils ont observé une lyse du mycélium de *Rhizoctonia solani* par plusieurs souches ectomycorhiziennes appartenant aux genres *Laccaria*, *Lactarius*, *Boletus* et *Russula*.

En conclusion, l'aptitude prophylactique des champignons ectomycorhiziens est incontestable et elle a été démontrée à plusieurs reprises. Pour les endomycorhizes, il n'a jamais été mentionné de phénomène d'antibiose (STRULLU, 1991; STROBEL et SINCLAIR, 1992). La résistance des plantes endomycorhizées aux agents pathogènes semble être due le plus souvent à l'amélioration de la nutrition phosphatée (ROSS, 1972).

Quel que soit le mécanisme utilisé, l'association mycorhizienne constitue sans aucun doute un moyen de lutte biologique contre les agents phytopathogènes et il conviendrait de maintenir les connaissances dans ce domaine, en vue d'une amélioration de la production végétale.

DEUXIEME PARTIE
MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL :

1.1. Espèces fongiques :

1.1.1. Espèces du genre *Tirmania* :

Les corps fructifères des deux espèces de terfez ; *Tirmania nivea* (Desf ex Fr) Trappe et *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon ont été récoltés en mars 1992 dans les zones arides et semi-arides de l'Ouest algérien (Bechar, El aricha) (Fig. 1). Leur détermination a eu lieu au Laboratoire de Microbiologie et Phytopathologie de l'Université d'Oran Es-Senia.

Ils ont été desséchés au soleil pendant deux mois et conservés à température ambiante.

Les mycéliums des deux espèces étudiées sont isolés à partir d'ascospores prélevées d'ascocarpes desséchés.

1.1.2. Espèces fongiques à tester

Les six espèces phytopathogènes proviennent du laboratoire de Phytopathologie de l' I.N.R.A de Clermont-Ferrand (France), (Tableau 1) ; il s'agit de :

Phytophthora souche 2143
Armillaria mellea
Phoma souche P1
Phomopsis souche PH 1
Sclerotinia sclerotiorum souche S S1
Claviceps souche CPT 2

Les deux espèces levuriformes proviennent de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ce sont :

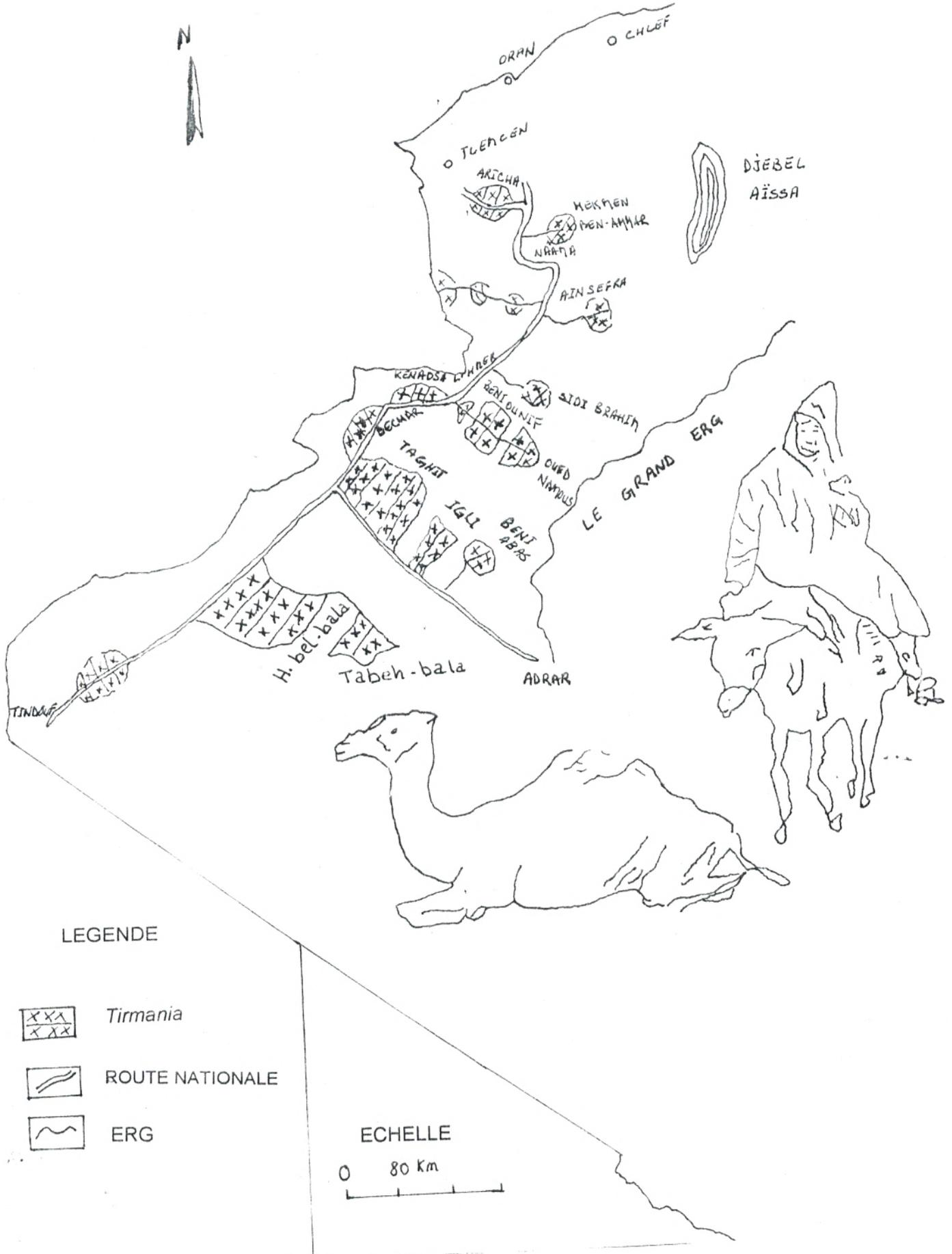
Candida albicans
Rhodotorula mucilaginosa.

1.2. Espèces bactériennes

Huit espèces bactériennes sont testées (Tableau 2). Elles proviennent du Laboratoire de Microbiologie de l'Université d'Oran Es-Senia. Il s'agit de:

Escherichia coli
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas fluorescens
Proteus mirabilis
Streptococcus hemolyticus
Staphylococcus aureus
Salmonella typhi
Klebsiella sp

Fig. 1 : Repartition géographique du genre *Tirmania* dans la région Sud - Ouest de l'Algérie (d'après BESSAÏH ,1994).



LEGENDE



Tirmania

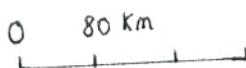


ROUTE NATIONALE



ERG

ECHELLE



1.3. Milieux de culture :

*Milieux de culture des espèces fongiques :

- Milieu de malt à 1 % liquide :

Extrait de malt..... 10 g
Eau distillée..... 1000 ml

- Agar à l'extrait de malt :

Milieu de malt liquide..... 1000 ml
Agar - agar..... 20 g
Le pH est ajusté à 6,0 avec NaOH 0,4N.

Ce milieu est couramment utilisé à la station de Mycologie de l'I.N.R.A de Clermont - Ferrand pour la culture des truffes (CHEVALIER, 1972) et celles des terfez (RAVOLANIRINA, 1986 ; FORTAS, 1990 ; FORTAS et CHEVALIER, 1992 b).

-Milieux de Sabouraud

Ce milieu est utilisé pour la culture des champignons levuriformes.
Bouillon glucosé à 2% de Sabouraud :

Peptone.....10,0 g
Glucose..... 20,0 g
Eau distillée.....1000 ml

Agar glucosé à 2% de Sabouraud :

Bouillon glucosé de Sabouraud 1000 ml
Agar - agar.....17,0 g
Le pH est ajusté à 5,6

*Milieux de culture des espèces bactériennes :

- Bouillon nutritif :

Peptone.....5 g
Extrait de viande.....1 g
Extrait de levure.....2 g
NaCl.....5 g
Eau distillée..... 1000 ml

-Gélose nutritive :

Bouillon nutritif..... 1000 ml
Agar - agar.....15 g

Le pH est ajusté à 7,3

-Agar de Mueller-Hinton

Le milieu liquide est proposé par MUELLER et HINTON (1941) pour tester la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques et les sulfamides.

Nous avons utilisé l'agar de Mueller - Hinton pour les tests de diffusion. Ce milieu est commercialisé sous forme déshydratée. Sa composition est la suivante :

Infusât de viande.....	5 g
Hydrolysât de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar - agar	12,5 g

Il est préparé en mélangeant 36,5 g de milieu et 1000 ml d'eau distillée. Le pH est de 7,4 +/- 0,2.

Tous les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 30 mm.

2. METHODES :

2.1. Conservation des cultures :

*Cultures fongiques :

Les cultures des deux espèces de terpez et celles des champignons phytopathogènes sont conservées dans des tubes ou dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre contenant du milieu malt à 1% gélosé . Les boites sont fermées par un ruban adhésif afin de réduire l'évaporation et maintenir la stérilité du milieu.

La conservation des champignons levuriformes a lieu dans des tubes de milieu Sabouraud gélosé et incliné.

*Cultures bactériennes :

Les espèces bactériennes sont conservées dans des tubes contenant de la gélose nutritive incliné. Elles sont repiquées régulièrement tous les deux mois.

2.2. Isolement des mycéliums des deux espèces de *Tirmania* :

L'isolement est réalisé selon la technique de FORTAS (1990) et FORTAS et CHEVALIER (1992 b). Cette technique consiste à prélever des fragments de gléba à partir d'exsiccatas d'ascocarpes desséchés et préalablement désinfectés à l'alcool . Ces fragments sont ensuite hydratés dans des tubes

contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Ils sont agités à l'aide d'un vortex pour obtenir une suspension d'ascospores homogène. Après 24 heures, une goutte de cette suspension contenant de nombreuses ascospores est étalée dans une boîte de Pétri contenant du malt à 1 % .

Les boîtes sont ensuite soigneusement fermées à l'aide d'un ruban adhésif pour maintenir la stérilité du milieu, puis placées dans une étuve à 25°C.

Les boîtes sont observées quotidiennement au microscope photonique afin de suivre les étapes de la germination.

2.3. Préparation des précultures mycéliennes en milieu solide :

Pour obtenir des cultures homogènes dont les caractéristiques de croissance sont reproductibles d'une série à une autre, nous avons utilisé la méthode des implants circulaires.

Des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant 20 ml de milieu malt à 1 % , sont ensemencées par des implants circulaires de 8 mm de diamètre prélevés aseptiquement à l'emporte-pièce à la périphérie des thalles des cultures de champignons phytopathogènes ou de terpez, conservées en boîte de Pétri sur le milieu malt.

Les boîtes scellées à l'aide de ruban adhésif, sont incubées à 25 °C. Dans tous les tests, les précultures sont âgées de :

- 5 jours pour *Sclerotinia sclerotiorum*.
- 6 jours pour *Phomopsis*, *Phoma* , *Phytophthora*.
- 10 jours pour *Claviceps*.
- 12 jours pour *Armillaria mellea*.
- 21 jours pour *T.nivea* et *T. pinoyi*.

2.4. Culture mycélienne de terpez en milieu liquide :

Des fioles de 500 ml , contenant chacune 250 ml de milieu malt liquide sont ensemencées avec un implant (carré de 1 cm de côté) prélevé d'une préculture de terpez âgée de 3 semaines .

Le temps de culture est de 1 à 2 mois avec une oxygénation de 75 RPM , à la température du laboratoire .

2.4.1. Obtention des filtrats de culture des deux espèces de *Tirmania*.

Le filtrat n°1 est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette directement à partir de la fiole de culture.

Le filtrat n°2 est obtenu en séparant le mycélium âgé de 4 semaines du milieu de culture par filtration sous vide à l'aide d'un entonnoir en verre fritté (Fig . 2) .

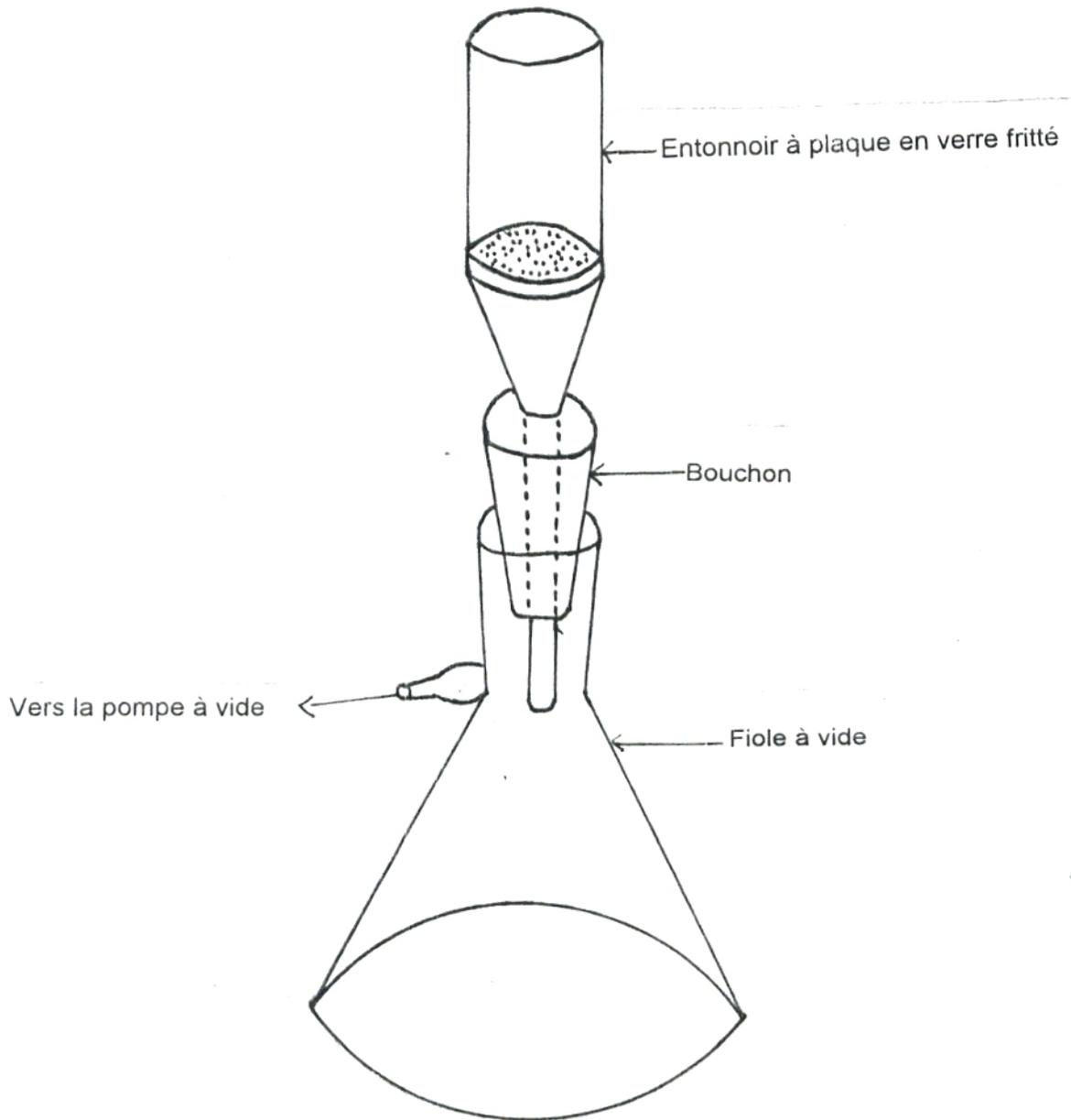


Fig.2 : Schéma de l'appareil de filtration sous vide des cultures en milieu liquide.

2.5. Méthodes d'extraction des substances antibactériennes et antifongiques.

2.5.1. Extraits de gléba des deux espèces de *Tirmania* :

2.5.1.1. Extraction par contact gléba - solvants, selon la méthode de ROUGIEUX (1963) :

Les extraits de gléba de *T. nivea* ou de *T. pinoyi* sont obtenus par contact, pendant 6 et 24 heures et agitation de 1 g de gléba, prélevée aseptiquement à partir d'ascocarpes desséchés et de 10 ml de solvant.

Les solvants utilisés sont : l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, l'acétate d'amyle et le chloroforme.

2.5.1.2. Extraction par le soxhlet :

Les extraits de gléba sont obtenus à l'aide du soxhlet et l'acétate d'éthyle.

Les vapeurs du solvant entrent en contact avec le matériel fongique qui subit plusieurs lavages successifs. Les substances solubles dans l'acétate d'éthyle seront entraînées.

*Description du soxhlet (Fig.3) :

- Le soxhlet est constitué d'un ballon dans lequel est mis le solvant,
- d'une partie intermédiaire constituée par un large tube renfermant une cartouche faite de papier filtre dans laquelle est introduit le produit broyé.
- d'un petit tube latéral (1) partant d'un point situé au dessous de la cartouche et aboutissant au dessous du rodage supérieur du large tube central. Un autre petit tube latéral (2) servant de siphon, part d'un point situé juste au dessus de la cartouche et aboutit au dessus du rodage inférieur.
- d'un réfrigérant vertical muni à la partie inférieure d'un rodage qui s'emboîte dans le rodage supérieur de la partie intermédiaire.

*Obtention des extraits de gléba :

30 g de gléba prélevés à partir d'ascocarpes desséchés et réduits en poudre à l'aide d'un broyeur de type SDFH 48, sont placés dans la cartouche qui est ensuite introduite dans le tube intermédiaire. 500 ml d'acétate d'éthyle sont versés dans le ballon dans lequel sont ajoutées quelques graines de pierre ponce afin d'éviter une surébullition.

Le dispositif est chauffé à environ 70°C.

Les vapeurs du solvant entraînées dans le tube (1) sont condensées par le réfrigérant et retombent sur la poudre de gléba. Quand la solution atteint le niveau N, le siphon (2) s'amorce et celle-ci retombe dans le ballon. Cette opération est répétée pendant 3 heures.

*Concentration des extraits de gléba :

La concentration a pour but d'éliminer le solvant d'extraction.

La solution obtenue est transvasée dans un ballon. Le solvant est chassé à l'aide du rotavapor à 40°C jusqu'à un volume final de 10 ml.

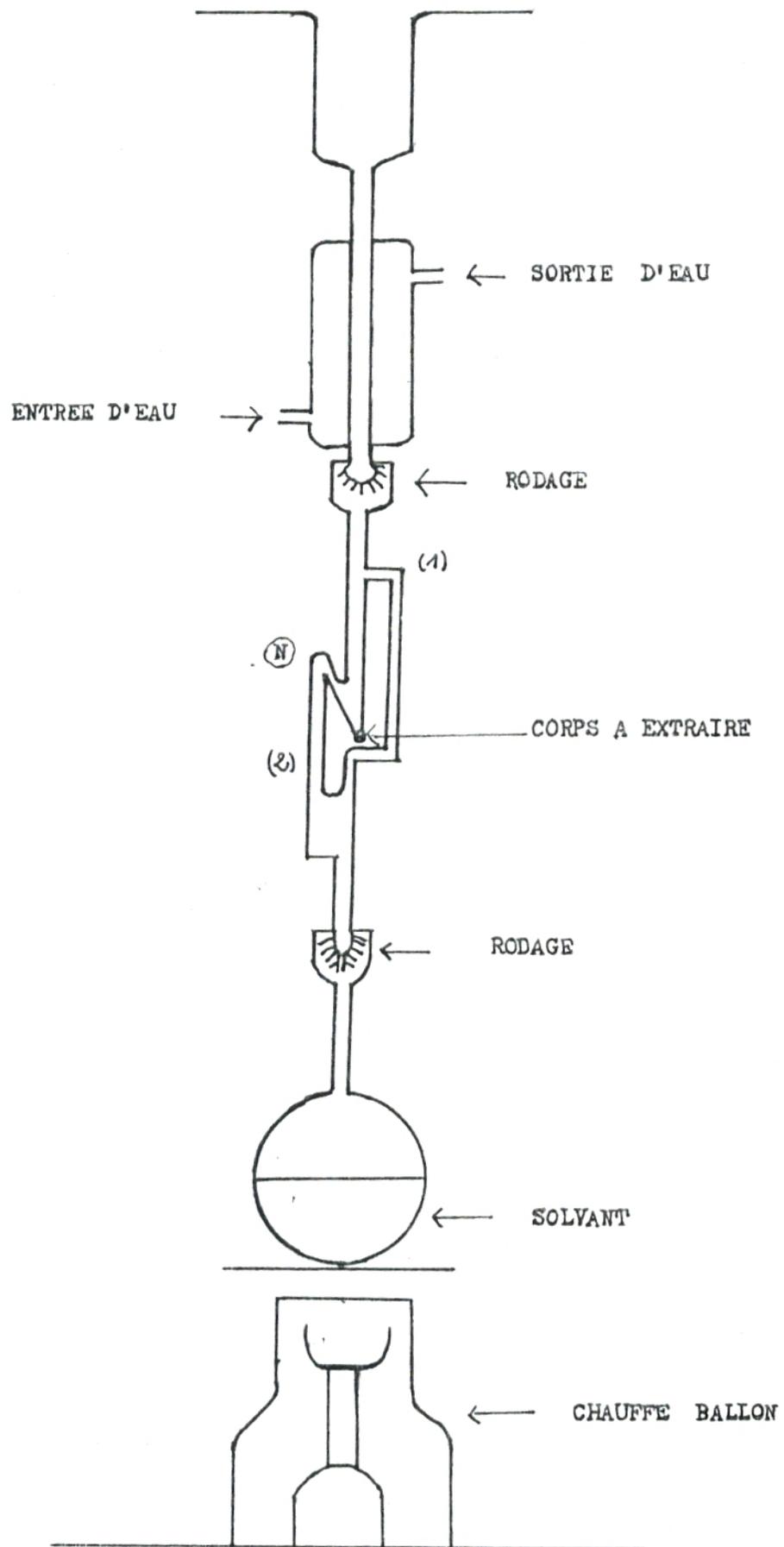


Fig 3 : Schéma du soxhlet

L'évaporation du reste du solvant se fait sous courant d'azote (débit 100 $\mu\text{l} / \text{mn}$) jusqu'à l'obtention d'un composé visqueux de couleur brunâtre qui est repris dans 10 ml de méthanol.

2.5.2.Extraits des filtrats de culture des deux espèces de *Tirmania* :

Après 4 semaines d'incubation, la culture en milieu liquide est filtrée sous vide selon la méthode décrite précédemment, le filtrat n° 2 est récupéré. L'extraction a pour but de faire passer les substances inhibitrices de la phase aqueuse à la phase organique.

Le solvant d'extraction est l'acétate d'éthyle . Il faut éviter d'utiliser des solvants très polaires car ils sont moins sélectifs (LARPENT et SANGLIER , 1989) .

L'extraction consiste à introduire un litre du filtrat de culture et 150 ml d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter (BOCKOWSKA et ESCOULA , 1977 ; KUPKA *et al.* 1979 ; HEIM et ANKE , 1988 ; STEIMAN *et al.* 1989 ; MASSIAS *et al.* 1989 ; LAUER et ANKE, 1989). Le mélange est agité vigoureusement, en prenant soin d'ouvrir le robinet de l'ampoule afin de laisser échapper les gaz qui se sont formés. Le mélange est ensuite laissé décanter jusqu'à l'apparition de deux phases : une phase aqueuse surmontée d'une phases organique . Cette dernière est récupérée tandis que la phase aqueuse est remise dans l'ampoule pour une 2^{ème} extraction avec 150 ml d'acétate d'éthyle.

Cette opération est répétée de nouveau une autre fois.

*Concentration de l'extrait des filtrats de culture.

La phase organique est récupérée dans un flacon contenant du sulfate de sodium ($\text{Na}_2 \text{SO}_4$) anhydre pour éliminer toute trace d'eau.

Elle est ensuite filtrée puis concentrée à 40°C dans un rotavapor jusqu'à un volume final de 10 ml. L'évaporation du reste du solvant se fait sous courant d'azote (débit 100 $\mu\text{l} / \text{mn}$) jusqu'à obtention d'un dépôt brunâtre qui est pesé et repris dans 10 ml de méthanol.

Généralement 3 litres de filtrat de culture de *T.nivea* donnent environ 1,5 g de produit brut.

2.5.3. Extraction à partir du mycélium.

Le mycélium récupéré est mixé pendant 10 mn dans un mixer électrique avec du méthanol en excès (AL MAADHIDI, 1976). Il est filtré sous vide. Le filtrat est récupéré dans un flacon contenant du $\text{Na}_2 \text{SO}_4$. Il est ensuite filtré avec du papier filtre et concentré sous vide jusqu'à un volume final de 5 ml.

2.6. Tests d'activité des filtrats et des différents extraits :

2.6.1. Tests avec les filtrats de culture des deux espèces de *Tirmania*.

Après une semaine de mise en culture liquide, l'activité inhibitrice du filtrat n°1 a été testée tous les 3 jours pendant 60 jours.

2.6.1.1. Test antibactérien par la méthode de diffusion en milieu solide:

*Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture en boîte de Pétri, on prélève 4 à 5 colonies bien isolées. On les émulsionne dans un tube à essai contenant 20 ml de bouillon nutritif. Après 16 h d'incubation des cultures bactériennes, des dilutions sont effectuées au 1/10 pour les Streptocoques, au 1/100 pour les Staphylocoques, au 1/1000 pour le reste des bactéries (BIOMERIEUX, 1986).

*Ensemencement des milieux de culture et dépôt des disques :

1 ml de l'inoculum bactérien est déposé à l'aide d'une pipette stérile dans une boîte de Pétri, 20 ml de milieu Mueller-Hinton gélosé, maintenu en surfusion à 40 °C sont coulés dans chaque boîte.

Les boîtes sont homogénéisées par un mouvement circulaire lent.

Après solidification du milieu, 3 disques stériles, en papier Whatman de 6 mm de diamètre, sont imprégnés chacun de 0,1 ml du filtrat de *T. nivea* ou de *T. pinoyi* et déposés séparément à la surface du milieu préalablement ensemencé.

Dans les boîtes témoins, les disques sont imprégnés de milieu malt liquide stérile.

Les boîtes sont placées à 4°C pendant 30 mn afin de permettre la diffusion des substances inhibitrices (AL-MAADHIDI, 1976).

Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 et 48 h.

2.6.1.2. Tests antifongiques :

*Champignons levuriformes :

- Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture en boîte de Pétri, on prélève 4 à 5 colonies isolées. Elles sont émulsionnées dans 10 ml de bouillon de Sabouraud et mises à incuber. Après 48 h d'incubation, on effectue des dilutions au 1/100 afin d'obtenir une culture dense mais non totalement confluyente (BIOMERIEUX, 1986).

- Ensemencement et dépôt des disques :

La méthode utilisée est celle précédemment décrite pour les bactéries sauf que le milieu Mueller-Hinton est remplacé par le milieu Sabouraud.

Les boîtes sont incubées à 25°C pendant 48 h.

*Champignons phytopathogènes.

- Par la méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) :

Elle consiste à faire un puits de 8 mm de diamètre à l'aide d'un emporte-pièce, au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu malt gélosé et à déposer aseptiquement dans le puits 0,5 ml du filtrat n°1 de *T.nivea* ou de *T. pinoyi* à l'aide d'une pipette stérile.

Le puits est ensuite recouvert d'un implant circulaire de 8 mm de diamètre de l'espèce fongique à tester.

Dans les boîtes témoins, le puits est rempli de 0,5 ml de milieu malt liquide stérile.

Les boîtes sont incubées à 25°C.

- Par la méthode d'incorporation des filtrats de culture en boîte de Pétri :

Les filtrats n° 2, obtenus après 4 semaines de culture mycélienne de *T. nivea* ou de *T. pinoyi* sont stérilisés par filtration sur membrane (Swinex millipore 0,45 µm).

Ils sont ensuite incorporés v/v au milieu malt à 4% d'agar et maintenu en surfusion à 40°C (BELLAHCENE, 1990).

Après homogénéisation et refroidissement du milieu, les boîtes sont ensemencées avec un implant circulaire des espèces fongiques phytopathogènes à tester.

Dans les boîtes témoins, le filtrat est remplacé par de l'eau distillée stérile.

Les cultures sont incubées à 25 °C .

2.6.2. Tests avec les différents extraits :

2.6.2.1. Test antibactérien par la méthode de diffusion en milieu solide :

Trois disques stériles de 6 mm de diamètre en papier Whatman sont imprégnés de 50 µl de l'extrait. Ils sont séchés à proximité de la flamme du bec benzen avant d'être déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé.

Dans les boîtes témoins, les disques sont imprégnés de 50 µl du solvant d'extraction ou de méthanol.

Les boîtes sont laissées pendant 30 mn à 4°C . Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 et 48 h.

2.6.2.2. Tests antifongiques :

*Champignons levuriformes:

La méthode utilisée est celle de la diffusion en milieu solide, précédemment décrite dans les tests antibactériens.

*Champignons phytopathogènes par la méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) :

0,5 ml de l'extrait est déposé à 1 cm du centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu malt gélosé. La boîte est entrouverte à proximité de la flamme du bec benzen afin de permettre l'évaporation du solvant. Un implant circulaire du champignon à tester est déposé au centre de la boîte de Pétri.

Dans la boîte témoin, l'extrait est remplacé par le solvant d'extraction ou par le méthanol. Les boîtes sont incubées à 25 °C.

2.7. Tests d'antagonisme *in vitro* entre les *Tirmania* et les champignons phytopathogènes :

2.7.1. Méthode de confrontation des espèces fongiques en boîte de Pétri:

Un implant circulaire de terpez de 8 mm de diamètre est placé dans une boîte de Pétri contenant du milieu malt gélosé.

Après 12 jours d'incubation à 25°C, un implant de 8 mm de diamètre de l'espèce fongique phytopathogène à tester est déposé à 3 cm de l'implant de terpez. Les boîtes scellées à l'aide du ruban adhésif sont incubées à 25 °C.

Les boîtes témoins sontensemencées uniquement par un implant circulaire de l'espèce fongique à tester.

2.7.2. Méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) modifiée :

Le milieu malt gélosé coulé dans les boîtes de Pétri est recouvert à la surface par une membrane millipore (KOPE et FORTIN, 1989),(0,20 µm, 90 mm de diamètre) à la place du papier cellophane utilisé par DENNIS et WEBSTER (1971 a). Un implant circulaire de 8 mm de diamètre de *T.nivea* ou de *T.pinoi* est déposé au dessus de la membrane au centre de chaque boîte de Pétri.

Les boîtes scellées à l'aide du ruban adhésif, sont incubées à 25°C. Après 3 semaines d'incubation, la membrane portant la culture du terpez est retirée aseptiquement puis elle est remplacée par un implant circulaire du champignon phytopathogène à tester.

Les boîtes témoins sontensemencées par un implant circulaire du champignon phytopathogène.

2.7.3.Méthode de double couche (In BELLAHCENE, 1990) :

Un implant circulaire de 8 mm de diamètre, prélevé à partir d'une préculture de *T.nivea* ou de *T.pinoyi*, est placé au centre d'une boîte de Pétri contenant 15 ml de milieu malt à 1 % gélosé . Les boîtes sont maintenues fermées à l'aide d'un ruban adhésif et mises à incuber à 25°C.

Après 2 semaines d'incubation, la surface de la culture est recouverte par une membrane millipore (0,20 µm et 90 mm de diamètre) puis 15 ml de milieu malt gélosé y sont coulés. Un implant circulaire , de 8 mm de diamètre , du champignon phytopathogène est déposé au centre de chaque boîte.

Dans les boîte témoins, l'implant de terpez est remplacé par un implant du champignon à tester.

Les boîtes scellées à l'aide de ruban adhésif sont incubées à 25°C.

2.7.4. Recherche des substances antifongiques volatiles chez *T.nivea* et *T.pinoyi* :

Un implant circulaire de 8 mm de diamètre, prélevé à partir d'une préculture de terpez est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu malt gélosé.

Après 2 semaines d'incubation à 25 °C, la partie inférieure de chaque boîte contenant la culture de terpez est collée avec celle contenant le champignon à tester par du ruban adhésif (Fig. 4) (DENNIS et WEBSTER, 1971b ; OLIVIER et GERMAIN, 1983).

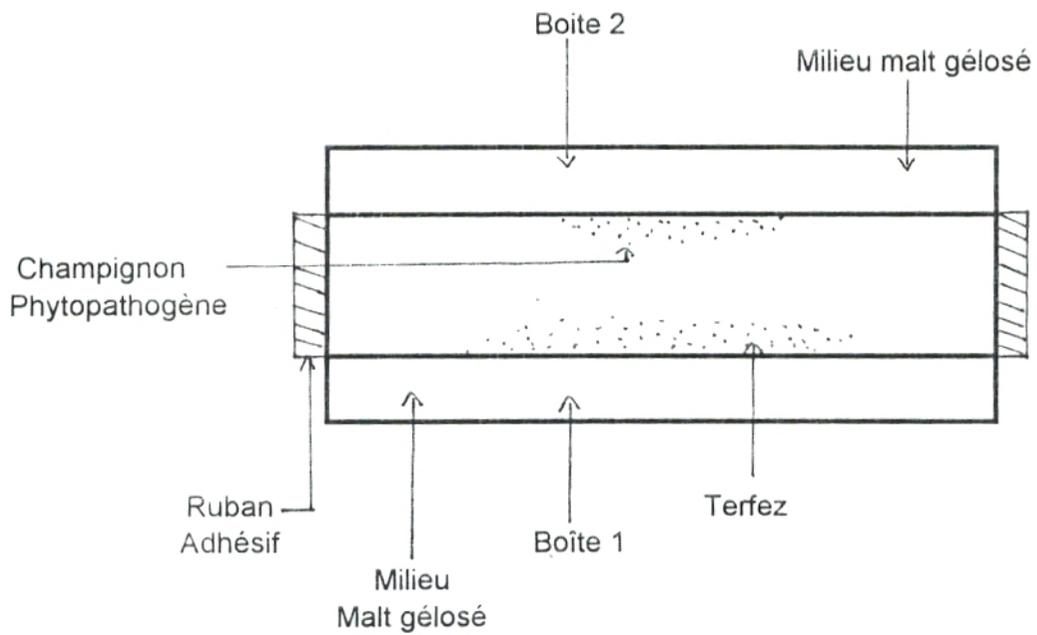


Fig .4 : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la mise en évidence des substances antifongiques volatiles (d'après OLIVIER et GERMAIN , 1983)

2.8. Méthodes de mesure :

2.8.1. Test antibactérien :

La sensibilité des espèces bactériennes aux filtrats de culture ou aux divers extraits de terpez (extraits de filtrats de culture ou de gléba) est appréciée par l'existence ou non de zones d'inhibition. Le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque est mesuré après 24 et 48 h d'incubation.

les résultats obtenus représentent la moyenne de 3 répétitions.

2.8.2. Tests antifongiques :

*Champignons levuriformes :

La sensibilité de ces espèces fongiques est évaluée également par la mesure des diamètres des zones d'inhibition après 48 h de culture.

*Champignons phytopathogènes :

- Dans le cas des tests avec les divers extraits :

L'inhibition est évaluée par l'arrêt de la croissance mycélienne du champignon phytopathogène dès qu'il atteint l'extrait.

Le diamètre de cette zone d'inhibition est mesuré dans deux directions perpendiculaires.

- Dans le cas des tests avec les filtrats de culture et les tests d'antagonisme:

La croissance des champignons phytopathogènes a été évaluée quotidiennement en mesurant les diamètres des cultures autour de l'implant circulaire dans deux directions perpendiculaires.

Un pourcentage d'inhibition est calculé (In BELLAHCENE, 1990):

$$I = \frac{Dt - Dm}{Dt} \times 100$$

I : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne

Dt : Diamètre moyen de la culture mycélienne du Témoin.

Dm : Diamètre moyen de la culture mycélienne en présence du terpez

Les mesures sont arrêtées lorsque le témoin recouvre toute la boîte.

Pour la recherche du phénomène d'antagonisme par confrontation sur boîte des espèces de terpez avec les champignons phytopathogènes, nous avons calculé le coefficient de croissance mycélienne (GUILLAUMIN, 1983), il s'agit du rapport :

$$CI = \frac{Ca}{Ct}$$

CI : Coefficient de croissance mycélienne

Ca : croissance linéaire de l'espèce phytopathogène en présence du terpez , évaluée tous les jours.

Ct: Croissance linéaire du témoin

Chaque test comprend 3 répétitions.

2.9. Méthodes analytiques des divers extraits :

2.9.1. Analyse par chromatographie en couche mince :

La CCM est une méthode d'analyse immédiate et de grande utilité. Elle permet la séparation et l'identification d'un très grand nombre de substances organiques et même minérales.

L'un des aspects fondamentaux de la chromatographie en couche mince est l'analyse qualitative qui permet de déterminer le nombre de constituants dans un mélange inconnu.

Nous avons analysé les extraits de gléba de *T. pinoyi* et de *T. nivea*, obtenus par soxhlet et les extraits du filtrat de culture de *T. nivea*, par chromatographie ascendante unidimensionnelle sur couches minces.

*Dépôt des extraits :

Après activation de la plaque de gel de silice (Kieselgel 60 F₂₅₄, 20×20 cm), à une température de 110° C pendant 30 mn, on dépose les extraits méthanoliques à 1 cm du bord inférieur en petit volume de 10 µl à l'aide d'un capillaire gradué.

*Développement des plaques :

Le développement ascendant des plaques s'effectue dans des cuves en verre dont les dimensions sont appropriées à celles des plaques à développer .

Après séchage des dépôts, les plaques sont placées dans les cuves saturées par 100 ml d'un mélange de solvant benzène / acétate d'éthyle 90 /10 (V/V) (Fig. 5).

Pour opérer en atmosphère saturée, il est nécessaire de placer sur les parois latérales de ces cuves des bandes de papier filtre imprégnées de l'éluant .

Lorsque le front du solvant est à 1 cm du bord supérieur les plaques sont retirées des cuves et séchées.

*Révélation chimique:

La révélation des spots sur les plaques est l'un des aspects techniques le plus important de la chromatographie en couche mince, la plupart des composés organiques absorbe la lumière ultraviolette entre 254 et 366 nm. Le procédé le plus simple consiste à utiliser des couches fluorescentes en UV.

Un deuxième procédé consiste à faire appel à des réactifs de révélation.

La révélation de nos spots à été réalisée en premier lieu à l'aide d'une lampe UV 254 -366 nm et en second lieu par pulvérisation sur la plaque de l'acide sulfurique à 2% dans l'éthanol / H₂O (1/1). Ce réactif permet de mettre en évidence certains composés comme le cholestérol, les glucosides, les vitamines, les drogues et les produits pharmaceutiques (VERNIN, 1970).

La couleur et le Rf (Facteur de rétention des taches sont notés):

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

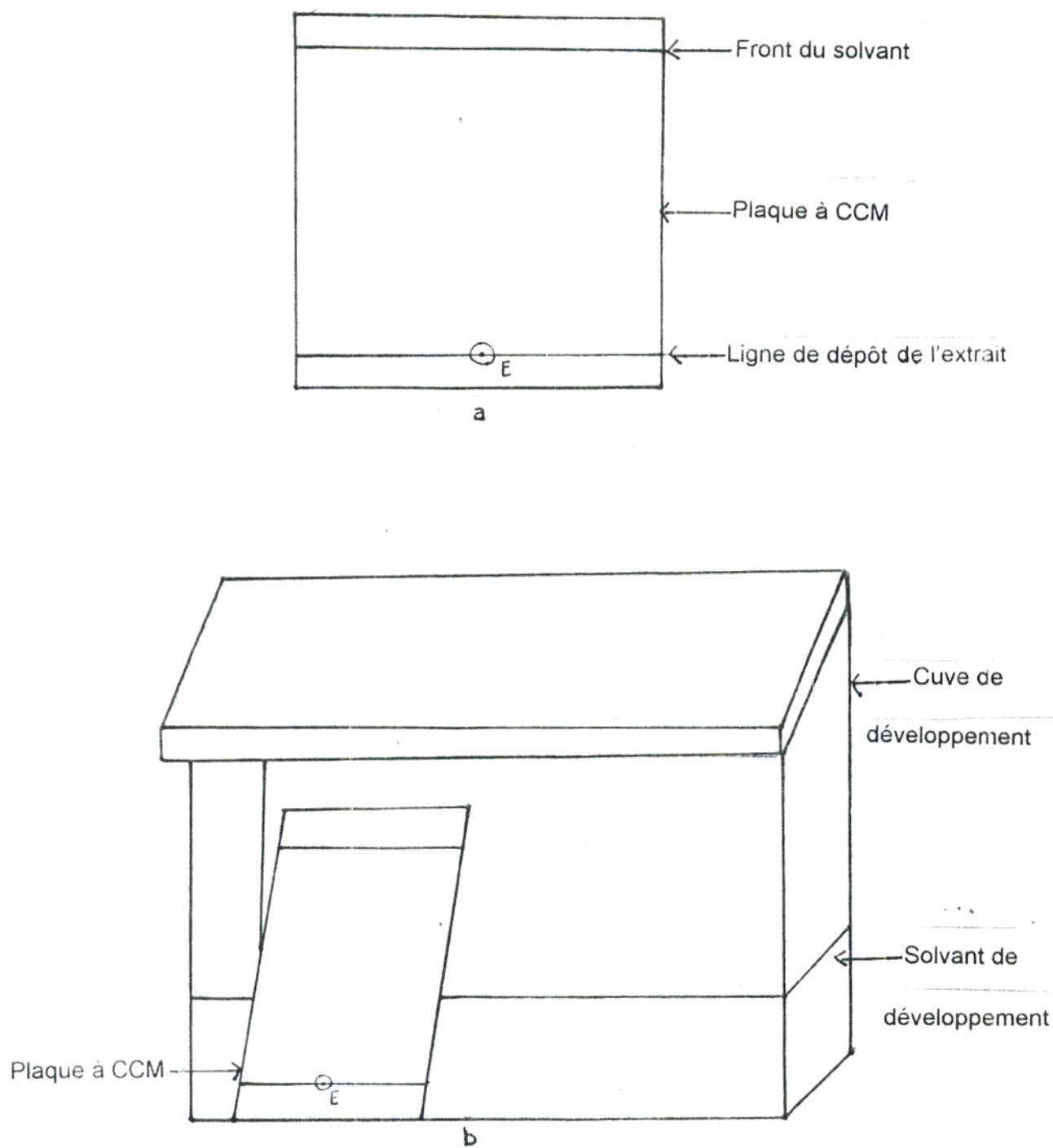


Fig 5 : a) Dépôt de l'extrait à chromatographier .
b) Cuve contenant la chromatoplaque et l'éluant

*Révélation microbiologique (ASSELINEAU et ZALTA ,1973, AL-MAADHIDI 1976 ; BOUTIBA,1992) :

La bioautographie ou la révélation microbiologique a été utilisée afin de détecter la présence des substances inhibitrices sur la chromatoplaque.

La technique consiste à sécher la plaque chromatographique développée et la déposer dans une boîte en plastique (25 x 25 cm) préalablement désinfectée à l'alcool . Du papier filtre stérile, imbibé d'eau distillée stérile est déposé sur le fond de la boîte pour humidifier l'atmosphère et empêcher la dessiccation rapide du milieu gélosé.

50 ml de milieu Sabouraud gélosé maintenu en surfusion à 40°C sont additionnés de 5 ml d'une culture de *Rhodotorula muciliginosa* en milieu Sabouraud liquide.

Après homogénéisation, le milieu est coulé sur la couche mince, par petites quantités en commençant par la partie supérieure de la chromatoplaque.

Après solidification du milieu, la boîte est placée à 4°C pendant 30 mn pour permettre la diffusion des principes actifs. Elle est ensuite incubée à 25°C .

Le diamètre et le Rf des zones d'inhibition sont notés.

2.9.2. Fractionnement de l'extrait du filtrat de culture de *T. nivea* :

Le fractionnement est réalisé par chromatographie en phase liquide sur colonne ouverte. C'est une opération très délicate, elle permet d'obtenir plusieurs fractions en fonction de la polarité (DALI YUCEF, 1994).

*Principe de la chromatographie sur colonne :

C'est une méthode d'analyse et de séparation de soluté.

La phase stationnaire est un solide appelé adsorbant et la phase mobile représente les solvants organiques de polarité différente : hexane -dichlorométhane -méthanol (1/1/1).

Dans le présent travail nous avons utilisé le gel de silice (70 - 230 Mesh) comme adsorbant (ANKE et OBERWINKLER, 1977; KUPKA *et al* . 1979), il a été conditionné au four à 180°C pendant au moins 5 heures.

*Préparation de la colonne :

Après activation du support, le gel est mélangé avec de l'hexane. Le mélange est légèrement agité puis introduit dans la colonne à l'aide d'un entonnoir.

La quantité de l'adsorbant est égale à 10 fois la quantité du soluté à fractionner.

Il faut prendre soin de ne pas mettre l'adsorbant en contact de l'air pour qu'il ne sèche pas.

La colonne ayant servi au fractionnement est en verre. Elle mesure 20 cm de longueur et 1 cm de diamètre .

Elle est conditionnée en faisant passer successivement les 3 solvants qui sont de qualité spectroscopique (MERCK).

La surface de l'adsorbant est recouverte de coton afin d'éviter sa perturbation lors de l'élution.

*Dépôt et élution :

L'extrait concentré est introduit dans l'adsorbant en ouvrant légèrement le robinet de la colonne. L'élution se fait avec les 3 solvants successivement en commençant par le moins polaire (hexane), le moyennement polaire (dichlorométhane) et le plus polaire (méthanol)

Trois fractions d'égal volume sont récoltées . Elles sont concentrées jusqu'à un volume final de 5 ml.

Les trois fractions obtenues sont testées sur les espèces bactériennes et les espèces fongiques.

Les fractions actives sont récupérées puis analysées par HPLC.

2.9.3. Analyse de la fraction active par HPLC (High Performancy Liquid Chromatography) :

Pour vérifier si la fraction active est constituée de plusieurs composés, nous l'avons analysé par HPLC.

Les principes de la HPLC reposent sur :

- La chromatographie d'adsorption : chromatographie liquide - solide
- La chromatographie de partage : chromatographie liquide - liquide
- La chromatographie par échange d'ions
- La chromatographie d'exclusion

Dans le cas de notre travail, il s'agit d'une chromatographie liquide - solide. L'appareil utilisé est de type Unicam - Philips PU 4003 PYE.

Il est constitué d'un contrôleur de débit et de pression (le débit étant de 0,3 ml / mn) , d'une pompe, d'un détecteur de sortie , d'une colonne inversée avec le gel de silice comme adsorbant et enfin d'un ordinateur avec imprimante (Fig . 6) .

L' éluant utilisé est le méthanol.

1 ml de la fraction méthanolique active récupérée à partir de la colonne chromatographique , est diluée dans du méthanol ; 500 µl de cette préparation sont injectés dans l'appareil à l'aide d'une seringue. L'enregistreur note les pics des composés présents avec leurs pourcentages et leurs temps de rétention (c'est le temps de sortie de chaque pic).

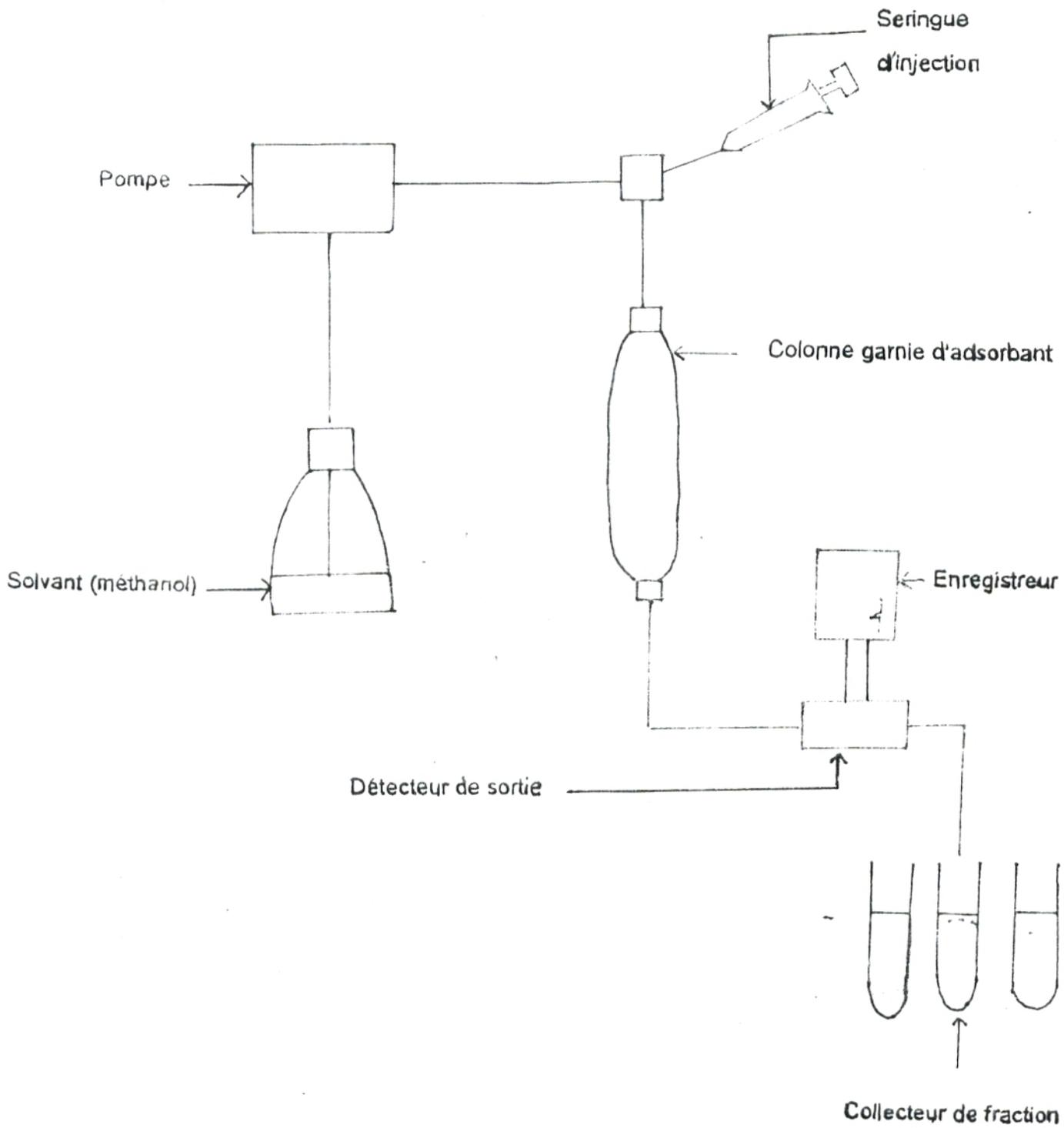


Fig 6 : Schéma du dispositif de la HPLC (document Merck - France in AUDIGIE et al . 1982) .

TROISIEME PARTIE
RESULTATS ET DISCUSSION

1. Morphologie des ascospores des deux espèces de *Tirmania* :

Les corps fructifères ou ascocarpes ont 10 à 25 cm de diamètre, leur couleur est blanche lactée jaunissant avec l'âge, ils présentent parfois un court prolongement basilaire (Pl.1, Figs. 1 et 2).

La gléba ou la chair est spongieuse, homogène et charnue de couleur blanche variant au jaune.

Les asques sont piriformes, ils renferment le plus souvent 8 ascospores.

Les deux espèces de *Tirmania* ; *T.nivea* et *T.pinoyi* se différencient par la morphologie de leurs ascospores ; chez *T.nivea*, elles sont elliptiques et lisses (Pl.1, Fig.3), chez *T.pinoyi*, elles sont sphériques et lisses (Pl.1, Fig.4).

2. Caractéristiques de la germination des ascospores et obtention du mycélium

La germination des ascospores des deux espèces de *Tirmania*, est précédée par une phase de latence de durée variable selon les espèces (FORTAS, 1990, FORTAS et CHEVALIER, 1992b).

Au début de leur germination, les ascospores libèrent des globules lipidiques réfringents, gonflent et doublent presque de volume (Pl.2, Fig.1; Pl.3, Fig.1)

On observe ensuite l'extrusion d'un tube germinatif qui émerge d'un point quelconque de l'ascospore (Pl.3, Fig.2). L'émission de deux tubes germinatifs est rarement observée.

Les ascospores gonflent et germent même à l'intérieur de l'asque, le tube germinatif émis traverse la paroi de l'asque (Pl.3, Fig.3).

Les hyphes émis par les ascospores sont généralement septés et ramifiés (Pl.2, Fig.4)

Chez *T. nivea*, nous avons observé la germination des ascospores de grande dimension (Pl.2, Figs. 1 et 2). Ces spores n'ont jamais germé chez *Terfezia arenaria* et *Terfezia claveryi* (FORTAS, 1990 ; FORTAS et CHEVALIER, 1992 b). Les hyphes émis ont un aspect "annelé" (Pl.2, Fig.3)

2.1. Discussion :

Nous avons remarqué que les ascospores des deux espèces de *Tirmania* étudiées ont un pouvoir germinatif assez faible.

Selon FORTAS (1990) et FORTAS et CHEVALIER (1992 b) le taux de germination et la durée de la phase de latence varient avec la composition du milieu de culture. La phase de latence de *T. pinoyi* sur milieu malt est de 15 jours. Dans notre étude, la phase de latence de *T.pinoyi* est de 4 semaines et celle de *T.nivea* est de 7 semaines.

Il est assez difficile de connaître l'origine du faible pouvoir germinatif des spores de terfez. Dans le cas des *Tuber*, de nombreux facteurs susceptibles d'agir

sur la germination ont été évoqués : âge des ascocarpes, humidité, imperméabilité des enveloppes sporales , et les nombreux traitements utilisés afin de lever la dormance des spores ont échoués(GRENTE *et al.* 1972 ; KULIFAJ, 1984) .

Au cours de la germination des ascospores des deux espèces de terfez étudiées , le tube germinatif émerge d'un point quelconque de la spore comme l'ont montré AWAMEH et ALSHEIKH (1979 a et b) ; FORTAS (1990) ; FORTAS et CHEVALIER (1992 b) ; BOUSSIR (1992) ; BESSAIH (1994). Aucun point de sortie spécifique n'a été observé.

FORTAS(1990) ; FORTAS ET CHEVALIER(1992 b) ont observé la présence d'ascospores de grande dimension chez *Terfezia arenaria* et *Terfezia claveryi* , selon ces auteurs la présence de ces spores est difficile à expliquer d'autant plus qu'elles n'ont jamais germé . Dans notre étude , ces ascospores présentes chez *T.nivea* ont germé ; les hyphes émis ont une morphologie différente de celle des hyphes issus des autres ascospores.

Enfin , comme l'a signalé FORTAS (1990), nous avons remarqué que la suspension de spores utilisée pour les isolements est toujours exempte de germes contaminants d'origine bactérienne ou fongique , ce qui laisse supposer que les terfez possèdent certaines propriétés antibiotiques comme de nombreux champignons ectomycorhiziens.

PLANCHES 1 À 3.

PLANCHE 1

MORPHOLOGIE DES ASCOCARPES ET DES ASCOSPORES DES DEUX ESPÈCES DE *TIRMANIA* :

Fig.1 : Ascocarpe de *T.nivea* présentant un court prolongement basilaire.

Fig.2 : Ascocarpe de *T.pinoyi* à péridium parcouru de petites fentes peu profondes.

Fig.3 : Asque de *T.nivea* renfermant 8 ascospores elliptiques et lisses .
G x1200.

Fig.4 : Asque de *T. pinoyi* renfermant 8 ascospores sphériques et lisses.
G x 1200.

PLANCHE I

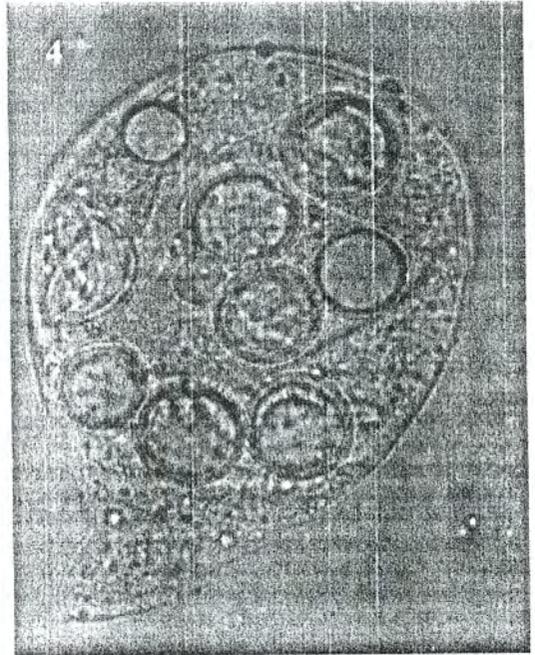
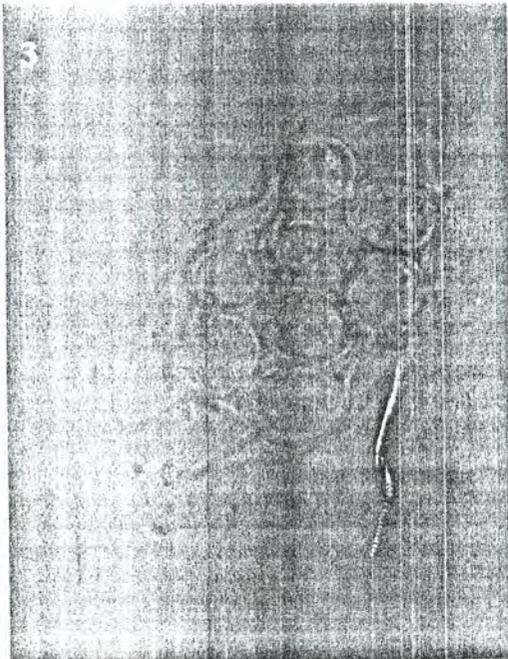


PLANCHE 2

DIFFÉRENTS STADES DE LA GERMINATION DES ASCOSPORES DE *T.NIVEA*.

Fig.1 : Deux ascospores de *T.nivea* en début de germination dont une est de grande dimension (flèches).

Remarquer leur diamètre par rapport à celui des trois autres ascospores non germées. G x1200

Fig. 2 : Germination d'une ascospore de *T. nivea* de grande dimension .
G x 1200 .

Fig.3 : Hyphe articulé émis par une ascospore de *T .nivea* de grande dimension. G x 1200

Fig.4 : Morphologie des hyphes septés des ascospores de *T. nivea*.
G x 600 .

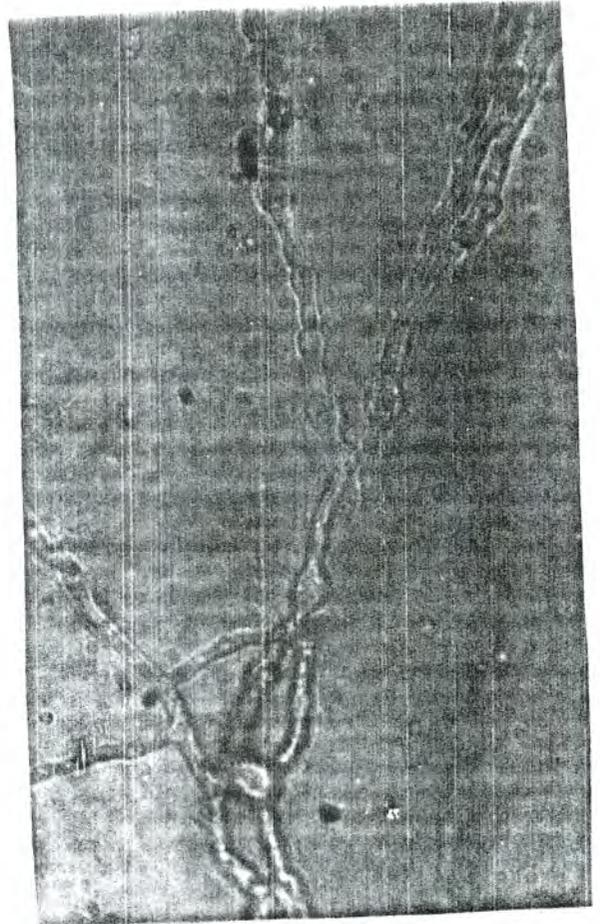
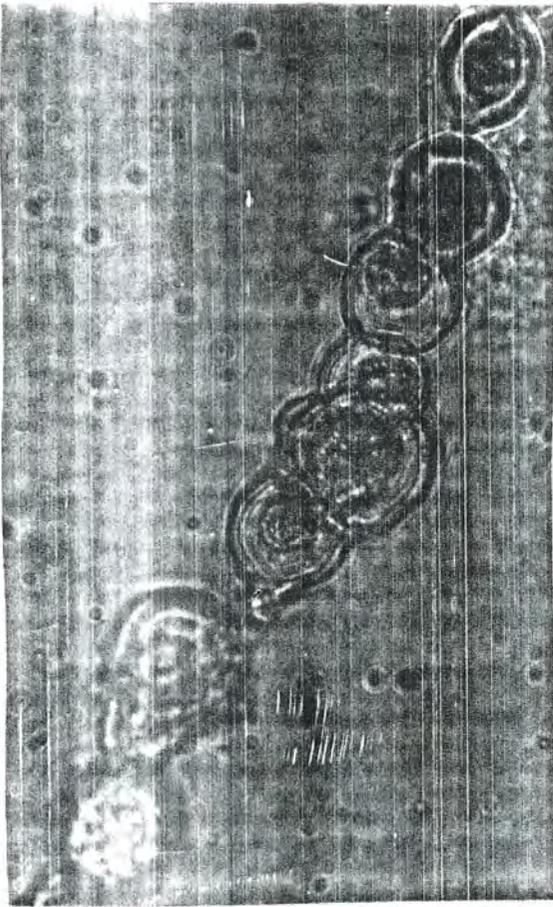
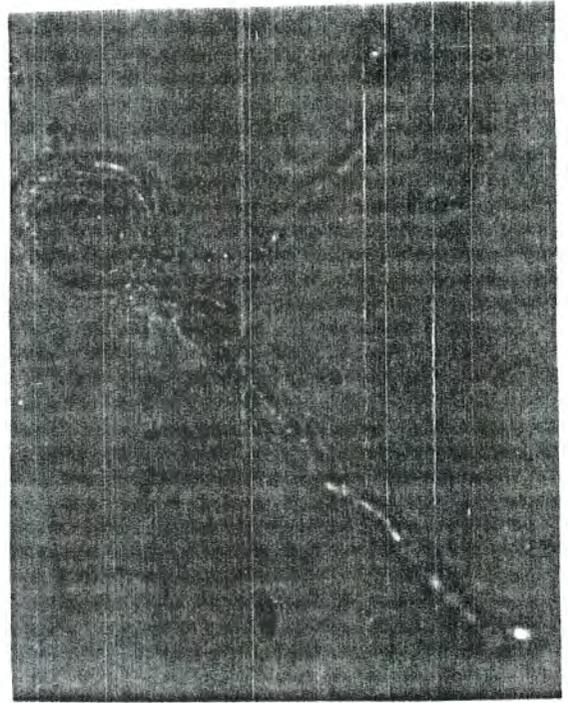
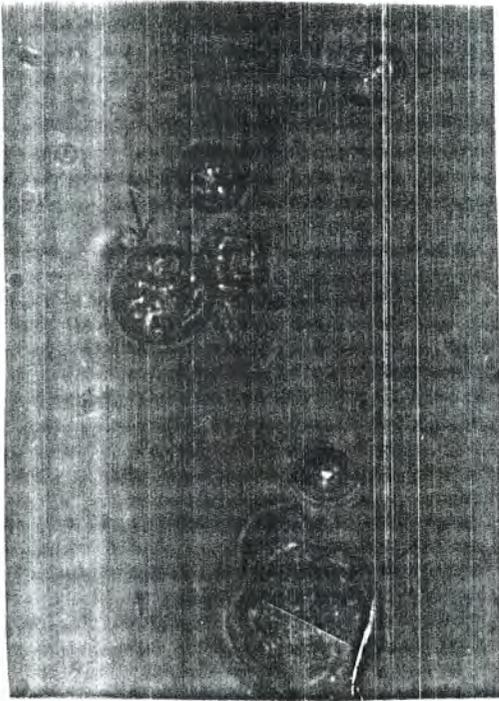


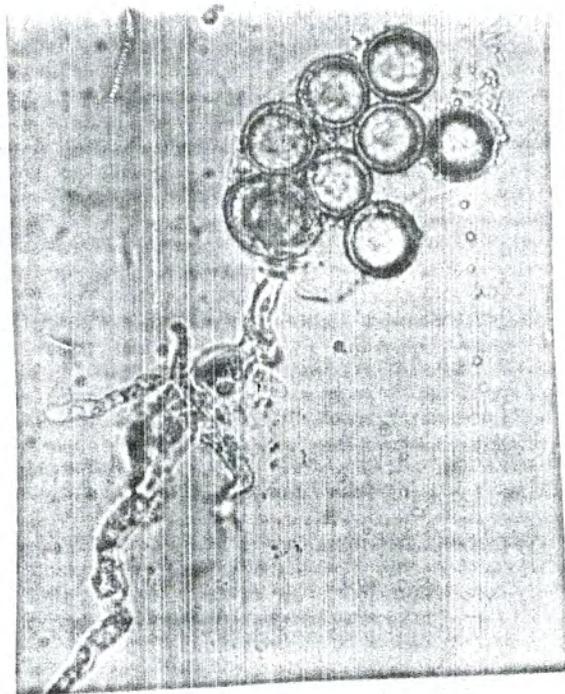
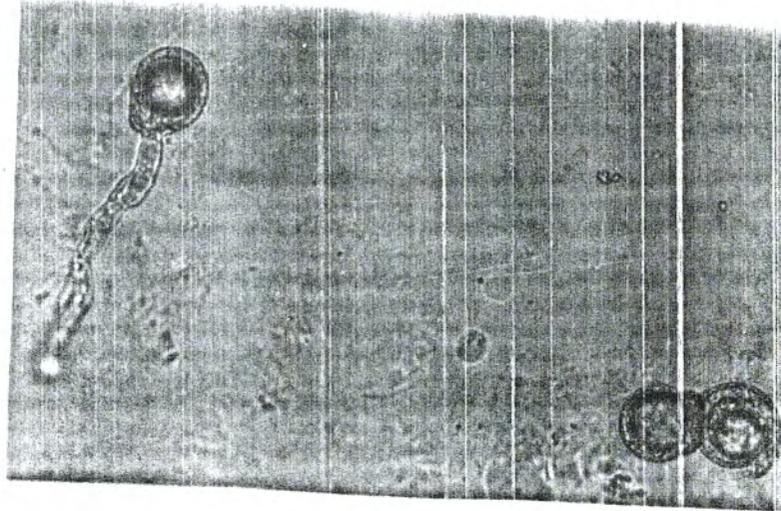
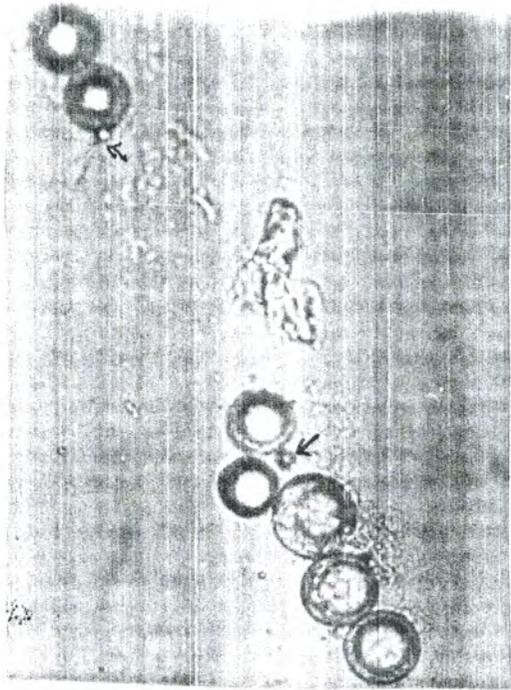
PLANCHE 3

DIFFÉRENTS STADES DE LA GERMINATION DES ASCOSPORES DE *T.PINOYI*

Fig. 1 : Ascospore de *T.pinoyi* en germination avec libération de quelques globules lipidiques (flèches). G x 1200.

Fig. 2 : Extrusion d'un tube germinatif à partir d'une ascospore de *T. pinoyi* .
G x 1200

Fig. 3 : Extrusion d'un tube germinatif ramifié par une ascospore de *T. pinoyi*
contenue dans un asque à 8 ascospores . G x 1200



3. Description des cultures mycéliennes des deux espèces de *Tirmania* :

En culture sur boîte, le mycélium de *T. pinoyi* ou de *T. nivea* est aérien peu dense et de couleur blanchâtre. Il envahit la boîte au bout de 3 à 4 semaines d'incubation (Pl. 4, Figs.1 et 2).

En culture liquide, après 8 semaines d'incubation, il présente une masse dense et compacte de couleur blanchâtre.

4. Activité des filtrats de culture mycélienne de *T. nivea* et de *T. pinoyi* sur la croissance des micro-organismes testés :

4.1. Sur la croissance des espèces bactériennes et levuriformes par la méthode de diffusion en milieu solide :

Les filtrats n°1 de *T. nivea* et de *T. pinoyi* provenant de cultures âgées de 3 à 27 jours n'ont montré aucune inhibition de la croissance des espèces bactériennes et levuriformes. Par contre, les filtrats issus des cultures de *T. nivea*, âgées de 30 à 60 jours inhibent faiblement la croissance de *S. hemolyticus* uniquement (Tableau 1). Le diamètre de la zone d'inhibition est de 8 mm (Pl.4, Fig.3).

4.2. Sur la croissance des champignons phytopathogènes :

4.2.1 Selon la méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) avec le filtrat n°1:

Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes sont nuls quel que soit l'âge des filtrats de culture testés.

4.2.2. Par incorporation des filtrats n°2, au milieu de culture des champignons phytopathogènes :

Parmi les espèces fongiques testées avec les filtrats n°2 d'une culture de *T. nivea* de 4 semaines, 3 seulement présentent un retard de croissance mycélienne par rapport à celle de la culture témoin. Les pourcentages d'inhibition sont de 20 à 40,50 avec *S. sclerotiorum* (Pl.4, Fig.4), de 20 à 31 avec *Phytophthora*, de 11 à 20,2 avec *Phoma* (Fig.1). Les autres espèces testées ne présentent aucun retard de croissance, au contraire la croissance de *Phomopsis* semble plus rapide que celle du témoin en présence des filtrats de *T. nivea* ou de *T. pinoyi*, puisque les valeurs des pourcentages d'inhibition sont négatives.

Le filtrat de culture de *T. pinoyi* ne montre aucune inhibition importante (Tableau 2).

Tableau 1 : Activité des filtrats de culture des deux espèces de terfez sur la croissance de *S.hemolyticus*.

Age des cultures de terfez en milieu liquide (jours)	Filtrats de cultures				Température ° C (pH mètre)
	pH		Activité		
	<i>T.nivea</i>	<i>T. pinoyi</i>	<i>T. nivea</i>	<i>T. pinoyi</i>	
3 ème	5,90	5,90	-	-	20
6 ème	6,00	6,10	-	-	22
9 ème	6,00	6,00	-	-	23.80
12 ème	6,10	6,10	-	-	23
15 ème	6,10	6,10	-	-	24
18 ème	6,17	6,15	-	-	24
21 ème	6,17	6,16	-	-	23
24 ème	6,18	6,16	-	-	24,50
27 ème	6,19	6,17	-	-	25
30 ème	6,16	6,18	+	-	23
33 ème	6,10	6,16	+	-	24
36 ème	5,90	5,80	+	-	23,80
39 ème	5,90	5,50	+	-	24
42 ème	5,83	5,90	+	-	25
45 ème	5,90	5,80	+	-	25
48 ème	5,90	5,90	+	-	25,50
51 ème	6,00	6,00	+	-	24
54 ème	6,10	6,00	+	-	25
57 ème	5,90	6,10	+	-	23.70
60 ème	5,90	5,80	+	-	26

(+) : Présence d'une inhibition de la croissance de *S.hemolyticus*.

(-) : Absence d'une inhibition de la croissance de *S.hemolyticus*.

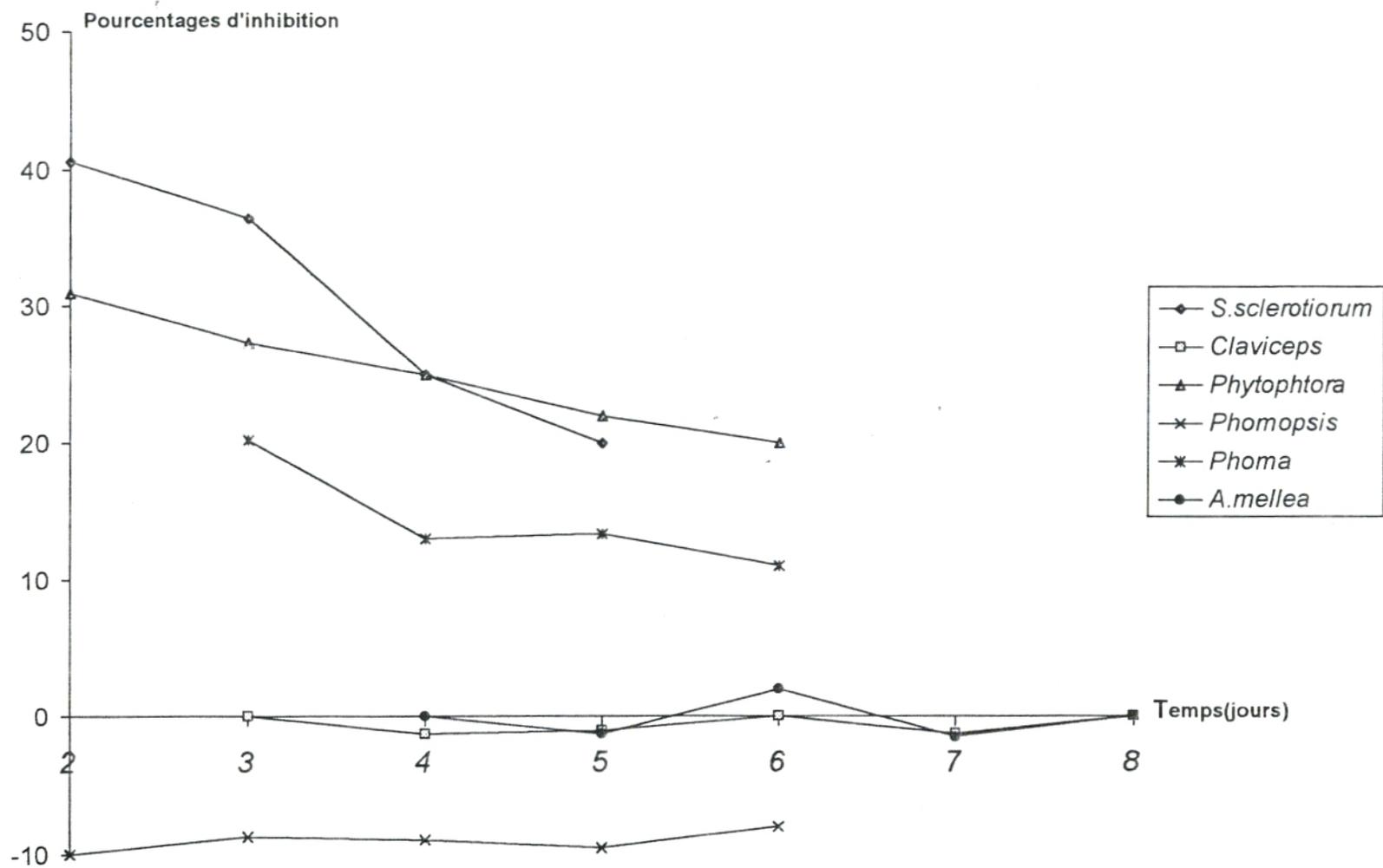


Fig.1 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes en présence du filtrat de culture de *T.nivea* incorporé au milieu de culture

Tableau 2 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes en présence du filtrat de culture de *T.pinoyi* incorporé au milieu de culture .

Temps d'incubation (jours)	2ème jour	3ème jour	4ème jour	5ème jour	6ème jour	7ème jour	8ème jour
Pourcentages d'inhibition des espèces testées							
<i>S. sclerotiorum</i>	1.30	0	0	1.50			
<i>Claviceps</i>		0	-1.20	0	-0.25	-1	0
<i>Phytophthora</i>	0.70	0.80	0	0.65	0		
<i>Phomopsis</i>	-9.40	-8.50	-9.85	-6.60	-6		
<i>Phoma</i>		0.50	0.07	0	0		
<i>A.mellea</i>		0	-3	-2	2.10	-1	0

4.3. Discussion :

Nous n'avons observé aucune inhibition des micro-organismes testés avec les filtrats obtenus au bout de 27 jours de culture du mycélium de *T.nivea* ou de *T. pinoyi* . Il est vrai que la synthèse de métabolites secondaires ne démarre souvent qu'après la phase de croissance active. L'activité n'apparaît qu'à partir du 30^{ème} jour de la mise en culture. Une seule bactérie est sensible au filtrat de culture de *T.nivea*.

Les substances inhibitrices semblent être présentes en faible quantité et sont donc très diluées dans le milieu de culture liquide, ou bien elles y sont peu solubles, ce qui expliquerait l'absence d'inhibition chez les champignons phytopathogènes testés , et le faible diamètre de la zone d'inhibition observée chez *S.hemolyticus*.

Les champignons phytopathogènes testés par incorporation du filtrat de culture de *T.nivea* montrent un retard de croissance par rapport aux témoins. L'espèce *S. sclerotiorum* présente le pourcentage d'inhibition le plus important, elle est suivie de *Phytophthora* et enfin de *Phoma* . Les autres espèces ne montrent aucune inhibition.

Le pH du milieu de culture liquide ne varie pas beaucoup durant toute la période de la mise en culture. L'inhibition observée ne peut pas être le fait d'une acidification du milieu de culture comme l'ont montré RASANAYAGAM et JEFFRIES (1992) chez de nombreux champignons éctomycorrhiziens.

PLANCHE 4

ASPECT DES CULTURES MYCÉLIENNES DES DEUX ESPÈCES DE *TIRMANIA* :

Fig. 1 : Mycélium de *T. nivea* , après 25 jours de culture sur milieu malt à 1 %

Fig. 2 : Mycélium de *T. pinoyi* après 25 jours de culture sur milieu malt à 1 %

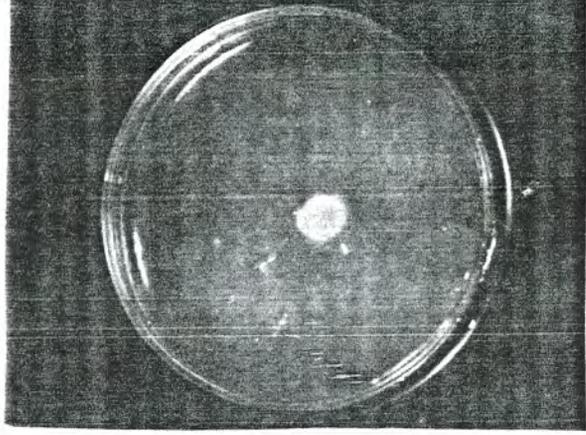
ACTIVITÉ DU FILTRAT DE CULTURE

Fig.3 : Inhibition de la croissance de *S. hemolyticus* après 24h de culture, en présence du filtrat n°1 de *T. nivea*, obtenu après 30 jours de culture .

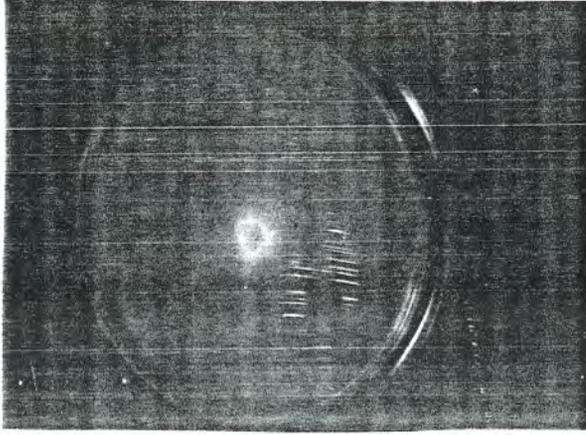
Fig.4 : Croissance de *S. sclerotiorum* en présence du filtrat n°2 de culture de *T. nivea* incorporé au milieu du champignon phytopatogène.

T : Témoin

2

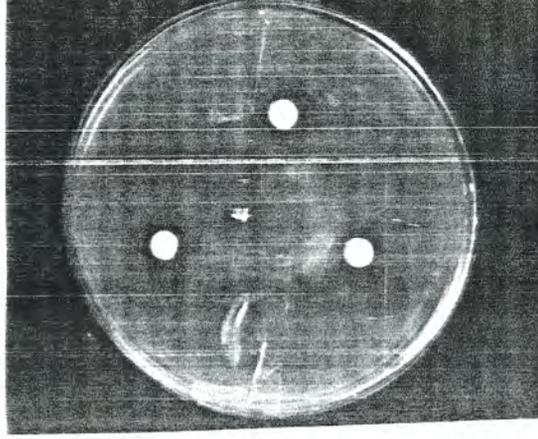
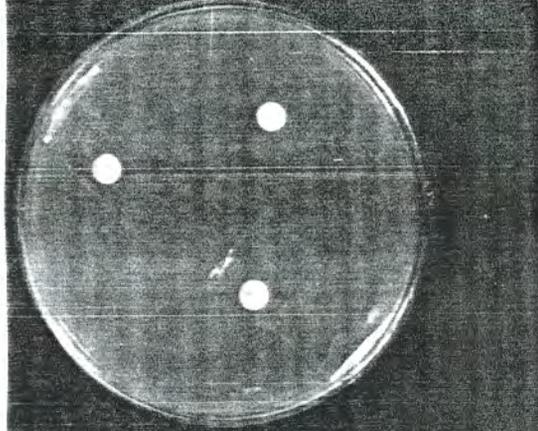


1



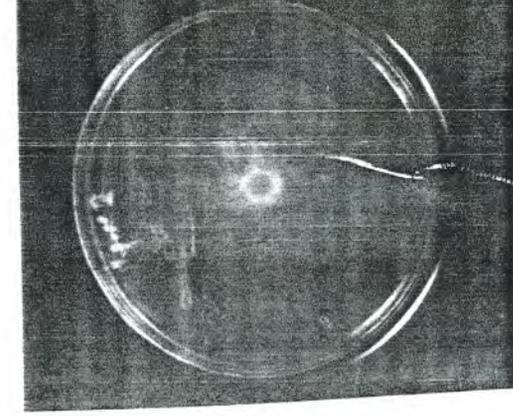
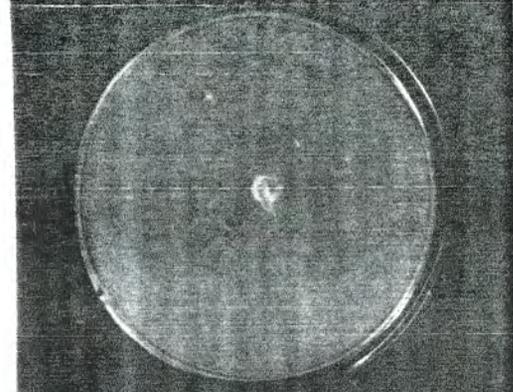
3

T



4

T



5. Activité des divers extraits sur la croissance des micro-organismes testés

5.1. Extraits obtenus par contact gléba-solvant:

5.1.1 Sur la croissance des espèces bactériennes :

En présence des extraits de gléba de *T.nivea* ou de *T.pinoyi* à l'acétate d'éthyle, 5 espèces bactériennes présentent des zones d'inhibition (Fig.2). Il s'agit de *P.fluorescens*, *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *P.mirabilis*, *S.typhi*, avec des diamètres d'inhibition allant de 7 à 9 mm (Pl.5, Figs.1 et 2).

Avec les extraits à l'acétate d'amyle de *T.nivea* et de *T.pinoyi*, 3 espèces bactériennes seulement présentent des zones d'inhibition allant de 7 à 7,30 mm. Il s'agit de *S.typhi*, *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* (Fig.2)

En présence des extraits au chloroforme de *T. nivea*, 4 espèces bactériennes présentent des zones d'inhibition allant de 7 à 7,52 mm . Il s'agit de *P.fluorescens*, *S.typhi*, *P.aeruginosa* et *S.aureus*.

Les diamètres des zones d'inhibition observés avec l'extrait de *T.pinoyi* sont compris entre 7 et 7,52 mm. Les espèces concernées sont : *P.mirabilis*, *P.fluorescens*, *P.aeruginosa* et *S.typhi* (Fig. 2).

Pour une même espèce bactérienne, les diamètres de ces zones sont sensiblement les mêmes, après 24 et 48 heures d'incubation, quelle que soit la durée de contact gléba-solvant. Le témoin ne présente aucune zone d'inhibition.

Avec les extraits à l'éther de pétrole, aucune des espèces testées n'a été inhibée quel que soit le temps de contact gléba-solvant.

5.1.2.Sur la croissance des espèces fongiques

Nous n'avons observé aucune inhibition de la croissance des espèces levuriformes ou phytopathogènes avec les extraits obtenus par contact gléba de *T. nivea* ou de *T. pinoyi* et les divers solvants utilisés.

5.2. Extraits de gléba obtenus à l'aide du soxhlet:

5.2.1. Espèces bactériennes

Toutes les espèces bactériennes testées présentent des zones d'inhibition après 24h de culture (Fig 3). Les diamètres de ces zones sont de 7 à 15 mm avec l'extrait de *T. nivea* et de 7 à 11 mm avec l'extrait de *T.pinoyi*.

Dans les deux cas, *P.fluorescens* présente les diamètres d'inhibition les plus importants.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)

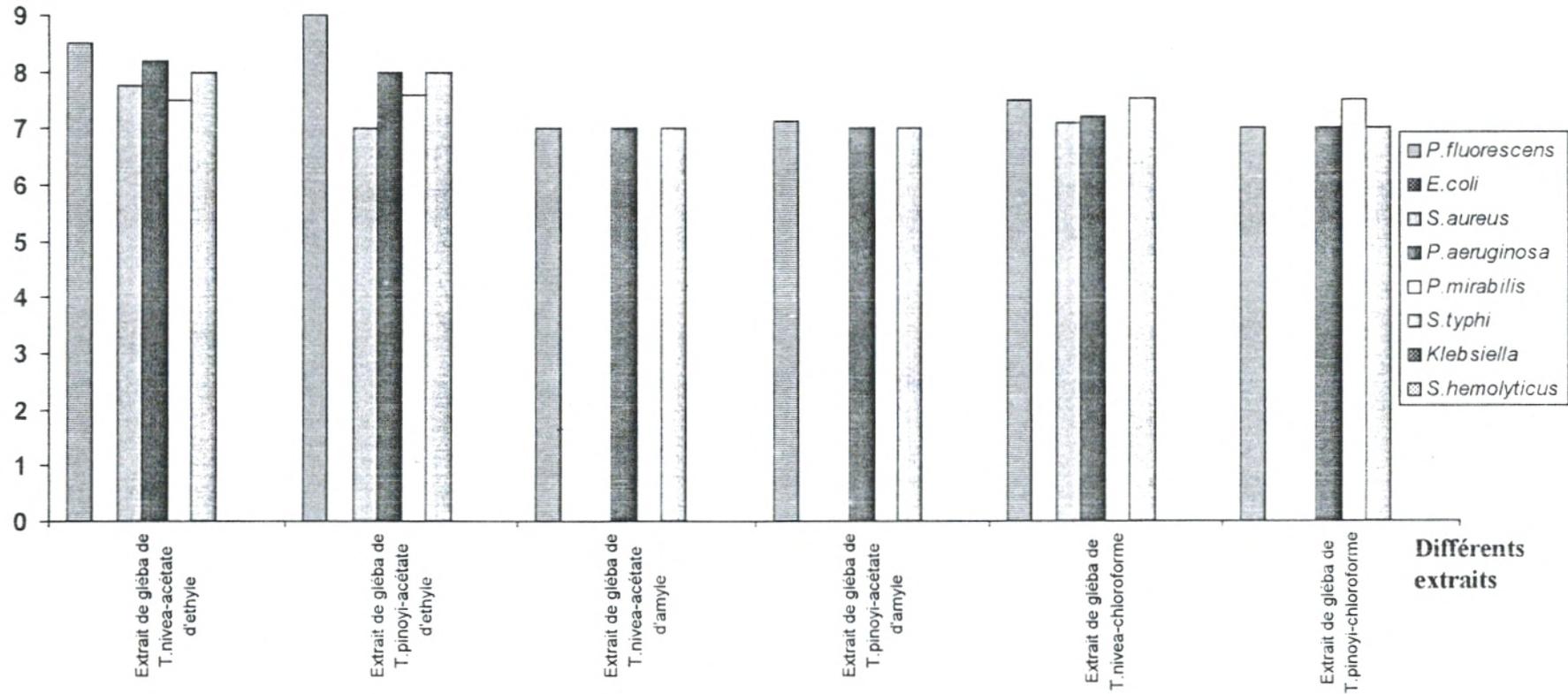


Fig.2 : Diamètres des zones d'inhibition des espèces bactériennes en présence des extraits de gléba de *T.nivea* et de *T.pinoyi* obtenus après 24h de contact gléba-solvants (Après 24h de culture bactérienne).

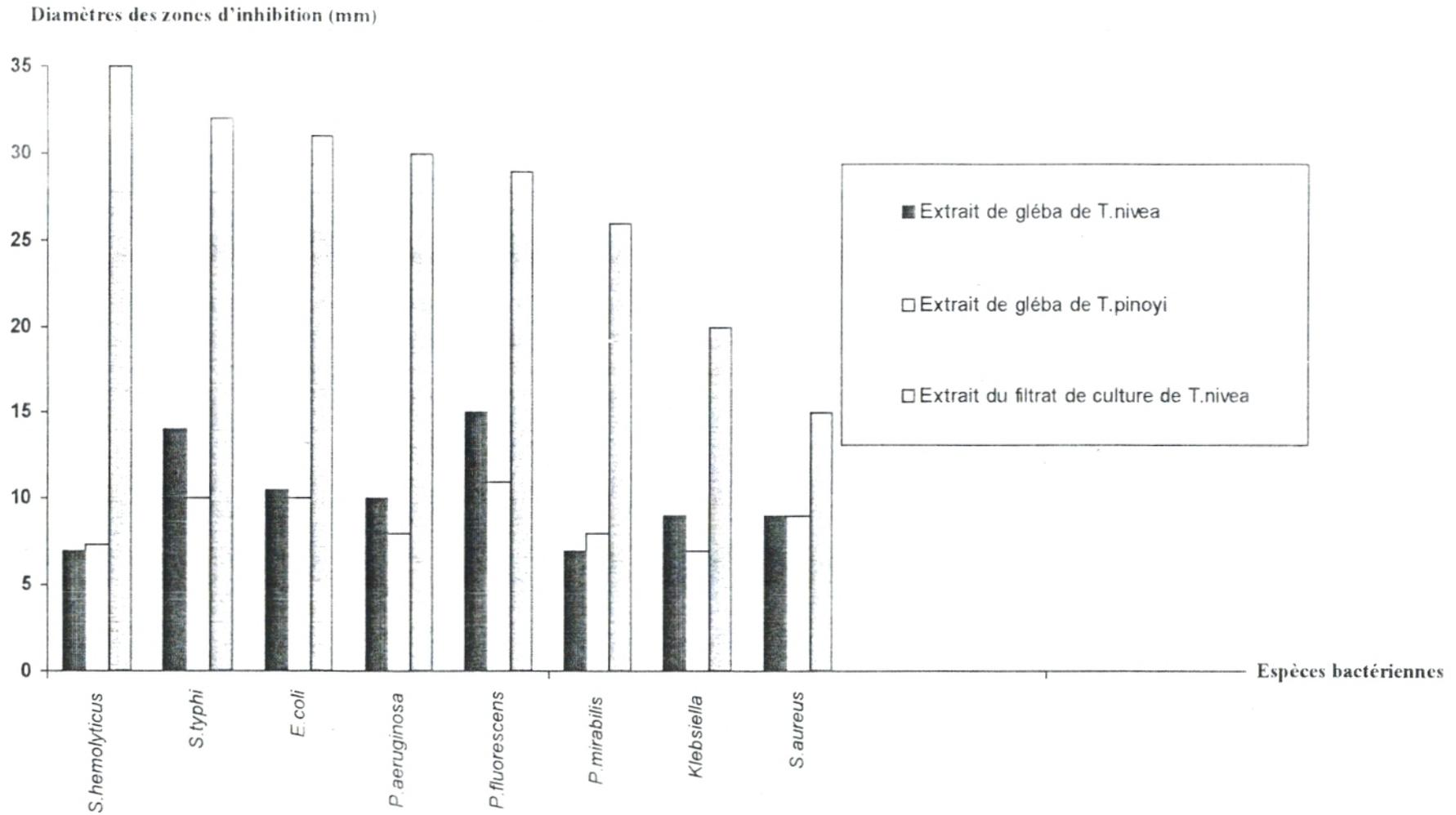


Fig.3 : Diamètres des zones d'inhibition des espèces bactériennes en présence des extraits de gléba de *T. nivea* et de *T. pinoyi* obtenus par soxhlet et du filtrat de culture de *T. nivea*. (Après 24h de culture).

5.2.2 Espèces fongiques

Les deux espèces levuriformes testées ; *Candida albicans* et *Rhodotorula mucilaginosa* présentent des zones d'inhibition après 48 h de culture(Fig. 4) . Les diamètres de ces zones sont de 19 à 20,50 mm en présence de l'extrait de *T.pinoyi* et de 25 mm en présence de celui de *T.nivea* (Pl.6, Figs.1et 2).

Les champignons phytopathogènes testés ne montrent aucune zone d'inhibition quel que soit l'extrait utilisé..

5.3.Extrait des filtrats de culture

5.3.1.Espèces bactériennes :

Contrairement au filtrat de culture de *T.nivea* qui a montré une faible inhibition, l'extrait méthanolique du filtrat de *T.nivea*, de couleur jaunâtre, est très inhibiteur vis à vis de toutes les espèces bactériennes testées. Les diamètres des zones d'inhibition sont de 15 à 35 mm après 24h de culture(Pl. 7, Figs. 1et 2) On pourra noter le degré de sensibilité de ces espèces, par ordre décroissant (Fig.3) :

S.hemolyticus >*S. typhi* >*E . coli*>*P. aeruginosa* >*P. fluorescens* >*P . mirabilis*>
Klebsiella sp >*S.aureus* .

Le diamètre de ces zones ne varie pas après 48 h de culture .

5.3.2.Espèces fongiques:

Les deux espèces levuriformes sont fortement inhibées par l'extrait du filtrat de *T.nivea*. Elles présentent des diamètres d'inhibition de 30 mm (Fig.4)

Parmi les champignons phytopathogènes *Sclerotinia sclerotiorum* et *Phytophthora* présentent une forte inhibition (Pl. 7, Fig.3); *Phoma* présente une zone d'inhibition plus faible (Fig 4)

Aucune inhibition n'est observée avec *Claviceps*, *Phomopsis* et *A. mellea*.

L'extrait du filtrat de culture de *T. pinoyi* semble être inactif aussi bien sur les espèces fongiques que bactériennes.

Les hyphes des trois espèces phytopathogènes sensibles à l'extrait du filtrat de culture de *T.nivea* sont prélevés à la périphérie de la zone d'inhibition et colorés à la fuschine acide puis observés au microscope photonique .

Leur morphologie diffère quelque peu de celle des témoins . Ils présentent de nombreux renflements chez *S . sclerotiorum* (Pl.8 , Fig . 1) ou de nombreuses ramifications chez *Phytophthora* et *Phoma* (Pl. 8 bis , Figs.3 et 5).

Diamètres des zones d'inhibition (mm)

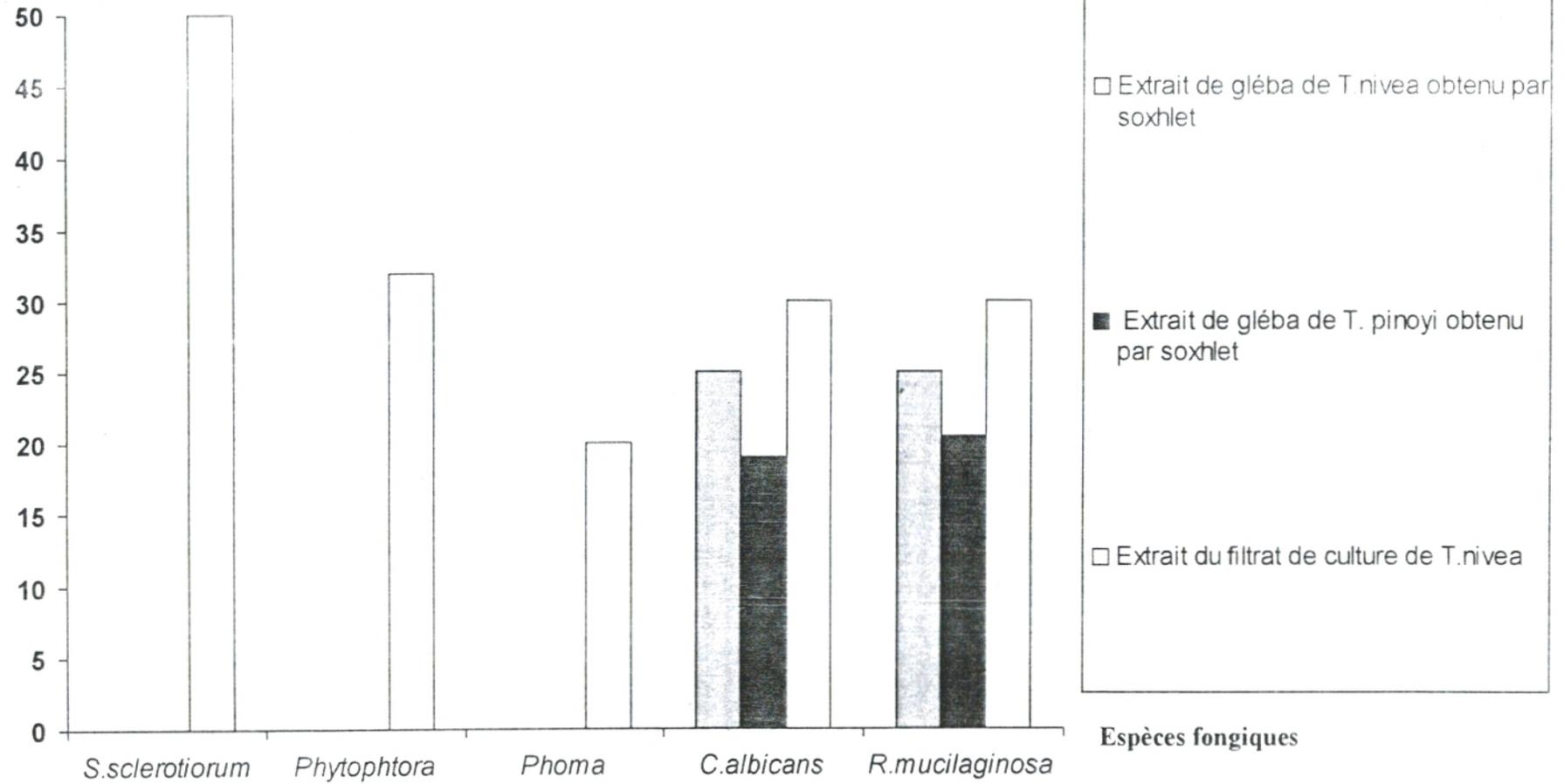


Fig.4 : Diamètres des zones d'inhibition des espèces fongiques testées avec l'extrait du filtrat de culture de *T.nivea* et les extraits de gléba de *T.nivea* et de *T.pinoyi* obtenus par soxhlet.

5.4. Extraits du mycélium:

Les extraits méthanoliques récupérés à partir du mycélium des deux espèces de *Tirmania* n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la croissance de tous les micro-organismes testés .

5.5. Discussion :

L'inhibition observée chez les micro-organismes testés dépend de plusieurs facteurs à savoir : le type d'extrait, la méthode d'extraction et le type de solvant.

Parmi les extraits obtenus par contact gléba-solvant, celui à l'acétate d'éthyle semble donner la meilleure inhibition. Cet extrait est actif aussi bien sur les bactéries Gram + que sur les bactéries Gram - , avec une moyenne de 5 mm par groupe de bactéries (Tableau 3) .

L'extrait au chloroforme est légèrement plus inhibiteur que celui à l'acétate d'amyle .

Le temps de contact gléba-solvant ne semble pas beaucoup influencer sur l'inhibition .

Les deux espèces de *Tirmania* donnent relativement la même inhibition sur les espèces bactériennes .

L'extrait à l'éther de pétrole est inactif, il est fort possible que les substances inhibitrices soient insolubles dans les solvants apolaires.

Les extraits obtenus par soxhlet inhibent fortement la croissance de toutes les espèces bactériennes testées, ainsi que celle des deux espèces levuriformes . L'espèce *T. nivea* a donné les meilleures zones d'inhibition avec une moyenne de 10,18 mm pour les espèces bactériennes et de 25 mm pour les espèces levuriformes (Tableau 3).

L'extrait méthanolique obtenu à partir du filtrat de *T. nivea* inhibe très fortement la croissance des espèces bactériennes, levuriformes et phytopathogènes.

Parmi, les espèces bactériennes testées *S. hemcliticus* semble être la plus sensible. D'ailleurs elle est la seule sensible au filtrat de *T. nivea* .

Dans le cas des champignons phytopathogènes, la meilleure inhibition est observée chez *S. sclerotiorum*.

Les champignons levuriformes présentent les même zones d'inhibition .

L'observation au microscope photonique a montré que certains champignons phytopathogènes présentent une légère modification morphologique de leurs hyphes qui apparaissent ramifiés ou renflés . KOPE et FORTIN (1989) ont d'ailleurs signalé des altérations semblables causées par des sécrétions de 16 espèces ectomycorhiziennes

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des activités des extraits de gléba et des filtrats de cultures de *T.nivea* et *T.pinoi* sur la croissance des espèces fongiques et bactériennes .

Diamètres des zones d'inhibition (mm)	DIVERS EXTRAITS															
	Gléba												FILT RAT			
	Contact				gléba				- solvant						Sox hlet	
Espèces testées	Acétate d'éthyle		Acétate d'amyle		Chloro forme		<i>T.nivea</i>	<i>T.pinoi</i>	<i>T.nivea</i>	<i>T.pinoi</i>	<i>T.nivea</i>	<i>T.pinoi</i>	<i>T.nivea</i>	<i>T.pinoi</i>		
	<i>T. nivea</i>	<i>T. pinoi</i>	<i>T.nivea</i>	<i>T. pinoi</i>	<i>T.nivea</i>	<i>T.pinoi</i>										
Espèces bactériennes	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h				
<i>P. fluorescens</i>	8.5	8.52	9	9	7.13	7	7	7.13	7	7.50	7	7	15	11	29	0
<i>E.coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10.5	10	31	0
<i>S. aureus</i>	7.50	7.75	7	7	0	0	0	0	7.10	7.10	0	0	9	9	15	0
<i>P.aeruginosa</i>	8.50	8.20	7.80	8	7	7	7	7	7.20	7.20	7	7	10	8	30	0
<i>P.mirabilis</i>	7.56	7.50	7.66	7.60	0	0	0	0	0	0	7.52	7.50	7	8	26	0
<i>S.typhi</i>	8	8	8.10	8	7.30	7	7.10	7	7.40	7.52	7	7	14	10	32	0
<i>Klebsiella sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	7	20	0
<i>S.hemolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7.30	35	0
Moyenne par groupe	5	5	4.94	4.95	2.67	2.62	2.63	2.64	3.58	3.66	3.56	3.56	10.18	8.78	27.25	0
Champignons levuriformes																
<i>C.albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	19	30	0
<i>R.mucilaginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	20.50	30	0
Moyenne par groupe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	19.75	30	0
Champignons phytopathogènes																
<i>S.sclerotiorum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0
<i>Phytophthora</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0
<i>Phoma</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
<i>Claviceps</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phomopsis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A.mellea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moyenne par groupe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0

PLANCHES 5 À 8

PLANCHE 5**ACTIVITÉ DES EXTRAITS OBTENUS PAR CONTACT GLÉBA-SOLVANT :**

Fig.1 : Inhibition de la croissance de *P. mirabilis* en présence de l'extrait de gléba de *T. pinoyi* , obtenu par contact gléba- acétate d'éthyle

Fig. 2 : Inhibition de la croissance de *S. aureus* en présence de l'extrait de gléba de *T. nivea* obtenu par contact gléba-acétate d'éthyle.

T : Témoin

PLANCHE 6

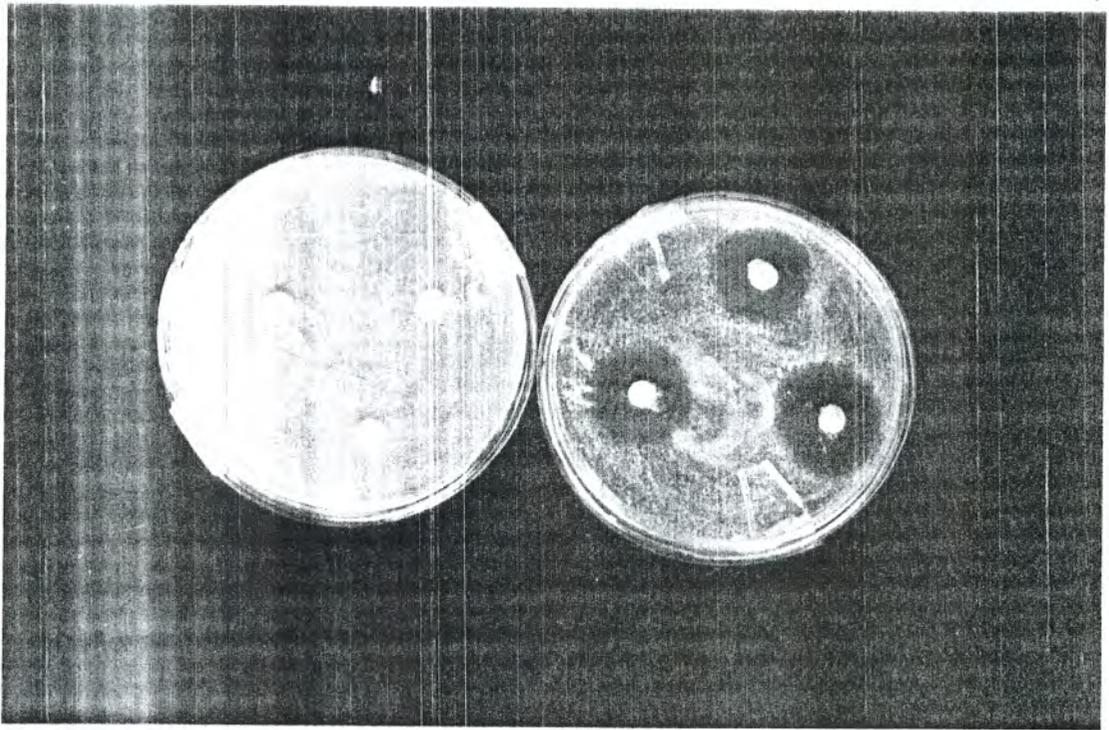
ACTIVITÉ DES EXTRAITS DE GLÉBA OBTENUS PAR SOXHLET :

Fig. 1 : Inhibition de la croissance de *C. albicans* en présence de l'extrait de gléba de *T. pinoyi* obtenu au soxhlet (après 48 h de culture).

Fig.2 : Inhibition de la croissance de *R. mucilaginosa* en présence de l'extrait de gléba de *T. pinoyi* obtenu au soxhlet (après 48 heures de culture).

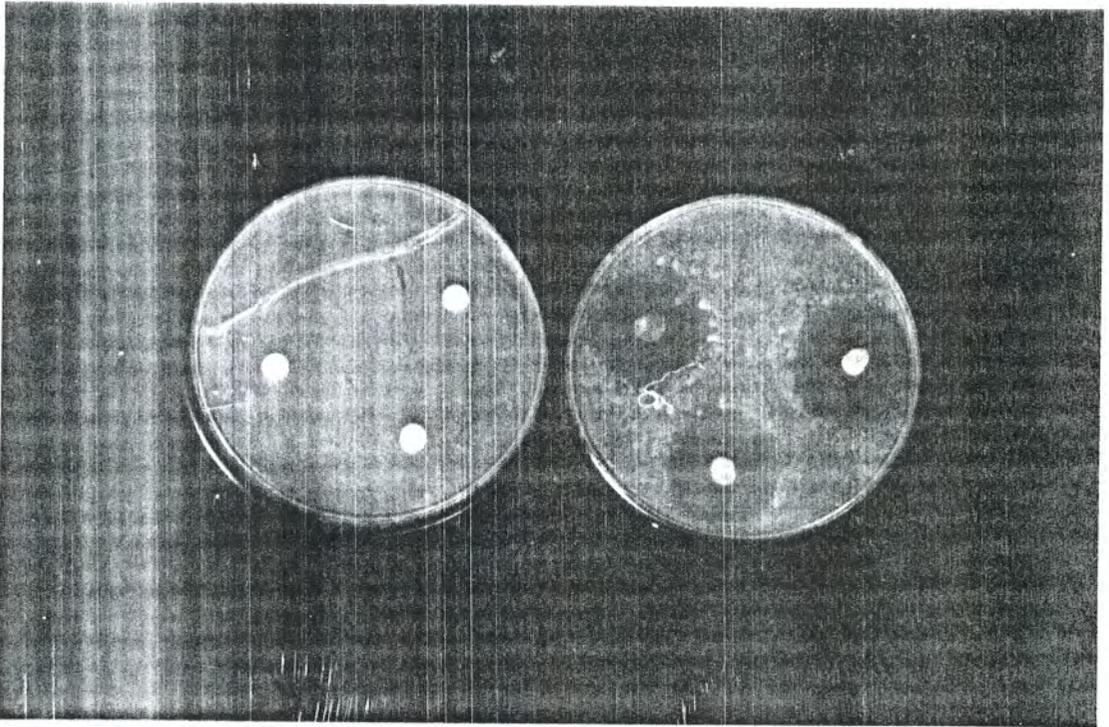
Remarquer la pigmentation rose pâle sur milieu Sabouraud.

T : Témoin



1

T



2

T

PLANCHE 7

ACTIVITÉ DE L'EXTRAIT DU FILTRAT DE CULTURE DE *T. NIVEA*

Fig . 1: Inhibition de la croissance de *S. hemolyticus* en présence de l'extrait méthanolique du filtrat de culture de *T. nivea* (après 24 h de culture)

Fig .2 : Inhibition de la croissance de *Klebsiella sp* en présence de l'extrait méthanolique du filtrat de culture de *T. nivea* (après 24 h de culture)

Fig. 3 : Inhibition de la croissance de *S. sclerotiorum* en présence de l'extrait méthanolique du filtrat de culture de *T.nivea* (après 5 jours de culture)

T : Témoin

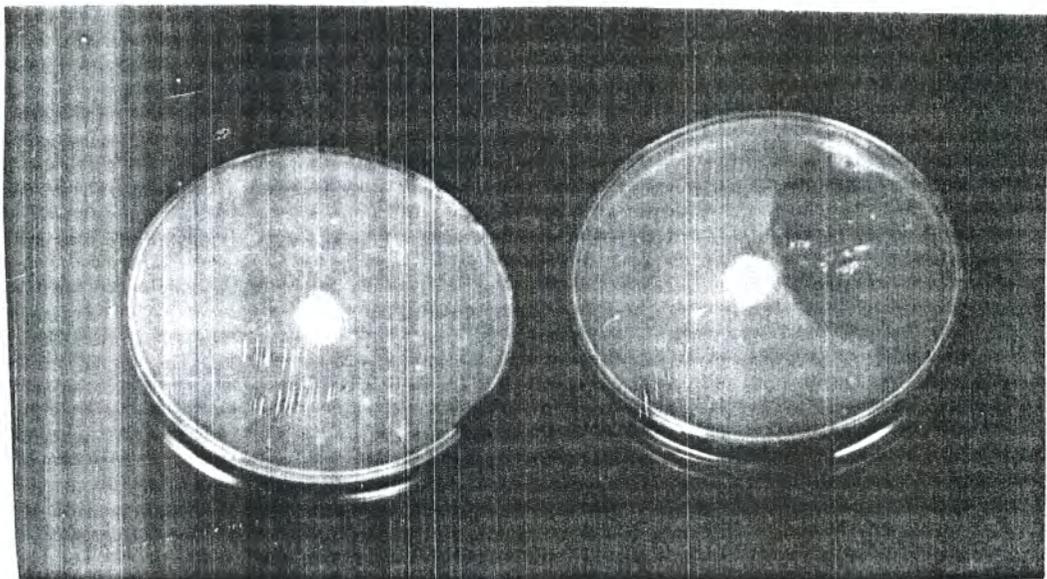
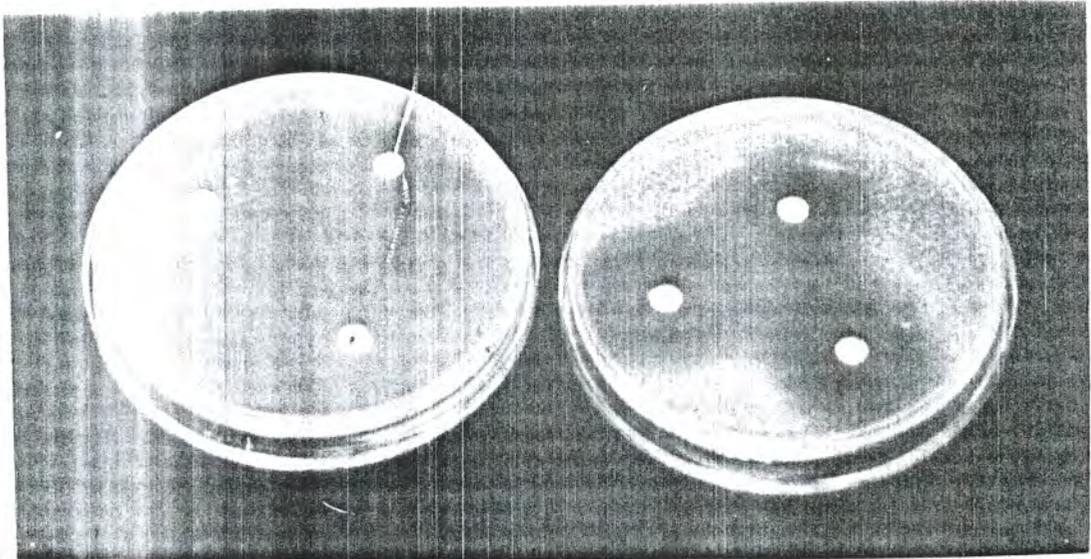
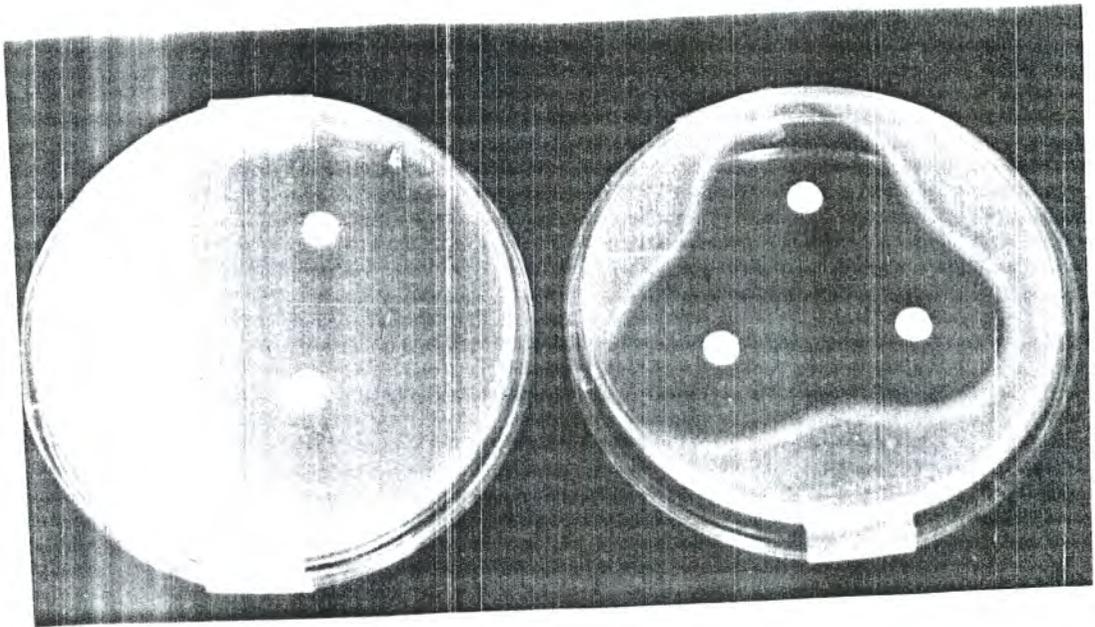


PLANCHE 8**MORPHOLOGIE DES HYPHES DES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES EN
PRESENCE DE L'EXTRAIT DU FILTRAT DE CULTURE DE *T.NIVEA*.**

Fig. 1 : Morphologie des hyphes de *S. sclerotiorum* présentant de nombreux renflements. G x 1600

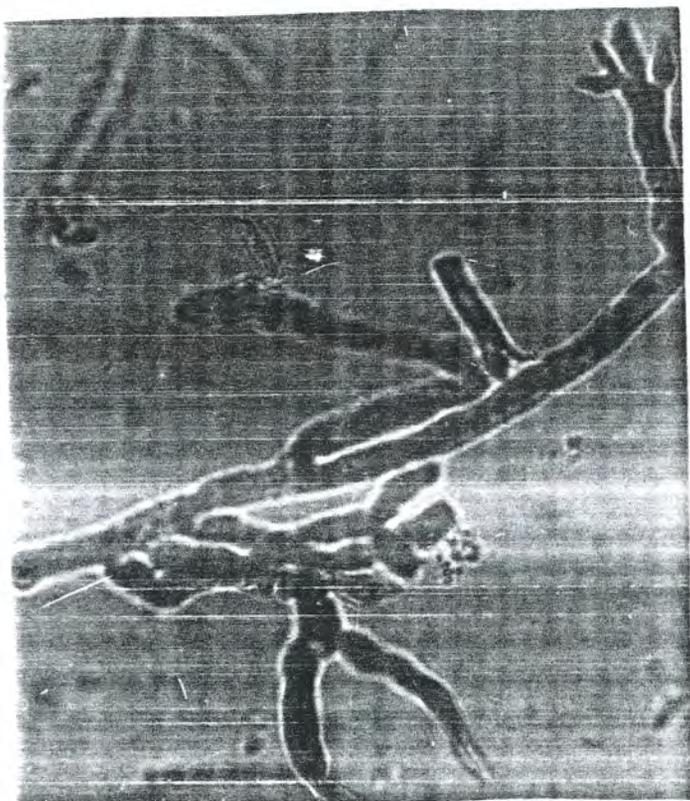
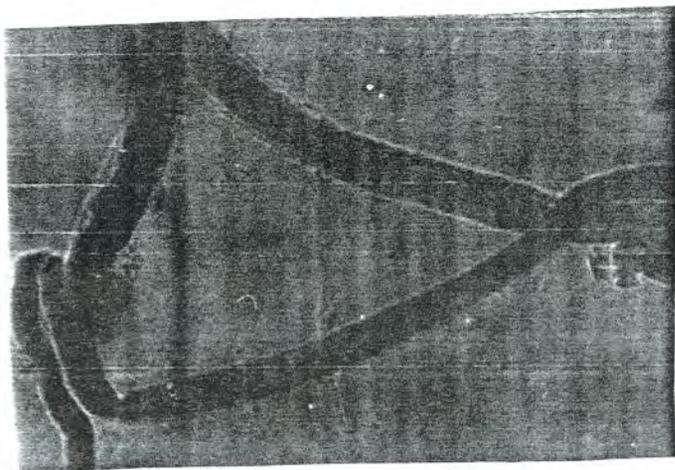
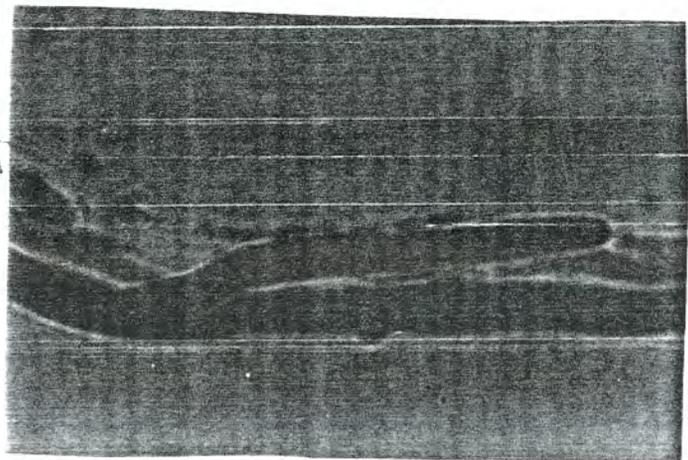
Fig. 2 : Hyphes de *S. sclerotiorum* témoin. G x 1600

Fig. 3: Hyphes de *Phytophthora* montrant de nombreuses ramifications. G x 1600

Fig. 4: Hyphes de *Phytophthora* témoin .G x 1600

Fig. 5: Hyphes de *Phoma* . G x 1600

Fig. 6: Hyphes de *Phoma* témoin . Gx 1600.



6 . Pouvoir antagoniste des deux espèces de *Tirmania* vis à vis des champignons phytopathogènes

6.1. Méthode de confrontation :

L'observation quotidienne des cultures a permis de suivre la croissance mycélienne des espèces fongiques confrontées .

Nous avons souvent remarqué que les espèces phytopathogènes confrontées, envahissent le mycélium de *T. pinoyi*. Par contre, avec *T. nivea*, trois espèces seulement sont en cause ; il s'agit de *Phomopsis*, *Claviceps* et *Armillaria mellea* . Le coefficient de croissance linéaire est souvent égal à 1 puisque les espèces phytopathogènes confrontées poussent aussi bien que les témoins. Pour *Phomopsis* confronté à *T. pinoyi* et *T. nivea*, ce coefficient est relativement supérieur à 1 (Tableau 4, Fig. 5).

Les mesures de la croissance sont effectuées au fur et à mesure de l'avancée des fronts mycéliens, elles sont arrêtées lorsque les deux fronts mycéliens entrent en contact. Les mesures de la croissance deviennent ensuite impossible à cause de l'interpénétration des mycéliums des 2 espèces fongiques confrontées, à l'exception de *A. mellea*, dont la croissance reste visible .

Nous avons d'ailleurs remarqué une inhibition de la croissance du mycélium des deux espèces de *Tirmania*, dès qu'il arrive à proximité de celui de *A. mellea*.

Les mycéliums de *Phoma*, *S. sclerotiorum* et *Phytophthora* en présence de *T. nivea* ont une croissance assez lente par rapport au témoin , leur coefficient de croissance linéaire est inférieur à 1 . Il est compris entre 0.50 et 0.70 pour *S. sclerotiorum*, 0,60 et 0,76 pour *Phytophthora*, 0,70 et 0,80 pour *Phoma* (Fig 5). La croissance de ces espèces s'arrête dès qu'elles sont en contact avec le mycélium de terpez . Dans ce cas , c'est le terpez qui envahit la culture mycélienne du champignon phytopathogène.

6.2. Méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) modifiée, essai double couche

Parmi les espèces fongiques testées , trois seulement présentent un retard de croissance mycélienne par rapport à celle de la culture témoin en présence du mycélium de *T. nivea*.

Les espèces testées par la méthode de DENNIS et WEBSTER ((1971 a) modifiée donnent des pourcentages d'inhibition allant de 44 à 52 % chez *Sclerotinia sclerotiorum*, de 30 à 42 % chez *Phytophthora* et de 13 à 31 % chez *Phoma* (Fig. 6)

Les espèces testées par la méthode de double couche en présence du mycélium de *T. nivea* donnent des pourcentages d'inhibition allant de 33 à 35,80 % chez *S. sclerotiorum*, 31 à 32 % chez *Phytophthora* et de 20 à 24 % chez *Phoma* (Fig.7).

Tableau 4: Coefficients de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes confrontés au mycélium de *T.pinoyi*.

Temps d'incubation (jours)	2ème jour	3ème jour	4ème jour	5ème jour	6ème jour	7ème jour
Coefficients de croissance mycélienne des espèces testées						
<i>S. sclerotiorum</i>	1	1.02				
<i>Claviceps</i>		1	1.10	1	1	
<i>Phytophthora</i>	1	1	1			
<i>Phomopsis</i>	1.30	1.45				
<i>Phoma</i>		1	1	1.12		
<i>A. mellea</i>			1	0.97	1.10	0.90

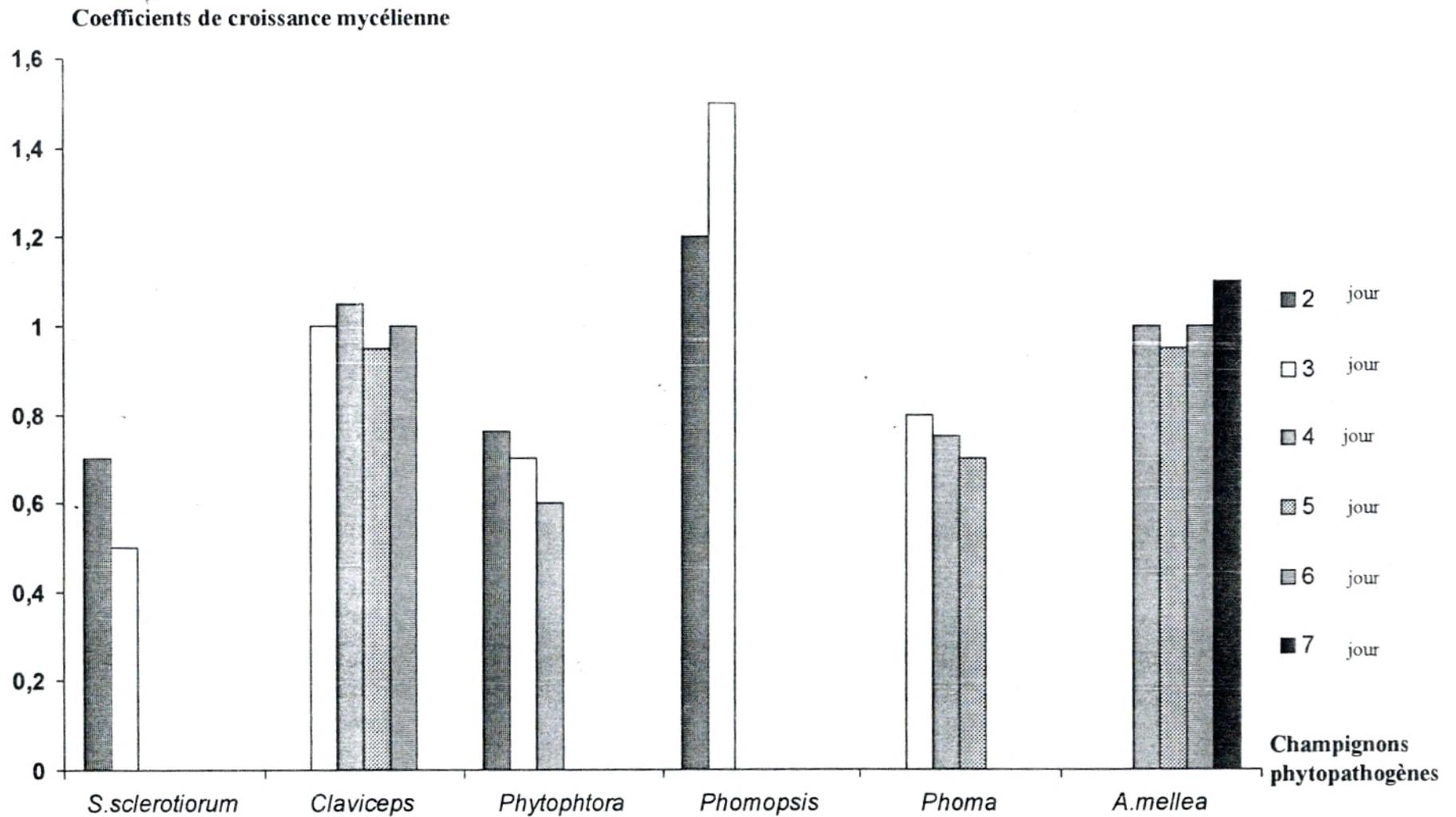


Fig.5 : Coefficient de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes confrontés au mycélium de *T. nivea*.

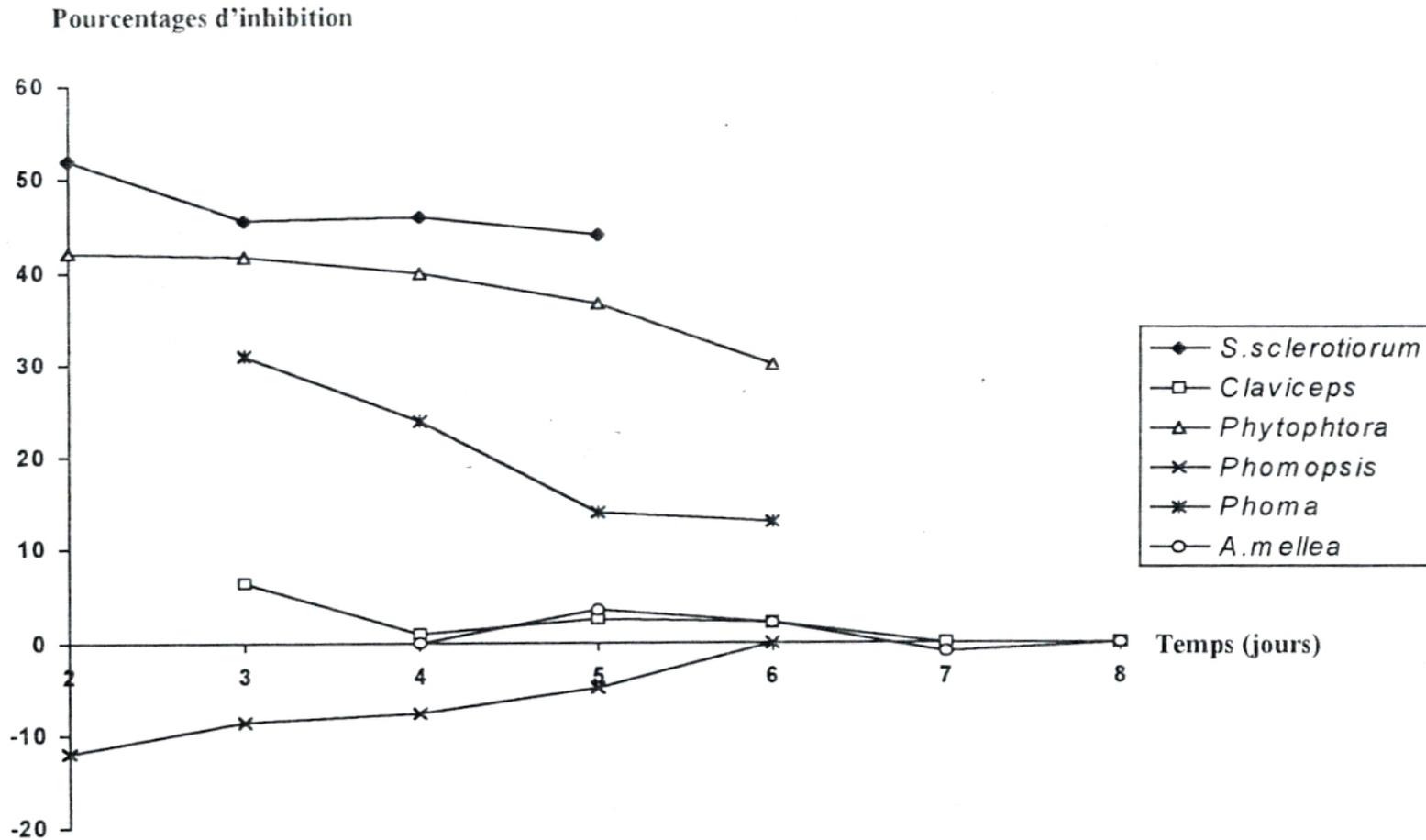


Fig.6 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes en présence de *T.nivea* par la méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) modifiée.

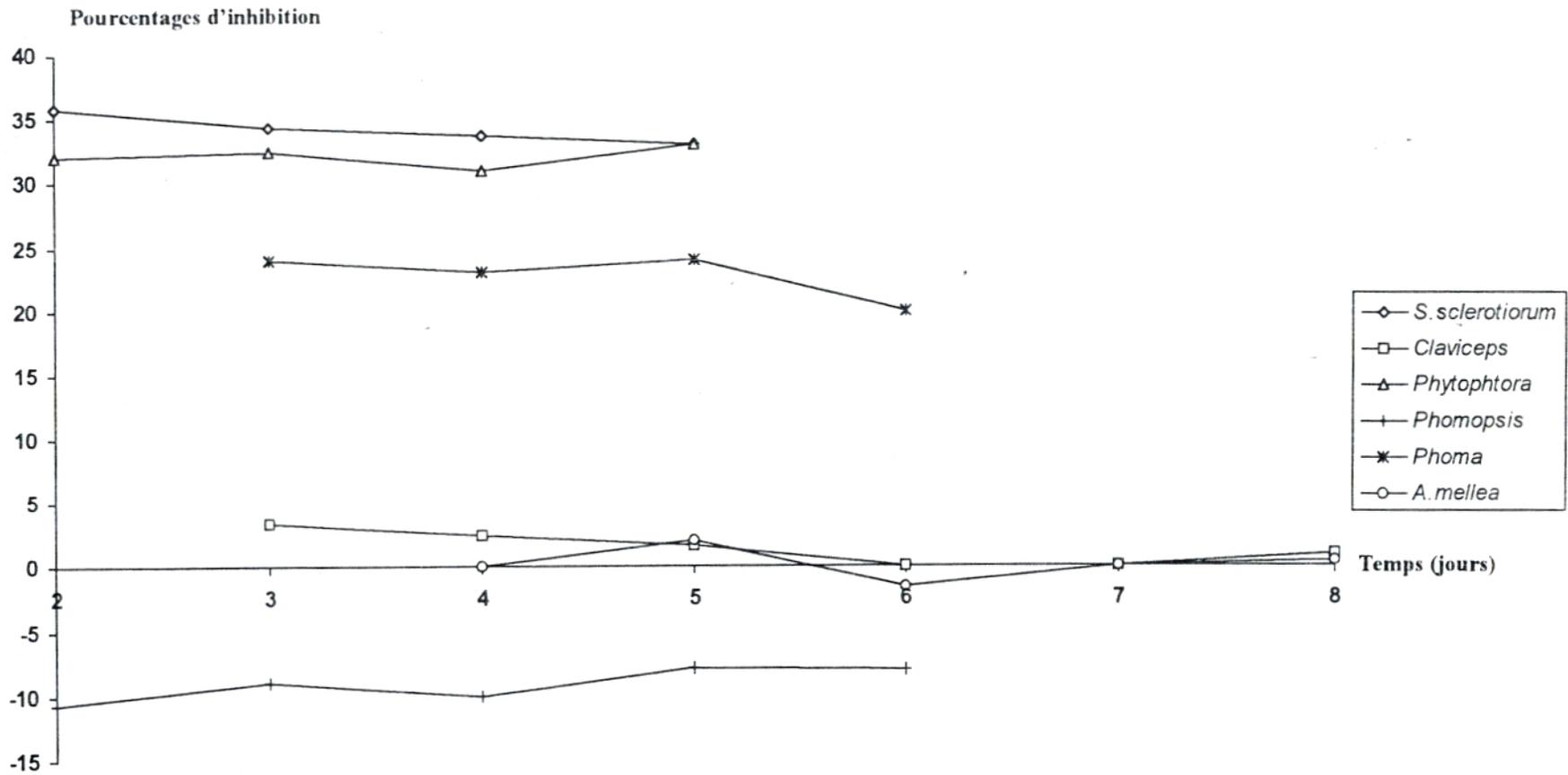


Fig.7 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes en présence de *T.nivea* (essai double couche).

Les deux autres espèces fongiques : *Claviceps* et *A.mellea* ont une croissance semblable à celle du témoin . Par contre, *Phomopsis* a une croissance plus rapide en présence des deux espèces de *Tirmania*.

L'espèce *T.pinoyi* a donné des pourcentages d'inhibition insignifiants (Tableau 5).

6.3. Test des inhibiteurs volatils :

Toutes les espèces testées ont une croissance analogue à celle de la culture témoin. Quelle que soit l'espèce de terfez utilisée, les pourcentages d'inhibition sont pratiquement insignifiants (Tableau 6).

6.4. Discussion :

Les tests réalisés ont permis de mettre en évidence chez *T.nivea*, l'existence de substances qui affaiblissent la croissance des mycéliums de trois espèces fongiques : *S.sclerotiorum*, *Phytophthora* et *Phoma* .

Les pourcentages d'inhibition observés avec la méthode de DENNIS et WEBSTER (1979 a) semblent être les plus élevés, *S. sclerotiorum* est l'espèce fongique la plus sensible , elle est suivie par *Phytophthora* puis par *Phoma* .

Les résultats obtenus montrent que les substances inhibitrices ont un effet marqué sur la croissance de ces trois espèces pendant les premiers jours d'incubation. Cette inhibition diminue au cours du temps, ce qui laisserait supposer que ces substances sont instables et qu'elles subissent une dégradation due soit à leur nature chimique ou bien à l'action des espèces fongiques phytopathogènes. Selon ASSELINEAU et ZALTA (1973), certains champignons possèderaient la capacité de synthétiser des enzymes qui inactivent l'antibiotique en modifiant sa structure chimique . SERRAIN (1985) a d'ailleurs remarqué le même phénomène en étudiant l'antagonisme de quelques souches de *Trichoderma* vis à vis de *Fusarium oxysporum*.

L'essai double couche donne des pourcentages d'inhibition plus faible mais plus constants dus probablement à la présence du mycélium de *T. nivea* dans le milieu de culture.

La méthode de confrontation n'a montré aucune zone d'inhibition bien définie, néanmoins, en présence de *T.nivea* , nous avons remarqué que *S. sclerotiorum* et *Phytophthora* poussaient très lentement en comparaison avec le témoin . Leur vitesse de croissance est d'autant moins rapide que la culture s'approche du terfez. La croissance de *Phoma* est également retardée mais de façon moins importante .

Il pourrait s'agir soit d'une mauvaise diffusion des substances inhibitrices, ou bien d'une inhibition faible. Selon PORTER (1924) avec cette technique, différentes interactions peuvent être observées. Il peut d'agir soit d'une inhibition forte avec l'apparition d'une zone claire qui sépare les deux colonies, ou bien d'une inhibition faible sans zone visible avec un arrêt de la croissance des colonies à la ligne de contact avec ou sans lyse hyphale.

Tableau 5 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes en présence de *T.pinoyi*.

Temps d'incubation (jours)	2ème		3ème		4ème		5ème		6ème		7ème		8ème	
	jour		jour		jour		jour		jour		jour		jour	
Pourcentages d'inhibition des especès testées	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
<i>S. sclerotiorum</i>	1.90	0	0	1.15	0.70	0	0	0						
<i>Claviceps</i>			0	1.80	2.50	2.50	1.70	0.41	0	0	0	0	0	0
<i>Phytophthora</i>	0	1.50	1.40	2.50	-1	0	1.70	0.50	0	0.41				
<i>Phomopsis</i>	-10.50	-8.66	-11	-8.30	-8.70	-10.50	-6	-6.50	-5.58	0				
<i>Phoma</i>			2.10	1.80	0	0	1.16	0	0	0				
<i>A.mellea</i>					2.50	2.10	1.10	-1	0	0	1	0.50	0.50	0.50

a : Par la méthode de DENNIS et WEBSTER (1971 a) modifiée .

b : Essai double couche

Tableau 6 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons phytopathogènes en présence des cultures mycéliennes de *T.nivea* et *T.pinoyi* (test des inhibiteurs volatils) .

Temps d'incubation (jours)	2ème jour		3 ème jour		4 ème jour		5 ème jour		6 ème jour		7 ème jour		8 ème jour	
	<i>T. nivea</i>	<i>T. pinoyi</i>	<i>T. nivea</i>	<i>T. pinoyi</i>	<i>T. nivea</i>	<i>T. pinoyi</i>	<i>T. nivea</i>	<i>T. pinoyi</i>	<i>T. nivea</i>	<i>T. pinoyi</i>	<i>T. nivea</i>	<i>T. pinoyi</i>	<i>T. nivea</i>	<i>T. pinoyi</i>
<i>S. sclerotiorum</i>	1.52	0	-0.95	1.30	0	-1.20	0	0						
<i>Claviceps</i>			0	1	1.90	0	0.22	0	0	0	0.70	0	1	0
<i>Phytophthora</i>	1.70	1.50	1.05	0	0	0	1.90	0	1	0				
<i>Phomopsis</i>	1	0	0	0	1.70	2.20	0.70	0	0.52	0				
<i>Phoma</i>			4	0.50	1.11	1.50	0	0.70	0.31	-0.50				
<i>A. mellea</i>					0	0	1.25	0	-0.95	1	0	0	0	0

Nous avons observé une légère modification morphologique des hyphes des champignons phytopathogènes en contact avec le mycélium de *T. nivea*. Ils présentent un cytoplasme quelque peu altéré, mais nous n'avons pas remarqué de phénomènes de mycoparasitisme (enroulement ou pénétration) comme l'ont montré ZHAO ZHIPENG *et al.* (1989) chez de nombreux champignons ectomycorrhiziens et DENNIS et WEBSTER (1971 c) chez les *Trichoderma*. Le diamètre important des hyphes de terfez ne permet sans doute pas leur pénétration dans les hyphes des espèces fongiques phytopathogènes.

L'espèce *A. mellea* inhibe la croissance des deux espèces de *Tirmania*, probablement par émission de substances antibiotiques. GUILLAUMIN (1983) a d'ailleurs préconisé l'utilisation de souches d'*A. mellea* non pathogènes comme un moyen de lutte biologique.

Tout comme avec le filtrat et son extrait, l'espèce *T. pinoyi* ne montre aucune activité sur les champignons testés.

Le retard de croissance observé chez les trois champignons phytopathogènes ne peut pas être dû à une carence du milieu de culture en éléments nutritifs, car le milieu malt est favorable à la croissance des champignons. D'un autre côté, les espèces fongiques cultivées en présence de *T. pinoyi* ne montrent aucun effet inhibiteur. Nous avons remarqué une croissance plus rapide de *Phomopsis* par rapport à celle du témoin. ROUGIEUX (1963) a d'ailleurs observé une stimulation de la croissance d'*Azotobacter chroococcum* en présence de *Terfezia boudieri* Chatin.

En ce qui concerne les substances inhibitrices volatiles, de nombreux auteurs (KRYWOLAP ET CASIDA, 1964; KRUPA et NYLUND, 1972; SCHISLER et LINDERMAN, 1989) ont mis en évidence leur production par les champignons mycorrhiziens. Dans le cas des terfez, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence de tels composés. Il faut toutefois être prudent quant à l'affirmation de leur inexistence.

OLIVIER et GERMAIN (1983) ont remarqué l'influence du milieu de culture sur la production de ces composés chez les *Trichoderma*. Sur milieu malt à 1 %, ces mêmes auteurs ont observé une très faible inhibition des espèces fongiques testées. En enrichissant ce milieu par incorporation de carboxyméthyl cellulose, l'effet inhibiteur est accru.

Le dispositif que nous avons utilisé présente un inconvénient majeur car pour introduire le champignon phytopathogène, on doit ouvrir les boîtes, par conséquent éliminer les composés volatils éventuellement produits. On ne peut donc mesurer que l'activité des gaz émis pendant la durée de confrontation. OLIVIER et GERMAIN (1983) ont remédié à cela en utilisant un dispositif en circuit fermé permettant l'accumulation des gaz. Il serait souhaitable d'effectuer une étude plus approfondie avec des dispositifs plus performants pour mettre en évidence la présence éventuelle d'une activité antifongique volatile chez les terfez.

7 . Analyses des divers extraits :

7.1.Analyse par C.C.M :

7.1.1 . Extraits de gléba de *T. nivea* et de *T. pinoyi* :

La révélation des chromatoplaques a permis de mettre en évidence la présence de différents composés dans les extraits de gléba de *T.nivea* et *T.pinoyi* . Leurs Rf sont notés dans les tableaux 7 et 8 et représentés dans les figures 10 et 11.

Nous avons remarqué que les extraits de *T.pinoyi* et de *T. nivea* , présentent 3 taches ayant des Rf identiques : Les taches 2, 6 et 7 pour *T.nivea* et 1, 3 et 4 pour *T.pinoyi* .

7.1.2. Extrait du filtrat de culture de *T. nivea*

La CCM a permis de mettre en évidence la présence de 4 composés ayant des Rf différents de ceux des extraits de gléba (Tableau 9, Fig. 12).

7.1.3 - Bioautographie des chromatoplaques :

La révélation microbiologique des chromatoplaques de l'extrait du filtrat de *T.nivea* a permis de déterminer 2 zones d'inhibition distinctes, au niveau des Rf de 0,250 et de 0,533 (Tableau 10).

Rhodotorula mucilaginosa est un germe qui diffuse un pigment caroténoïde qui donne une coloration rose pale au milieu Sabouraud. L'absence de développement fongique donc de pigmentation indique la présence des zones d'inhibition sur la chromatoplaque (Pl .9, Fig.1).

La bioautographie des chromatoplaques des extraits de gléba n'a révélé aucune zone d'inhibition de cette espèce levuriforme .

7.2. Fractionnement et analyse par HPLC :

Parmi les 3 fractions testées sur les micro-organismes, seule la dernière récupérée dans le méthanol est active .

Les zones d'inhibition observées sont relativement les mêmes que celles observées avec l'extrait du filtrat de *T .nivea* (Tableau 11).

L'analyse par HPLC a montré que cette fraction présente deux pics, donc 2 composés ayant le premier un temps de rétention de 4,86 mn et un pourcentage de 37,759 et le second présente un temps de rétention de 6,13 mn et un pourcentage de 62,241.(Fig.13) .

Tableau 7 : Chromatographie sur couche mince de l'extrait de gléba de *T.nivea* obtenu par soxhlet.

N° Des taches	Rf	Coloration des taches		
		Révélation chimique	UV.366 nm	UV.294 nm
1	0.166	bleu		
2	0.378	bleu	violet	violet
3	0.405	marron	violet	
4	0.486	marron	violet	violet
5	0.810	marron	jaune	
6	0.918	bleu		
7	0.970	rouge		

Tableau 8 : Chromatographie sur couche mince de l'extrait de gléba de *T.pinoyi* obtenu par soxhlet.

N° Des taches	Rf	Coloration des taches		
		Révélation chimique	UV.366 nm	UV.294 nm
1	0.378	bleu	violet	violet
2	0.891	marron	jaune	
3	0.918	bleu	violet	
4	0.970	rouge		

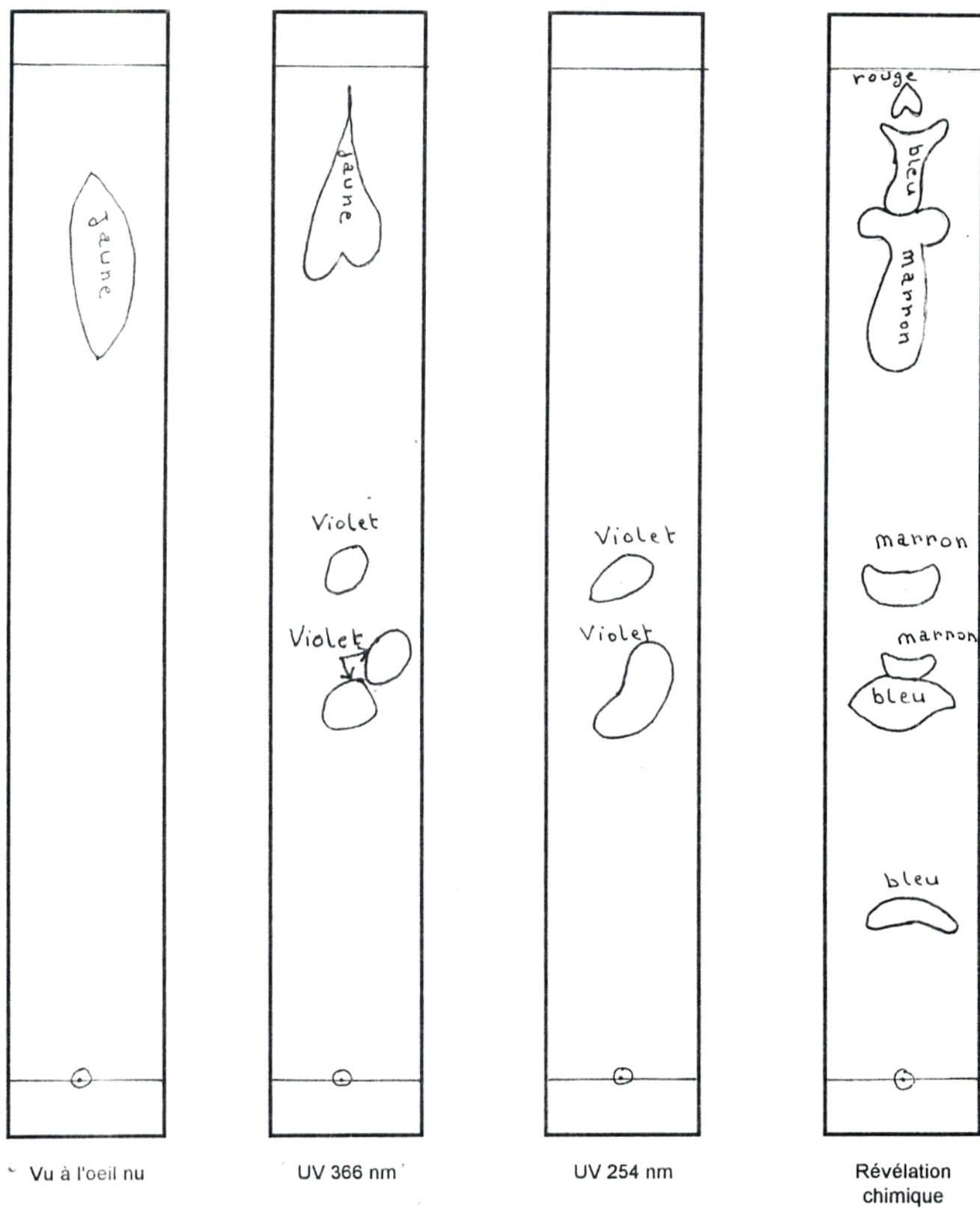


Fig .10 : Analyse chromatographique sur couche mince de l'extrait de gléba de *T.nivea* obtenu par soxhlet .

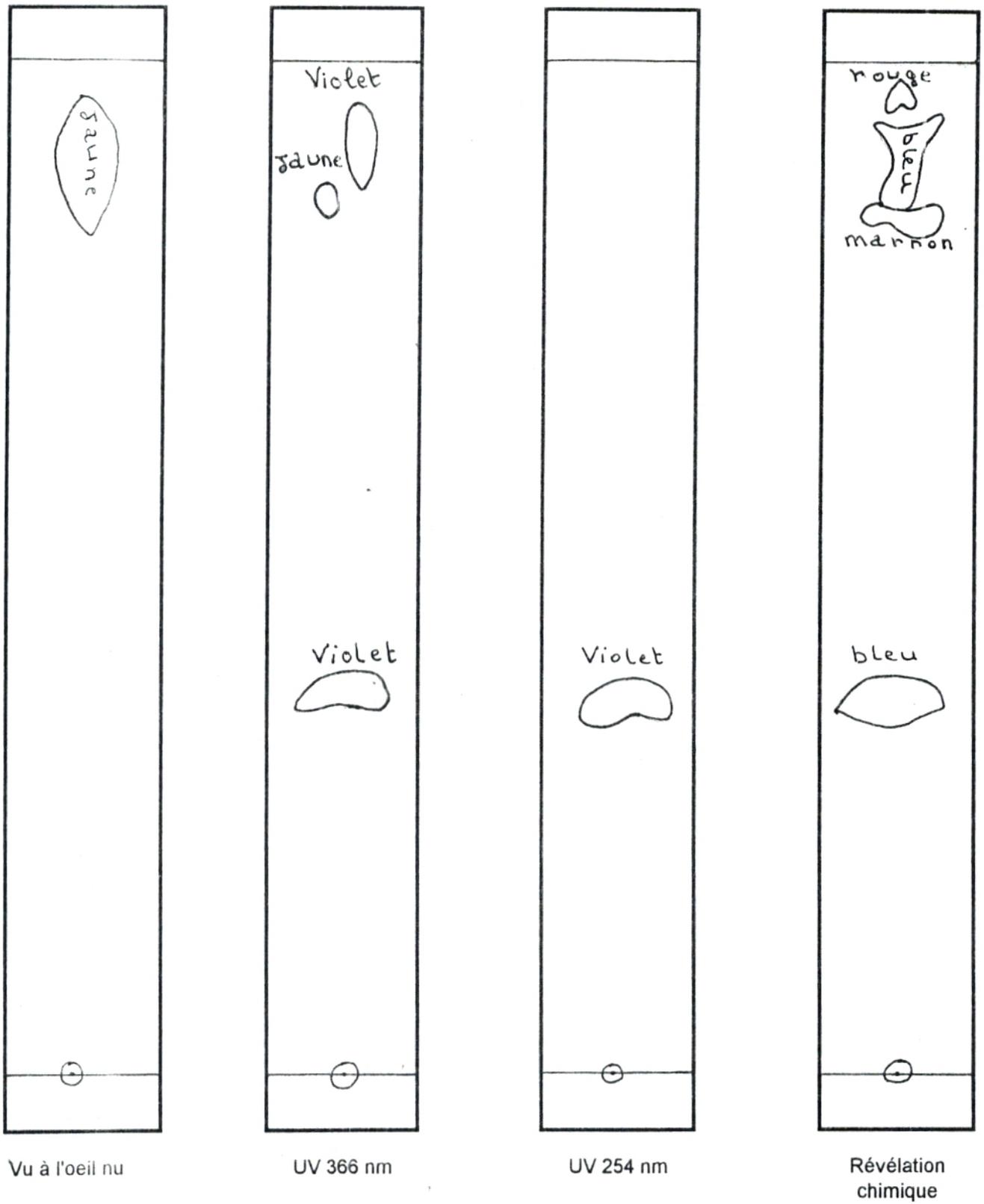


Fig . 11 : Analyse chromatographique sur couche mince de l'extrait de gléba de *T. pinoyi* obtenu par soxhlet .

Tableau 9 : Chromatographie sur couche mince de l'extrait du filtrat de *T.nivea*.

N° Des taches	Rf	Coloration des taches		
		Révélation chimique	UV.366 nm	UV.294 nm
1	0.250	marron	violet	
2	0.533	marron	violet	
3	0.866	bleu		
4	0.944	marron	jaune	jaune

Tableau 10 : Valeur des Rf des zones d'inhibition de l'extrait du filtrat de culture de *T.nivea* obtenus par bioautographie.

N° des taches	Rf des zones d'inhibition	Diamètre des zones d'inhibition
1	0.250	20
2	0.533	22

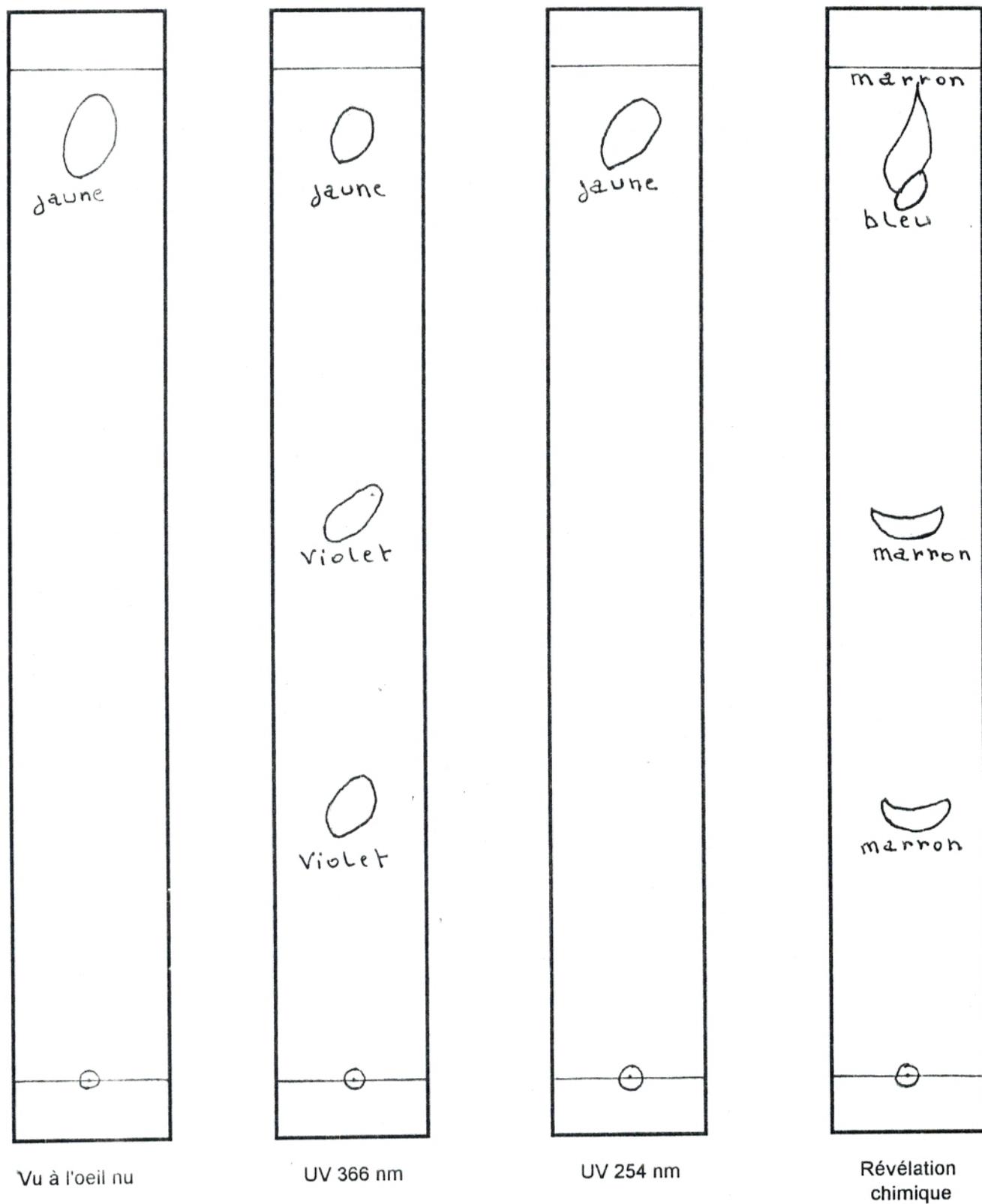
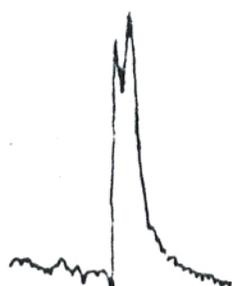


Fig .12 : Analyse chromatographique sur couche mince de l'extrait du filtrat de culture de *T.nivea*.

Tableau 11 : Activité de la 3^{ème} fraction de *T.nivea* obtenue par chromatographie sur colonne.

Diamètres des zones d'inhibition (mm)	Extrait
Espèces testées	
<i>P. fluorescens</i>	29
<i>E.coli</i>	28.55
<i>S.aureus</i>	14
<i>P.aeruginosa</i>	30
<i>P. mirabilis</i>	26.70
<i>S.typhi</i>	30.80
<i>Klebsiella sp</i>	18
<i>S. hemolyticus</i>	29.75
<i>C.albicans</i>	25
<i>R.mucilaginosa</i>	25.70
<i>S.sclerotiorum</i>	30
<i>Phytophthora</i>	27.16
<i>Phoma</i>	15



FILE 1.	METHOD 2.	RUN 16.	INDEX 16
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	37.759	4.86	1138711 62
2	62.241	6.13	327114 02
TOTAL	100.		2138845

Fig.13 : Analyse par H.P.L.C. de la fraction active

7.3 - Discussion :

L'analyse par CCM des différents extraits a permis de tirer les conclusions suivantes : Les extraits obtenus à partir de la gléba des deux espèces de *Tirmania* et du filtrat de culture de *T. nivea* semblent différents, puisque les valeurs des Rf sont différentes .

Quant aux extraits inhibiteurs obtenus à partir de la gléba de *T.nivea* et de *T.pinoyi* nous n'avons pas pu déterminer s'ils sont identiques ou non puisque la révélation microbiologique des chromatoplaques a été impossible et les Rf des composés inhibiteurs n'ont pas pu être déterminés ; ces derniers sont probablement volatils ou présents en faible quantité .

La HPLC a d'ailleurs confirmé les résultats de la bioautographie, la seule fraction active de l'extrait du filtrat de *T.nivea* présente 2 pics donc deux composés ayant des pourcentages différents .

PLANCHE 9

Fig.1 : Révélation microbiologique de la chromatoplaque de l'extrait méthanolique du filtrat de culture de *T.nivea* .
Remarquer les deux zones d'inhibitions de *R. muciliginosa* .

QUATRIEME PARTIE
CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail nous avons essayé de mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique des extraits de gléba et des filtrats de culture de deux espèces de terpez appartenant au genre *Tirmania*, ainsi que leur pouvoir antagoniste vis à vis des champignons phytopathogènes.

Les isolements du mycélium des deux espèces fongiques à partir d'ascocarpes ont permis d'étudier quelques caractéristiques de la germination des ascospores. Cette dernière est caractérisée par une phase de latence d'origine inconnue et variable selon les espèces de terpez. FORTAS (1990) et FORTAS et CHEVALIER (1992 b) sont d'ailleurs arrivés à la même conclusion.

Les mycéliums isolés ont une croissance lente sur les milieux gélosés ou liquides comme c'est le cas des *Tuber* (GRENTE *et al.* 1972) et de tous les champignons mycorhiziens.

La possibilité de cultiver le mycélium sur le milieu malt à 1% liquide avec agitation nous a permis d'effectuer différents tests biologiques.

Les tests d'antagonisme vis à vis des champignons phytopathogènes ont montré que le mycélium de *T.nivea* est un bon antagoniste probablement par la production de substances antibiotiques ayant des propriétés antifongiques . L'espèce *Sclerotinia sclerotiorum* présente la plus forte inhibition.

Au contraire, le mycélium de *T.pinoyi* ne montre aucune activité antagoniste. Comme *T.nivea*, cette espèce semble exercer une action stimulante sur la croissance de *Phomopsis*, probablement par l'élaboration de facteurs de croissance.

L'activité des extraits de gléba semble être différente de celle du filtrat de culture. Les extraits de gléba des deux espèces de terpez inhibent la croissance des espèces bactériennes et levuriformes uniquement.

L'extrait du filtrat de *T.nivea* est actif après 1 mois de culture sur toutes les espèces bactériennes, levuriformes et sur certains champignons phytopathogènes tel que *S. sclerotiorum* qui présente la meilleure inhibition. Ces résultats rejoignent ceux observés dans les tests d'antagonisme.

Pour l'espèce *T.pinoyi*, seuls les extraits obtenus à partir de la gléba sont actifs.

Par ailleurs, l'analyse par CCM a confirmé la différences entre les extraits de gléba et ceux du filtrat de culture de *T. nivea*.

Les résultats obtenus par la bioautographie et l'analyse par HPLC ont montré que la fraction active est constituée de deux composés de nature inconnue.

Outre leur importance alimentaire, les terpez pourraient être utilisés en médecine humaine étant donné leurs remarquables propriétés antibactériennes. Mais avant d'envisager leur utilisation, il est nécessaire d'optimiser la production des composés inhibiteurs sur des milieux de culture plus favorables à la croissance de

ces champignons et de caractériser les molécules actives en utilisant des techniques de pointe comme la HPLC couplée au spectre de masse, la RMN, la diffraction aux rayons X... et enfin comparer les résultats obtenus avec une banque de données des antibiotiques pour déterminer s'il s'agit de molécules nouvelles.

Ainsi, nous avons pu apporter des éléments nouveaux sur le pouvoir antibactérien et antifongique des terfez.

La mise en évidence de leurs propriétés antifongiques permettrait aux terfez de jouer un rôle dans la protection des plantes hôtes vis à vis des agents phytopathogènes comme c'est le cas chez de nombreux champignons ectomycorhiziens.

Il serait donc intéressant de tester d'autres espèces fongiques phytopathogènes *in vitro* et peut-être même de faire une étude *in situ* afin de vérifier si dans la nature les terfez sont de bons antagonistes.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDELLAH, N.Y., HASSAN, Y.M., MOSSA, J.S. et AL-YAHYA, M.A. (1979).- Studies on the nutritive value of Saudi truffles and the possibility of their preservation by canning, Proc. 2nd Arab Conf. Food Sci. Technol: 369-379.
- ACKERMAN, L.G., VAN WYK, P.J. et du PLESSIS, L.M. (1975). - Some aspects of the composition of the Kalahari truffle or N'abba, S.A. Food Rev., **2** : 145 - 146.
- AL-DELAIMY, K.S. (1977). - Protein and amino acid composition of truffles, Can. Inst.Food. Sci. Technol. J.,**10** : 221 - 222.
- AL-DELAIMY, K.S et ALI, S.H .(1970). - Storage, Spoilage and proximate food composition of Iraqi truffles, Bejr Trop Subtrop Tantiwirt Tropenreterinar med., **8** : 7781- 7782.
- AL-MAADHIDI, J.F. (1976). - Properties of antibiotic produced by *Aspergillus candidus* isolated from Baghdad area, Thesis for the degree of Master of science in Botany / Mycology , 66 p.
- AL-SHABIBI, M.M.A., TOMA, J.S. et HADDAD, B.A. (1982).- Iraqi truffles. Proximate analysis and characterisation of lipids, Can .Inst . Food Sci. Technol J. ,**15** : 200 - 204.
- ALSHEIKH, A. M., et TRAPPE, J.M .(1983). - Desert truffles : the genus *Tirmania*. Trans . br. Mycol. Soc. , **8** : 83 - 90.
- ALVAREZ, I.F., PARLADE.J. et TRAPPE. J.M (1992) . - *Loculotuber gennadii* Gen et Comb. Nov. and *Tuber multimaculatum* sp , Nov. Mycol., **84** : 926 - 929
- ANKE, T . et OBERWINKLER, F. (1977). - The strobilurins- new antifungal antibiotics from the basidiomycète *Strobilurus tenacellus* , J. antibiotics, **30** : 806 - 810.
- ASSELINAU, J. et ZALTA, J.P. (1973) . - Les antibiotiques : Structure et Exemples de mode d'action, Ed, Hermann, Paris , 359 p.
- AUDIGIE, CL. , DUPONT , G. et ZONZAIN, F. (1982). - Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tome 1, Ed. Doin , Paris ,190 p.
- AWAMEH, M.S. et ALSHEIKH, A .(1979 a) . - Laboratory and field study of four kinds of truffle, *Terfezia* and *Tirmania* species, for cultivation,Mush. Sc., **10** : 507 - 517
- AWAMEH, M.S. et ALSHEIKH, A. (1979 b). - Characteristics and ascospore germination of white kame (*Tirmania nivea* and *T. pinoyi*), Ann. Phytopathol.,**11** : 223 - 229.

- AWAMEH , M.S., ALSHEIKH, A . et GHAWAS, S. (1979). - Mycorrhizal synthesis between *Helianthemum ledifolium*, *H. salicifolium* and four species of genera *Terfezia* and *Tirmania* using ascospores and mycelial cultures obtained from ascospores germination, Proc . 4th North Amer. Conf on Myc., Fort collins, Collorado, U.S.A.
- BELLAHCENE, M (1990) . - Antagonisme de dix souches de *Trichoderma* vis à vis de trois formes spéciales de *Fusarium oxysporum*. Thèse de Magister, Univ. d'Oran Es-Senia , 77 p.
- BESSAIH, A. (1994). - Isolement, identification et étude de la germination de trois espèces de terfez d'Algérie, Mémoire de D.E.S., Univ. Oran Es-Senia, 49 p.
- BIOMERIEUX (1986) . - Bactériologie - AntibioGramme : 119 - 122 .
- BOCKOWSKA, B.O, et ESCOULA, L. (1977). - Production de la patuline en milieu liquide par des moisissures appartenant aux genres : *Aspergillus* et *Penicillium*, Ann . Rech . Vét., **8** :129 - 133.
- BOKHARY, H.A . , SULEIMAN , A.A.A. et BASALAH , M.O. (1989) . - The fatty acid component of the desert truffle « al kamah » of Saudi Arabia, J. Food. Protec ., **9** : 668 - 669.
- BOKHARY , H.A., SULEIMAN, A.A.A. , BASALAH, M.O. et PARVEZ. S. (1987).- Chemical composition of desert truffles from Saudia Arabia , Can Inst. Food. Sci. Technol., **5** : 336 - 341.
- BONDOUX, P. et PERRIN, R. (1982) . - Mycorhizes et protection des plantes, C.R. Acad . Agr. Fr., **68** : 1162 - 1177.
- BONFANTE - FASOLO, P. , GIANINAZZI - PEARSON, V. , SCANNERINI, S. et GIANINAZZI. S. (1986) . - Analyses ultrastructurales des interactions entre plantes et champignons au niveau cellulaire dans les mycorhizes , Physiol . Veg., **24** : 245 - 252.
- BOUCHAREB, F.(1994) . - Etude écologique des terfez , cas de la région de Aïn Sefra, Mémoire de D.E.S.,Univ. de Mostaganem , 81 p.
- BOUGHDAOUI , L. (1984) . - Etude sur les mycorhizes du pin d'alep (*Pinus halepensis*) Mill , Thèse de Magister en sciences agronomiques, I.N.A Alger , 79 p.
- BOUSSIR, A. (1992) . - Identification de 4 espèces de terfez d'Algérie et étude des caractéristiques de leur germination, Mémoire de D.E.S., Univ. Oran Es-Senia , 49 p.

- BOUTIBA , S. (1992) . - Contribution à l'étude de l'activité antibiotique par une souche de *Bacillus subtilis* , Mémoire de D.E.S., Univ. de Sétif,70 p.
- CHATIN, A. (1892) . - La truffe , Lib. J.B. BAILLIERE et Fils, Paris , 372 p.
- CHEVALIER , G. (1972) . - Obtention de cultures de mycélium de truffe à partir du carpophore et des mycorhizes, C.R. Acad . Agr . Fr., **58** : 981 - 989.
- CHEVALIER , G. , RIOUSSET , L. , DEXHEIMER , J. et DUPRE , C. (1984) . - Synthèse mycochizienne entre *Terfezia leptoderma* Tul. et diverses Cistacées , Agronomie , **4** : 210 - 211
- DALI YOUCEF, N.(1994) . - Contribution à l'analyse des hydrocarbures polluant la nappe phréatique de Remchi . Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse, Thèse de Magister en chimie organique. Univ.de Tlemcen , 93 p .
- DEHNE , H.W. (1982) . - Interactions between vesicular arbuscular mycorrhizal and plant pathogens, *Phytopatologische Zeitung*, **72** : 1115 - 1119.
- DELMAS, J. (1989) . - Les champignons et leur culture, Ed. Flammarion, la maison rustique, Paris , 969 p.
- DENNIS , C. , WEBSTER , J. (1971 a) . - Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* . II - production of non volatile antibiotics, *Trans. Br. Mycol . Soc.*, **57** : 25 - 39.
- DENNIS , C . WEBSTER , J. (1971 b) . - Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. II - production of volatile antibiotics, *Trans . Br. Mycol. Soc.*, **57** : 41 - 48.
- DENNIS, C. WEBSTER, J. (1971 c) . - Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* . II - Hyphal interaction, *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **57** : 363 - 369.
- DEXHEIMER, J. , GERRARD, J. , LEDUC , P. et CHEVALIER, G (1985) . - Etude ultrastructurale comparée des associations symbiotiques mycorrhiziennes *Helianthemum salicifolium* - *Terfezia claveryi* et *Helianthemum salicifolium* - *Trefezia leptoderma*, *Can . J. Bot .*,**63** : 582 - 591.
- DEYSSON, G., DELCOURT, A.(1980) .-Cryptogamie (mycologie générale et appliquée), Ed. C.D.U et SEDES, Paris, 409 p.
- DONADINI, J.C. (1979) . - Les champignons hypogés des iles d'Hyères (Ascomycètes et Basidiomycètes), *Trav. Sci. Parc nation. Port - Cros.*, **5** : 9 - 18

- DONADINI, J.C.(1983) . - Etude des Discomycètes.Critères taxonomiques des Pezizales et Tubérales, Bull. Soc. Linn. Provence, **35** : 53 - 73.
- DUCHESNE , L.C., et PETERSON, R.L., ELLIS, B.E. (1987). - Interactions between the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* et *Pinus resinosa* induces resistance to *Fusarium oxysporum*. Can. J. Bot ., **66** : 558 - 562.
- DUCHESNE , L.C. , PETERSON, R.L . , ELLIS , B.E.(1988) . - The accumulation of plant produced antimicrobial compounds in response to ectomycorrhiza fungi, Phytoprotection , **68** : 17 - 27.
- ENSAA - INRA - INRAP (1985) . - Les mycorrhizes , Ed. INRAP - SED , Dijon.
- EWAZE , J.O. et AL-NAAMA , M .(1989) . - Studies en nitrogen métabolism of *Terfezia spp.* and *Tirmania spp*, New Phytol . , **12** : 419 - 422.
- FALLAHYAN, F.(1973) . - Contribution à la flore mycologique de l'Iran. Macromycètes, Rev. Mycol ., **38** : 243 - 244.
- FISHER, E.(1897) . - Ascomyceten : Tubereen und Hemiasceen. In Rabenhort's Kryptogamen Flora Von Deutschland , **1** : 1 - 131.
- FORTAS, Z.(1990) . - Etude de trois espèces de terfez : caractères cultureux et cytologie du mycélium isolé et associé à *Helianthemum guttatum*, Thèse de Doctorat d'état .Univ.d'Oran Es-Senia, I.N.R.A Clermont - Ferrand , 166 p.
- FORTAS , Z. et CHEVALIER . G. (1988) . - Effet des conditions de culture sur la mycorrhization d'*Helianthemum guttatum* , par 3 espèces des genres *Terfezia* et *Tirmania* (Truffes du Désert), 2 ème cong. Int. Tartufo, Spoleto, Italie : 197 - 200.
- FORTAS , Z .et CHEVALIER . G. (1992 a) . - Effet des conditions de culture sur la mycorrhization d'*Helianthemum guttatum* par trois espèces de terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* , Can. J. Bot ., **70** : 2453 - 2460.
- FORTAS , Z. et CHEVALIER, G. (1992 b) . - Caractéristiques de la germination des ascospores de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe , récolté en Algérie , Cryptogam . Mycol., **13** : 21 - 29 .
- GIANINAZZI - PEARSON , V. et GIANINAZZI , S. (1986) . - The physiology of improved phosphate nutrition in mycorrhizal plants . In : Physiological and genetical aspects of mycorrhizae , 1st ESM on Mycorrhizae, Eds . V . GIANINAZZI -PEARSON , S. GIANINAZZI , I.N.R.A., Paris, 101 -109 .

- GILKEY , H.M. (1939) . - Tuberales of North America . Oregon state monogr .
New in Bot . , **1** : 1 - 63 .
- GILKEY , H.M. (1947) . - New or otherwise noteworthy species of Tuberales ,
Mycologia , **39** : 441 - 452 .
- GREUTE , J. , CHEVALIER , G. et POLLACSEK , A. (1972) . - La germination
de l'ascospore de *Tuber melanosporum* et la synthèse sporale
des mycorhizes , C.R. Acad . Sci. , Paris , **275** : 743 - 746 .
- GUILLAUMIN, J.J. (1983) . - Antagonisms between the different species
composing the *Armillaria mellea* group In : Les antagonismes
microbiens . Modes d'action et application à la lutte biologique
contre les maladies des plantes, colloques de l'I.N.R. A, Dijon,
18 : 193 - 199.
- HADLEY , G. (1975) . - Organisation and fine structure of orchid mycorrhiza. In :
Endomycorrhizas, Eds. F.E. SANDERS , B. MOSSE, P.B.
TINKER. Academic Press , London , New York , 335 - 351.
- HALOUBI , A. (1988) . - Les plantes des terrains salés et désertiques, vues par
les anciens Arabes : Confrontation des données historiques avec
la classification des végétaux, leur état et leur répartition actuels
en proche Orient, thèse de doctorat . Acad. Montpellier , 417 p.
- HARLEY, J.L. (1969) . - The biology of mycorrhiza. Leonard Hill. London , 334 p
- HEIM , R. (1934) . - Observation sur la flore mycologique Malgache : Présence
du genre *Terfezia* à Madagascar, Ann. Cryptogam exot . , **7** : 5- 8.
- HEIM, J. et ANKE, T. (1988) . - Antibiotics from Basidiomycètes. XXIX : Pilatin,
a new antibioticly active marasmane derivative from cultures of
Flagelloscypha pilatii agerer, J. Antibiotics, **12** : 1752 - 1757.
- IMAI , S. (1933) . - On two species of Tuberaceae , Proc. Imp. Acad . (Tokyo) ,
9:182 - 189.
- JANEX - FAVRE , M.C. et PARGUEY - LEDUC , A. (1985) . - Les asques et les
ascospores de *Terfezia claveryi*, Cryptogam . Mycol . , **6** : 87 - 99.
- JANEX - FAVRE , M.C. , PARGUEY - LEDUC , A. et RIOUSSET , L. (1988) . -
L'ascospore hypopé d'une terfez française (*Terfezia leptoderma*
Tul.Tubérales ,Discomycètes) ,Bull .Soc .Mycol . Fr.,**104** :145-178 .
- KOPE , H.H. et FORTIN , J.A. (1989) . - Inhibition of phytopathogenic fungi *in*
vitro by cell free culture media of ectomycorrhizal fungi , New
Phytol . , **113** : 57 - 63 .

- KORF , R.P. (1973) . - Discomycetes and Tuberales . In : The fungi an Advanced Treatise , Eds . G.C. AINSWORTH , F.K . SPARROW , A.S. SUSSMAN . Academic Press , New York , London , 249 - 319 .
- KRUPA , S. et NYLUND , D.E. (1972) . - Studies on ectomycorrhizae of pine. III - Growth inhibition of two root pathogenic fungi by volatile organic constituents of ectomycorrhizal root systems of *Pinus sylvestris* L , Eur . J . For Pathol . , **3** : 194 - 200.
- KRYWOLAP , G.N. et CASIDA , L.E. (1964) . - An antibiotic produced by the mycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme* , Can . J . Microbiol . , **3** : 365 - 370.
- KRYWOLAP , G.N., GRAND , L.F. et CASIDA , L . E. (1964) . - The natural occurrence of an antibiotic in the mycorrhizal fungus *Cenococcum graniforme* , Can . J . Microbiol . , **10** : 323 - 328.
- KULIFAJ , M. (1984) . - *Tuber melanosporum* Vitt: Contribution à l'étude de la morphogénèse et de la physiologie de l'ascocarpe, Thèse de Doctorat 3ème cycle - Univ . P. Sabatier , Toulouse, 72 p.
- KUPKA , J . , ANKE , T. et OBERWINKLER , F. (1979) . - Antibiotics from Basidiomycetes . VII Crinipellin , A new antibiotic from Basidiomycetes fungus *Crinipellis stipitaria* (Fr) Pat , J . antibiotics, **2** : 130 - 135.
- LARPENT , J.P. et SANGLIER , J.J. (1989) . - Biotechnologie des antibiotiques , Ed. Masson, Paris, Milan, Barcelone , Mexico , 472 p.
- LAUER , U. et ANKE , T. (1989) . - Antibiotics from Basidiomycetes . XXXI. Aleurodiscal : An antifungal sesterpenoid from *Aleurodiscus mirabilis* (Berk et Curt) Höhn , J. Antibiotics, **6** : 875 - 882.
- LEDUC , J.P., DEXHEIMER, J. et CHEVALIER, G. (1986) . - Etude ultrastructurale comparée des associations de *terfezia leptoderma* avec *H. salicifolium* , *Cistus albidus* et *Cistus salviaefolius* . In : Aspects physiologiques et génétiques des mycorrhizes . 1er SEM sur les mycorrhizes , Eds . V . GIANINAZZI - PEARSON , S. GIANINAZZI . INRA , Paris, 291 - 294 .
- LEI , J. et DEXHEIMER , J. (1986) . - Etude de l'organisation ultrastructurale de vitroplants de chênes (*Quercus robur* L.) , Biology of the cell , **57** : 4 a.
- LETACON , F. et BOUCHARD , D. (1990) . - Les possibilités de mycorrhization contrôlée en sylviculture tempérée, Recherche . Forêt . Entreprise, **74** : 29 - 42.

- MAIRE , R. (1906) . - Notes mycologiques, Ann . Mycol., **4** : 329 - 335.
- MALENÇON, J. (1938) . - Les truffes européennes . Historique . Morphogénie. Organographie. Classification. Culture, Rev. Mycol., **3**: 1-92.
- MALENÇON, G. (1973) . - Champignons hypogés du Nord de l'Afrique , Persoonia , **7** : 261 - 288.
- MARASAS , W.F.O , et TRAPPE, J.M. (1973) . - Notes on Southern African Tuberales , Bothalia, **11** : 139 - 141.
- MARKS , G.C. et FOSTER , R.C. (1973) . - Structure , morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizae. In : Ectomycorrhizae , their ecology and physiology , Eds . G . C. MARKS, T.T . KOZLOWSKI. Academic Press, New York , London , 1 - 41.
- MARX , D.H. (1968) . - The influence of Ectotrophic Mycorrhizal fungi on the resistance of Pine Roots to Pathogenic Infections . I - Antogonisme of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria, Phytopathology, **58** : 153 - 163.
- MARX , D.H. (1969) . - The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection . II - Production, identification, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis var. piceina* , Phytopathology , **59** : 411 - 417
- MARX, D.H. (1972) . - Ectomycorrhizae as biological deterrents 3558 to pathogenic root infections , Annu. rev . Phytopathol., **10** : 429-454.
- MARX , D.H. (1973) . - Mycorrhizae and Feeder roots disease. In : Ectomycorrhizae, Eds. G.C. MARKS , T.T . KOZLOWSKI . Academic Press, New York , 351 - 382.
- MARX , D.H. et DAVEY , C.B (1969) . - The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections . III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinammomi* , Phytopathology , **59** : 549 - 558.
- MARX , D.H. et CORDELL , C.E (1989) . - Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth . Eds. J.M ,WHIPPS, R. D, LUMSDEN. British Mycology Society , Cambridge : 1 - 29 .
- MASSIAS , M. , MOLHO, L. , REBUFFAT, S., CESARIO , M., GUILHEN, J. , PASCARD , C. et BODO , B. (1989) . - Vermiculinol and Vermiculidiol, Macrodiolides from the fungus *Penicillium vermiculatum* , Phytochemistry , **5** : 1491 - 1494.

- MATTIROLO, O. (1906) . - Secondo contribuzione allo studio della flora ipogea del portogallo, Bohm. Sol. Broteriana : 227 p.
- MORENO , G . , GALAN , R . et ORTEGA , A. (1986) . - Hypogeous fungi from continental Spain , Cryptogam. Mycol ., **7** : 201 - 229.
- MUELLER , H.J. et HINTON , J. (1941) . - A protein free medium for primary isolation of *Gonococcus* and *Meningococcus* , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **48** : 330 - 333.
- OLIVIER , J.M et GERMAIN , R (1983) . - Etude des antibiotiques volatiles des *Trichoderma* In : Les antagonismes microbiens . Modes d'action et application à la lutte biologique contre les maladies des plantes . Les colloques de l'I.N.R.A. Dijon, **18** : 17 - 34.
- PARGUEY - LEDUC, A . , MONTANT , C. et KULIFAJ, M. (1987) . - Morphologie et structure de l'ascospore adulte du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord, Discomycètes), Cryptogam. Mycol ., **8** : 173 - 202.
- PERRIN , R et GIANINAZZI - PEARSON , V .(1984) . - Influence de l'endomycorhization du merisier sur le potentiel infectieux des sols infestés par *Phytium spp* . 27 ème colloque de la société française de Phytopathologie, Agronomie, **5** : 562.
- PIROTTA , R. et ALBINI , A. (1900) . - Osservazioni sulla biologia del tartufo giallo (*Terfezia leonis*) , Atti. Accad. naz. Lincei Rc . , **9** : 4.
- PORTER , C.L (1924) . - Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi, Americ. J. Bot ., **11** : 168 - 188.
- RASANAYAGAM , S. et J. JEFFRIES, P. (1992) . - Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi, Mycol. Res ., **96** : 971 - 976.
- RAVOLANIRINA , F. (1986) . - Etude de l'influence de quelques facteurs sur la croissance mycélienne des terfez *in vitro* et synthèse des mycorhizes , D.E.A. de Biologie et Physiologie Végétale. Univ. Clermont - Ferrand II , 70 p.
- READ . D.J (1974) . - *Pezizella ericacae* sp. nov. , the perfect state of a typical mycorrhizal endophyte of Ericaceae, Trans. Br. Mycol. Soc ., **63** : 381 - 383.
- ROSS. J.P. (1972) . - Influence of *Endogone* mycorrhizae on *Phytophthora* root of soybean, Phytopathology, **62** : 896 - 897.

- ROUGIEUX , R. (1963) . - actions antibiotiques et stimulantes de la truffe du désert (*Terfezia boudieri* Chatin) Ann. Inst. Pasteur , Paris , **105** : 315 - 318.
- SASEK , V. et MUSILEK , V. (1968) . - Two antibiotic compounds from Mycorrhizal basidiomycetes, Folia . Microbiol., **13** : 43 - 45
- SCANNERINI, S. et BONFANTE - FASOLO, P. (1982) . - Données actuelles sur la cytologie des mycorhizes. In : Les mycorhizes , partie intégrante de la plante : biologie et perspectives d'utilisation , Les colloques de l'I.N.R.A., Dijon, **13** : 25 - 36
- SCANNERINI , S. , BONFANTE - FASOLO, P. et FONTANA, A. (1975) . - An ultrastructure model for the host - symbiont interaction in the endotrophic mycorrhizae of *Ornithogalum umbellatum* L. In : Endomycorrhizas , Eds . F.E. SANDERS, B. MOSSE, B. TINKER. Academic Press, London, . New-york , 313 - 324
- SCHENK, N.C. (1981) . - Can mycorrhiza control root disease? Plant . Dis ., **65** : 230 - 234.
- SCHEROMM , P. (1994) . - Les mycorhizes, alliées des arbres forestiers, Biofutur, **131** : 33 - 39.
- SCHONBECK , F. (1979) . - Endomycorrhizae in relation to plant disease. In : Soil - born plant pathogens, Eds. W. SCHIPPERS, W. GAMS. Academic Press, Londres : 280 - 281.
- SERRAIN, S. (1985) . - Aptitude de différentes souches de *Trichoderma* à limiter la gravité des fusarioses vasculaires, Mémoire de fin d'études en Agronomie et techniques culturales. Ecole nationale d'ingénieurs des travaux agricoles, Dijon , 46 p .
- SERRIGNY , J. et DEXHEIMER , J. (1986) . - Endomycorhize d'une orchidée tropicale : *Epîdendron ibaguense*. Etude comparative des activités phosphatasiques acides entre le champignon symbiote associé et isolé . In : Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes. 1er SEM sur les mycorhizes, Eds. V. GIANINNAZI - PEARSON , S. GIANINNAZI, I.N.R.A , Paris: 271 - 274.
- SHAW, T.M., DIGHTON , J. et SANDERS, F.E. (1995) . - Interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi on agar and in association with seedlings of lodgepole pine (*Pinus contorta*) , Mycol . Res., **99** : 159 - 165.
- SCHISLER , D.A. et LINDERMAN, R.G. (1989) . - Response of nursery soil microbial populations to volatiles purged from soil around Douglas - fir ectomycorrhizae, Soil. Biol. Biochem ., **21** : 397 - 401.

- STEIMAN , R. , SEIGLE , F., SAGE , L . et KRIVOBOK A, (1989) . - Production of patulin by Mycomycetes, Mycopathol., **105** : 129 - 133.
- STROBEL, N.E. et SINCLAIR, W.A. (1992) . - Defense Mechanisms of woody Plants against Fungi , Eds . R.A . BLANCHETTE , A.R . BIGGS, 458 p.
- STRULLU, D.G. (1976) . - Recherches de Biologie et de Microbiologie Forestières : Etude des relations nutrition - développement et cytologie des mycorhizes chez le Douglas (*Pseudomonas menziesii* Mirb .) et les Abiétacées, Thèse Doctorat ès Sciences Naturelles. Univ. de Rennes , 309 p.
- STRULLU, D.G. (1978) . - Histologie et cytologie des endomycorhizes, Physiol. Veg., **16** : 657 - 669
- STRULLU, D.G. (1985) . - Les mycorhizes , Eds . GEBRÜDER ORNTRAEGER. Berlin, Stuttgart , 198 p.
- STRULLU, D.G. (1991) . - Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Lavoisier, Paris, 250 p.
- STRULLU , D. G. et GOURRET, J.P. (1974) . - Ultrastructure et évolution du champignon symbiotique des racines de *Dactylorhiza maculata* L , Vern. J. Microscopie, **20** : 285 - 294.
- STRULLU , D . G . et GOURRET , J.P. (1980) . - Données ultrastructurales sur l'intégration cellulaire de quelques parasites ou symbiotes des plantes. II. Champignons mycorrhiziens, Bull . Soc. Bot. Fr., **127** : 97 - 106.
- SYLVIA, D .M et SINCLAIR , W.A (1983) . - Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas - Fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria Laccata*, Phytopathology, **73** : 390 - 397
- TRAPPE, J.M. (1962) . - Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae , Bot . Rev . , **28** : 538 - 606 .
- TRAPPE , J.M. (1971) . - A synopsis of Carbomycetaceae and Terfeziaceae (Tuberales) , Trans.br. Mycol . Soc. , **57** : 85 - 92.
- TRAPPE , J.M (1979) . - The orders, families and genera of hypogeous ascomycotina (Truffles and their relatives) , Mycotaxon, **9** : 297 - 340.
- TRAPPE, J.M. (1988) . - Mycorrhizae for green Asia. Proceedings of the first asian conference on mycorrhizae, . Eds. A. MAHADEVA , N. RAMAN , K. NATARAJAN, India , 346 - 349.

- TRAPPE , J.M. et SUNDBERG, W.J. (1977) . - *Terfezia gigantea* (Tuberales) in North America , Mycologia , **69** : 433 - 437.
- TRAPPE , J.M. et MOLINA , R. (1986) . - Taxonomy and genetics of mycorrhizal fungi, their interactions and relevance, Mycorrhizae : physiology and genetics . 1er SEM. Dijon , I.N.R.A ., 133 - 146
- VERRIN , G. (1970) . - La chromatographie en couche mince, techniques et applications en chimie organique, Ed. Dunod, Paris , 175 p.
- WILKINS, W.H. et HARRIS, G.C.M. (1944) . - Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. VI . Examination of the larger Basidiomycetes , Ann . Appl. Biol ., **31** , 261 - 270.
- ZAK , B. (1974) . - Ectendomycorrhiza of pacific madrone (*Arbustus menziesii*) , Trans . br.mycol . Soc ., **62** : 202 - 204.
- ZHAO ZHIPENG., XIU ZHEN GUO. et Bi KUO CHANG (1989) . - Preliminary selection of ectomycorrhizal fungi with resistance to *Rhizoctonia solani* . 2ème SEM Prague.

• أحمد بن علي بن حجر العسقلاني ، ٧٧٣ - ٨٥٢ ، فتح الباري شرح صحيح البخاري ،
دار المعرفة ، بيروت - لبنان .

RESUME

L'étude a porté sur la recherche de propriétés antibactériennes et antifongiques chez deux espèces de terfez d'Algérie (*Tirmania nivea* et *T. Pinoyi*)

L'isolement du mycélium à partir d'ascospores a permis d'effectuer différents tests d'antagonisme in vitro.

Les extraits obtenus à partir de l'ascocarpe des deux espèces de terfez sont actifs sur les espèces bactériennes et levuriformes. Par contre, seul l'extrait obtenu à partir du filtrat de culture de *T.nivea* est actif sur la plupart des micro-organismes testés.

Les tests d'antagonismes effectués vis à vis des champignons phytopathogènes montrent que l'espèce *T.nivea* est un bon antagoniste probablement par production de substances antibiotiques ayant des propriétés antifongiques.

L'analyse par chromatographie des extraits obtenus montre que les extraits de gléba de *T.nivea* et de *T.pinoyi* sont différents de celui du filtrat de culture de *T.nivea*, ce dernier est constitué de deux composés de nature inconnue.