

2024-2025

Master 1

Biologie Végétale

ÉTUDE DE LA COMPÉTITION POUR LES NUTRIMENTS ENTRE L'AGENT DE BIOCONTRÔLE *TRICHODERMA ATROVIRIDE* ET DES AGENTS PATHOGÈNES RESPONSABLES DE FONTES DE SEMIS

ELOI COPLEUTRE

4 juillet 2003

Sous la direction de Christophe Véronési

STAGE REALISÉ À L'INRAE (IRHS)

DU 14 AVRIL 2025 AU 13 JUIN 2025

Maître de stage : Thomas Guillemette

Jury

Philippe Simier : président

Thomas Guillemette : directeur

Christophe Véronési : tuteur

Philippe Grapin : membre



Soutenu publiquement le 1 juillet 2025

2024-2025

Master 1

Biologie Végétale

ÉTUDE DE LA COMPÉTITION POUR LES NUTRIMENTS ENTRE L'AGENT DE BIOCONTÔLE *TRICHODERMA ATROVIRIDE* ET DES AGENTS PATHOGÈNES RESPONSABLES DE FONTES DE SEMIS

ELOI COPLEUTRE

4 juillet 2003

Sous la direction de Christophe Véronési

STAGE REALISÉ À L'INRAE (IRHS)

DU 14 AVRIL 2025 AU 13 JUIN 2025

Maître de stage : Thomas Guillemette

Jury

Philippe Simier : président

Thomas Guillemette : directeur

Christophe Véronési : tuteur

Philippe Grapin : membre



Soutenu publiquement le 1 juillet 2025



AVERTISSEMENT

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les travaux des étudiant·es : ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

FICHE DE DIFFUSION DU MEMOIRE



DUNE : Dépôt numérique des étudiants

Autorisation de diffusion en ligne

Partie réservée à l'étudiant·e

Courriel : eloi.copleutre@etud.univ-angers.fr

N° étudiant·e : 21000684

Je soussigné·e Eloi COPLEUTRE

certifie être l'auteur·e du document intitulé

Étude de la compétition pour les nutriments entre l'agent de biocontrôle Trichoderma atroviride et des agents pathogènes responsables de fontes de semis

préparé sous la direction de Christophe Véronési

et soutenu le 1 juillet 2025

Je certifie la conformité de la version électronique déposée avec l'exemplaire imprimé remis au jury et certifie disposer de tous les droits sur les documents figurant dans mon mémoire ou, à défaut, disposer de toutes les autorisations nécessaires auprès des ayants droits. Agissant en l'absence de toute contrainte et sachant que je dispose à tout moment d'un droit de retrait de mes travaux :

J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

accès tout public À compter : de la date de soutenance

accès réservé communauté universitaire

du :

Je n'autorise pas la diffusion du document

Le : 24/06/2025

A : Angers

Signature :



Partie réservée au maître ou à la maîtresse de stage

Nom du (de la) maître de stage : Guillemette Thomas

J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

accès tout public À compter : de la date de soutenance
 accès réservé communauté universitaire du :

Je n'autorise pas la diffusion du document

Le : 24/06/2025

A : Angers

Signature :

Partie réservée aux membres du jury

Nom(s) :

J'autorise la diffusion du document en texte intégral par l'Université d'Angers :

sans corrections accès tout public À compter : de la date de soutenance
 avec corrections accès réservé communauté universitaire du :

Je n'autorise pas la diffusion du document

Le :

A :

Signature(s) :

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de mon stage et à la richesse de cette expérience.

Je remercie sincèrement Thomas Guillemette, mon maître de stage, pour sa confiance, sa disponibilité, ses conseils assidus tout au long de mon travail, ainsi que pour la relecture attentive de mon rapport.

Je remercie également Étienne Brémand et Franck Bastide, mes encadrants, pour leur accompagnement constant, leur expertise, leurs relectures et leur aide précieuse tout au long du stage. Leur soutien m'a été d'une grande aide, tant sur le plan technique que dans la compréhension globale du projet.

Un grand merci à Christophe Véronési, mon tuteur pédagogique, pour son suivi, ses conseils et l'attention portée à mon parcours.

Je tiens également à remercier Philippe Simier, responsable pédagogique de l'UE Stage, pour sa disponibilité et ses réponses claires à mes questions tout au long de cette période.

Enfin, je remercie toute l'équipe FungiSem pour son accueil chaleureux, sa bienveillance et les échanges enrichissants que j'ai pu avoir avec chacun. Travailler à leurs côtés a été une expérience à la fois formatrice et motivante.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné Eloi Copleutre

déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, numérique ou papier, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport.

signé par l'étudiant le 12 / 06 / 2025

GLOSSAIRE

Apiacées : Famille botanique d'Angiospermes, à inflorescences en ombelles et souvent aromatiques (Exemples : carotte, céleri, persil)

Appressoria-like : Structures similaires aux appressoria, permettant l'adhésion et la pénétration des pathogènes fongiques ou oomycètes dans l'hôte.

Ascomycètes : Champignons formant des spores sexuées (ascospores) dans des asques, souvent regroupés en fructifications.

Abiotiques : Facteurs physiques et chimiques non vivants influençant le développement des êtres vivants (lumière, température, eau...).

Antibiose : Interaction où un organisme inhibe un autre *via* la production de substances antimicrobiennes (comme des métabolites secondaires ici).

Bioagresseurs : Organismes nuisibles aux cultures, tels que champignons, insectes, bactéries ou virus.

Biotique : Qui concerne les organismes vivants d'un écosystème et leurs interactions.

Brassicacées : Famille botanique d'Angiospermes caractérisée par des siliques comme fruits (Exemples : colza, chou, *Arabidopsis*)

Conidies : Spores asexuées non mobiles, produites par mitose chez les champignons, notamment les Ascomycètes.

Cryptogamiques : Se dit des organismes se reproduisant par spores, sans fleurs ni graines (champignons, fougères, algues).

Désoxyose : Monosaccharide dont un groupe hydroxyle est absent

Disaccharide : Glucide formé de deux monosaccharides liés par une liaison glycosidique

GATA : Famille de facteurs de transcription se liant aux séquences "GATA" de l'ADN, impliqués dans la régulation génique.

Gymnospermes : Plantes vasculaires à graines « nues », dont les ovules et graines sont portés à découvert sur des écailles ou rameaux fertiles, sans être enfermés dans un ovaire.

Hyphes : Filaments multicellulaires constituant le mycélium fongique.

Hypocreaceae : Famille de champignons ascomycètes de l'ordre des Hypocreales, caractérisés par des ascomates périthéciaux (structures reproductrices sexuées s'ouvrant vers l'extérieur par une petite ouverture appelée ostiole).

Macroorganismes : Êtres vivants de taille suffisamment grande pour être observés à l'œil nu (Exemples : plantes, animaux, champignons macroscopiques).

Microbiote : Ensemble des micro-organismes vivant en communauté dans un habitat spécifique.

Microorganismes : Êtres vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu (Exemples : bactéries, virus, champignons microscopiques, algues unicellulaires, protozoaires).

Mycélium : Réseau d'hyphes représentant la phase végétative d'un champignon.

Mycoparasite : Se dit d'une espèce fongique parasitant d'autres champignons.

Nécrotrophe : Organisme pathogène qui tue les cellules hôtes pour se nourrir de leurs tissus morts.

Oomycètes : Protistes filamenteux, proches des champignons, produisant des zoospores biflagellées et des oospores résistantes.

Oosporanges : Structures de reproduction sexuée des oomycètes où se forment les oospores.

Parasitisme : Relation biologique où un organisme vit aux dépens d'un hôte vivant, souvent sans le tuer immédiatement.

Pentose : Sucre simple (monosaccharide) composé de 5 atomes de carbone. Il en existe deux types principaux : les aldopentoses (comme le ribose) et les cétopentoses (comme le ribulose).

Peronosporales : Ordre d'oomycètes contenant des pathogènes importants comme les agents du mildiou.

Plantules : Jeunes pousses issues de la germination d'une graine, stade précoce du développement végétal.

Rapport C/N : Rapport entre les quantités de carbone et d'azote, indicateur clé du métabolisme microbien et de la qualité du sol.

Rhizosphère : Zone du sol immédiatement influencée par les racines d'une plante, caractérisée par une activité microbienne intense et des échanges de substances entre les racines et les microorganismes.

Siliques : Fruits secs déhiscents, caractéristiques des Brassicacées, contenant les graines sur une cloison centrale.

Turbidité : Mesure optique de la transparence d'un liquide, déterminée par la quantité de lumière diffusée et absorbée par les particules en suspension.

Zoospores : Spores flagellées, mobiles, produites par certains protistes (oomycètes), adaptées à la dispersion en milieu aqueux.

LISTE DES ABREVIATIONS

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

ATER : Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

AUC : Area Under Curve (Aire Sous la Courbe)

GABA : Gamma-AminoButyric Acid (acide γ -aminobutyrique)

GEVES : Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences

HIMIC : High-throughput Microbiology (Microbiologie Haut-Débit)

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement

IRHS : Institut de Recherche en Horticulture et Semences

IsoMer : Institut des Substances et Organismes de la Mer

NTU : Nephelometric Turbidity Unit (Unité de Turbidité en Néphélométrie)

PDA : Potato Dextrose Agar

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

QuaSaV : Qualité et Santé du Végétal

qsp : Quantité Suffisante Pour

SFR : Structure Fédérative de Recherche

SNA : Synthetic Nutrient deficient Agar

UMR : Unité Mixte de Recherche

TABLE DES MATIERES

Avertissement	3
Fiche de diffusion du mémoire.....	4
Remerciements.....	6
Engagement de non plagiat	7
Glossaire	8
Liste des abréviations.....	10
Table des matières	11
Liste des illustrations et des tableaux	13
Liste des annexes	14
Introduction	16
1- Présentation du lieu de stage	16
2- Gestion des fontes de semis.....	18
2.1- Un enjeu d'ampleur mondiale.....	18
2.2- Agents pathogènes responsables des fontes de semis	18
2.3- Méthodes de lutte contre les fontes de semis	20
2.3.1- Utilisation de fongicides chimiques	20
2.3.2- Le biocontrôle comme une solution alternative	20
2.3.2.1- Définition du biocontrôle	20
2.3.2.2- <i>Trichoderma</i> spp., un agent de biocontrôle prometteur ..	20
2.3.2.3- Présentation du projet TrichoSeed	22
3- Utilisation des nutriments par les champignons	22
4- Objectifs du stage.....	24
Matériel et méthodes.....	26
1- Matériel biologique	26
2- Méthodes employées.....	28
2.1- Concept et application de la néphélométrie	28
2.2- Constitution des milieux et des souches.....	28
2.2.1- Préparation des nutriments azotés et carbonés	28
2.2.2- Préparation des suspensions de conidies et d'oosporanges ..	30
2.3- Protocole expérimental.....	30
2.3.1- Préparation et configuration des plaques.....	30
2.3.2- Mesure par néphélométrie.....	32
2.3.3- Analyse des données	32
2.3.3.1- Export et traitement initial des données	32
2.3.3.2- Tests statistiques et analyses multivariées	32
Résultats	36
1- Comparaison de la croissance des souches	36
2- Préférences nutritionnelles des souches.....	36

Discussion	40
1- Performances de croissance des souches	40
2- Stratégies de croissance selon les nutriments	42
Conclusion	52
Liste des références bibliographiques	54
Annexes.....	56
Annexe I : Comparaison des moyennes d'AUC pour chaque souche sur les substrats azotés et carbonés.....	57
Annexe II : Comparaison des performances de croissance d'Abra43 et des souches de <i>T. atroviride</i> sur certains acides aminés	61
Annexe III : Corrélation entre l'AUC et la turbidité maximale	62
Résumé/Abstract	64

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Symptômes de fontes de semis causés par *Alternaria brassicicola* sur plantules de radis (*Raphanus sativus* L.) - Phytotron IRHS, juillet 2024, Étienne Brémand.

Figure 2 : Symptômes de fontes de semis causés par *Pythium ultimum* sur plantules de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) – Serre Faculté des Sciences Angers, décembre 2024, Étienne Brémand.

Figure 3 : Cultures sur boîte de Petri (milieu PDA) des différentes souches utilisées

Figure 4 : Schéma du principe de la néphélométrie, Eloi Copleutre (réalisé avec BioRender)

Figure 5 : Néphélomètre du plateau HIMIC (NEPHELOstar, BMG Labtech) avec le stacker de plaques 96 puits, INRAE Beaucouzé (Bâtiment B), avril 2025, Eloi Copleutre.

Figure 6 : Exemple de la croissance fongique (ici, souche N1295 de *T. atroviride*) d'une plaque 96 puits au bout de 7 jours dans les conditions du cadre de l'étude, IRHS, mai 2025, Eloi Copleutre.

Figure 7 : Schéma d'un exemple de courbe de croissance fongique obtenue par néphélométrie avec les paramètres associés, Eloi Copleutre.

Figure 8 : Boxplot de la distribution des AUC obtenues en néphélométrie de tous les substrats pour chacune des souches. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $\alpha = 5\%$).

Figure 9 : Heatmap des pourcentages de croissance des souches sur les différents substrats azotés, normalisée par la croissance maximale de chaque souche.

Figure 10 : Heatmap des pourcentages de croissance des souches sur les différents substrats carbonés, normalisée par la croissance maximale de chaque souche.

Tableau I : Représentation de la disposition des nutriments azotés (en bleu) et carbonés (en rouge) sur les plaques 96 puits utilisées en néphélométrie.

Tableau II : Représentation de la disposition des témoins sur les plaques 96 puits utilisées en néphélométrie.

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Comparaison des moyennes d'AUC pour chaque souche sur les substrats azotés et carbonés

Annexe I.A : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Pythium ultimum* Pu19.

Annexe I.B : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche d'*Alternaria brassicicola* Abra43.

Annexe I.C : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* I237.

Annexe I.D : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* N1295.

Annexe I.E : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* N1508.

Annexe I.F : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* P3041.

Annexe I.G : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* P3080.

Annexe I.H : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* P3116.

Annexe II : Comparaison des performances de croissance d'Abra43 et des souches de *T. atroviride* sur certains acides aminés

Annexe II.A : Boxplot de la distribution des temps de latence (en heures) triés par médiane pour Abra43 et chaque souche de *T. atroviride* sur les substrats du groupe 4 de la figure 9.

Annexe II.B : Boxplot de la distribution des pentes maximum (en kNTU/h) triés par médiane pour Abra43 et chaque souche de *T. atroviride* sur les substrats du groupe 4 de la figure 9.

Annexe II.C : Boxplot de la distribution des turbidités maximales (en kNTU) triés par médiane pour Abra43 et chaque souche de *T. atroviride* sur les substrats du groupe 4 de la figure 9.

Annexe III : Corrélation entre l'AUC et la turbidité maximale

Annexe III : Nuage de points de la corrélation de Spearman ($\rho = 0,89$, $p < 2,2^{-16}$) entre l'AUC et la turbidité maximale obtenus par néphéloscémie sur tous les substrats pour toutes les souches

INTRODUCTION

1- PRÉSENTATION DU LIEU DE STAGE

L’Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) regroupe à Beaucouzé (Maine-et-Loire) les principaux acteurs régionaux de la recherche en sciences du végétal. Il s’agit d’une Unité Mixte de Recherche (UMR 1345) étant sous la tutelle commune de l’INRAE (Institut National de Recherche pour l’Agriculture, l’alimentation et l’Environnement), de l’Institut Agro Rennes-Angers et de l’Université d’Angers. Cet institut fait partie de la SFR (Structure Fédérative de Recherche) QuaSaV (Qualité et Santé du Végétal). L’IRHS compte plus de 250 agents, dont 79 chercheurs et enseignants-chercheurs, 10 post-doctorants et ATER (Attaché Temporaire d’Enseignement et de Recherche), 26 doctorants, 45 ingénieurs et 85 techniciens (au 1er décembre 2022). Les 14 équipes de l’institut rassemblent des compétences variées afin d’améliorer la qualité et la santé des espèces horticoles et des semences. L’objectif est de contribuer au développement de systèmes de production performants, sains et durables, adaptés aux filières alimentaires et ornementales. Les études de l’institut se structurent autour de 4 axes scientifiques, à savoir les mécanismes de réponse et d’adaptation des plantes à l’environnement biotique* et abiotique*, les stratégies de biocontrôle et autres méthodes alternatives aux intrants chimiques, les histoires évolutives des plantes et microorganismes* associés et enfin, la recherche méthodologique et le développement d’outils innovants (INRAE, 2022).

Un des sujets traités à l’IRHS est la pathologie fongique des semences, dont l’étude est notamment portée par l’équipe FungiSem. Cette équipe étudie comment les champignons phytopathogènes se transmettent aux semences et à partir de celles-ci, ce qui représente une étape cruciale pour leur écologie et l’épidémiologie des maladies. L’équipe FungiSem cherche alors à élucider ces mécanismes en identifiant les facteurs de virulence des champignons. Ils cherchent aussi à comprendre les réponses des plantes à cette interaction. Un autre aspect important de leurs travaux est l’étude du rôle du microbiote* des semences dans la transmission des agents pathogènes. Leurs recherches se concentrent principalement sur des espèces d’*Alternaria* spp. transmises par des semences de Brassicacées* cultivées ou sauvages comme *Arabidopsis thaliana* L., ou encore d’Apiacées* avec le modèle de la carotte (*Daucus carota* subsp. *sativus* L.). L’objectif est de contribuer au développement de méthodes de lutte innovantes, telles que le biocontrôle, la biostimulation* des semences et l’amélioration génétique de la résistance des plantes (Bataillé-Simoneau, 2024).

Parmi les nombreux plateaux techniques de la SFR QuaSaV, le plateau HIMIC (High Throughput Microbiology) constitue un appui à l’équipe FungiSem. Ce dernier met à disposition des instruments et des expertises pour isoler et caractériser la diversité microbienne en faisant appel à des technologies haut-débit de suivi de croissance des microorganismes* (Fischer-Le Saux, 2025).

2- GESTION DES FONTES DE SEMIS

2.1- Un enjeu d'ampleur mondiale

D'ici 2050, la population mondiale devrait atteindre environ 9,7 milliards d'habitants (United Nations Department of Economic and Social Affairs, 2024), ce qui nécessitera une augmentation de 70 % de la production alimentaire (FAO, 2024). Cependant, malgré les avancées dans le domaine agricole pour améliorer la sécurité alimentaire, les cultures sont aujourd'hui confrontées à divers stress biotiques* et abiotiques* en raison du réchauffement climatique, de la pollution et de la croissance démographique, entraînant des pertes de rendement importantes (Sood et al., 2020). En effet, les plantes peuvent être exposées à de nombreux agents pathogènes au cours de leur vie qui peuvent compromettre leur développement. Parmi les maladies existantes, la fonte de semis occupe une place particulière. Cette dernière entraîne la dégradation des graines en germination et des jeunes plantules*, que ce soit pépinière ou en plein champ (Lamichhane et al., 2017). Cette maladie constitue un obstacle majeur à la productivité agricole, en particulier aux stades précoce du développement des cultures. Les symptômes sont causés par une grande diversité d'agents pathogènes présents dans l'air, le sol ou sur le matériel végétal (parties aériennes ou semences) dans lesquels figurent principalement des champignons (mycètes*) et des organismes apparentés (comme les oomycètes*) regroupés sous le terme de maladies cryptogamiques*.

2.2- Agents pathogènes responsables des fontes de semis

Parmi ceux-ci, *Alternaria brassicicola*, appartenant au phylum des Ascomycètes*, peut causer des fontes de semis chez des espèces de Brassicacées* (Nowakowska et al., 2019). Ce champignon a la capacité de réaliser une transmission verticale* via les semences, survenant après l'infection des siliques*, ce qui entraîne alors la contamination des graines en développement. La fonte des semis peut aussi être causée par des Oomycètes* comme *Pythium ultimum*, une espèce appartenant à l'ordre des Peronosporales* (Khrieba, 2020). Cette espèce est particulièrement dommageable sur de nombreuses cultures. De plus, sa capacité à survivre dans le sol et les débris végétaux facilite sa propagation aux plantes dans divers environnements. Les zoospores* mobiles (provenant des oosporanges*) de cette espèce peuvent se mouvoir dans l'eau contenue dans le sol afin d'infecter la plantule*. Des exemples de symptômes de ces deux espèces sont illustrés dans les figures 1 et 2.



Figure 1 : Symptômes de fontes de semis causés par *Alternaria brassicicola* sur plantules de radis (*Raphanus sativus L.*) - Phytotron IRHS, juillet 2024, Étienne Brémand.



Figure 2 : Symptômes de fontes de semis causés par *Pythium ultimum* sur plantules de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) – Serre Faculté des Sciences Angers, décembre 2024, Étienne Brémand.

2.3- Méthodes de lutte contre les fontes de semis

2.3.1- Utilisation de fongicides chimiques

Les deux espèces d'agents pathogènes citées (*Alternaria brassicicola* et *Pythium ultimum*) peuvent causer des dégâts variés sur de nombreuses cultures, entraînant ainsi des pertes économiques significatives. Pour lutter contre ce phénomène, il est fréquent d'utiliser des fongicides classiques. Cependant, l'usage excessif de ces produits a des impacts majeurs. En effet, leur utilisation excessive représente une menace pour la santé humaine et pose des problèmes environnementaux. De plus, cette pratique favorise l'émergence de microorganismes* résistants aux pesticides dans l'écosystème (Lamichhane et al., 2017). Ces défis sont au cœur des objectifs de la stratégie Écophyto 2030, qui vise à réduire l'utilisation et les risques liés aux produits phytopharmaceutiques de synthèse en encourageant des alternatives durables. L'objectif est de concilier la protection des cultures, la santé publique et le respect de l'environnement (Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire, 2023).

2.3.2- Le biocontrôle comme une solution alternative

2.3.2.1- Définition du biocontrôle

Face à ces défis, des stratégies de gestion durable des maladies des semences, moins dépendantes des pesticides conventionnels, se révèlent de plus en plus cruciales. Parmi elles, le biocontrôle apparaît comme une solution prometteuse. Celui-ci désigne l'utilisation d'organismes vivants ou de substances naturelles pour prévenir ou réduire les dommages causés par des bioagresseurs* dans les cultures. Cette approche englobe différentes techniques (utilisation de macroorganismes*, microorganismes*, substances chimiques naturelles et médiateurs chimiques) qui visent à maintenir l'équilibre des écosystèmes agricoles tout en limitant l'utilisation de produits phytosanitaires de synthèse (Deguine, 2023 ; Stenberg et al., 2021).

2.3.2.2- *Trichoderma spp.*, un agent de biocontrôle prometteur

Au sein des méthodes de biocontrôle, l'utilisation du genre *Trichoderma* spp., de la famille des *Hypocreaceae** (phylum des Ascomycètes*) est largement reconnue et répandue (Coninck et al., 2020 ; García-Sánchez et al., 2024 ; Oszust et al., 2020 ; Saxena et al., 2025 ; Sood et al., 2020). En effet, sur les 129 produits à base de microorganismes* autorisés en France, 47 sont issus de champignons dont 20 de *Trichoderma* spp. (ANSES, 2025). Ce champignon mycoparasite*, souvent présent dans les sols, est connu pour ses qualités d'antagonistes envers les autres champignons ou oomycètes* du sol qui pourraient causer des fontes de semis, comme *A. brassicicola* (Tseng et al., 2020) et *P. ultimum* (Boat et al., 2020).

2.3.2.3- Présentation du projet TrichoSeed

Dans ce contexte de biocontrôle par *Trichoderma* spp., ce stage s'inscrit dans le cadre du projet TrichoSeed, porté par l'équipe FungiSem, qui vise à comprendre les mécanismes impliqués dans l'antagonisme de l'agent de biocontrôle *Trichoderma atroviride*. Ce champignon filamenteux retrouvé dans le sol agit contre différents agents pathogènes responsables de la fonte des semis. Les différents mécanismes d'antagonisme de *Trichoderma atroviride* étudiés sont l'antibiose*, se traduisant par la production de métabolismes secondaires antimicrobiens (Dutta et al., 2022 ; Hermosa et al., 2014 ; Saxena et al., 2025) ; le parasitisme*, avec la production d'enzyme de dégradation, l'enroulements d'hyphe* autour de ceux de l'agent pathogène et la pénétration grâce à des structures d'appressoria-like* (García-Sánchez et al., 2024 ; Mukherjee et al., 2022 ; Sood et al., 2020) et enfin la compétition pour l'espace et les nutriments (Dutta et al., 2023 ; Macías-Rodríguez et al., 2020 ; Oszust et al., 2020 ; Sood et al., 2020). Parmi ces nombreuses stratégies d'antagonisme, ce stage se focalise sur la compétition trophique pour les nutriments entre *T. atroviride* et des agents phytopathogènes responsables de la fonte de semis (*A. brassicicola* et *P. ultimum*).

3- UTILISATION DES NUTRIMENTS PAR LES CHAMPIGNONS

Les principaux nutriments consommés par les champignons ou oomycètes* sont de nature carbonée et azotée (Kerkaert et Huberman, 2023). Étant donné les différences génétiques de ces trois espèces (*T. atroviride* et *A. brassicicola* appartiennent à des classes différentes d'ascomycètes* et *P. ultimum* est un oomycète), des variations existent probablement par rapport à leur consommation en carbone et en azote. La disponibilité limitée de ces nutriments crée une compétition intense dans le sol entre ces différentes espèces. En effet, *T. atroviride* peut utiliser une large gamme de sources de carbone et d'azote, le qualifiant alors d'un bon candidat dans la compétition pour les nutriments (Danielson et Davey, 1973 ; Davis et Wong, 2010 ; Gao et al., 2007 ; García-Sánchez et al., 2024 ; Kerkaert et Huberman, 2023 ; Tadijan et al., 2021). Ce champignon filamenteux peut se développer dans la rhizosphère* en utilisant du carbone et de l'azote provenant de matière organique en décomposition ou de matière minérale. En revanche, les champignons phytopathogènes responsables de la fonte des semis ont des stratégies d'acquisition de nutriments plus spécifiques en fonction de leur hôte. Par exemple, *A. brassicicola* va adapter sa croissance et sa virulence en fonction de la disponibilité en azote, en interagissant avec le métabolisme des acides aminés des plantes et le rapport C/N* (Barrit et al., 2022 ; Ochsenreither et al., 2012). *Pythium ultimum*, quant à lui, interfère avec la disponibilité du carbone et de l'azote dans la rhizosphère* (Rosberg et al., 2014). Cependant, il est observé que la consommation en azote par les champignons est peu documentée dans la littérature.

Par ailleurs, il n'existe à ce jour que très peu de publications référençant la capacité d'un agent de biocontrôle et d'agents pathogènes à utiliser une large gamme de sources azotées et carbonées. Cette absence de données met en évidence la nécessité d'études comparatives sur la consommation des nutriments par des agents pathogènes afin de mieux comprendre leur interaction et leur potentiel dans le cadre de stratégies de biocontrôle.

4- OBJECTIFS DU STAGE

L'étude de la compétition pour les nutriments entre *T. atroviride* et les agents phytopathogènes responsables de la fonte des semis est une donnée importante, mais peu étudiée, pour optimiser les stratégies de biocontrôle. Pour ce faire, six souches de *T. atroviride* présentant des variations intra-spécifiques en termes de pouvoir de parasitisme (certaines faibles et d'autres fortes) ont été sélectionnées. D'autre part, deux agents pathogènes, *A. brassicicola* et *P. ultimum*, qui sont éloignés phylogénétiquement mais responsables tous deux de fontes de semis, ont été choisis. Ainsi, l'objectif de ce stage est d'identifier d'éventuels nutriments pouvant être préférentiellement consommés par chacun de ces microorganismes*. Cela permettra d'évaluer si une compétition nutritionnelle existe entre eux et si certains nutriments pourraient avantager *T. atroviride* sans favoriser les agents pathogènes, améliorant ainsi sa compétitivité. Pour répondre à cette question, différents nutriments carbonés et azotés ont été sélectionnés afin de mesurer la croissance de ces microorganismes* par néphélométrie.

MATERIEL ET METHODES

1- MATERIEL BIOLOGIQUE

Dans le cadre de ce projet de stage, différentes souches de mycètes* (*Trichoderma atroviride* et *Alternaria brassicicola*) ou d'oomycète* (*Pythium ultimum*) ont été sélectionnées. Six souches de *T. atroviride* ont été utilisées. La souche I1237 est issue de produits commercialisé par le groupe Agrauxine by Lesaffre. Les souches P3041, provenant de semences de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) ; P3080, isolées de semences de lin (*Linum usitatissimum* L.) et P3116, isolée à partir de semences de laitues (*Lactuca sativa* L.) proviennent toutes les trois d'isolement réalisés par le GEVES (Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences, Beaucouzé). Enfin, les souches N1295, issues de sédiments de surface marins et N1508, isolées à partir de moules proviennent de l'unité IsoMer (Institut des Substances et Organismes de la Mer, Nantes Université). Pour les agents pathogènes, seulement une souche de chacun d'entre eux a été sélectionnée. Pour *A. brassicicola*, la souche utilisée est Abra43, qui a été isolée de feuilles de radis (*Raphanus sativus* L.) par l'équipe FungiSem. Pour l'oomycète* *P. ultimum*, la souche sélectionnée est Pu19, provenant de plantules* de Gymnospermes* et isolée par l'Institut de Westerdijk (Pays-Bas). Les illustrations de toutes ces souches sont regroupées dans la figure 3. Avant leur repiquage sur boîte de Petri, ces différentes souches ont été conservées à -80°C dans du glycérol (à 30%).

Ces différents microorganismes* ont été cultivés sur boîte de Petri sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Ribeiro et al., 2025) afin d'assurer leur conservation. En parallèle de cela, d'autres milieux ont été préparés spécifiquement pour favoriser la sporulation des différentes espèces. Les souches de *T. atroviride* ont été repiquées sur un milieu préparé avec 24 g de graines de millet broyées, 15 g d'agar bactériologique et une qsp (quantité suffisante pour) 1 L d'eau. Les souches d'*A. brassicicola* ont quant à elles été repiquées sur un milieu V8, préparé avec 3 g de CaCO₃, 200 mL de V8 (mélange de huit légumes en soupe), 20 g d'agar bactériologique puis une qsp 1 L d'eau. Enfin, les souches de *P. ultimum* ont été repiquées sur un milieu SNA (Synthetic Nutrient deficient Agar) (Paredes, 2024). Avant de couler ces milieux sur boîtes de Petri sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique), chacun d'entre eux est passé par l'autoclave afin de garantir leur stérilité. Toutes ces souches ont été conservées à 22°C et à l'obscurité.

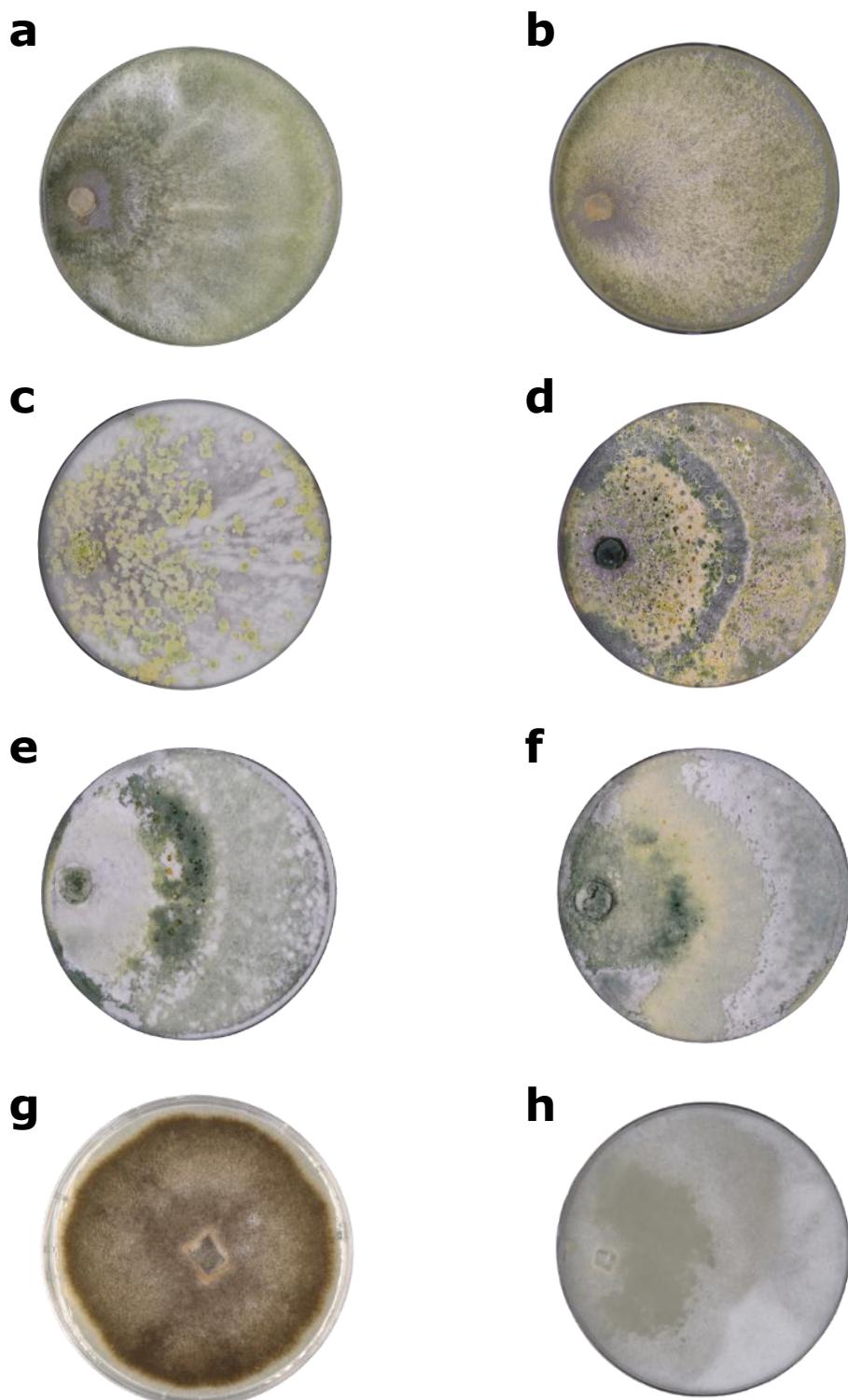


Figure 3 : Cultures sur boîte de Petri (milieu PDA) des différentes souches utilisées (*Trichoderma atroviride* : **a** - I1237, **b** - P3041, **c** - P3080, **d** - P3116, **e** - N1295, **f** - N1508 ; *Alternaria brassicicola* : **g** - Abra43 ; *Pythium ultimum* : **h** - Pu19).

2- METHODES EMPLOYEES

2.1- Concept et application de la néphélométrie

Afin d'identifier les nutriments impliqués dans la croissance des différentes souches, la néphélométrie a été utilisée, étant une méthode directe de mesure de la lumière diffusée par les particules en suspension (Joubert et al., 2010). Cette technique a donc pour objectif de mesurer la turbidité* d'une solution au cours du temps, représentant alors la croissance des souches, comme le schématisé la figure 4. Pour cela, des plaques 96 puits ont été mises en place. Ces dernières contiennent les différents substrats azotés et carbonés, ainsi que la souche d'intérêt.

2.2- Constitution des milieux et des souches

2.2.1- Préparation des nutriments azotés et carbonés

Dans un premier temps, la préparation des différents nutriments azotés et carbonés a été réalisée. Pour obtenir 50 mL de chacune de ces solutions, une pesée de chaque substrat a été faite de façon à avoir toujours 15 g/L de carbone et 0,5 g/L d'azote pour tous les substrats utilisés : ces concentrations permettent aux souches de ne pas être trop en carence ni d'avoir une concentration excessive. Ensuite, chacun des éléments, étant sous forme de poudre, a été dissous dans de l'eau Milli-Q® (eau ultra pure, Lab Water Solutions) avant le réglage du pH de la solution à 5,8. Enfin, chaque solution a été filtrée à 0,2 µm pour stériliser cette dernière. En tout, 24 sources d'azote et 8 sources de carbone ont été testés. Les sources d'azote utilisées pour les tests comprennent des composés inorganiques, comme le nitrate d'ammonium et le nitrate de potassium, ainsi que des composés organiques tels que l'adénine, le GABA (acide γ-aminobutyrique), l'urée et tous les acides aminés de chiralité "L", car cette forme est mieux assimilée par les champignons (avec une chiralité "D-", ils ne se développent pas ou peu). Tous les acides aminés ont été utilisés, sauf la tyrosine, qui a été exclue car cet acide aminé n'est soluble qu'à pH très acide. Pour les sources de carbone, différents monosaccharides* (fructose, rhamnose et xylose) et disaccharides* (cellobiose, maltose, saccharose, tréhalose) ont été testés ainsi qu'un polyol (alcool à 3C), le glycérol. Le milieu utilisé en néphélométrie pour la croissance de nos différentes souches est le milieu Pellier (Pellier et al., 2003), préparé à 1,43X (car il sera dilué au 7/10 ultérieurement) et auquel nous avons enlevé le glucose. Ce milieu minéral ne contient ni sources d'azote ou de carbone.

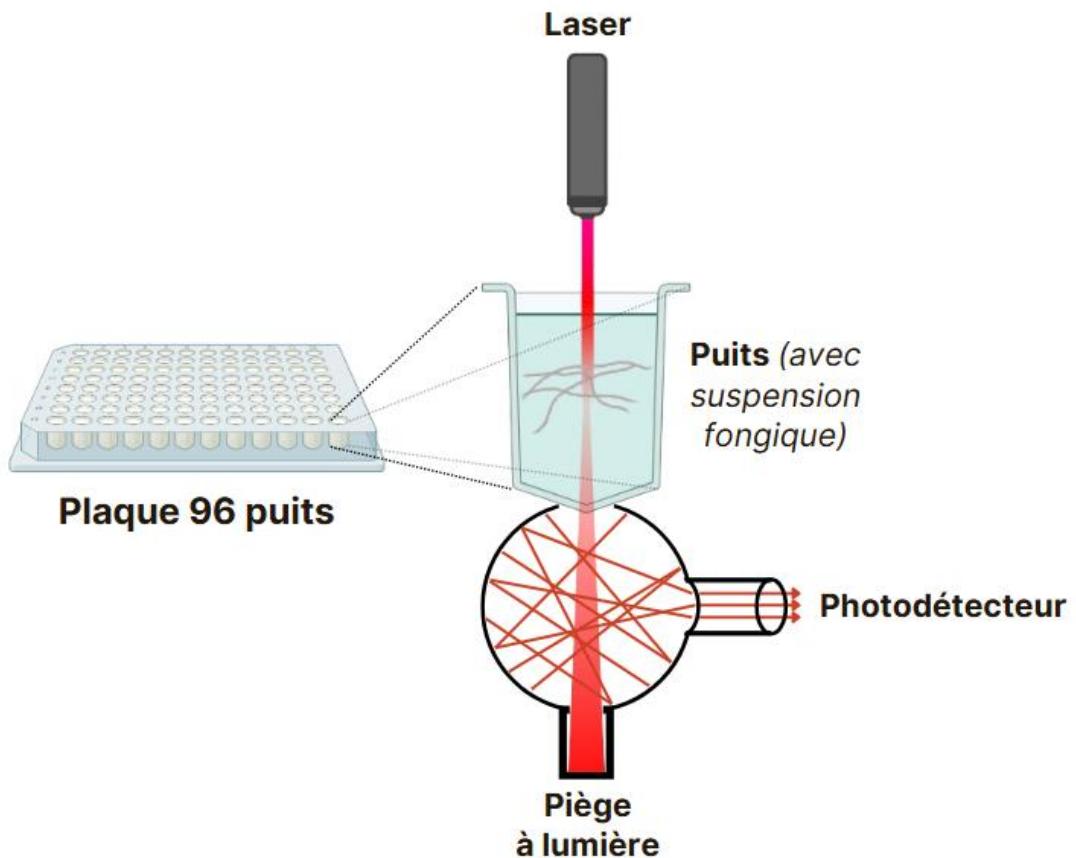


Figure 4 : Schéma du principe de la néphélométrie, Eloi Copleutre (réalisé avec BioRender)

2.2.2- Préparation des suspensions de conidies et d'oosporanges

Dans un second temps, les suspensions de conidies ont été préparées. À partir de grattages avec de l'eau Milli-Q® effectués sur des souches de *T. atroviride* cultivées sur un milieu à base de graines de millet et d'*A. brassicicola* sur un milieu V8, tous deux âgés de 7 jours, des suspensions de conidies* ont été préparées. Chaque suspension, d'un volume de 5 mL et d'une concentration de 10^6 conidies*/mL, a été obtenue à l'aide d'un calibrage réalisé avec une cellule de Thoma (631-0697, Marienfeld). Pour *P. ultimum*, la méthode est différente. Ici, trois boîtes de Petri cultivées 1 mois sur milieu SNA, avec présence d'oosporanges* confirmée au microscope, sont utilisées. Les cultures sont grattées pendant 30 secondes avec un râteau en verre et 4 mL d'eau Milli-Q® pour récupérer les oosporanges*. L'eau en suspension est récupérée et combinée dans un tube de 15 mL puis les fragments d'hyphes sont éliminés à la pipette. La suspension est centrifugée à 3 000 g pendant 10 minutes, concentrée par retrait de 4 mL de surnageant, puis homogénéisée au vortex. La concentration est calculée à partir du nombre d'oosporanges* observées dans une cellule de Malassez (631-0975, Marienfeld), puis ajusté par dilution avec de l'eau Milli-Q® pour obtenir 10^4 oosporanges*/mL.

2.3- Protocole expérimental

2.3.1- Préparation et configuration des plaques

Chaque condition est testée en triplicat dans des plaques de 96 trous stériles. Chaque trou contient 200 µL de solution, préparée au préalable dans des tubes de 1,5 mL (un tube permet de remplir trois trous). De plus, chaque condition est reproduite de manière indépendante trois fois pour garantir la fiabilité des résultats. Ainsi, chaque condition est testée au total 9 fois. Les tableaux I et II montrent respectivement le plan des plaques des nutriments et celui des témoins. En ce qui concerne les plaques de nutriments (Tableau I), les trous de cette dernière sont remplis avec les éléments préparés en amont, à savoir avec le milieu Pellier, la suspension, la source de nutriments (azotée ou carbonée selon le trou) et le glucose ou l'ammonium (selon le trou). L'ammonium sert de source d'azote de référence pour l'évaluation des différents substrats carbonés, tandis que le glucose est utilisé comme source de carbone de base pour tester les différents substrats azotés. De plus, ces deux éléments sont respectivement la source d'azote et le sucre la plus simple à assimiler par les champignons (García-Sánchez et al., 2024). Pour préparer la plaque témoin (Tableau II), les trous sont complétés selon le cas avec de la suspension ou de l'eau, de l'ammonium ou de l'eau, et enfin du glucose ou de l'eau. Le témoin avec l'eau sert à vérifier l'absence de contamination. Ceux avec ammonium sans carbone et ceux avec glucose sans azote permettent d'observer la croissance des champignons en l'absence de l'un ou l'autre de ces éléments.

Tableau I : Représentation de la disposition des nutriments azotés (en bleu) et carbonés (en rouge) sur les plaques 96 puits utilisées en néphéломétrie.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Nitrate d'ammonium			Acide aspartique			Lysine			Cellobiose		
B	Nitrate de potassium			Cystéine			Méthionine			Fructose		
C	Adénine			Glutamine			Phénylalanine			Glycérol		
D	GABA			Acide glutamique			Proline			Maltose		
E	Urée			Glycine			Sérine			Rhamnose		
F	Alanine			Histidine			Thréonine			Saccharose		
G	Arginine			Isoleucine			Tryptophane			Tréhalose		
H	Asparagine			Leucine			Valine			Xylose		

Tableau II : Représentation de la disposition des témoins sur les plaques 96 puits utilisées en néphéломétrie.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Souche 1 – Glucose Ammonium						Souche 2 - Glucose Ammonium					
B	Souche 1 - Glucose Eau						Souche 2 - Glucose Eau					
C	Souche 1 - Ammonium Eau						Souche 2 - Ammonium Eau					
D												
E	Souche 3 - Glucose Ammonium											
F	Souche 3 - Glucose Eau											
G	Souche 3 - Ammonium Eau											
H										Eau - Glucose Ammonium		

2.3.2- Mesure par néphélométrie

Les différentes plaques de 96 puits sont placées dans le néphélomètre du plateau HIMIC (NEPHELOstar, BMG Labtech) relié à un stacker, permettant d'empiler plusieurs plaques dans le même néphélomètre, comme l'illustre la figure 5. Celui-ci va, toutes les 30 minutes et pendant 7 jours prendre une valeur de turbidité* dans chacun des puits à l'aide d'un laser de 635 nm (Joubert et al., 2010). L'enceinte dans laquelle est placée le néphélomètre et le stacker est maintenue à 25°C et à l'obscurité. Au bout d'une semaine, les plaques sont retirées car les souches ont atteint un plateau de croissance. La figure 6 représente un exemple de la croissance observée en plaque 96 puits au bout d'une semaine.

2.3.3- Analyse des données

2.3.3.1- Export et traitement initial des données

Les données obtenues au bout d'une semaine par le logiciel de néphélométrie sont ensuite exportées.

Elles sont transférées vers une matrice conçue sur Microsoft® Excel® 2024 en amont du stage, afin d'être analysées. La matrice permet de visualiser l'allure des courbes de croissance pour les différents nutriments testés et la souche associée. En plus de cela, la matrice calcule l'AUC (aire sous la courbe), calculée par la méthode des rectangles, étant un indicateur synthétique de la croissance globale des champignons (ou oomycètes*) sur les différentes sources. Des paramètres complémentaires sont obtenus, tels que le temps de latence ou lag phase (en h), étant le temps nécessaire pour dépasser 200 NTU (unité de turbidité* en néphélométrie) ; le taux de croissance maximal ou pente (en kNTU/h), représentant la tangente la plus élevée sur la courbe entre 5 points ; et la turbidité* maximale (en kNTU), étant la valeur du plateau de la courbe. Toutes ces données sont mesurées pour chaque puits de la plaque. La figure 7 illustre le genre de courbe obtenue pour un puits avec toutes les données calculées.

2.3.3.2- Tests statistiques et analyses multivariées

L'ensemble des matrices correspondant à chaque souche et à chaque répétition a été regroupé dans une feuille Microsoft® Excel® 2024. Les données ainsi compilées ont été importées dans RStudio (version 2025.05.0-496, R 3.5.0 avec les packages multicomp, agricolae, gplots et ggplots2) pour les analyses statistiques. Les conditions testées incluent les souches et les substrats, tandis que les variables quantitatives correspondent aux paramètres mesurés, à savoir l'AUC, le temps de latence, la pente et la turbidité* maximale. La normalité et l'homoscédasticité des résidus issus de l'analyse de variance (ANOVA) ont été vérifiées respectivement à l'aide des tests de Kolmogorov-Smirnov et de Bartlett ($p\text{-value} > 0,05$). Les valeurs aberrantes identifiées (dues par exemple à des contaminations de puits) ont été retirées afin de garantir la robustesse des analyses. Les différences d'AUC entre les souches ont été évaluées à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi d'un

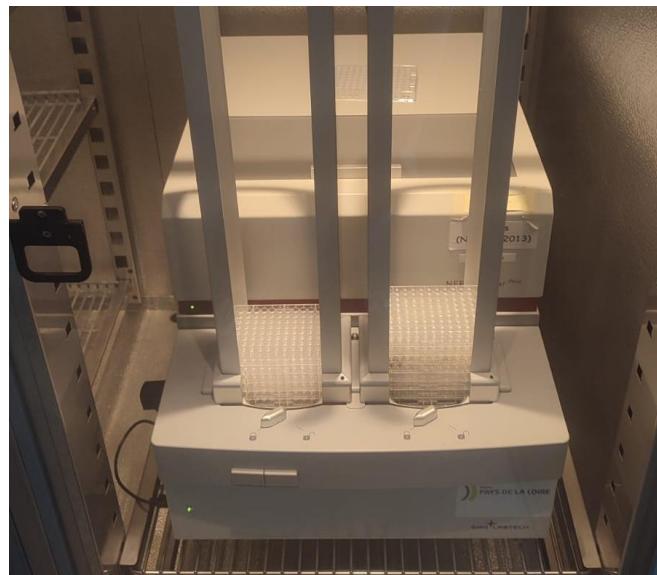


Figure 5 : Néphélomètre du plateau HIMIC (NEPHELOstar, BMG Labtech) avec le stacker de plaques 96 puits, INRAE Beaucozé (Bâtiment B), avril 2025, Eloi Copleutre.

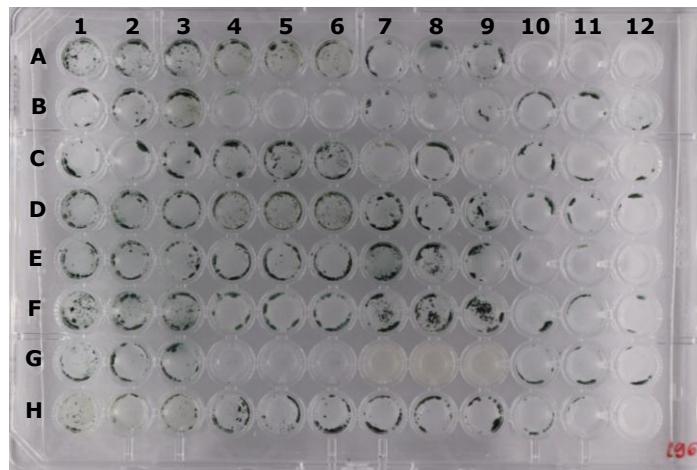


Figure 6 : Exemple de la croissance fongique (ici, souche N1295 de *T. atroviride*) d'une plaque 96 puits au bout de 7 jours dans les conditions du cadre de l'étude, IRHS, mai 2025, Eloi Copleutre.

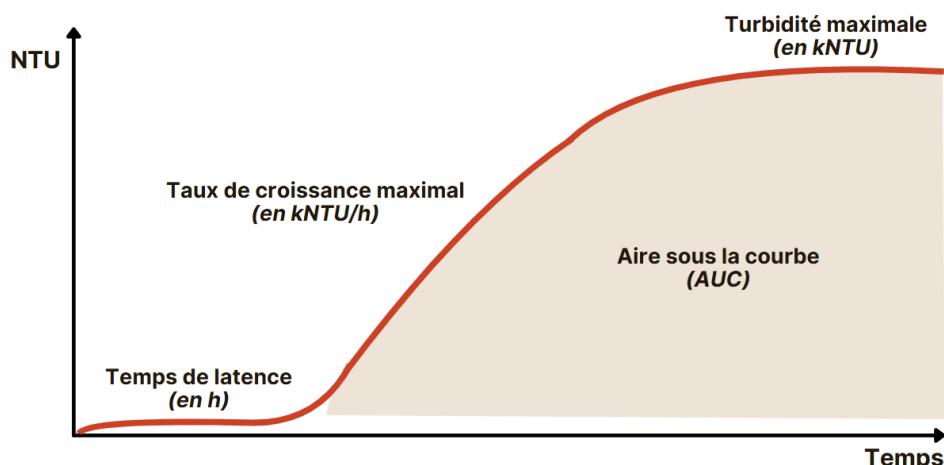


Figure 7 : Schéma d'un exemple de courbe de croissance fongique obtenue par néphélométrie avec les paramètres associés, Eloi Copleutre.

test post-hoc de Dunn avec correction de Benjamini-Hochberg ($\alpha = 5\%$). Un test de comparaison multiple de Tukey ($\alpha = 5\%$) a été réalisé pour analyser les différences significatives d'AUC entre les souches. De plus, une analyse globale prenant en compte l'ensemble des souches et des substrats a été menée à l'aide d'une carte de chaleur (heatmap) avec un clustering hiérarchique (qui a été appliqué à la fois aux lignes (substrats) et aux colonnes (souches), basé sur la distance euclidienne et utilisant la méthode de liaison complète). Afin de visualiser quels sont les substrats les plus utilisés par les souches, les valeurs d'AUC pour chaque substrat ont été divisées par l'AUC maximale mesurée chez la souche pour obtenir un pourcentage de croissance par rapport à la croissance maximale mesurée (Oszust et al., 2020). Cette méthode a permis de visualiser clairement les similarités entre les profils de croissance des différentes souches et substrats. Des tests de corrélation de Spearman ont été réalisés entre l'AUC et chacun des autres paramètres, afin d'évaluer les relations statistiques entre ces variables.

RESULTATS

1- COMPARAISON DE LA CROISSANCE DES SOUCHES

La figure 8 représente la distribution des AUC entre les souches. Les boîtes indiquent la médiane et les quartiles, tandis que les points dispersés montrent la variabilité des mesures individuelles au sein de chaque souche. Les box plots sont ici triées par leur médiane, avec les deux agents pathogènes à gauche du graphique et les souches de *T. atroviride* à droite. Cette figure montre que, d'une manière globale, les souches de *T. atroviride* ont une meilleure croissance par rapport aux agents pathogènes, ce qui est traduit par des AUC significativement plus importantes. Par comparaison, l'aire médiane de P3041, qui est la plus élevée, est 4,34 fois plus grande que celle de Pu19 ou 3,1 fois plus grande que celle d'Abra43. De plus, une variabilité significative existe au sein des différentes souches de *T. atroviride* sur la croissance fongique. En effet, certaines souches présentent des différences significatives, selon un ordre décroissant d'AUC : P3041, N1508 et I1237. Ces trois souches se distinguent significativement de N1295, qui partage un niveau de significativité similaire avec P3116, elle-même équivalente à P3080. En somme, cette figure met en évidence une forte hétérogénéité entre les souches lorsqu'on utilise les données brutes. Cependant, des biais apparaissent avec *P. ultimum*, dont le type d'inoculum et la concentration diffèrent de ceux des deux autres champignons (10^3 oosporanges*/mL contre 10^6 conidies*/mL), ce qui justifie la normalisation en pourcentage utilisée dans les figures suivantes.

2- PREFERENCES NUTRITIONNELLES DES SOUCHES

Les figures 9 et 10 représentent respectivement l'AUC des substrats azotés et carbonés, normalisées par rapport à l'AUC maximale de chaque souche permettant ainsi afin de visualiser le pourcentage de croissance relatif sur ces substrats.

Pour les substrats azotés, la figure 9 indique dans le groupe 1 (avec la leucine, l'isoleucine, la valine, la méthionine, l'adénine, l'acide glutamique, la thréonine, le GABA, l'urée et le nitrate de potassium) une faible croissance de la souche Pu19 de *P. ultimum*. En revanche, *A. brassicicola* (Abra43) affiche une croissance sur davantage de substrats par rapport à Pu19 dans ce groupe de substrats. Les souches de *T. atroviride* sont celles qui présentent la meilleure croissance dans ce groupe, bien que l'on observe une variabilité inter-souche. Dans le groupe 2 (avec le nitrate d'ammonium, le chlorure d'ammonium, la lysine et la phénylalanine), les agents pathogènes montrent une faible croissance, surtout pour Abra43. Les souches de *T. atroviride* ont quant à elles comparativement de bien meilleures croissances. En ce qui concerne le groupe 3 (avec l'asparagine et l'histidine), la croissance est assez élevée sur toutes les souches. Cependant, les souches de *T. atroviride* P3080 et P3116 ont des croissances comparativement moyennes sur l'histidine. Ensuite, dans le groupe

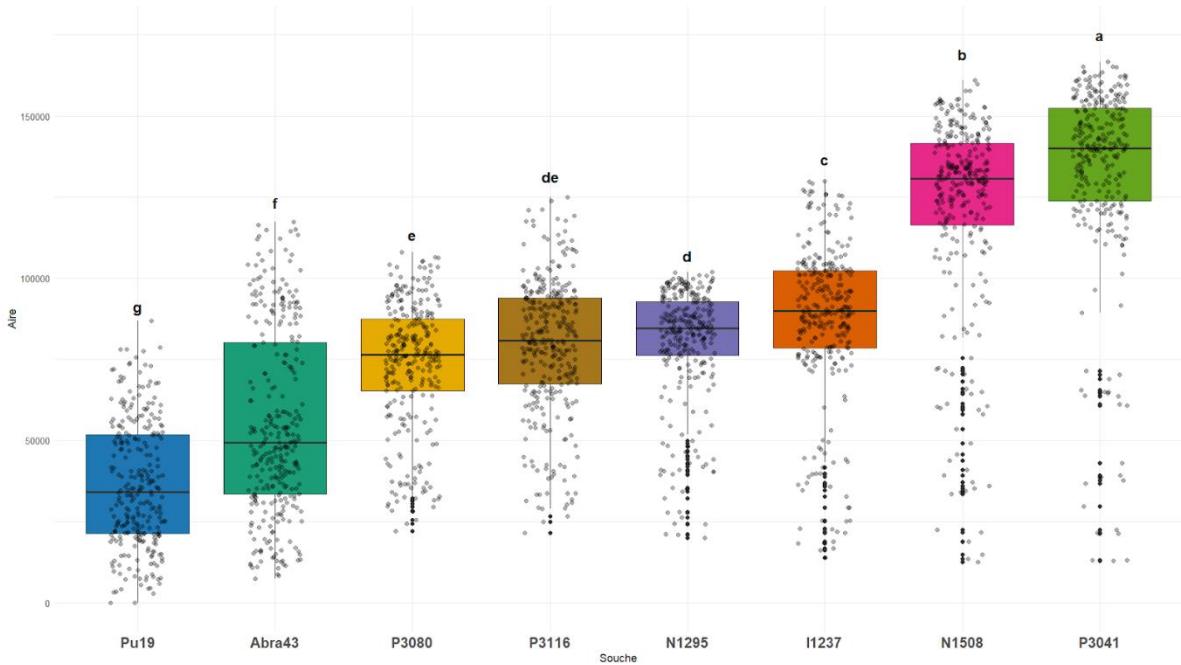


Figure 8 : Boxplot de la distribution des AUC obtenues en néphéломétrie de tous les substrats pour chacune des souches. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $a = 5\%$).

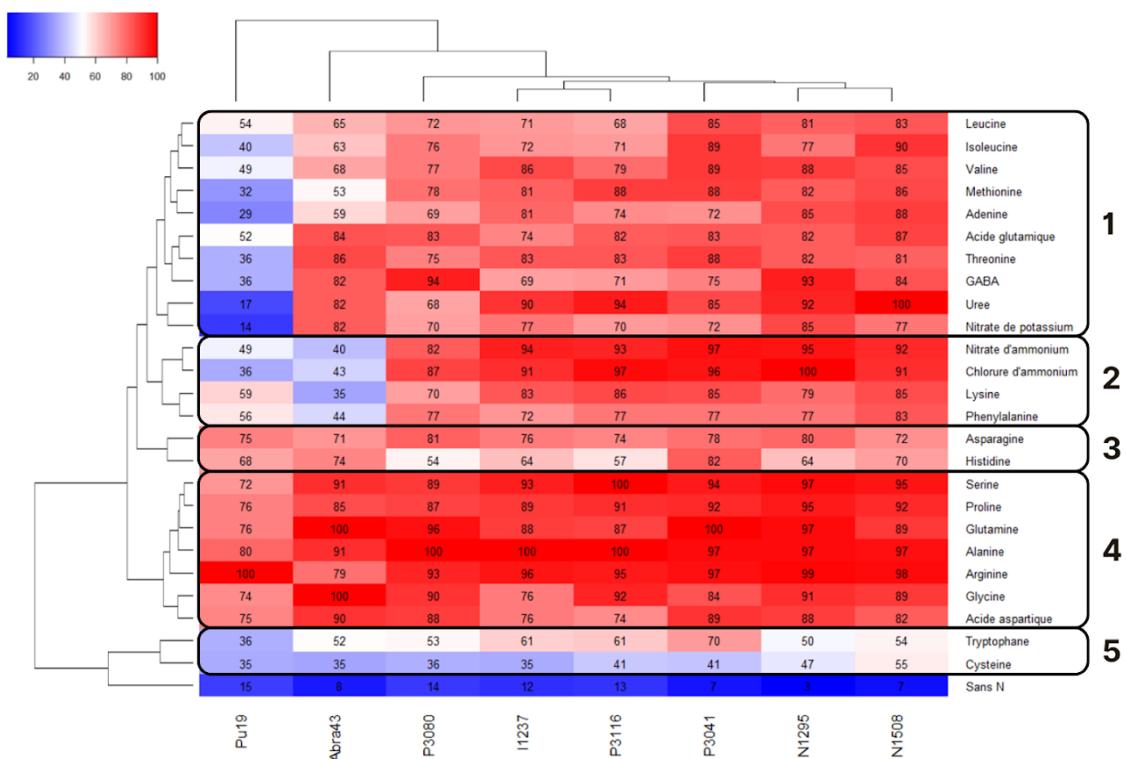


Figure 9 : Heatmap des pourcentages de croissance des souches sur les différents substrats azotés, normalisée par la croissance maximale de chaque souche.

Cette heatmap, organisée par clustering hiérarchique, présente la croissance des souches selon différents groupes. Une valeur faible, ou une teinte bleue, dans une case indique une croissance limitée de la souche sur le substrat correspondant. À l'inverse, une valeur élevée, représentée par une teinte rouge, signifie une croissance importante.

4 (avec la sérine, la proline, la glutamine, l'alanine, l'arginine, la glycine et l'acide aspartique), la croissance est globalement élevée et homogène entre les différentes souches, même si Pu19 affiche une croissance plus faible sur ces nutriments. Des différences sont observées entre les souches de *T. atroviride*, notamment la souche I1237, qui présente une AUC plus faible pour la glycine et l'acide aspartique, et la souche P3116, également moins performante pour ce dernier acide aminé. Enfin, le groupe 5 (avec le tryptophane et la cystéine) est celui où le moins de souches arrivent à croître. En effet, les deux souches d'agents pathogènes présentent des croissances faibles à modérées sur ces substrats. Une forte variabilité inter-souches est observée chez *T. atroviride*. Plus précisément, les souches P3080, N1295 et N1508 ont une croissance nettement plus faible par rapport aux souches I1237, P3116 et P3041 en ce qui concerne le tryptophane (les valeurs sont plus proches et faibles également pour la cystéine). Le clustering distingue ici deux groupes : Pu19 seul, et les autres souches, avec Abra43 séparée des six *T. atroviride*.

Pour ce qui est des substrats carbonés, la figure 10 illustre premièrement une croissance modérée à élevée de toutes les souches sur le xylose, saccharose, fructose et tréhalose. En revanche, Abra43 a une croissance assez faible sur le tréhalose. Par ailleurs, une variabilité inter-souches est observée au sein de *T. atroviride* avec une difficulté légèrement plus marquée, mais significativement différente, pour P3116 et P3080 à croître sur le saccharose, ainsi que sur le fructose pour la souche N1508. Une très bonne croissance sur glucose est observée pour toutes les souches. Le glycérol met en évidence une nette distinction entre la faible croissance des agents pathogènes et celle, plus élevée, des souches de *T. atroviride*, en particulier N1295, I1237, P3041 et N1508, tandis que les autres présentent une croissance plus modérée. Le maltose permet des croissances modérées sur les deux souches d'agents pathogènes et sur N1295. En revanche, les autres souches présentent une croissance allant de faible à modérée sur ce substrat, en particulier I1237, dont la croissance est faible. La cellobiose entraîne une très bonne croissance pour les agents pathogènes, notamment pour *A. brassicicola*. Le constat est inverse pour toutes les souches de *T. atroviride*, pour lesquelles la croissance est limitée. Enfin, le rhamnose entraîne de faibles croissances pour toutes les souches, avec une distinction pour Abra43 qui a la croissance la plus élevée. Cette fois-ci, le clustering des souches fait une distinction claire entre les deux agents pathogènes et les souches de *T. atroviride*.

L'annexe I présente, pour chaque souche, les différences significatives d'AUC sur les substrats azotés et carbonés. Certains acides aminés sont consommés par toutes les souches (groupe 4, figure 9), mais une analyse des lag phases, pentes maximales et turbidités* maximales révèle qu'Abra43 croît généralement moins vite que les *T. atroviride* sur ces substrats (annexe II). Une forte corrélation de Spearman ($\rho = 0,89$, $p < 2,2\text{e-}16$) entre l'AUC et la hauteur du plateau de croissance (annexe III) suggère que l'AUC dépend principalement de ce paramètre. La corrélation est plus faible avec la pente ($\rho = 0,77$) et même négative avec la lag phase ($\rho = -0,46$), mais reste significative ($p < 2,2\text{e-}16$) pour ces deux paramètres.

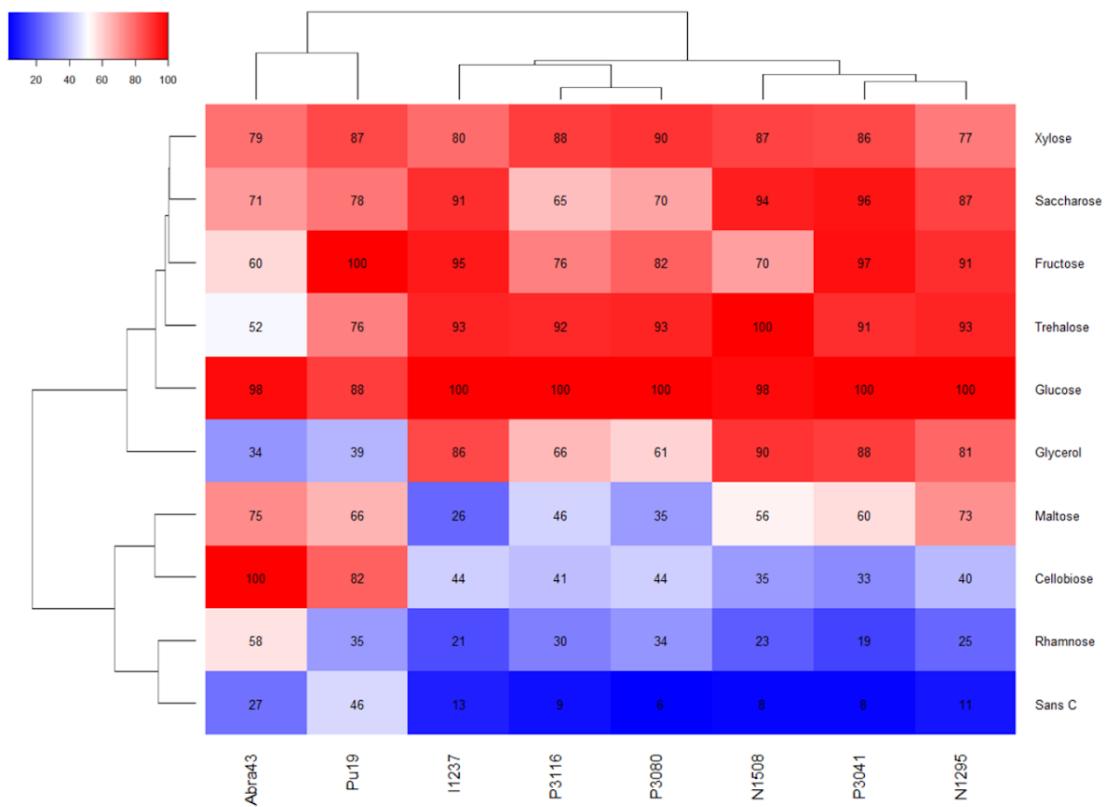


Figure 10 : Heatmap des pourcentages de croissance des souches sur les différents substrats carbonés, normalisée par la croissance maximale de chaque souche.

Cette heatmap, organisée par clustering hiérarchique, présente la croissance des souches selon différents groupes. Une valeur faible, ou une teinte bleue, dans une case indique une croissance limitée de la souche sur le substrat correspondant. À l'inverse, une valeur élevée, représentée par une teinte rouge, signifie une croissance importante.

DISCUSSION

1- PERFORMANCES DE CROISSANCE DES SOUCHES

Les observations faites dans la figure 8 confirment qu'en milieu liquide, les souches de *T. atroviride* présentent une croissance (caractérisée par les valeurs d'AUC) nettement supérieure à l'agent pathogène *A. brassicicola* (Abra43) sur tous les nutriments. Cette supériorité est en accord avec des études décrivant *Trichoderma* spp. comme un genre fongique avec une colonisation rapide de son milieu (Oszust et al., 2020 ; Schuster et Schmoll, 2010). Cette aptitude à coloniser rapidement son environnement avec son mycélium* constitue un mécanisme clé du biocontrôle exercé par *Trichoderma* spp., lui permettant de rivaliser efficacement avec des agents pathogènes plus lents comme *A. brassicicola* grâce à sa compétitivité nutritionnelle élevée (Benítez et al., 2005 ; Vinale et al., 2008 ; Woo et al., 2014).

Les fortes différences de croissance observées entre les souches peuvent être partiellement liées à leur éloignement phylogénétique. En effet, *T. atroviride* et *A. brassicicola* appartiennent au phylum des Ascomycètes*, tandis que *P. ultimum* est un Oomycète*, un groupe phylogénétiquement distinct des champignons. Les faibles AUC globales observées pour *P. ultimum* pourraient notamment s'expliquer par le type et la concentration de l'inoculum, ainsi que par ses particularités métaboliques susceptibles d'altérer ses performances métaboliques dans les conditions expérimentales (Fawke et al., 2015 ; Martin, 2009).

Des différences d'AUC globales sur l'ensemble des nutriments sont également observées entre les différentes souches de *T. atroviride*, ce qui est indiqué par les niveaux de significativité présentés dans la figure 8. Ces résultats suggèrent que certaines souches indiquent des performances nettement supérieures sur certains nutriments, traduisant des préférences ou efficacités métaboliques différentes. À ce jour, la diversité génétique entre différentes souches de *T. atroviride* en réponse à une large gamme de nutriments n'a pas été documentée dans la littérature, soulignant alors l'intérêt de ce stage.

Cependant, les résultats obtenus pour *P. ultimum* (Pu19) doivent être interprétés avec prudence. Bien que cette souche croisse plus lentement que *T. atroviride* en milieu liquide, l'inverse est observé sur milieu solide, comme a pu le montrer un test réalisé en amont du stage. Au vu de ces résultats-là, la comparaison entre les espèces est difficile. Les AUC brutes ne seront alors pas pris en compte, en revanche, le pourcentage avec le rapport de l'AUC maximale sera privilégié.

2- STRATEGIES DE CROISSANCE SELON LES NUTRIMENTS

Les figures 9 et 10 mettent en évidence, pour chaque souche, les substrats les plus favorables à sa croissance. En rapportant la croissance à la performance maximale de chaque souche, cette approche permet de comparer leurs préférences nutritionnelles sans biais lié aux différences globales de croissance observées précédemment.

L'analyse des profils de croissance sur différents substrats azotés, illustrée par la figure 9, révèle des comportements variés entre les souches étudiées.

Le groupe 1 affiche des profils de croissance très distincts entre les souches. Les croissances limitées de *P. ultimum* (Pu19) dans ce groupe suggèrent une capacité métabolique plus limitée pour l'utilisation de ces sources d'azote, notamment pour l'urée et le nitrate de potassium. En effet, il n'y a pas de différence significative par rapport au témoin sans azote (Annexe I), montrant que cette souche n'est pas capable d'assimiler ou de métaboliser ces sources d'azote. Pour ce qui est de l'urée, une étude démontre que ce nutriment peut indirectement exercer un effet toxique sur *P. ultimum*, ce qui peut inhiber sa croissance, et ce même à de faibles concentrations (Veverka et al., 2007). La souche Abra43 d'*A. brassicicola* est capable de croître sur un plus grand nombre de substrats azotés par rapport à Pu19 dans ce même groupe, traduisant alors probablement d'une plus grande plasticité métabolique. Certains de ces nutriments, dont la leucine et le GABA, sont abondants dans les plantes d'*Arabidopsis thaliana* L. qui présentent une sensibilité accrue à l'infection (Barrit et al., 2022). Ces résultats pourraient expliquer la croissance supérieure d'*A. brassicicola* observée *in vitro* sur ces mêmes composés, en soulignant leur rôle potentiel comme source nutritive privilégiée pour ce champignon. Comparativement aux deux agents pathogènes, les souches de *T. atroviride* ont de meilleures croissances sur ces substrats. Ceci est cohérent avec le fait que la détection et l'ajustement du métabolisme en fonction de la disponibilité des nutriments dans l'environnement sont des processus cruciaux pour *T. atroviride* (Baldin et al., 2024). Cet article met spécifiquement en évidence le rôle central du gène *areA* dans la répression catabolique de l'azote, ce qui pourrait expliquer la capacité de *T. atroviride* à exploiter une gamme plus large et plus efficace de sources azotées par rapport aux agents pathogènes étudiés, qui expriment probablement moins ce gène. Ce gène code un facteur de transcription GATA* essentiel à l'activation des gènes nécessaires à l'utilisation de sources d'azote secondaires en l'absence d'ammonium ou de glutamine. Ce mécanisme est bien conservé chez les champignons filamenteux Ascomycètes*, contribuant ainsi à leur plasticité métabolique et à leur adaptation en conditions pauvres en azote (Tudzynski, 2014). La forte capacité de certaines souches à croître sur l'urée a aussi été rapportée dans la littérature (Danielson et Davey, 1973), probablement due à une forte activité uréase, comme cela a été prouvé chez *Trichoderma guizhouense* (Liu et al., 2020).

Le groupe 2 des nutriments azotés a mis en évidence de faibles croissances pour les agents pathogènes par rapport aux meilleures sources, particulièrement marquées chez Abra43. Ces résultats suggèrent que l'ammonium, bien qu'étant une source d'azote facilement assimilable pour de nombreux organismes, pourrait être moins favorable ou même toxique à des concentrations élevées pour ces agents pathogènes, comme il l'a été montré chez d'autres espèces (Fu et al., 2022). Ce désavantage peut être exploité par *T. atroviride*, tolérant mieux ces composés. Par ailleurs, les acides aminés tels que la lysine et la phénylalanine peuvent être importés *via* des perméases membranaires spécialisées appartenant à la famille des Amino Acid Permeases (AAP), dont l'efficacité peut varier selon les espèces (Yang et al., 2024). Les champignons pathogènes comme Abra43 pourraient posséder des transporteurs moins performants ou moins exprimés, ou encore des limitations dans la métabolisation, ce qui réduirait ainsi leur capacité à utiliser efficacement ces sources azotées. À l'inverse, *T. atroviride* semblerait mieux équipé pour assimiler ces nutriments, probablement grâce à des perméases adaptées, ce qui favoriserait sa croissance dans ces conditions, lui conférant ainsi un avantage compétitif direct.

Le groupe 3 illustre une croissance modérée à élevée sur toutes les souches, suggérant que l'asparagine et l'histidine sont des sources d'azote universellement accessibles et importantes pour la croissance de ces espèces. Pour *P. ultimum*, une étude a démontré que ces acides aminés favorisent une croissance robuste (Agnihotri et Vaartaja, 1967). En revanche, pour les deux autres espèces, rien ne figure dans la littérature concernant la croissance fongique sur ces deux acides aminés.

Les acides aminés du groupe 4 ont donné, pour la plupart des souches, la croissance la plus importante comparativement aux autres nutriments. Ces acides aminés sont décrits dans la littérature comme facilement métabolisables par les champignons (Yang et al., 2024) et sont impliqués dans des voies métaboliques centrales (glycolyse et cycle de Krebs). Parmi les substrats azotés testés, l'arginine est celui qui permet la croissance la plus élevée de la souche Pu19, avec une efficacité significativement supérieure à celle des autres substrats (Annexe I). Cette préférence pourrait suggérer une stratégie d'économie énergétique car cette souche exploite la disponibilité de l'arginine plutôt que de mobiliser une voie de biosynthèse complexe, notamment celle impliquant la conversion de l'a-cétoglutarate. Cette voie est peu exprimée chez *P. ultimum* (Ah-Fong et al., 2019), ce qui peut justifier sa forte affinité pour l'arginine parmi l'ensemble des substrats proposés. Les croissances de Pu19 sont comparativement plus faibles par rapport aux autres souches, comme cela a été détaillé précédemment. En revanche, les valeurs d'AUC normalisées sont assez semblables entre *A. brassicicola* et les souches de *T. atroviride* pour ces nutriments. L'annexe II met en évidence qu'Abra43 croît moins rapidement par rapport aux souches de *T. atroviride*. Ainsi, une phase de latence plus courte et une pente maximale plus forte pour *T. atroviride* indiquerait alors une meilleure aptitude à coloniser rapidement un substrat, à épuiser plus vite les ressources disponibles et à empêcher l'établissement des agents pathogènes par exclusion compétitive.

Enfin, le groupe 5 rassemble les milieux pour lesquels le moins de souches parviennent à croître, indiquant que le tryptophane et la cystéine sont des sources d'azote plus difficiles à utiliser. Cette difficulté peut s'expliquer par une faible induction des transporteurs spécifiques ou des enzymes de dégradation de ces acides aminés, limitant ainsi leur utilisation. En effet, le métabolisme du tryptophane et de la cystéine nécessite des voies enzymatiques spécifiques qui sont parfois régulées de manière différente ou moins exprimées selon les souches. Cela peut entraîner une croissance plus lente dans des milieux où ces acides aminés sont les seules sources d'azote (Yang et al., 2024). De plus, une étude menée sur le genre *Alternaria* spp. indique que la cystéine et le tryptophane ont un effet inhibiteur sur la germination des spores (Daigle et Cotty, 1991). Chez les champignons, la dégradation du tryptophane mobilise une voie catabolique complexe produisant des intermédiaires potentiellement toxiques en cas de déséquilibre enzymatique (McGary et al., 2013), tandis que le catabolisme de la cystéine peut générer un stress sulfuré par accumulation de sulfite, notamment observé chez *Candida albicans* (Hennicke et al., 2013).

La croissance des différentes souches sur les substrats carbonés, présentée dans la figure 10, varie également selon les conditions.

Premièrement, les souches ont toutes montré une croissance modérée à élevée sur le xylose. Ce pentose* est présent dans les parois végétales, ce qui rend sa dégradation cruciale pour les agents pathogènes. Avant de pouvoir entrer dans la voie des pentoses phosphates, le xylose doit être converti en xylulose à l'aide d'enzymes spécifiques (xylose réductase, xylose déshydrogénase, xylose kinase). Chez *T. atroviride*, il semble que le régulateur Xyr1 active et contrôle cette voie, permettant ainsi une assimilation efficace du xylose et expliquant sa bonne croissance sur ce sucre. Cette observation est confirmée par une étude menée sur cette espèce (Stricker et al., 2006).

Le saccharose, étant un disaccharide* de fructose et de glucose, a également permis une croissance modérée chez toutes les souches. Pour être utilisé par les cellules, il doit d'abord être hydrolysé en glucose et fructose, grâce à des invertases (Manoochehri et al., 2020 ; Zerillo et al., 2013). Les différences entre les souches peuvent alors s'expliquer par des variations dans l'efficacité enzymatique et par le niveau d'expression ou le nombre de gènes codant ces enzymes.

La plupart des souches ont montré une croissance allant de modérée à élevée sur le fructose. En comparaison avec les autres sources de carbone, le fructose est la source entraînant la meilleure croissance pour *P. ultimum*. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que ce sucre est souvent présent dans les exsudats des jeunes racines, offrant ainsi à cet oomycète* une source de carbone facilement accessible et commune dans la rhizosphère* (Lévesque et al., 2010, Nisha et al., 2024). Les différences observées pour les autres souches pourraient être dues à des variations dans la régulation transcriptionnelle des mécanismes d'assimilation du fructose.

Le tréhalose, un disaccharide* composé de deux molécules de glucose reliées par une liaison α1-1, favorise la croissance des souches de *T. atroviride* par rapport aux agents pathogènes (Khalil et Alsanousi, 2009). Il est donc probable que l'enzyme tréhalase de *T. atroviride* soit plus efficacement exprimée ou plus active, ce qui permet une hydrolyse rapide du tréhalose en deux molécules de glucose, pouvant être directement utilisé dans la glycolyse (Danielson et Davey, 1973).

Le glucose est le sucre qui, de manière globale, entraîne la meilleure croissance sur toutes les souches. Ce résultat est attendu car ce monosaccharide* est la source primaire de sucre pour les champignons (García-Sánchez et al., 2024). Toutefois, une limite méthodologique doit être signalée : les puits qui contenaient du glucose incluaient également du chlorure d'ammonium, utilisé pour créer une condition témoin des substrats carbonés avec les sources les plus facilement assimilables. Cette combinaison pourrait avoir biaisé les résultats en favorisant artificiellement la croissance de *T. atroviride*, même si la comparaison des substrats entre eux diminue ce biais.

Le glycérol, qui est un polyol (alcool à 3C), entraîne une limitation de la croissance des agents pathogènes, ce qui n'est pas le cas pour les souches de *T. atroviride*, comme déjà démontré par autre étude (Oszust et al., 2020). Ce constat s'explique par la grande capacité métabolique de *T. atroviride*. La meilleure assimilation du glycérol par *T. atroviride*, démontrée ici *in vitro*, pourrait lui donner un avantage compétitif.

En ce qui concerne le maltose, étant un disaccharide* de deux glucoses à liaison α1-4 produit par la dégradation de l'amidon, une différence de croissance est notable entre les agents pathogènes, qui ont une meilleure croissance, et les souches de *T. atroviride*, ayant une croissance comparativement plus faible (hormis N1295). Cette variabilité reflète probablement des différences dans l'efficacité ou la régulation des transporteurs de maltose et des enzymes maltases, comme cela a pu être montré chez d'autres champignons (Vongsangnak et al., 2009).

Le cellobiose, qui est un disaccharide* de glucose lié en β-1,4 et un produit intermédiaire lors de la dégradation de la cellulose, entraîne de très bonnes croissances pour les agents pathogènes, notamment chez Abra43, contrairement aux souches de *T. atroviride* où la croissance est limitée. Cette différence montre une spécialisation métabolique liée à leur rôle écologique. En effet, *A. brassicicola* est un champignon nécrotrophe* dont la dégradation efficace des parois cellulaires végétales, étant composés principalement de cellulose, est nécessaire pour sa croissance et son parasitisme. L'hydrolyse du cellobiose en glucose est effectuée par des enzymes appelées β-glucosidases. Une étude réalisée sur *Trichoderma hamatum* a révélé une faible expression de cette enzyme (Cheng et al., 2017), ce qui pourrait expliquer la croissance limitée sur ce substrat. En revanche, *A. brassicicola* possède un large éventail d'enzymes de dégradation de la paroi, comprenant 249 glycosidases au total capables de catalyser l'hydrolyse de liaisons glycosidiques, y compris celles du cellobiose (Cho, 2015). Cet agent pathogène est donc bien adapté pour utiliser des composés comme le cellobiose, ce qui lui donne un avantage pour coloniser des tissus végétaux. Le fait que les agents

pathogènes utilisent mieux le cellobiose suggère que ces derniers pourraient avoir un avantage compétitif pour cette ressource dans certains milieux riches en résidus végétaux. Dans ce cas, la compétition de *T. atroviride* serait moins efficace sur ce nutriment.

Enfin, le rhamnose, étant un monosaccharide* désoxyose* présent dans la pectine végétale, a entraîné la croissance la plus faible pour toutes les souches, à l'exception d'Abra43. Une étude mentionne la présence de α-L-rhamnosidases chez *Alternaria alternata*, ce qui peut suggérer sa capacité à croître sur ce nutriment (Zhang et al., 2018). En revanche, aucune étude ne mentionne cette enzyme pour les deux autres espèces.

Des résultats étonnans sont observés pour la souche Pu19 lorsqu'aucune source de carbone n'est présente. En effet, bien que la croissance soit limitée comparativement au substrat entraînant la meilleure croissance (à savoir le fructose), l'AUC sans source de carbone n'est pas significativement celle la plus faible (Annexe I.A). Cela pourrait suggérer d'une part que le glycérol et le rhamnose inhibent partiellement la croissance de *P. ultimum*, et d'autre part que cet oomycète* semble pouvoir se développer sans source de carbone externe. Cette croissance en absence de substrat carboné pourrait être également dû à la présence de réserves dans les oosporanges utilisées comme inoculum.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'étudier la croissance de différentes souches de *Trichoderma atroviride* ainsi que de deux agents phytopathogènes responsables de fontes de semis : *Alternaria brassicicola* et *Pythium ultimum*. Leur développement a été analysé sur diverses sources d'azote et de carbone afin de déterminer si des conditions nutritionnelles spécifiques pourraient favoriser la compétitivité de *T. atroviride* sans avantager les agents pathogènes. Les résultats ont montré que *T. atroviride* présente généralement une croissance plus rapide et un développement plus important par rapport aux agents pathogènes, notamment sur des substrats comme l'urée, le nitrate d'ammonium et le glycérol. Cette capacité à exploiter efficacement les nutriments, en particulier ceux issus des fertilisants azotés, tout en occupant rapidement l'espace, pourrait jouer un rôle clé dans la prévention des fontes de semis.

En plus de sa supériorité générale, cette étude révèle une importante diversité métabolique entre les souches de *T. atroviride*. Certaines se distinguent par leur capacité à croître sur des substrats moins favorables aux agents pathogènes, ouvrant la voie à des conditions de culture ciblées pour favoriser leur développement. La combinaison des souches aux profils complémentaires pour exploiter la diversité nutritive du sol et optimiser l'implantation de *T. atroviride* dans des environnements variables paraît prometteur. Cette aptitude à utiliser divers nutriments pourrait renforcer leur compétitivité face aux pathogènes. Toutefois, la notion de compétition et de spécialisation dans des « niches écologiques » reste à nuancer, car les conditions expérimentales ne reflètent pas la complexité biotique* et abiotique* du sol ou de la rhizosphère*. Des essais ont débuté sur *Rhizoctonia solani*, un agent pathogène tellurique responsable de fonte de semis. Son profil métabolique sera analysé après ce stage.

Pour aller plus loin dans ces recherches, plusieurs pistes sont envisageables. Il faudrait d'abord mesurer la consommation réelle des nutriments pour lier les profils de croissance aux capacités d'assimilation et distinguer les substrats utilisés de ceux simplement disponibles. Des tests sur plantes avec des substrats clés (urée, glycérol, nitrate d'ammonium) permettraient de vérifier si le type de nutriments influe sur l'efficacité de protection de *T. atroviride*. Ces essais, réalisés en culture hors sol ou sur substrat inerte (vermiculite) avec différentes solutions nutritives, seraient utiles pour les applications sur semences ou sol. Ces résultats pourraient guider l'amélioration des produits de biocontrôle en ajustant les fertilisants lors de l'application au sol ou en intégrant des nutriments spécifiques dans leur formulation. L'association du traitement de graines avec un apport nutritif pourrait améliorer la compétitivité de *T. atroviride* contre les agents de fonte de semis et stimuler la germination des plantules. Par ailleurs, il serait également pertinent d'inspecter les génomes des souches étudiées pour identifier les voies métaboliques impliquées dans l'utilisation de ces différentes sources nutritives et vérifier la cohérence avec cette étude. Enfin, ces résultats améliorent la compréhension de la nutrition des *Trichoderma* spp., un sujet peu étudié mais essentiel pour expliquer l'hétérogénéité d'efficacité des produits de biocontrôle à base de ces champignons.

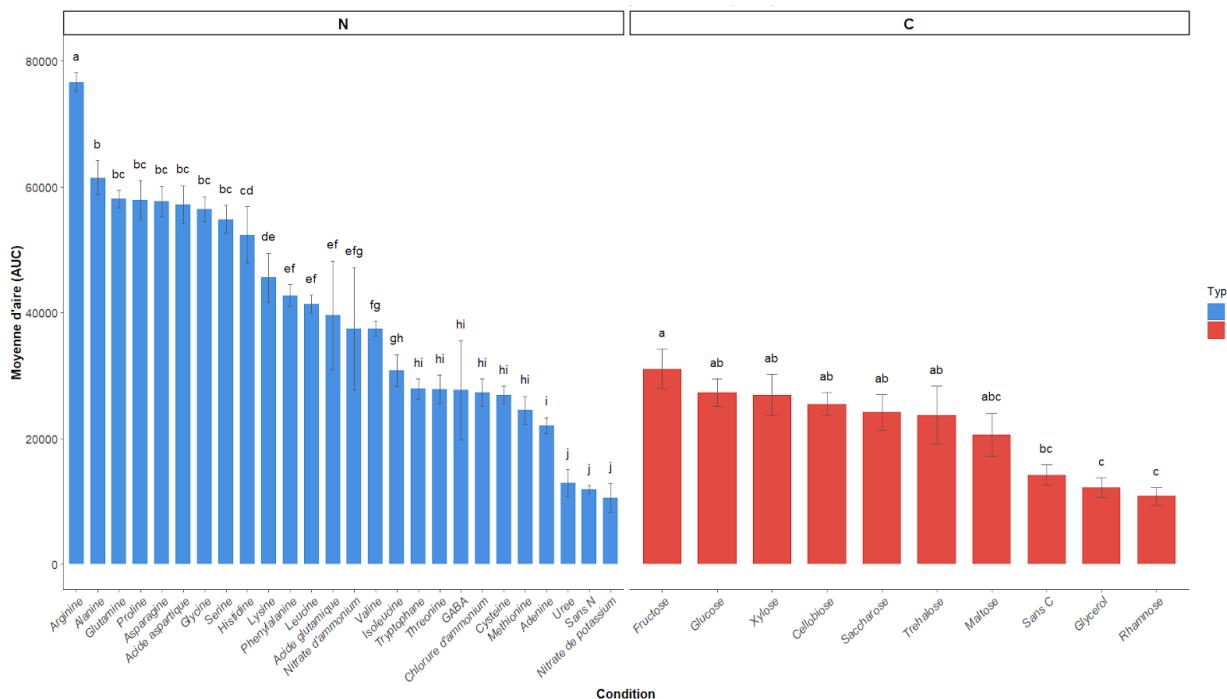
LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agnihotri VP, Vaartaja O.** 1967. The influence of nitrogenous compounds on growth of *Pythium* species. Canadian Journal of Microbiology **13**, 1509–1519.
- Ah-Fong AMV, Kagda MS, Abrahamian M, Judelson HS.** 2019. Niche-specific metabolic adaptation in biotrophic and necrotrophic oomycetes is manifested in differential use of nutrients, variation in gene content, and enzyme evolution. PLOS Pathogens **15**, e1007729.
- ANSES.** 2025. E-Phy. <https://ephy.anses.fr/>. Consulté en juin 2025.
- Baldin C, Segreto R, Bazafkan H, et al.** 2024. Are1-mediated nitrogen metabolism is associated with iron regulation in the mycoparasite *Trichoderma atroviride*. Microbiological Research **289**, 127907.
- Barrit T, Porcher A, Cukier C, Satour P, Guillemette T, Limami AM, Teulat B, Campion C, Planchet E.** 2022. Nitrogen nutrition modifies the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the necrotrophic fungus, *Alternaria brassicicola*. Physiologia Plantarum **174**, e13621.
- Bataillé-Simoneau N.** 2024. Pathologies fongiques des semences. <https://irhs.angers-nantes.hub.inrae.fr/recherche/pathologies-fongiques-des-semences/personnel>. Consulté en mai 2025.
- Boat MA, Sameza SML, Iacomi B, Tchameni SN, Boyom FF.** 2020. Screening, identification and evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol potential of common bean damping-off pathogens. Biocontrol Science and Technology **30**, 228–242.
- Benítez T, Rincón A, Limón MC, Codón A.** 2005. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology **7**, 249–60.
- Cheng P, Liu B, Su Y, et al.** 2017. Genomics insights into different cellobiose hydrolysis activities in two *Trichoderma hamatum* strains. Microbial Cell Factories **16**, 63.
- Cho Y.** 2015. How the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* kills plant cells remains an enigma. Eukaryotic Cell **14**, 335–344.
- Coninck E, Scauflaire J, Gollier M, Liénard C, Foucart G, Manssens G, Munaut F, Legrèvre A.** 2020. *Trichoderma atroviride* as a promising biocontrol agent in seed coating for reducing *Fusarium* damping-off on maize. Journal of Applied Microbiology **129**, 637–651.
- Daigle DJ, Cotty PJ.** 1991. The influence of cysteine, cysteine analogs, and other amino acids on spore germination of *Alternaria* species. Canadian Journal of Botany **69**, 2353–2356.
- Danielson RM, Davey CB.** 1973. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. Soil Biology and Biochemistry **5**, 505–515.
- Davis MA, Wong KH.** 2010. Nitrogen metabolism in filamentous fungi. Dans : **Borkovich KA, Ebbole DJ (éds.)** *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, Washington, DC : ASM Press, p. 325–338.
- Deguine J.** 2023. Lutte biologique et biocontrôle : un besoin de clarification. Cahiers Agricultures **32**.
- Dutta P, Deb L, Pandey A.** 2022. *Trichoderma*-from lab bench to field application: Looking back over 50 years. Frontiers in Agronomy **4**.
- Dutta P, Mahanta M, Singh SB, et al.** 2023. Molecular interaction between plants and *Trichoderma* species against soil-borne plant pathogens. Frontiers in Plant Science **Volume 14-2023**.
- FAO.** 2024. *The State of Food and Agriculture 2024*.
- Fawke S, Doumane M, Schornack S.** 2015. Oomycete Interactions with Plants: Infection Strategies and Resistance Principles. Microbiology and Molecular Biology Reviews **79**, 263–280.
- Fischer-Le Saux M.** 2025. HIMIC. <https://www.sfrquasav-angers.org/plateaux-techniques/himic>. Consulté en mai 2025.
- Fu W, Cao X, An T, Zhao H, Zhang J, Li D, Jin X, Liu B.** 2022. Genome-wide identification of resistance genes and transcriptome regulation in yeast to accommodate ammonium toxicity. BMC Genomics **23**, 514.
- Gao L, Sun MH, Liu XZ, Che YS.** 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. Mycological Research **111**, 87–92.
- García-Sánchez VJ, Sánchez-López KL, Esquivel Méndez JJ, Sánchez-Hernández D, Cervantes-Chávez JA, Landeros-Jaime F, Mendoza-Mendoza A, Vega-Arreguín JC, Esquivel-Naranjo EU.** 2024. Carbon and Nitrogen Sources Influence Parasitic Responsiveness in *Trichoderma atroviride* NI-1. Journal of Fungi **10**.
- Hermosa R, Cardoza RE, Rubio MB, Gutiérrez S, Monte E.** 2014. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. Dans : **Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, et coll. (éds.)** *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Amsterdam: Elsevier, p. 125–137.
- Hennicke F, Grumbt M, Lermann U, et al.** 2013. Factors Supporting Cysteine Tolerance and Sulfite Production in *Candida albicans*. Eukaryotic Cell **12**, 604–613.
- INRAE.** 2022. Centre INRAE Pays de la Loire. <https://www.inrae.fr/centres/pays-loire>. Consulté en mai 2025.
- Joubert A, Calmes B, Berruyer R, Pihet M, Bouchara J-P, Simoneau P, Guillemette T.** 2010. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. BioTechniques **48**, 399–404.
- Kerkaert JD, Huberman LB.** 2023. Regulation of nutrient utilization in filamentous fungi. Applied Microbiology and Biotechnology **107**, 5873–5898.
- Khalil S, Alsanusi B.** 2009. Utilisation of Carbon Sources by *Pythium*, *Phytophthora* and *Fusarium* Species as Determined by Biolog® Microplate Assay. The open microbiology journal **3**, 9–14.
- Khrieba MI.** 2020. Damping-off Caused by *Pythium* Species: Disease Profile and Management. *Pythium: Diagnosis, Diseases and Management*.

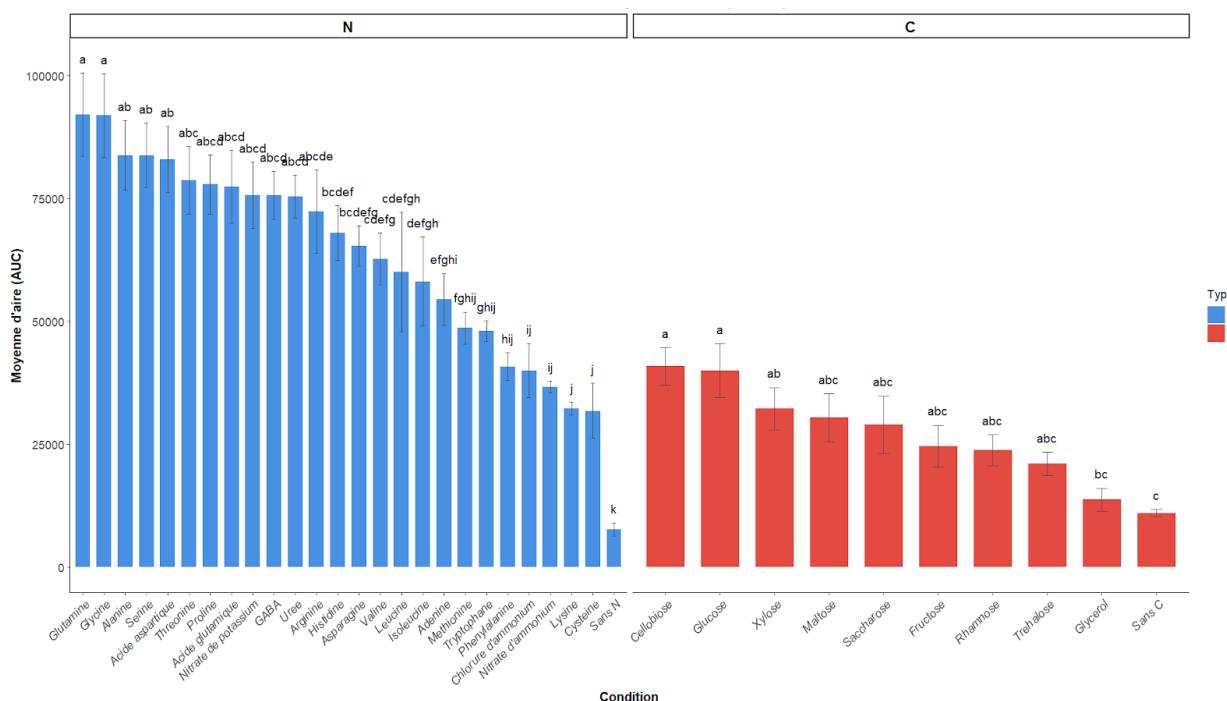
- Lamichhane JR, Dürr C, Schwanck AA, Robin M-H, Sarthou J-P, Cellier V, Messéan A, Aubertot J-N.** 2017. Integrated management of damping-off diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **37**, 10.
- Lévesque CA, Brouwer H, Cano L, et al.** 2010. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biology* **11**, R73.
- Liu Q, Meng X, Li T, Raza W, Liu D, Shen Q.** 2020. The Growth Promotion of Peppers (*Capsicum annuum* L.) by *Trichoderma guizhouense* NJAU4742-Based Biological Organic Fertilizer: Possible Role of Increasing Nutrient Availables. *Microorganisms* **8**.
- Macías-Rodríguez L, Contreras-Cornejo HA, Adame-Garnica SG, del-Val E, Larsen J.** 2020. The interactions of *Trichoderma* at multiple trophic levels: inter-kingdom communication. *Microbiological Research* **240**, 126552.
- Manoochehri H, Hosseini NF, Saidijam M, Taheri M, Rezaee H, Nouri F.** 2020. A review on invertase: Its potentials and applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **25**, 101599.
- Martin F.** 2009. *Pythium* Genetics. *Oomycete Genetics and Genomics*. 213–239.
- McGary KL, Slot JC, Rokas A.** 2013. Physical linkage of metabolic genes in fungi is an adaptation against the accumulation of toxic intermediate compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 11481–11486.
- Mukherjee PK, Mendoza-Mendoza A, Zeilinger S, Horwitz BA.** 2022. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews* **39**, 15–33.
- Nowakowska M, Wrzesińska M, Kamiński P, Szczechura W, Lichocka M, Tartanus M, Kozik EU, Nowicki M.** 2019. *Alternaria brassicicola* – Brassicaceae pathosystem: insights into the infection process and resistance mechanisms under optimized artificial bio-assay. *European Journal of Plant Pathology* **153**, 131–151.
- Nisha FA, Tagoe JNA, Pease AB, Horne SM, Ugrinov A, Geddes BA, Prüß BM.** 2024. Plant seedlings of peas, tomatoes, and cucumbers exude compounds that are needed for growth and chemoattraction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 and *Azospirillum brasilense* Sp7. *Canadian Journal of Microbiology* **70**, 150–162.
- Ochsenreither K, Hümmer D, Syldatk C, Neumann A.** 2012. Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation. *AMB Express* **2**, 28.
- Oszust K, Cybulska J, Frąc M.** 2020. How Do *Trichoderma* Genus Fungi Win a Nutritional Competition Battle against Soft Fruit Pathogens? A Report on Niche Overlap Nutritional Potentiaties. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Paredes GS, Paredes GS.** 2024. SNA (Synthetic Nutrient Deficient) Agar for Identification fungi. protocols.io *in press*.
- Pellier A-L, Lauge R, Veneault-Fourrey C, Langin T.** 2003. CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Molecular microbiology* **48**, 639–55.
- Ribeiro EC, Araújo EK, Penha MS, Nascimento AS, da Silva DF, Miranda RD.** 2025. Optimisation of Potato Dextrose Agar Culture Medium for Actinobacteria Growth. *Microorganisms* **13**.
- Rosberg AK, Gruyer N, Hultberg M, Wohanka W, Alsanous BW.** 2014. Monitoring rhizosphere microbial communities in healthy and *Pythium ultimum* inoculated tomato plants in soilless growing systems. *Scientia Horticulturae* **173**, 106–113.
- Saxena A, Dey R, Dube SP, Raghuwanshi R.** 2025. Chapter 5 - Advances in *Trichoderma* biology for biocontrol applications. *Biodiversity, Bioengineering, and Biotechnology of Fungi*. Academic Press, 77–104.
- Schuster A, Schmoll M.** 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**, 787–799.
- Sood M, Kapoor D, Kumar V, Sheteiwly MS, Ramakrishnan M, Landi M, Araniti F, Sharma A.** 2020. *Trichoderma*: The "Secrets" of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants* **9**.
- Stenberg JA, Sundh I, Becher PG, et al.** 2021. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science* **94**, 665–676.
- Stricker AR, Grossstessner-Hain K, Würleitner E, Mach RL.** 2006. Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocreahojecorina*. *Eukaryotic Cell* **5**, 2128–2137.
- Tadijan Mitrović I, Tančić Živanov S, Purar B, Trivunović Z, Mitrović B.** 2021. Effect of different carbon and nitrogen sources combination in medium for production of biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Ratarstvo i povrtarstvo* **58**, 1–6.
- Tseng Y-H, Rouina H, Groten K, Rajani P, Furch ACU, Reichelt M, Baldwin IT, Nataraja KN, Uma Shaanker R, Oelmüller R.** 2020. An endophytic *Trichoderma* strain promotes growth of its hosts and defends against pathogen attack. *Front. Plant Sci.* **11**, 573670.
- United Nations Department of Economic and Social Affairs.** 2024. *World Population Prospects 2024*.
- Veretka K, Štolcová J, Růžek P.** 2007. Sensitivity of fungi to urea, ammonium nitrate and their quimolar solution UAN. *Plant Protection Science* **43**, 157–164.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL, Lorito M.** 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* **40**, 1–10.
- Vongsangnak W, Salazar M, Hansen K, Nielsen J.** 2009. Genome-wide analysis of maltose utilization and regulation in *Aspergilli*. *Microbiology* **155**, 3893–3902.
- Woo S, Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Lanzuise S, Manganiello G, Lorito M.** 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal* **8**.
- Yang Y, Li Y, Zhu J.** 2024. Research progress on the function and regulatory pathways of amino acid permeases in fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **40**, 392.
- Zerillo MM, Adhikari BN, Hamilton JP, Buell CR, Lévesque CA, Tisserat N.** 2013. Carbohydrate-Active Enzymes in *Pythium* and Their Role in Plant Cell Wall and Storage Polysaccharide Degradation. *PLOS ONE* **8**, e72572.
- Zhang T, Yuan W, Li M, Miao M, Mu W.** 2018. Purification and characterization of an intracellular α-l-rhamnosidase from a newly isolated strain, *Alternaria alternata* SK37.001. *Food Chemistry* **269**, 63–69.

ANNEXES

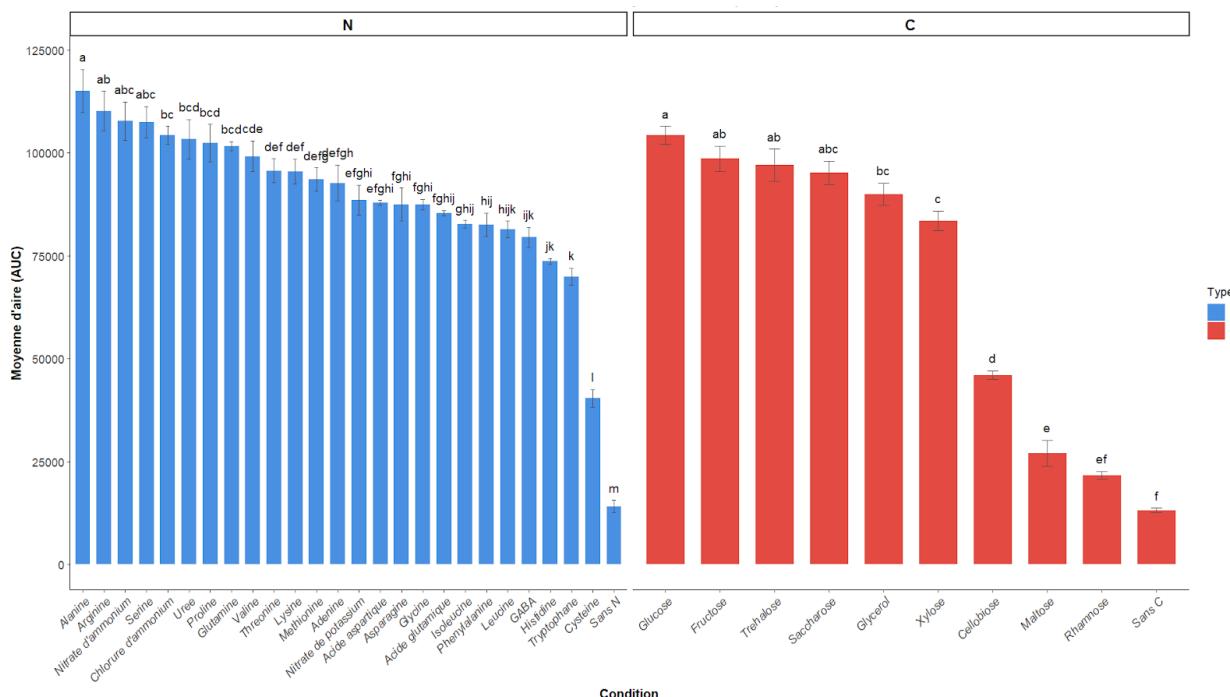
ANNEXE I : COMPARAISON DES MOYENNES D'AUC POUR CHAQUE SOUCHE SUR LES SUBSTRATS AZOTES ET CARBONES



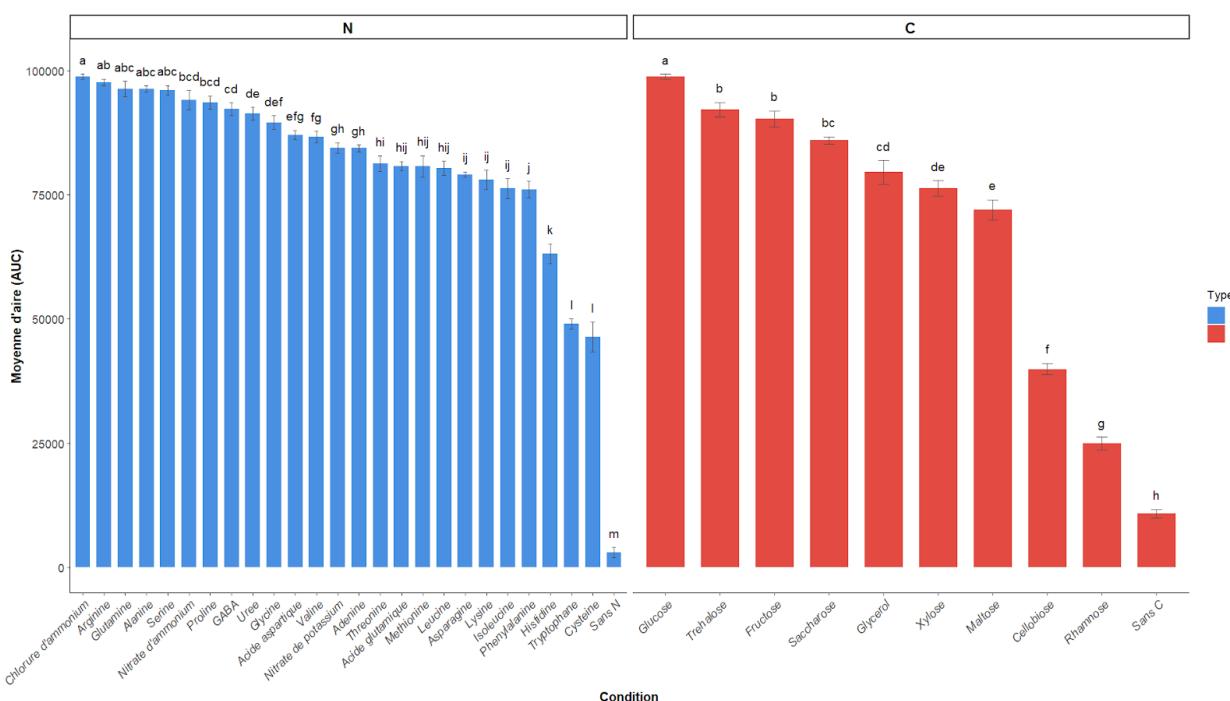
*Annexe I.A : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Pythium ultimum* Pu19. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $\alpha = 5\%$).*



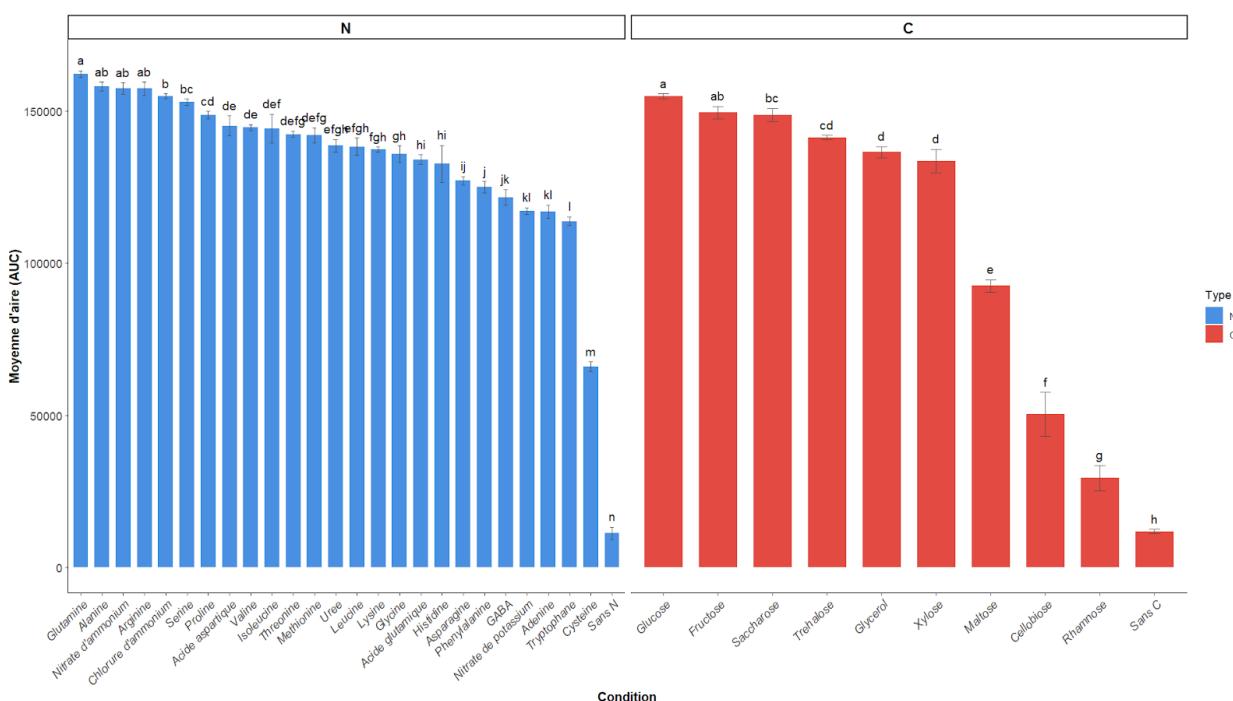
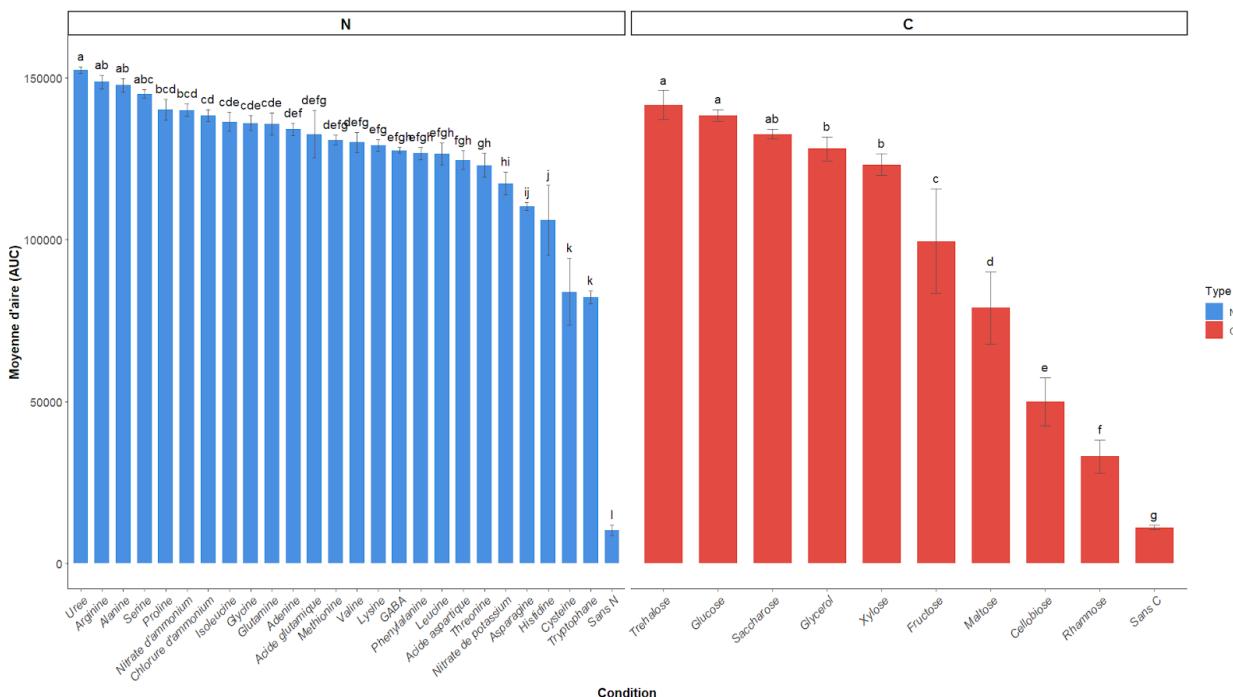
*Annexe I.B : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche d'*Alternaria brassicicola* Abra43. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $\alpha = 5\%$).*

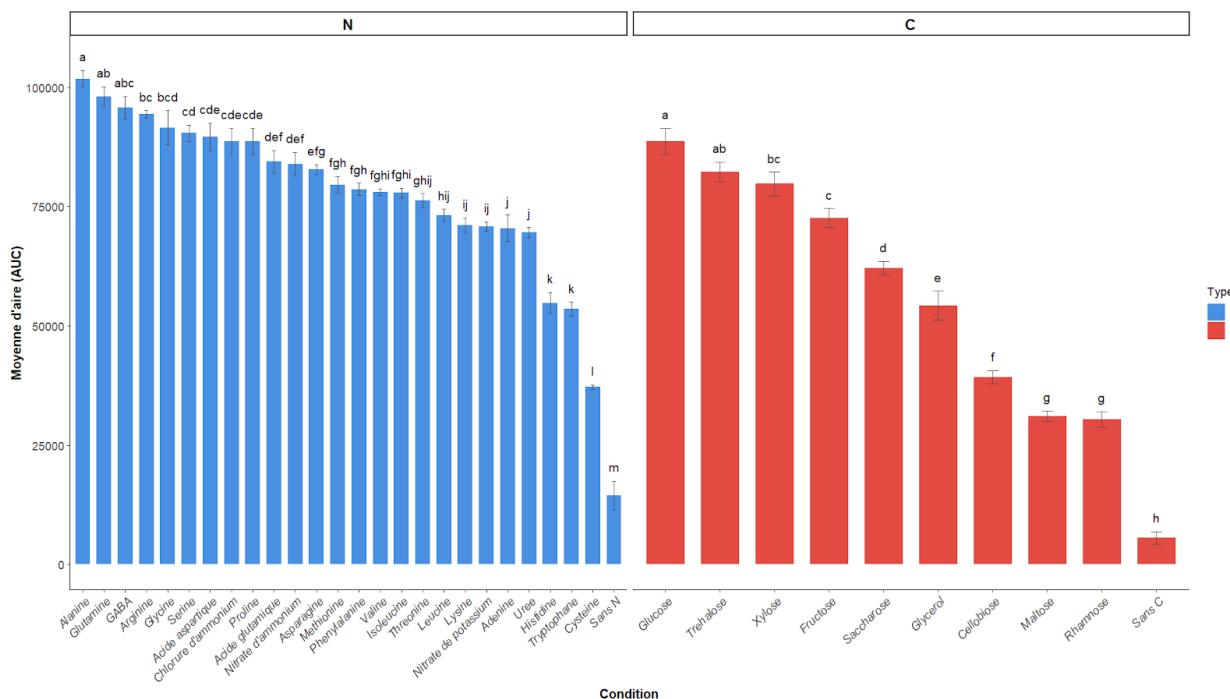


Annexe I.C : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* I237. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $a = 5\%$).

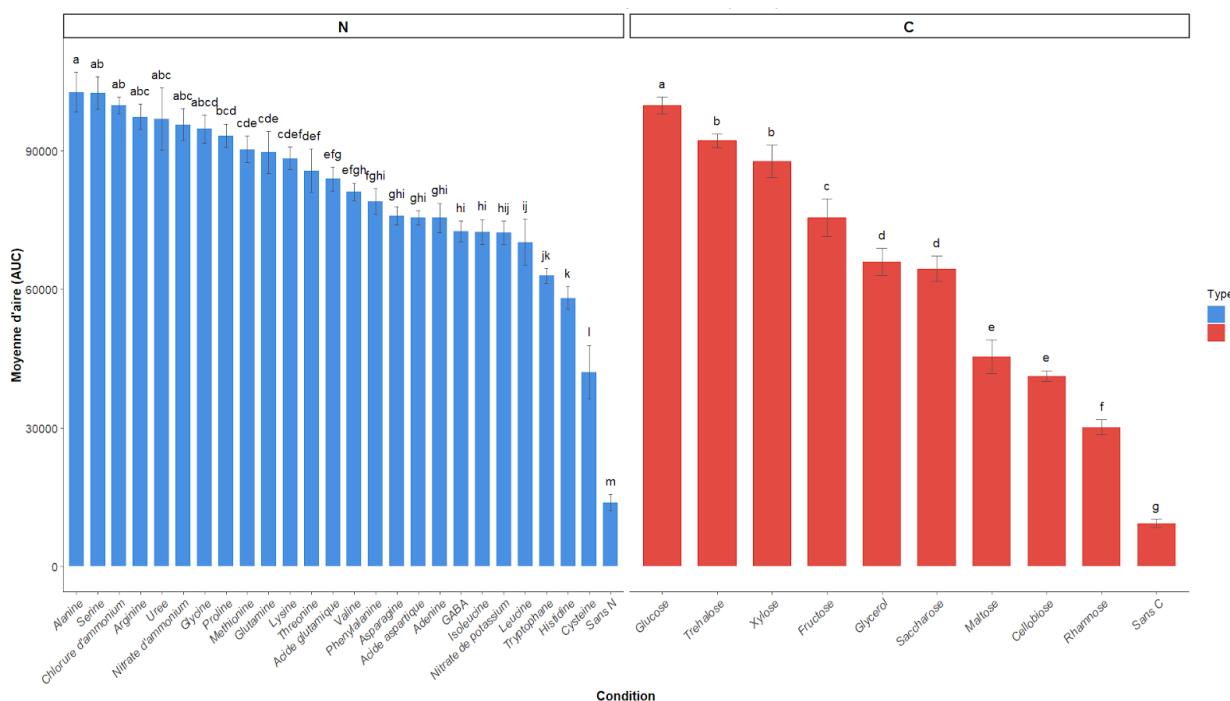


Annexe I.D : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* N1295. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $a = 5\%$).



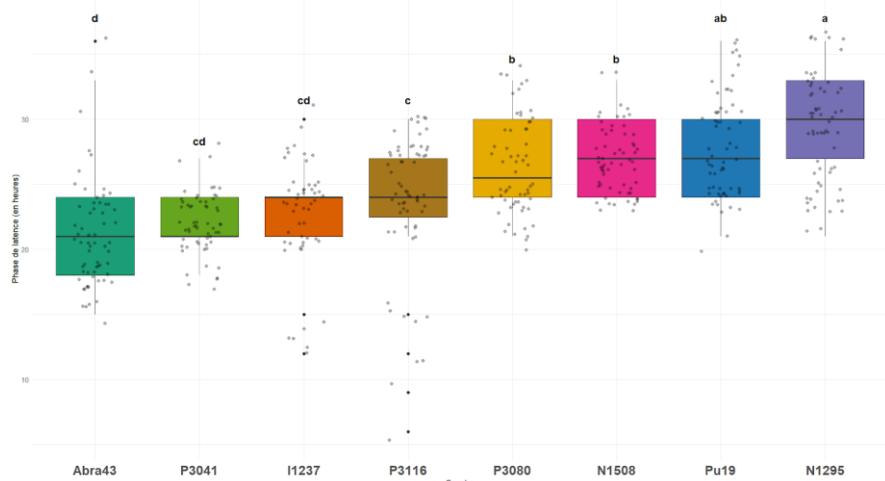


Annexe I.G : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* P3080. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $\alpha = 5\%$).

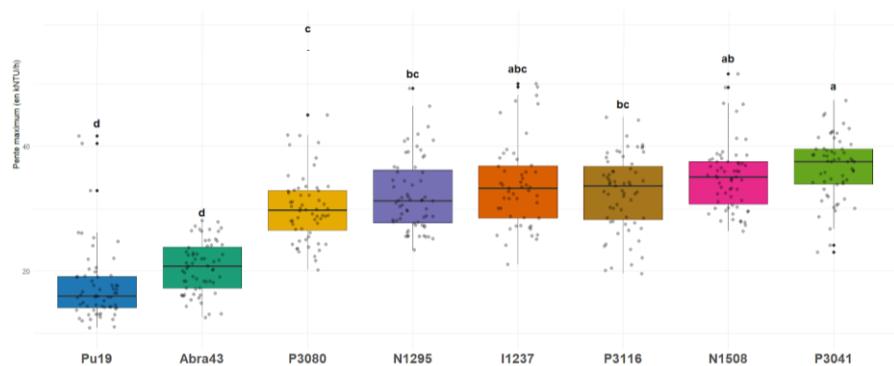


Annexe I.H : Histogramme des moyennes d'AUC par substrats azotés (N) et carbonés (C) de la souche de *Trichoderma atroviride* P3116. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $\alpha = 5\%$).

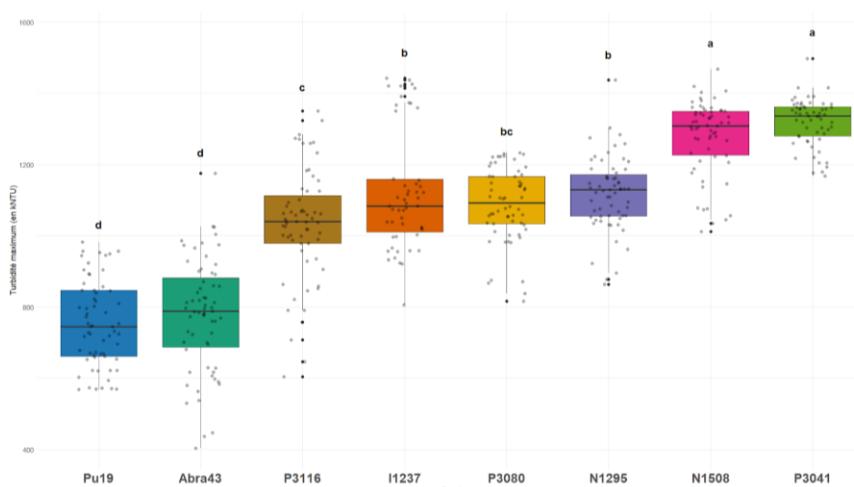
ANNEXE II : COMPARAISON DES PERFORMANCES DE CROISSANCE D'ABRA43 ET DES SOUCHES DE *T. ATROVIRIDE* SUR CERTAINS ACIDES AMINES



Annexe II.A : Boxplot de la distribution des temps de latence (en heures) triés par médiane pour Abra43 et chaque souche de *T. atroviride* sur les substrats du groupe 4 de la figure 9. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $\alpha = 5\%$).

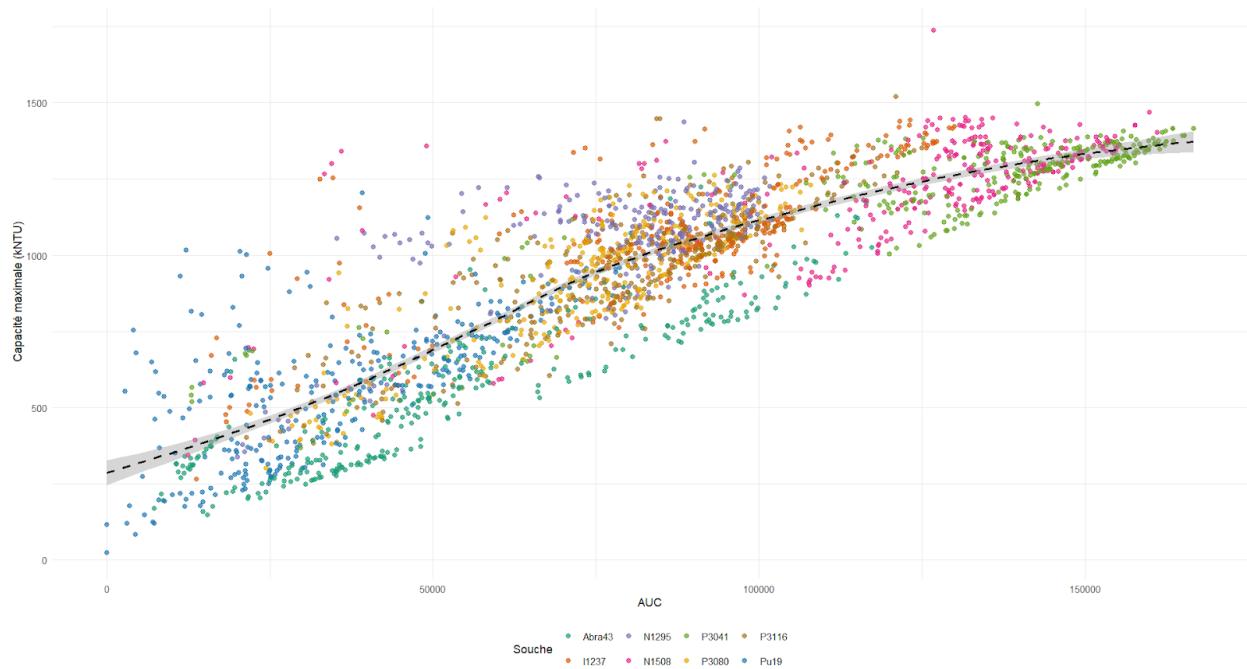


Annexe II.B : Boxplot de la distribution des pentes maximum (en kNTU/h) triés par médiane pour Abra43 et chaque souche de *T. atroviride* sur les substrats du groupe 4 de la figure 9. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $\alpha = 5\%$).



Annexe II.C : Boxplot de la distribution des turbidités maximales (en kNTU) triés par médiane pour Abra43 et chaque souche de *T. atroviride* sur les substrats du groupe 4 de la figure 9. Les lettres indiquent des différences significatives (test de Tukey, $\alpha = 5\%$).

ANNEXE III : CORRELATION ENTRE L'AUC ET LA TURBIDITE MAXIMALE



Annexe III : Nuage de points de la corrélation de Spearman ($\rho = 0,89$, $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$) entre l'AUC et la turbidité maximale obtenus par néphélosétrie sur tous les substrats pour toutes les souches

RESUME

Étude de la compétition pour les nutriments entre l'agent de biocontrôle *Trichoderma atroviride* et des agents pathogènes responsables de fontes de semis

Les fontes de semis, causées notamment par *Pythium ultimum* (un oomycète) et *Alternaria brassicicola* (un ascomycète), sont responsables de pertes agricoles importantes en affectant la survie des plantules. Dans ce contexte, *Trichoderma atroviride*, un champignon reconnu pour ses propriétés de biocontrôle, représente une alternative prometteuse aux produits phytosanitaires conventionnels. L'une des stratégies de biocontrôle qu'il mobilise repose sur la compétition nutritive, en s'appropriant plus efficacement les ressources disponibles par rapport aux agents pathogènes. Au cours de ce stage, la croissance de six souches de *T. atroviride* a été comparée à celle de *P. ultimum* et *A. brassicicola* sur différentes sources de carbone et d'azote, pendant sept jours et par néphélométrie. Les résultats montrent que *T. atroviride* se développe plus rapidement et de manière plus importante par rapport aux agents pathogènes sur certaines sources nutritives, notamment le nitrate d'ammonium, l'urée et le glycérol. Une diversité métabolique a également été observée entre les souches de *T. atroviride*, suggérant qu'une combinaison de souches aux profils complémentaires pourrait améliorer l'efficacité du biocontrôle. Ainsi, certaines sources nutritives semblent favoriser la croissance de *T. atroviride* au détriment des pathogènes, renforçant son potentiel dans la lutte contre les fontes de semis.

Mots-clefs : *Trichoderma atroviride*, *Alternaria brassicicola*, *Pythium ultimum*, croissance fongique, azote, carbone, fonte de semis, biocontrôle

ABSTRACT

Study of nutrient competition between the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* and pathogens responsible for damping-off disease

Damping-off diseases, caused notably by *Pythium ultimum* (an oomycete) and *Alternaria brassicicola* (an ascomycete), are responsible for significant agricultural losses by affecting seedling survival. In this context, *Trichoderma atroviride*, a fungus known for its biocontrol properties, represents a promising alternative to conventional plant protection products. One of the biocontrol strategies it employs is nutrient competition, as it more effectively appropriates available resources than the pathogens. During this internship, the growth of six *T. atroviride* strains was compared to that of *P. ultimum* and *A. brassicicola* on different carbon and nitrogen sources over seven days, using nephelometry. The results show that *T. atroviride* grows faster and more extensively than the pathogens on certain nutrient sources, notably ammonium nitrate, urea, and glycerol. Metabolic diversity was also observed among the *T. atroviride* strains, suggesting that combining strains with complementary profiles could enhance biocontrol effectiveness. Thus, certain nutrient sources appear to favor the growth of *T. atroviride* over that of the pathogens, reinforcing its potential in combating damping-off diseases.

Key words : *Trichoderma atroviride*, *Alternaria brassicicola*, *Pythium ultimum*, fungal growth, nitrogen, carbon, damping-off, biocontrol