



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Phytopathologie

Thème

**Activité antimicrobienne des champignons
endophytes isolé à partir de la plante de *Juniperus
oxycedrus L.***

Présenté par : - Charifi Kamir
- Saadaoui Razika

Devant le jury :

Président : M^r Sadrati Nouari MAA (El Bachir El Ibrahimi BBA)

Encadrant: M^{me} Zerroug Amina MAA (El Bachir El Ibrahimi BBA)

Examineur 1: M^r Mouatassem Dahou MAA (El Bachir El Ibrahimi BBA)

Année universitaire : 2014/2015

Annexe n° 01 : Milieux de culture**Potato dextrose agar (PDA)**

Pomme de terre épluchées et coupées.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Gélose Mueller-Hinton

Pour préparer ce milieu il faut peser 38g de poudre et la mélanger à 1L d'eau distillée.

Bouillon nutritif (BN)

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	5 g
NaCl.....	5 g
Eau distillée.....	1000 ml

Pikovskaya's medium (PVK)

Extrait de levure.....	0,5 g
Dextrose.....	10g
Phosphate de calcium.....	5g
Sulfate d'ammonium	0,5 g
Chlorure de potassium	0,2 g
Sulfate de magnésium.....	0,1g
Sulfate de manganèse.....	0,0001g
Sulfate ferreux	0,0001g
Agar	15g
Eau distillée.....	1000 ml

Annexe n°2

Tableau n°1 : Statut taxonomique générale (en %) des champignons endophytes détectés dans les différentes parties de *Juniperus oxycedrus* L.

Les divisions	Nombre de genres	Statut taxonomique générale
Deuteromycota	10	62,5
Ascomycotina	4	25
Stramenopiles	1	6,25
Autre division	1	6,25

Annexe n°3

Tableau n°2: Fréquence d'isolement (en %) des champignons endophytes présents dans les différents organes de *Juniperus oxycedrus* L.

Les organes	Nombre des isolats	Fréquence d'isolement
Racines	72	68,57
Tiges	26	24,76
Feuilles	7	6,67

I.1. Généralité sur les champignons endophytes

I.1.1. Définition des champignons endophytes

Au cours des 30 dernières années, les termes endophytes et champignons endophytes sont apparus fréquemment dans la littérature mycologique pour décrire les champignons internes des plantes (**Jeffrey al., 2008**).

Les applications contemporaines de ces termes ne sont pas toujours cohérentes ni sont acceptés par tous les chercheurs (**Petrini, 1991; Wennström, 1994; Wilson, 1995; Saikkonen et al., 1998; Stone et al., 2000**).

Selon **Hawksworth et al. (1995)** dans the Dictionary of the fungi, le mot « endophyte » désigne : « organisme qui vit dans la plante ».

Le terme « champignons endophytes » fut utilisé pour la 1^{ère} fois par **De Bary (1866) et Wilson (1997)** pour décrire les champignons isolés à partir des tissus des végétaux. Ces mycètes sont capables de coloniser les tissus sains internes des plantes, se développent de façon intercellulaire ou intracellulaire, sans y causer de symptômes, ni affecter négativement ou altérer le statut biologique et physiologique du végétal hôte.

Carroll (1988); Boddy et Griffith (1989) et Yates et al. (1997) définissent l'endophyte comme étant un champignon qui colonise les tissus des plantes saines pour y persister sous une forme dormante ou s'étendre sous forme d'infection sans produire de symptômes. Si leur présence a pour effet de protéger les tissus du stress biotiques et/ou abiotiques, il s'agit de champignons mutualistes (**Carroll, 1990; Latch, 1993 ; Claudine et Picq, 2000**).

La définition la plus couramment utilisée pour décrire les endophytes est celle de **Petrini (1991)** qui définit les endophytes comme étant tous les microorganismes vivant dans les organes végétaux interne à un certain moment de leurs vie et peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommage apparents chez l'hôte (**Hyde et Soyong, 2008**).

I.1.2. Théorie de l'origine des champignons endophytes

Bien que l'origine des termes peut être retracée au 19^{ème} siècle, leur sens contemporain est différent de celui d'origine (**Large, 1940; Carroll, 1986**). Bien que les

microbes apparaissant dans les cultures des tissus végétaux ont souvent été considérés comme contaminants provenant de l'extérieur des cultures, certains scientifiques ont suggérés que certains d'entre eux peuvent être des endophytes d'origine des tissus de la plante elle-même (Cassells, 1991; Holland, 1997).

Beaucoup d'espèces fongiques phytopathogènes sont des endophytes d'origine. D'autres étant associées aux végétaux supérieurs et sont considérés comme agents phytopathogènes latents, pouvant induire ainsi des maladies sur la plante-hôte une fois que cette dernière soit fragilisée dans son environnement par un ou plusieurs facteurs de nature abiotique ou biotique (Carroll, 1986).

Des investigations permirent la déduction d'une hypothèse énonçant que l'interaction plante/endophyte est généralement de nature « antagoniste équilibrée » entre le végétal et son agent pathogène (Tan et Zou, 2001; Schulz et al., 2002).

I.1.3. Biologie et écologie

Beaucoup des champignons endophytes fréquemment rapportés sont considérés comme des agents pathogènes mineurs ou secondaires par les pathologistes forestiers (Jeffrey et al., 2011). Les champignons endophytes pénètrent dans les tissus végétaux au niveau du système racinaire, cotylédons, tiges, feuilles et fleurs et ils peuvent soit se localiser au point d'entrée ou se propager dans toute la plante (Li et al., 2012).

Leurs fréquences dans les deux tissus sains et malades soulignent l'incertitude des limites séparant les formes endophytes, les agents pathogènes facultatifs et les agents pathogènes latents. En effet, les différences comportementales entre les espèces endophytes et pathogènes latentes sont faibles, ils peuvent refléter des différences en matière de durée de phase de latence ou de repos ainsi que les niveaux des préjudices subies par la plante-hôte durant la phase active de la croissance du champignon (Jeffrey et al., 2011).

Les champignons décrits comme "endophytes" présentent typiquement, une période de vie discrète durant laquelle la croissance et la colonisation peuvent cesser temporairement, et reprendre à nouveau après un changement induit par la part de la plante hôte ou de l'environnement physique ou biotique. Cette croissance épisodique est une caractéristique déterminante des endophytes, pour déterminer s'ils sont en fin de compte

considérés comme saprophytes, commensales, pathogènes latents ou mutualistes (Stone et al., 2004).

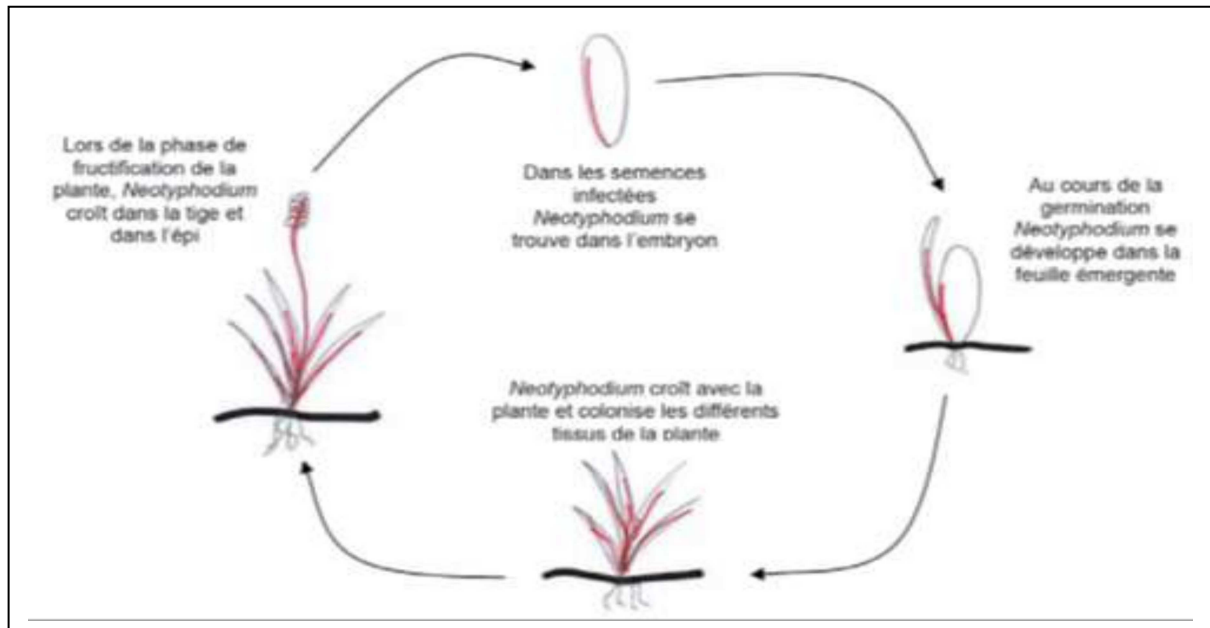


Figure n°1 : Représentation schématique du cycle de vie des champignons endophytes du genre *Neotyphodium* (Repussard et al., 2013).

I.1.4. Diversité et classification des champignons endophytes

La diversité des champignons endophytes est élevée, et y on a de nouvelles espèces encore non connus (Albrechtsen et al., 2010). Les champignons sont associés à des végétaux depuis de 400 million d'années (Krings et al., 2007; Sun et al., 2011), ils peuvent être trouvés chez toutes les espèces de plantes et dans les différentes régions du monde (Petrini et Carroll, 1981; Petrini et al., 1992; Larran et al., 2002).

Un certain nombre d'études récentes donnent des preuves solides que les champignons endophytes sont très diversifiés dans tous les organes des plantes hôtes et dans les forêts tropicales (Lodge et al., 1996; Frohlich et Hyde, 1999; Arnold et al., 2000; Arnold et al., 2001; Gamboa et Bayman, 2001). Ils ont trouvé que presque toutes les espèces des plantes vasculaires contiennent toujours plusieurs types de champignons endophytes dans les plaines et les forêts humides (Lodge et al., 1996; Arnold, 2002), et jusqu'à 140 espèces des champignons endophytes ont été trouvées en association avec les plantes individuelles dans une forêt tropicale humide (Frohlich et Hyde, 1999 ; Arnold, 2005).

Taxonomiquement les endophytes des racines et des organes aériennes de la plante appartiennent principalement au groupe des Ascomycètes et certains nombre limité d'espèces endophyte appartiennent au groupe des Basidiomycètes (**Petrini, 19861**) et à d'autres groupes comme les Deuteromycètes, Zygomycètes et les Oomycètes (**Orlando Petrini et al., 1992**).

I.1.4.1. Clavicipitaceous endophytes

Les endophyte de classe 1

Le Clavicipitaceae (Hypocreales; Ascomycota) comprennent une connexion de vie symbiotique avec les insectes, les champignons (*Cordyceps* sp.) et les graminées (*Balansia* spp., *Epichloë* spp. et *Claviceps* spp.) (**Bacon et White, 2000**).

I.1.4.2. Non clavicipitaceous endophytes

La distribution et l'abondance des champignons endophytes et les données actuelles concernant l'isolement et l'analyse des composés bioactifs permet leur utilisation potentielle comme agent de lutte biologique (**Selosse et al., 2004; Schulz, 2006; Arnold et al., 2007; Higgins et al., 2007; Kithsiri Wijeratne et al., 2008**).

Les endophytes de classe 2

Les endophytes de classe 2 comprennent une diversité d'espèces qui sont tous membres de la Dikarya (Ascomycota ou Basidiomycota). La plupart appartiennent à l'Ascomycota avec une minorité de Basidiomycota.

Les endophytes de classe 2 colonisent les racines, les tiges et les feuilles et sont responsables des infections importantes au sein des plantes, ils sont transmis par des graines et des rhizomes et présentent une faible abondance dans la rhizosphère et ont généralement des fréquences d'infection élevés (90-100%) dans les cultures des plantes des habitats stressés.

Les endophytes de classe 3

Les endophytes de classe 3 comprennent des champignons endophytes très diversifiés associés avec les feuilles d'arbres tropicaux (**Lodge et al., 1996; Fröhlich et Hyde, 1999; Arnold et al., 2000; Gamboa et Bayman, 2001**), les plantes non vasculaires et les plantes vasculaires sans graines, conifères, angiospermes ligneuses et herbacées dans

les biomes allant des forêts tropicales à la forêt boréales et l'arctiques (**Carroll, 1978; Petrini, 1986; Stone, 1988; Fisher et al., 1995; Davis et al., 2003; Higgins et al., 2007; Murali et al., 2007; Davis et Shaw, 2008**). En plus de se produire dans les tissus photosynthétiques et herbacées, les endophytes de classe 3 se trouvent dans les fleurs et les fruits, ainsi que dans le bois asymptotique et écorce interne (**Barengo et al., 2000; Kumar & Hyde, 2004; Tejesvi et al., 2005**).

Les endophytes de Classe 4

Actuellement, ces champignons sont considérés comme des «Dark Septate endophytes (DSE) distingués en tant que groupe fonctionnel sur la base de la présence des cloisons mélanisés sombre. En général, les endophytes de la classe 4 sont principalement des champignons ascomycètes qui ont des conidies ou stérile et qui forment des structures telles que des hyphes mélanisées et inter et intracellulaire micro sclérotés dans les racines. Ces champignons ne sont pas considérés comme pathogènes, comme ils sont observés sur les racines fines saines, et dans ce contexte, seront appelés endophytes dans un sens large dans l'Antarctique, l'Arctique, alpin, subalpin, et les zones tempérées, ainsi que des plaines côtières et les plaines africaines, et certains écosystèmes tropicaux (**Jumpponen et Trappe, 1998; Jumpponen, 2001; Rodriguez, 2009**).

Tableau n°I : Critères employés pour caractériser les classes des champignons endophytes (Rodriguez et al., 2008).

Critères	Clavicipitacé	Non – Clavicipitacées		
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Classe d'hôte	Limitée	Vaste	Vaste	Vaste
Tissu(s) colonisé	Pousses et rhizomes	Pousses, racines et rhizomes	Pousses	Racines
Colonisation dans la plante	Extensive	Extensive	Limitée	Extensive
Biodiversité au niveau de la plante	Basse	Basse	Élevée	Inconnue
Transmission	Horizontale et verticale	Horizontale et verticale	Horizontale	Horizontale
Avantages	NHA	NHA et HA	NHA	NHA

NHA : avantage comme la tolérance à la sécheresse, augmentation de la croissance.

HA : avantages résultant de la spécificité d'habitat et les pressions comme le pH, température et la salinité.

I.1.5. Modes de transmission des endophytes

Par leurs modes de reproduction sexuée ou asexuée, les champignons endophytes optèrent pour les voies de transmission verticale ou horizontale pour assurer leur perpétuité (Cheplick, 2009). Ils peuvent infecter les plantes au moyen d'une transmission horizontale, lorsque leur inoculum est transporté vers une autre plante, ou verticalement quand ils infectent la descendance des semences d'une plante infectée (Zabalgozcoa, 2008).

I.1.5.1. Transmission verticale

C'est la transmission du champignon systémique de la plante hôte à sa progéniture par l'intermédiaire de ses graines. Ce type de transmission est connu notamment chez les graminées comme l'endophytes *Neotyphodium* et certaines espèces de *Epichloë* (Zabalgozcoa, 2008). Elle est effectuée généralement par les formes végétatives (hyphes) du champignon porté par les semences de la plante hôte. La transmission verticale

avait été prédite par la théorie de l'évolution et était associée avec les fortes interactions mutualistiques, du fait que la survie et la reproduction de l'hôte et de l'endophyte sont étroitement liées. La transmission via les graines n'est pas assurée à 100% soit, parce que les hyphes du champignon endophyte faillent à se développer dans les graines ou les tiges (transmission imparfaite), soit par la perte de leurs viabilité (**Faeth., 2002**).

I.1.5.2. Transmission horizontale

Le mécanisme de transmission horizontale prédomine la dispersion des espèces endophytes (**Zabalgoeazcoa, 2008**). Elle s'effectue entre les plantes de la même espèce ou des espèces différentes via les spores. Ces spores sont déposées sur les différentes parties du végétal en particulier les feuilles. Le vent et les insectes peuvent agir comme un vecteur pour la transmission des spores (**Bultman et al., 1995; Rao et Baumann, 2004 ; Cheplick et Faeth, 2009**). Cependant, les taux de transmission horizontale devraient égaler ou excéder ceux perdus à cause de non viabilité des hyphes et de la transmission imparfaite afin de maintenir ou augmenter les fréquences de l'infection (**Faeth, 2002**). Cette forme de transmission horizontale a comme conséquence des graines infectées qui produisent des plantules infectées lors de la germination, plutôt que des plantes adultes simplement infectées (**Schardl et Leuchtman, 2005**).

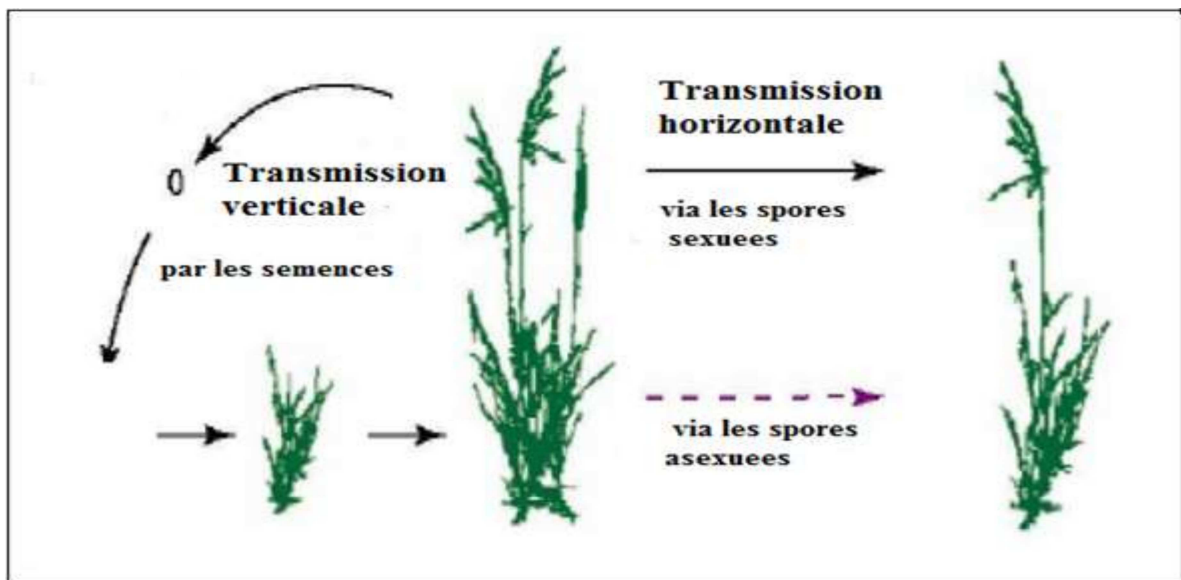


Figure n°2 : Cycle de vie et mode de transmission (verticale et horizontale) du champignon endophyte *Neotyphodium* sur son hôte *Festuca arundinacea* (**Saikkonen et al., 2004**).

I.1.6. Interaction entre la plante hôte et les champignons endophytes

Il existe une relation complexe entre les endophytes et leurs plantes hôtes, Ces Interactions hôte-endophytes peuvent aller du commensalisme au mutualisme et même au parasitisme. Les phénotypes des interactions sont souvent dépendants des dispositions génétiques des deux partenaires, leur stade de développement, l'état nutritionnel mais aussi des facteurs environnementaux (Johnson et al., 1997 ; Redman et al., 2001 ; Schulz et Boyle., 2005).

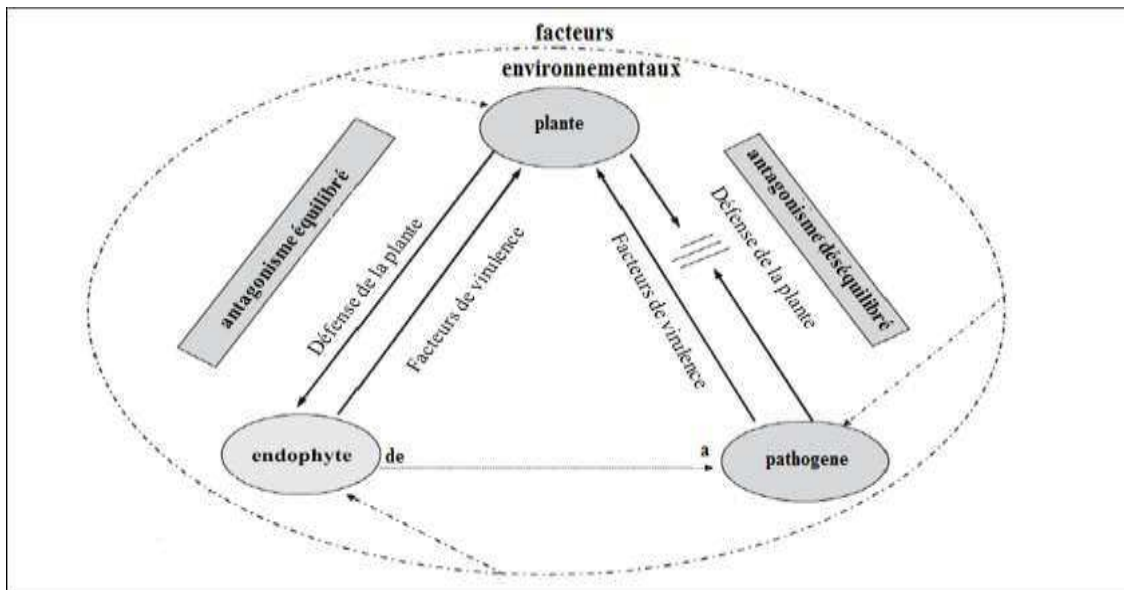


Figure n°3: Schéma explicatif de la relation hôte-endophyte (Schulz et Boyle, 2005).

Le commensalisme procure des avantages à l'endophyte en lui permettant de vivre paisiblement et lui apporte des nutriments sans affecter l'hôte. La relation mutuelle profite aux champignons endophytes en lui fournissant de l'énergie électrique, des éléments nutritifs, ainsi que la protection contre le stress environnemental, d'autre part les champignons endophytes aussi procurent indirectement un avantage à la plante hôte en stimulant sa croissance en produisant des substances spéciales, des métabolites et des enzymes principalement secondaires qui sont responsables de l'adaptation des plantes aux stress abiotiques tels que la lumière, la sécheresse et aux stress biotiques comme les herbivores, les insectes et les nématodes attaquant ou l'invasion des pathogènes (Barz et al., 1988 ; Kogel et al., 2006).

Le parasitisme est une exception dans les interactions plantes-endophytes; il peut être considéré comme un état déséquilibré d'une symbiose lorsque l'hôte est affaibli et les

conditions physiologiques ou écologiques favorisent la virulence (Müller et al., 2005 ; Schulz et Boyle, 2005 ; Kogel et al., 2006).

Schulz et Boyle (2005) ont proposé que la colonisation asymptotique des endophytes est une interaction antagoniste équilibrée entre ces derniers et leur plante hôte, et aussi longtemps que la virulence de l'endophyte et la défense de la plante sont équilibrés, l'interaction reste asymptotique. Une fois l'interaction hôte-endophyte devient déséquilibré, quand la plante est malade ou que son système de défense est troublé le champignon peut devenir pathogène. L'équilibre et le déséquilibre de cette interaction dépendent de l'état général des partenaires, la virulence du champignon, et les défenses de l'hôte, tous les deux influencés par les facteurs environnementaux, l'état nutritionnel et les stades de développement des partenaires.

Les endophytes possèdent une structure similaire avec les agents pathogènes et les deux possèdent les mêmes facteurs de virulence comme la production des métabolites phytotoxiques et exoenzymes qui sont nécessaires pour infecter et coloniser l'hôte. De plus, la pénétration des champignons dans la paroi cellulaire est normalement accompagnée par la libération des électeurs par les plantes (Jeffrey, 2011). Enfin, Moricca et Ragazzi (2008) indiquent que le type d'interaction entre une plante et un endophyte est contrôlée par les gènes des deux organismes et modulé par l'environnement.

I.1.7. La colonisation des tissus et la spécificité

Beaucoup des endophytes peuvent infecter localement les différentes parties des plantes, cette hypothèse est prouvée par le fait que plusieurs espèces endophytes sont isolées à partir des différents fragments de la même plante. Les espèces de *Neotyphodium* infectent de façon systémique l'espace intercellulaire des feuilles, les tiges, et les graines de leurs hôtes. Ces endophytes systémiques peuvent être isolés à partir des plusieurs fragments de la même plante. La spécificité des tissus et des organes permet à quelques endophytes de se trouver dans différentes parties spécifiques de la plante comme les racines, les feuilles, les brindilles tandis que d'autres peuvent infecter plusieurs pièces (Stone et al., 2004 ; Zabalgozcoa, 2008).

I.1.7.1. Les mycoendophytes colonisateurs des feuilles

Ils sont cosmopolites, c'est le type de colonisation prédominant de ce groupe. Les genres *Neotyphodium*, *Epichloë*, *Lophodermium*, *Phialophora* et *Rhabdocline* sont cités à titre d'exemples (Stone et al., 2004).

La richesse des champignons endophytes dans les feuilles est corrélée avec la teneur en eau, le ratio de la matière fraîche /la matière sèche et le poids spécifique des polyphénols de la feuille (Sanchez-Azofeira et al., 2012). Les communautés d'endophytes varient selon les espèces de plantes hôtes et le type de l'ontogenèse de l'organe végétale. La richesse en endophyte augmente au cours du développement de la feuille (Arnold., 2005; Arnold et al., 2003; Sanchez-Azofeira et al., 2012).

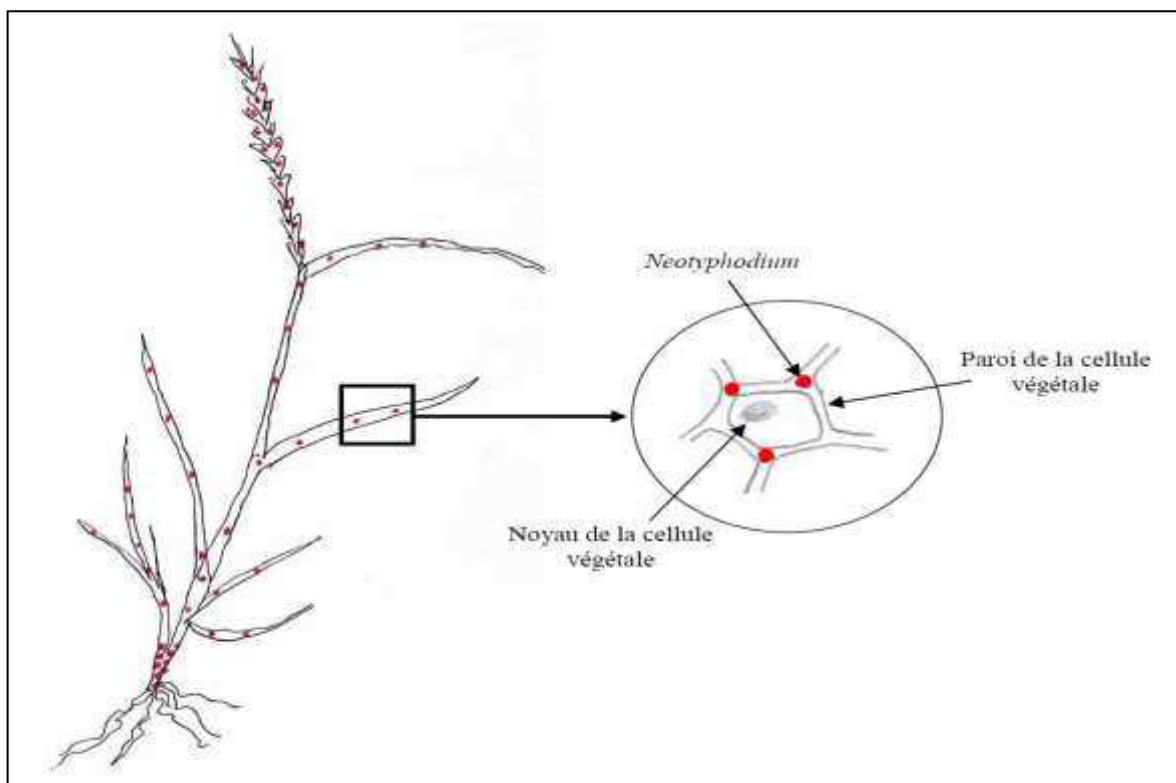


Figure n° 4 : Répartition de *Neotyphodium* dans la plante hôte et détail des espaces inter - cellulaires d'une section de feuille (Repussard et al., 2013).

I.1.7.2. Les mycoendophytes colonisateurs du xylème et le phloème

Les endophytes sont aussi endémique dans le xylème et le phloème (Sanchez Azofeira et al., 2012). Ils colonisent aussi bien les espaces intercellulaires que les cellules du xylème et du phloème (Garcia et al., 2012). les petits hyphes sont observés sous la

cuticule et entre les cellules épidermiques, les hyphes plus longs sont dans tous les tissus incluant les épidermes, le mésophylle (parenchyme palissadique et spongieux) et les tissus vasculaire (Harvey et al., 1975; Zareb, 2014).

I.1.7.3. Les mycoendophytes colonisateurs des racines

La diversité, les fréquences de colonisation et la densité de la communauté mycoendophyte au niveau des racines varient selon les conditions climatiques et édaphiques, ainsi que l'hétérogénéité de l'habitat. Les changements observés dans la dynamique des populations endophytes limitées à cette partie souterraine de la plante sont déterminés par les variations saisonnières subies par la partie aérienne (Sieber, 2002).

La colonisation des racines peut également être inter et intracellulaire, les hyphes forment souvent des enroulements intracellulaires, comme c'est le cas pour les Dark Septate Endophytes (DES) (Jumpponen et Trappe, 1998; Stone et al., 2000; Sieber, 2002) ou certains basidiomycètes (Varma et al., 2000). Il est rapporté que *Cryptosporiopsis*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Microdochium* et également les DSE tel que *Phialocephala* spp. et *Phialophora* spp. sont les espèces qui dominent fréquemment les communautés isolées des racines (Sieber, 2002).

I.1.8. Les rôles des champignons endophytes

I.1.8.1. Rôles physiologiques

Plus d'un siècle après la première description du concept de la symbiose (De Bary, 1879), il est devenu évident que presque toute vie multicellulaire sur terre est étroitement associée à la présence des micro-organismes. Puisque les plantes sont fermement ancrées dans le sol, il n'est pas surprenant qu'elles soient toutes considérées comme étant en symbiose avec les champignons mycorrhiziens et / ou endophytes (Petrini, 1996; Brundrett, 2006). Des preuves récentes indiquent que les champignons mutualistes, Plant Growth Promoting Fungi (PGPF) contribuent de manière significative, ou sont tenus responsables de l'adaptation des plantes face à des conditions de stress environnementaux, y compris la sécheresse, la chaleur, des pathogènes et même des conditions limitantes en nutriments (Stone et al., 2000). Par ailleurs, certaines plantes sont encore dans l'incapacité de résister à des conditions de stress en l'absence de leurs champignons associés (Redman et al., 2002 ; Heribert Hirt, 2012).

I.1.8.1.1. Rôle des endophytes dans la croissance de l'hôte et l'absorption des nutriments

Une des fonctions les plus potentiels des champignons endophytes, surtout dans les racines «champignons mycorrhiziens» est la facilitation d'absorption des nutriments par la plante hôte, ce qui conduit à la stimulation de sa croissance. L'amélioration de la nutrition et de la croissance peuvent avoir des effets positifs indirects sur les autres fonctions comme la tolérance aux stress ou la résistance aux agents pathogènes des plantes (**Kageyama et al., 2008**).

Les mécanismes de renforcement de l'absorption des nutriments par les plantes colonisées par des endophytes sont restés inaccessibles mais qui à l'appui de l'absorption des nutriments par les plantes colonisées par les champignons mycorrhiziens peuvent être appliquées, sous forme de mycélium extramatriciel permettant d'augmenter la surface d'absorption et donc d'augmenter l'accès aux éléments nutritifs du sol (**Barrow et Osuna, 2002 ; Selim et al., 2012**).

Piriformospora indica est un basidiomycète cultivable servant de système intelligent pour élucider les mécanismes de l'absorption des nutriments et la croissance de l'hôte (**Selim et al., 2012**), il colonise les racines de nombreuses espèces végétales (**Oelmueller et al., 2009**). Ce PGPF stimule la croissance, la production de biomasse et la quantité des semences de ses hôtes, y compris des gymnospermes et une large variété de plantes monocotylédones et dicotylédones comme le maïs, l'orge, le chou, les tomates, etc. Il favorise également l'absorption du nitrate et du phosphate (**Heribert Hirt, 2012**).

P. indica est impliqué dans l'accumulation de l'azote dans les pousses de *Nicotiana tobaccum* et *Arabidopsis thaliana*. Cette augmentation de la teneur en azote a été corrélée avec une augmentation de 50% de l'activité de la nitrate réductase, une enzyme clé dans l'assimilation du nitrate (**Sherameti et al., 2005; Selim et al., 2012**).

I.1.8.1.2. Rôle des endophytes dans la production des phytohormones

Les champignons endophytes offrent dans leurs associations symbiotiques avec les plantes un renforcement de la croissance végétative, par la production de phytohormones qui sont des molécules essentielles pour la croissance, la stimulation du métabolisme des nutriments et la défense des plantes. Les champignons endophytes peuvent augmenter la biomasse en produisant des hormones de croissance ou en induisant

la production de l'hormone par la plante hôte (**Petrini, 1991 ; Schulz et Boyle, 2005**). L'utilisation d'extraits des cultures fongiques des endophytes pour améliorer la croissance des plantes, indique que les agents solubles dans les extraits de culture peuvent stimuler la croissance de l'hôte de manière similaire aux champignons en croissance active, ce qui prouve que les champignons endophytes produisent des phytohormones in vitro ainsi que in vivo (**Selim et al., 2012**).

I.1.8.1.3. Rôle des endophytes sur la capacité photosynthétique

Un nouveau point de vue considère les endophytes comme agents important, dont le partenariat avec les plantes photosynthétiques a été déterminant pour l'évolution de la flore terrestre (**Moricca et ragazzi, 2008**). les effets des endophytes sur la photosynthèse ont été démontrés mais ils ne sont pas toujours significatifs par exemple *Colletotrichum musae* ont une capacité photochimique élevée par rapport aux plantes sans endophytes (**Pinto et al., 2000**).

I.1.8.2. Rôle écologique

I.1.8.2.1. Rôle des endophytes dans la résistance contre les pathogènes et herbivores (lutte biologique)

Les champignons endophytes peuvent protéger leurs plantes hôtes des agents pathogènes et de parasites (**Arnold et al., 2003; Akello et al., 2007**). Les endophytes systémiques et foliaires peuvent produire des alcaloïdes toxiques pour les insectes et les vertébrés (**Schardl, 2001**). Ils sont également capables d'induire une résistance aux maladies par un grand nombre de mécanismes de résistance. Ces mécanismes sont liés à l'état nutritionnel de l'hôte et à l'accroissement de l'aptitude des plantes en améliorant leur tolérance au stress abiotique (**Aguilar et Barea, 1996 ; Redman et al., 2002; Bae et al., 2008**).

I.1.8.3. Rôle des endophytes dans la tolérance de l'hôte aux stress

Les endophytes peuvent conférer à des plantes hôtes une tolérance à divers stress biotiques et abiotiques, occasionnés entre autres par la sécheresse, la chaleur, les herbivores et les attaques de pathogènes (**Rodriguez et al., 2008**). Il semble que la tolérance au stress de la plante hôte n'est pas une caractéristique générale de l'interaction avec les PGPF, mais une caractéristique du milieu spécifique de l'interaction. **Waller et al.**

(2005) ont signalé le potentiel de *Piriformospora indica* à induire une résistance aux maladies fongiques et la tolérance au stress salin dans l'orge. L'effet bénéfique sur l'état de défense a été détecté dans les feuilles distales et au niveau des racines montrant une induction de la tolérance systémique (Selim et al., 2012). Toutefois, ni le champignon ni la plante ne peuvent survivre seuls à des températures supérieures à 38 °C (Redman et al., 2002 ; Heribert Hirt, 2012).

I.1.9. Les métabolites bioactifs des champignons endophytes

Les champignons restent une source riche en nombreux agents thérapeutiques. Un certain nombre des substances qui sont des produits pharmaceutiques important ont été isolés et identifiés à partir des champignons endophytes.

Les champignons endophytes sont également considérés comme des nouvelles sources des composés bioactifs et plusieurs tentatives sont faites pour isoler et identifier ces composés bioactifs. Les champignons endophytes protégeant leurs hôtes des micro-organismes pathogènes sont utilisés comme une nouvelle approche pour lutter contre les maladies des plantes. Parfois les champignons endophytes produisent des antibiotiques sous forme des métabolites secondaires rapportés par la diversité des métabolites qui ont été isolés à partir des champignons endophytes soulignant leur rôle écologique puissant (Akanksha et Pavan, 2014).

1.1.9.1. Les champignons endophytes comme source des composés anticancéreux

Le cancer est une maladie dans laquelle la propagation incontrôlée et la croissance anormales des cellules peut entraîner la mort. Il a été considéré comme la principale cause de décès partout dans monde. En 2012, ils ont estimé 8,2 millions de décès de cancer dans le monde. Les médicaments anticancéreux présentent une toxicité non spécifique à la prolifération des cellules normales avec des effets secondaires considérables, mais pas efficaces contre de nombreuses autres formes de cancer.

Le premier médicament anticancéreux produit par les champignons endophytes est le diterpénoïde «Taxol» créant une plus grande sensibilisation et attraction que tout autre médicament. Ce composé interagit avec la multiplication cellulaire cancéreuse et interrompt l'augmentation de leur croissance et leur propagation. L'isolement du Taxol à partir de l'endophyte *Taxomyces andreanae* a fourni une nouvelle approche pour obtenir des médicaments à faible coût et plus disponibles par fermentation microbienne. Le taxol a

été trouvé chez différents genres des champignons endophytes, associés à un nombre différent des plantes supérieures dans le monde (Akanksha et Pavan, 2014).

Beaucoup d'autre métabolites produits par les plantes ont été produits aussi par les endophytes qui leurs sont associés comme l'alcaloïde "camptothécine" ($C_{20}H_{16}N_2O_4$) un agent antinéoplasique qui a été isolé du bois de la plante nommée *Camptotheca acuminata* Decaisne en Chine. Le 10-hydroxycamptothécine et la camptothécine sont deux précurseurs important pour la synthèse des médicaments anticancéreux le topotécan et irinotécan cliniquement plus utiles, dérivés de camptothécine ont une forme différente de propriétés médicinales et peut avoir différents avantages sans causer aucun inconvénient (Akanksha et Pavan, 2014).

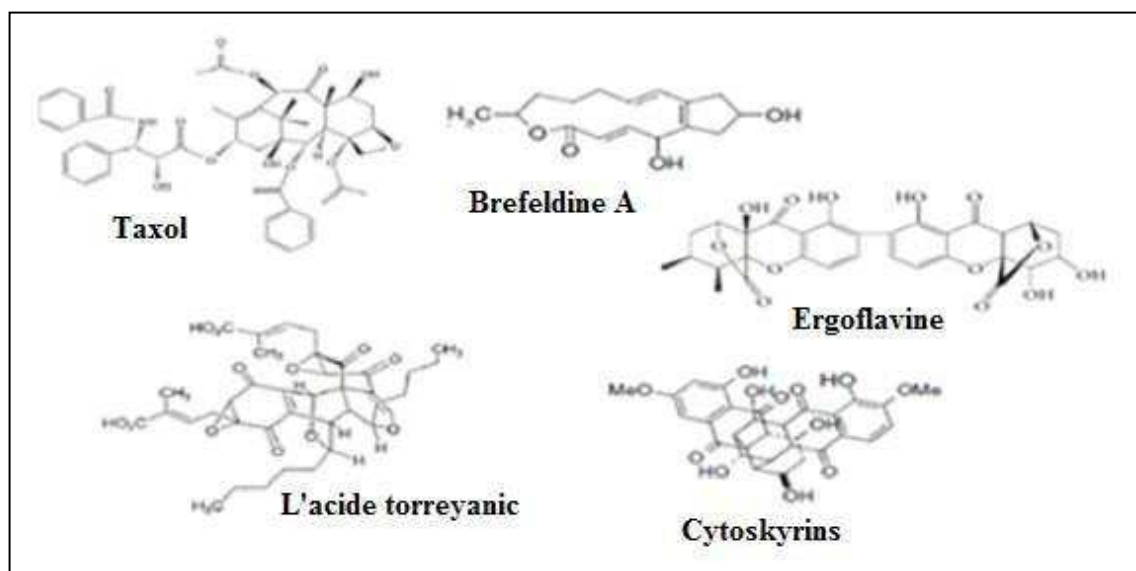


Figure n°5 : Quelques substances anticancéreuses produites par les champignons endophytes (Selim et al., 2012).

I.1.9.2. Les champignons endophytes comme source de composés antioxydants

Les antioxydants naturels sont généralement trouvés dans les plantes médicinales, les légumes et les fruits, cependant les champignons endophytes peuvent être une source potentielle de nouveaux antioxydants. Les polysaccharides produits à partir des plantes et des microorganismes peuvent être considérés comme antioxydant naturel. Les antioxydants (Isopestacin et Pestacin) ont été obtenues à partir de *Pestalotiopsis microspora* un champignon endophyte isolé à partir de la plante *Terminalia morobensis* (Akanksha et al., 2014).

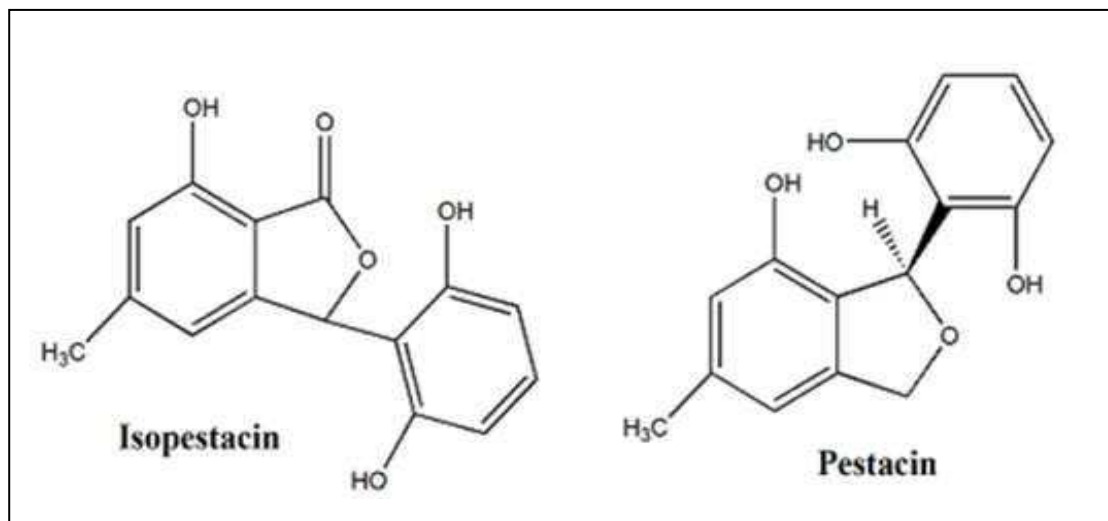


Figure n°6: Quelques substances antioxydantes produites par les champignons endophytes (Selim et al., 2012).

I.1.9.3. Les champignons endophytes comme source des composés antiviraux

Des nombreux agents antiviraux sont isolés à partir de champignons endophytes. Des différents composés comme l'acide cytonic A ($C_{32}H_{36}O_{10}$) et B ($C_{32}H_{36}O_{10}$) ont été isolés à partir de la culture de champignon endophyte *Cytospora* sp. Ces composés sont rapportés comme étant des inhibiteurs de la protéase du cytomegalovirus humain (Akanksha et Pavan, 2014). Il y a aussi Hinnuliquinone ($C_{32}H_{30}N_2O_4$) inhibiteur de la protéase VIH-1, il a été produit par les champignons endophytes présent dans les feuilles du chêne (*Quercus coccifera*) (Sanjana et al., 2012).

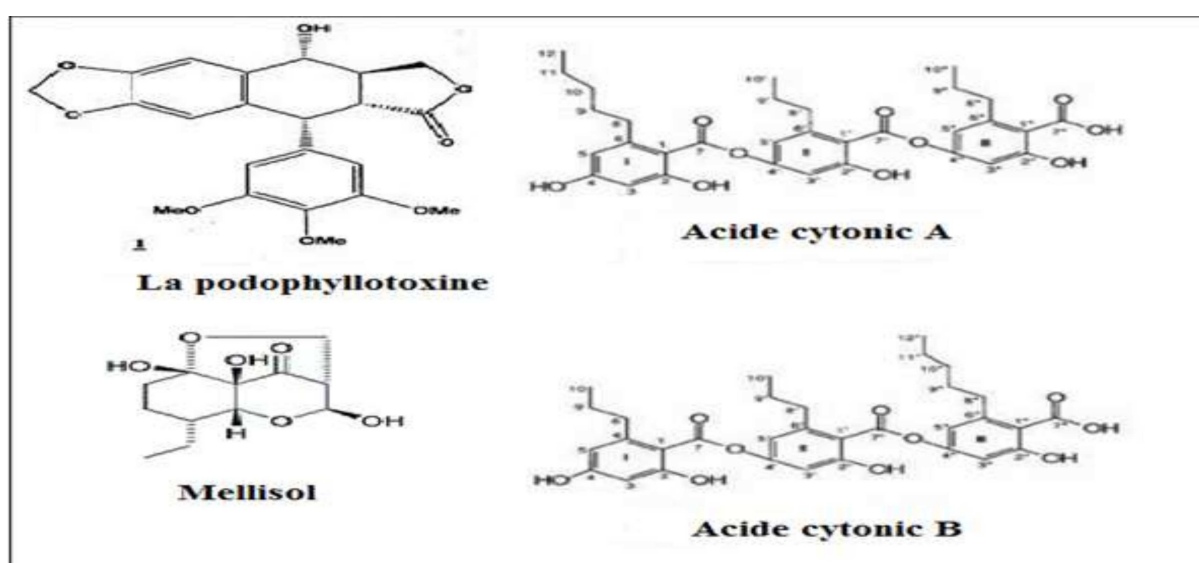


Figure n°7 : Quelques substances antivirales produites par les champignons endophytes (Selim et al., 2012).

I.1.9.4. Les champignons endophytes comme source de substances antibactériennes

Les champignons endophytes peuvent jouer un rôle dans la protection de leurs hôtes contre l'invasion des pathogène en produisant des métabolites secondaires. Il a été rapporté qu'un grand nombre de composés antimicrobiens sont isolés à partir des endophytes, appartenant à différentes classes structurales comme des alcaloïdes, des terpénoïdes, des phénols, Quinines, des flavonoïdes et stéroïdes. Les composés antimicrobiens peuvent être utilisés non seulement comme médicaments pour les humains, mais ils sont également utilisés comme conservateurs alimentaires dans le contrôle des maladies d'origine alimentaire et l'altération des aliments dus aux problèmes dans la chaîne alimentaire. L'endophyte *Phoma* sp., isolé à partir des différentes plantes médicinales a été signalé comme étant une source prometteuse de composés antimicrobiens. Un nouveau dérivé α -tétralone (3S)-3, 6,7- trihydroxy- α -tétralone avec cercosporamide, b-sitostérol et trichodermine ont été signalé étant produits par *Phoma* sp. endophytes de *Arisaema erubescens*. Ces composés exposent une activité antibactérienne contre les bactéries phytopathogènes *Xanthomonas campestris* et *Xanthomonas oryzae* ainsi que contre les champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* et *Magnaporthe oryzae* (Wang et al., 2012; Sanjana et al., 2012).

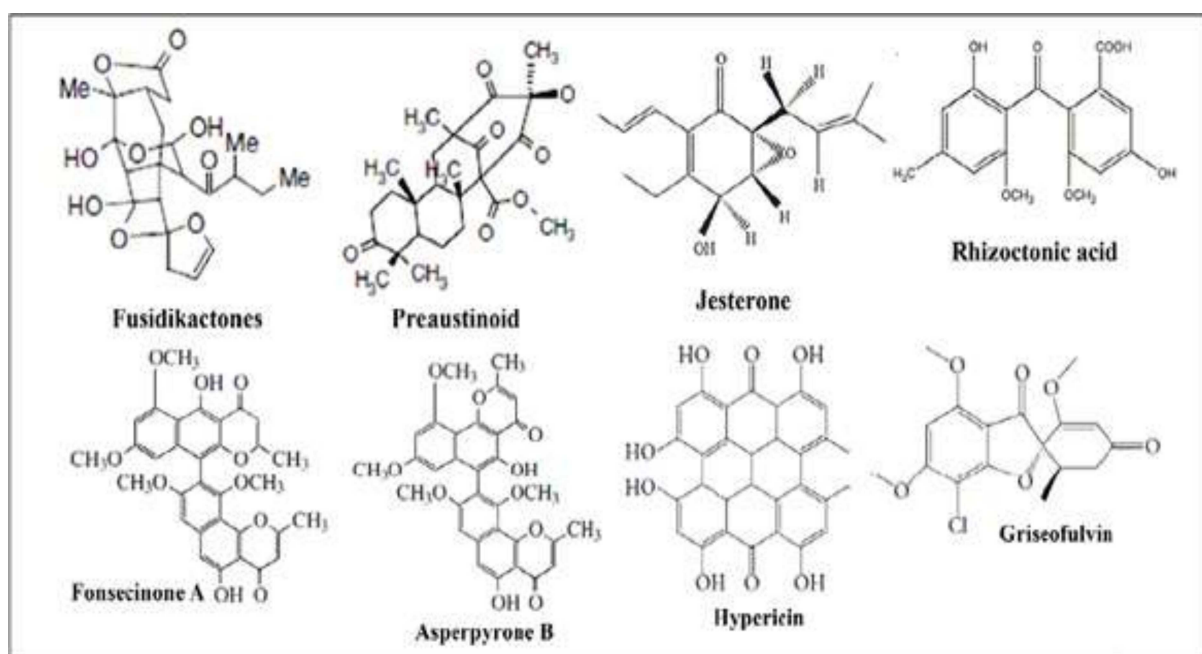


Figure n°8 : Quelques substances antibactériennes produites par les champignons endophytes (Selim et al., 2012).

I.1.9.5. Les champignons endophytes comme source de composés antifongiques

Il existe un grand nombre des agents antifongiques disponibles pour le traitement des diverses infections fongiques potentiellement mortelles. De nouveaux agents antifongiques ont été disponibles sur le marché, mais leur protection est devenue de plus en plus superficielle, en particulier chez des patients avec un traitement à long terme (**Sunil et Shilpa, 2012**).

Le champignon endophyte *Pestalotiopsis* existe dans la plupart des forêts tropicales du monde il produit l'acide Ambuique qui est un agent antifongique et qui a été isolé à partir de plusieurs souches de l'endophytes (*Pestalotiopsis microspora*, *P. guepinia* et *Monochaetia* sp.). C'est un agent actif contre *Pythium ultimum*, plusieurs *Fusarium* sp., *Diplodia natalensis* et *Cephalosporium graminineum*. D'autre part, Le champignon endophyte *Cryptosporiopsis quercina* isolé de la plante médicinale *Tripterigeum wilfordii*, serait à l'origine de la production de cryptocandin A, un lipopeptide antifongique. Ce dernier est actif contre un certain nombre d'agents pathogènes provoquant des maladies fongiques humaines, y compris *Candida albicans* et *Trichophyton* sp. et aussi contre un certain nombre de champignons phytopathogènes, y compris *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea* (**Sunil et Shilpa, 2012**).

I.2. Description de la plante utilisée

I.2.1. *Juniperus oxycedrus* L.

Le nom «oxycedrus» est composé de deux mots grecs «oxys» et «Cedros» qui signifient respectivement aigu et Cèdre, c'est-à-dire «Cèdre à feuilles épineuses» (**Garnier et al., 1961**).

I.2.1.1. Noms vernaculaires

En Arabe: Taga (**Quezel et Santa, 1962**).

En Français: Cadier, Cade, Genévrier oxycèdre, Petit Cèdre, Petit Cèdre d'Espagne.

En Anglais: Berried Cedar, Prickly Cedar, Brown berried Juniper, Cade Oil Plant.

En Allemand: Céder Wachholder, Spanischer Wachholder, Stachelbeere Wachholder.

En Italien : Appoggi, Ginepro Appoggi, Ginepro rosso, Ginepro Ossicedro (**Garnier et al., 1961 ; Bonnier, 1990**).

I.2.1.2. Description botanique

Juniperus oxycedrus L. ou genévrier oxycède est un arbuste ou un arbrisseau d'un vert glauque pouvant atteindre 9 mètres (**Becker et al., 1982**). Le port en colonne à l'âge adulte. Le feuillage persistant se présente sous forme d'aiguilles, ces aiguilles, à pointe fine et piquante, sont disposées en verticille de 3 sur 6 rangs. Leur face inférieure porte deux bandes blanches, ce qui permet de faire la distinction avec le genévrier commun (aiguilles à une seule bande blanche). Le genévrier cade est un arbrisseau dioïque (fleurs mâles et femelles ne poussant pas sur la même plante). Les fleurs mâles et femelles forment des petits cônes, les cônes, comestibles frais, sont bruns à orange. Les cônes femelles prennent peu à peu l'apparence de baies, les écailles se soudent les unes aux autres. Ces cônes arrivent à maturité au bout de deux ans environ. Les fruits sont bruns rouges à maturité, de 6 à 9 mm. La pollinisation est anémogame et la floraison a lieu au printemps (**Damerdji et Meniri, 2014**).



Figure n°9 : Description de *Juniperus oxycedrus* L.

I.2.1.3. Position systématique

La systématique du *Juniperus* se présente comme suit:

Tableau n° II : Taxonomie de *Juniperus oxycedrus* L. (Quezel et Santa, 1962).

Règne	Cupressacées
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Gymnospermes
Classe	Conifères
Ordre	Coniférales
Sous ordre	Taxales
Famille	Cupressacées
Genre	<i>Juniperus</i>
Espèce	<i>Juniperus oxycedrus</i> L.

I.2.1.4. Répartition géographique des espèces

C'est le petit cèdre du bassin méditerranéen ou petit cèdre d'Espagne des bois et des côtes arides (Becker et al., 1982; Bonnier, 1990), retrouvé aussi dans le midi de l'Europe, dans les montagnes méridionales sur les sols calcaires, micacés et marbreux (Garnier et al., 1961), où il est fréquemment associé au chêne vert et au chêne kermès. C'est un élément important de la strate arbustive méditerranéenne jusqu'à 1200 Km (du Maroc à l'Iran), on le rencontre dans l'ensemble du bassin (Marongiu et al., 2003).

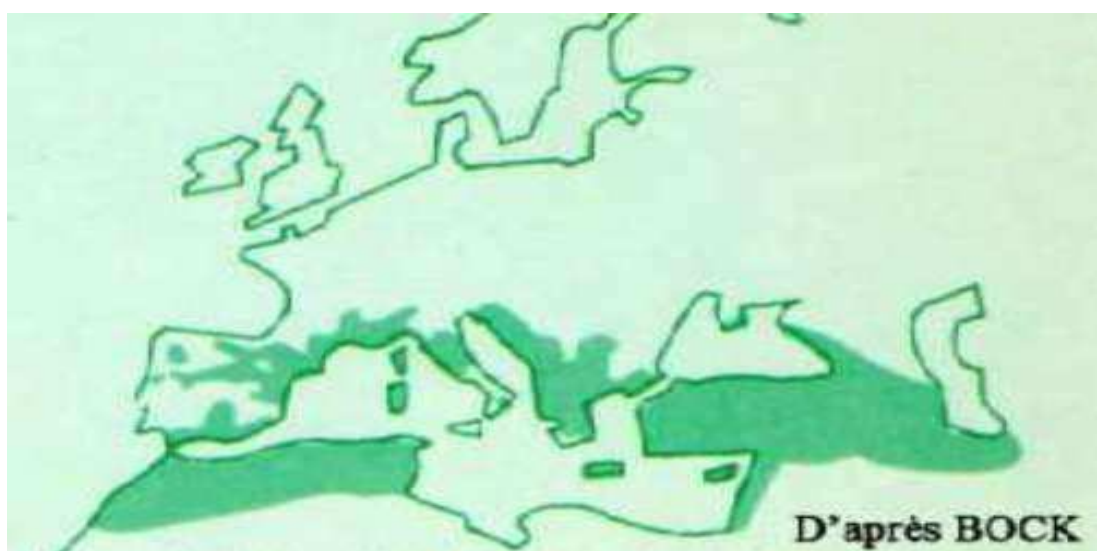


Figure n°10: Répartition géographique de *Juniperus oxycedrus* L.

I.2.1.5. Métabolites secondaires de *Juniperus oxycedrus* L.

I.2.1.5.1. Les huiles de cade

L'huile de cade ou l'huile de goudron d'oxycèdre appelé également « guetran er-rauguig » est l'une des huiles essentielles les plus utilisées en médecine traditionnelle. Elle est obtenue par distillation sèche à partir des branches de *Juniperus oxycedrus* L.

L'huile de cade se dissout entièrement dans différents solvants organiques (l'éther, l'acide acétique cristalline, le benzène, le chloroforme...). Elle contient 17 à 26% de phénols, dont 12% de gaïacol, du cadinène, et d'autres carbures, un alcool, le cadinol. Ses propriétés antiseptiques et antiparasitaires sont universellement connues et attribuées aux phénols. (Moreno et al., 1998).

I.2.1.5.2. Utilisation des huiles

I.2.1.5.2.1. Usages traditionnels

En médecine traditionnelle, cette plante est utilisée dans le traitement de diverses maladies tel que l'hyperglycémie, l'obésité, la tuberculose, la bronchite, et la pneumonie (Swanston-Flatt et al., 1990; Sanchez de Medina et al., 1994). Elle est également utilisée sous forme de décoction pour le traitement des troubles gastriques et comme un analgésique buccal (Fernández et al, 1996).

L'huile essentielle de cade, est un goudron obtenu par distillation du bois à la vapeur d'eau (Marongiu et al, 2003). Elle est prescrite pour traiter les affections cutanées, s'utilise avec efficacité dans les eczémas, psoriasis, gales ainsi que diverses dermatoses. Et prévient la chute des cheveux. L'infusion des baies en cas de digestion difficile, est également employée fréquemment contre les cystites. La combustion de l'extrémité de ses rameaux ou de ses baies est fortement germicide (Garnier et al., 1961).

I.2.1.5.2.2. Usages actuels

Le genévrier peut soulager en cas d'infections urinaires, de goutte, d'arthrose, d'asthme ou de migraine. L'huile essentielle de cade, est un remède millénaire utilisé contre les dermatoses. Il a des vertus assainissantes, essentiellement dans les produits de soin, notamment capillaires (anti-pellicules). En dermatologie, elle est prescrite pour traiter les affections cutanées. L'huile de cade est un parasiticide et antiseptique, une pommade

pour le traitement d'affections de la peau. Elle est utilisée en médecine vétérinaire et dans divers produits d'hygiène. Les applications doivent être à courte durée (risque cancérigène). Il a été démontré que les extraits méthanoliques et du dichlorométhane des feuilles et des tiges de *Juniperus oxycedrus* sp., réduisent la pression sanguine des rats normotensives (**Bello et al., 1997**), inhibent la réponse à l'histamine, à la sérotonine et à l'acétylcholine (**Moreno et al., 1997**) et possèdent une activité anti-inflammatoire significative (**Moreno et al., 1998**).

Introduction

Les champignons sont des organismes composés d'une ou de plusieurs cellules et peuvent se développer sur tous types de supports, notamment sur les plantes. Certains sont ainsi capables d'envahir des parcelles entières des cultures et sont responsables de la perte de nombreuses récoltes. C'est pourquoi leur impact économique n'est pas négligeable (**Massonnat, 2015**).

D'après certaines études (**West et al., 1993 ; Elbersen et West, 1996 ; Assuero et al., 2000 ; Cheplick et al., 2000 ; Morse et al., 2002**) ayant pour objet l'endosymbiose qui se forme entre les plantes et les champignons, il s'est avéré que quand elle est de type mutualiste, ces champignons participent pour une grande partie dans l'adaptation des plantes à leur environnement et à la survie même en cas de stress sévères, qu'ils soient biotiques ou abiotiques (**Morse et al., 2002, Clay et Schardl, 2002**), en pénétrant dans les tissus des végétaux au niveau du système racinaire, cotylédons, tiges, feuilles et fleurs (**Li et al., 2012**).

D'autre part, Toutes les plantes abritent une flore fongique constituée par des champignons non pathogènes dits "endophytes", ils sont estimés au nombre de 1.5 millions d'espèces et seulement environ 75.000 d'entre elles sont décrites (**Manoharachary et al., 2005**). Bien qu'ils soient invisibles et peu connus, leur fonction écologique apparait de plus en plus évidente puisqu'ils participeraient activement à une meilleure adaptation des plantes à leur environnement. Ils sont d'ailleurs qualifiés de mutualistes, exerçant un pouvoir protecteur pour les plantes. Une des composantes de ce mutualisme serait la production de molécules bénéfiques à la plante : ces molécules auraient des propriétés antibiotiques contre les agents phytopathogènes, insecticides ou anti-appétantes contre les insectes, ou encore hormonales pour stimuler la croissance de la plante (**Saikkonen et al., 1998**).

Les expériences effectuées sur les plantes médicinales ont montré que les champignons endophytes procurent à leurs plantes hôtes certaines caractéristiques bénéfiques : comme l'amélioration de l'absorption des nutriments (**Mandaym et Jumpponen, 2005; Dupont et al., 2007**). Ils renforcent la croissance végétative, par la production de phytohormones qui sont des molécules essentielles pour la croissance, et le développement et la défense des plantes (**Raktoniarania, 2007**).

L'objectif de notre présent travail consiste en l'étude des champignons endophytes isolés de *Juniperus oxycedrus* L. une plante médicinale de la famille des Cupressacées ainsi que leurs différentes activités antibactérienne, antifongique et solubilisation du phosphate.

Les plantes ont été collectées et amenées au laboratoire afin de réaliser les objectifs suivants :

- La contribution à l'étude des champignons endophytes isolés à partir de différents organes de la plante *Juniperus oxycedrus* L.
- L'isolement, purification, et conservation des champignons endophytes.
- Identification des champignons endophytes ayant des résultats positifs.
- La détermination des activités antibactérienne et antifongique par le test de l'antagonisme.
- La détermination de la capacité de solubilisation du phosphate par ses champignons endophytes.

Conclusion et perspectives

Les champignons endophytes, ont été décrits comme une source d'un large éventail de métabolites secondaires d'importance industrielle, agricole et médicale, ces métabolites peuvent avoir un pouvoir antibactérien, antifongique, antivirale, insecticide et anticancéreux (Qin et al., 2011; Tejesvi et al., 2007; Sadrati et al., 2013).

Dans cette étude, réalisée dans laboratoire de l'université de bordj Bou Arreridj, suite à un isolement, identification, et activité antimicrobienne des champignons endophytes de *Juniperus oxycedrus* L. de la région d'El Hamadia à BBA. Nous avons démontré que les différentes partie de la plante abrite divers taxons fongiques endophytes possèdent un effet antimicrobien contre plusieurs microorganismes pathogènes pour l'homme et pour les plantes.

La différence des taux de colonisation observée entre les différentes parties des plantes pourrait être due à un facteur principal qui est la richesse du sol en microorganismes. La recherche des mycoendophytes a été réalisée sur les différentes parties de la plante (racine, tige et feuille). 105 mycoendophytes ont été isolés représentant 16 genres : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, des mycéliums stériles, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Epicoccum*, *Tritirachium*, *Humicola*, *Phoma*, *Curvularia*, *Ulocladium*, *Bipolaris*.

Le test d'activité antimicrobienne des isolats identifiés, qui consiste à rechercher l'activité antibactérienne et antifongique sur le développement des souches testées, montre que les genres : *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium*, ont manifesté un effet antagoniste et antibiotique important, en considération avec les données bibliographiques. Cet effet est généralement dû au mode d'action de ces champignons par la compétition nutritive avec les champignons phytopathogènes ou par la production de certains métabolites secondaires bioactifs.

Le test de solubilisation du phosphate montre que neuf des champignons endophytes étaient capables de solubiliser le phosphate inorganique. Ils sont souvent plus efficaces dans la solubilisation du phosphate inorganique grâce à leur capacité de produire de la phosphatase impliqué dans le phénomène du stress de l'environnement.

Cette étude est une initiation, il est recommandé dans le future de réaliser des études plus approfondies qui visent principalement à :

- Identifier génétiquement des mycotaxons endophytes résultants de cette étude par des techniques de la biologie moléculaire ;
- Identifier les substances antimicrobiennes extraites par des méthodes plus performantes comme HPLC, CPG, afin d'obtenir de nouvelles substances ;
- Utiliser ses champignons endophytes actifs et leurs métabolites secondaires sont comme des moyens de lutte pour combattre les ravageurs et les microorganismes pathogènes.

II.1. Matériels**II.1.1. Matériel végétale**

Concernant la distribution spatiale de la plante *Juniperus oxycedrus* L., elle a été récoltée au niveau de la wilaya de Bordj Bou Arreridj. Les deux échantillonnages ont été effectués au niveau du site d'El Hamadia en mars 2015.

II.1.2. Milieux de culture

- Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe1)
- Mueller-Hinton (Annexe1)
- Bouillon Nutritif (Annexe 1)
- Milieu Pikovskaya (Annexe1)

II.1.3. Produits et réactifs

- Solution physiologique
- Agar, glucose ($C_6H_{12}O_6$), eau de javel ($NaOCl$)(3%), éthanol (70%), bleu de méthylène (colorant), chlorure de sodium ($NaCl$), peptone, extrait de viande, extrait de levure, peptone, dextrose, phosphate de calcium

II.1.4. Matériel microbien**II.1.4.1. Les bactéries pathogènes**

Elles proviennent de l'hôpital universitaire de Sétif, et comprennent trois bactéries à Gram positif : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et trois à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhimurium*

II.1.4.2. Les champignons phytopathogènes

Les souches fongiques utilisées dans les études in vitro d'antagonisme sont *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* provenant du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université de Ferhat Abbas Sétif.

II.2. Méthodes expérimentales

II.2.1. Echantillonnage

Les échantillons de la plante *Juniperus oxycedrus* L. utilisées pour l'isolement des champignons endophytes ont été collectés à partir de lieux différents au mont d'El Hamadia situé dans l'étage bioclimatique continental, qui offre des températures chaudes en été et très froides en hiver de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, au mois de Mars 2015.

Trois arbres sont choisis au hasard sur lesquelles les prélèvements des racines, tiges et feuilles ont été fait. Il faut choisir des plantes médicinales dans un bon état phytosanitaire, ainsi qu'un matériel végétal frais (**Devaraju et Satish, 2010; Gallo et al., 2008**). Les échantillons sont étiquetés, transportés et conservés à 4°C dans des sacs en plastiques et ne doivent dépasser les 24 heures (**Gallo et al., 2008**).

II.2.2. Stérilisation de surface et isolement des champignons endophytes

Tous les segments de *Juniperus oxycedrus* L. ont été préalablement lavés à l'eau du robinet pendant une dizaine de minutes afin d'enlever les saletés et les débris (**Hazalin et al., 2009; Khan et al., 2010**), puis ils ont subi une série de désinfection à l'éthanol 70%, pendant 2 minutes, à l'hypochlorite de sodium à 3 %, pendant 3 minutes puis dans l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes, de manière à éliminer les microorganismes présents sur le cortex. Les segments sont ensuite rincés 3 fois à l'eau distillée stérile pour éliminer les traces de désinfectants (**Arnold, 1999; Evans et al., 2003; Rubini et al., 2005**), et séchés sur du papier filtre stérile (**Khan et al., 2010; Pimentel et al., 2006**). La zone de prélèvement est choisie et les extrémités des tissus ont été coupés à l'aide d'un ciseau stérilisé par la flamme avant d'être placés dans des boîtes de Pétri. soixante morceaux de forme cubique de 5 à 7 mm ont été placés dans des boites de Pétri contenant du potato dextrose agar (PDA)(Annexe 1) préalablement passé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, et supplémenté aseptiquement avec de la gentamicine, la pénicilline G et l'ampicilline pour inhiber la croissance bactérienne, à raison de 5 à 6 segments par boîte, et sont mise à incubés à 28°C (**Gangadevi et al., 2008; Hazalin et al., 2009; Khan et al., 2010; Pimentel et al., 2006**). Les boites ont été contrôlées chaque jour pendant une durée maximale d'une trentaine de jours, chaque champignon poussant sur les fragments sera isolé, purifié et conservé sur du PDA incliné à 4°C (**Pimentel et al., 2006**).

II.2.3. Purification des souches

Afin d'obtenir des souches pures, les différentes colonies obtenues sont repiquées et ensemencées plusieurs fois dans des boîtes de Pétri contenant le même milieu d'isolement, puis incubées pendant 2 à 3 semaines à 28°C. Il est recommandé de réaliser le moins de repiquages possibles, pour conserver la stabilité génétique des souches (**Pimentel et al., 2006**).

II.2.4. Conservation des souches

Pour les conservés, les souches pures sont repiquées soit sur géloses inclinées du milieu PDA et incubées à 28°C jusqu'à croissance des souches puis conservées à 4°C. Soit conservée dans des tubes contenant de l'eau physiologie et placés par la suite dans un réfrigérateur à 4°C (**Pimentel et al., 2006**).

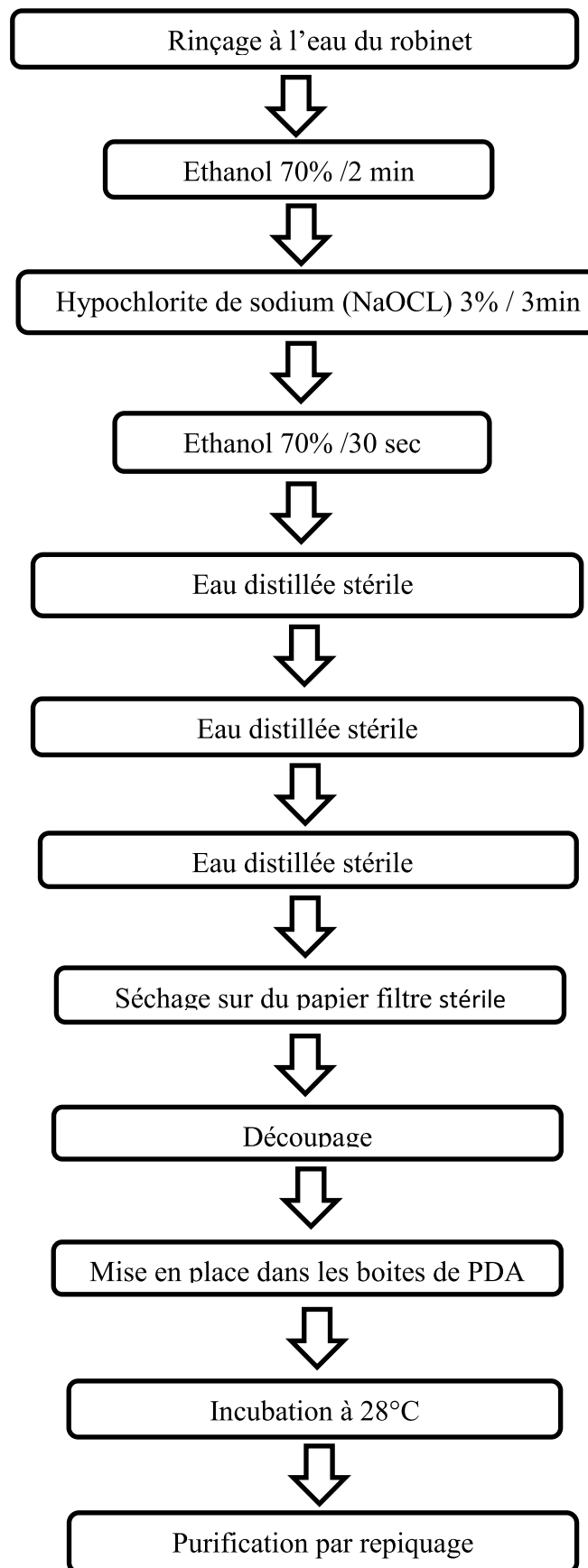


Figure n° 11: Stérilisation de surface et isolement des champignons endophytes (Gangadevi et al., 2008; Hazalin et al., 2009; Pimentel et al., 2006; You et al., 2009).

II.2.5. Les Paramètres

II.2.5.1. Le taux de colonisation (TC)

La fréquence de colonisation ou taux de colonisation (TC) a été calculée en se basant sur la formule de **Suryanarayanan et al., 2003**; **Rezwana et al., 2010** et **Khan, 2007**. Pour chaque type de tissus de la plante un pourcentage de colonisation a été calculé:

$$\text{Taux de colonisation} = \frac{\text{nombre de ségements colonisées par des endophytes}}{\text{nombre total de segments}} \times 100$$

II.2.5.2. Le taux d'isolement (TI)

Le taux d'isolement est une mesure effectuée pour déterminer la richesse fongique dans un échantillon d'un tissu donné de la plante, il est calculé d'après **Guo, (2000)** comme suit :

$$\text{Taux d'isolement} = \frac{\text{nombre d'isolats obtenu a partir des segments}}{\text{nombre total de segments}}$$

II.2.5.3. La fréquence relative d'isolement (FR)

La fréquence relative d'isolement est une mesure qui nous montre l'abondance d'une espèce endophyte dans un échantillon donné, elle est calculée d'après **Photita et al., (2001)** comme suit :

$$\text{fréquence relative d' isolement} = \frac{\text{nombre d'isolats d'une espèce}}{\text{nombre total des isolats}} \times 100$$

II.2.6. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) a été déterminée en utilisant la méthode des disques.

II.2.6.1. Préparation des microorganismes test

Les bactéries pathogènes ont été mises à croître dans du bouillon nutritif (BN) pendant 18 heures à 37°C, ensuite leur turbidité a été ajustée à l'aide du spectrophotomètre (10^8 UFC/ml) (**Chareprasert et al., 2006**).

L'activité antifongique des champignons endophytes a été testée contre trois champignons phytopathogènes: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans* et *Fusarium solani* var. *coeruleum*. Un disque de 6 mm de diamètre du champignon phytopathogène préalablement cultivés sur du PDA à 28°C pendant 5 jours (**Mukhtar et al., 2008**).

II.2.6.2. Activité antagoniste

L'activité antifongique des 105 isolats purs de champignons endophytes a été testé in vitro contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* par la méthode de la double culture, une méthode décrite par **Orole et Adejumo (2009)** et **Srividya et al., (2012)**. Le test a été réalisé sur du PDA en utilisant 3 disques de 5mm de diamètre du champignon endophyte provenant d'une culture de 10 jours au bord de chaque boîte de Pétri, ensuite un disque du même diamètre du champignon phytopathogène est mis au centre de la boîte en gardant la même distance entre le disque du champignon phytopathogène et les trois disques du champignon endophyte (**Evans et al., 2003; Holmes et al., 2004**). La boîte contrôle dépourvue de l'endophyte ainsi que toutes les autres boîtes de double culture ont été répétées trois fois et incubées à 28°C à l'obscurité. Après cinq jours d'incubation le rayon de chaque champignon phytopathogène est mesuré dans le sens des trois disques du champignon endophyte, ainsi que dans les boîtes contrôles (**Sadrati et al., 2013**).

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante (**Orole et Adejumo, 2009 et Srividya et al., 2012**).

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

R₁: étant la croissance radiale de l'agent phytopathogène dans le contrôle.

R₂: étant la croissance radiale de l'agent phytopathogène en double culture.

Les pourcentages d'inhibition ont été classés en quatre catégories selon le niveau de l'inhibition de la croissance fongique, en activité basse, modérée, haute et très haute (**Rahman et al., 2009**).

- Un pourcentage d'inhibition :

- ❖ <30% correspond à une activité antifongique basse
- ❖ 30% > et <50% correspond à une activité antifongique modérée
- ❖ 50% > et <70% correspond à une activité antifongique haute,
- ❖ $\geq 70\%$ correspond à une activité antifongique très haute.

II.2.6.3. Activité antibactérienne

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des champignons endophytes, on a utilisé six bactéries pathogènes : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et trois à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhimurium*.

Après que la bactérie pathogène (culture jeune de 24 heures) soitensemencée par écouvillonnage, des disques de 6 mm de diamètre, obtenus à l'emporte-pièce des cultures des champignons endophytes sont déposés sur les boîtes contenant la gélose de Muller Hinton (**Murugaiyan et al., 2014**). Les boîtes sont placées en étuve à 37°C pendant 24 heures. Les zones d'inhibition autour des blocs de champignons indiquant l'activité antimicrobienne ont été mesurées et enregistrées (**Asian, 2011**).

II.2.7. Identification

L'identification des champignons endophytes a été effectuée selon deux observations:

II.2.7.1. Observations macroscopique

L'observation macroscopique est une technique utilisée en microbiologie pour qualifier une souche microbienne. Les caractères morpho-culturels sur un milieu de culture solide sont étudiés (couleur, contours, relief, consistance, transparence, aspect de la surface et taille) (**Zareb, 2014**).

II.2.7.2. Observation microscopique

L'identification des isolats fongiques endophytes a été effectuée suite à une observation par microscope optique, en se basant sur les caractères morphologiques des hyphes (cloisonnement, coloration) et des formes reproductrices (fructifications, formes et couleurs des spores) et en se référant également aux clés d'identification (**Huang et al., 2008**).

II.2.8. Solubilisation du phosphate

La majorité des sols agricoles sont pauvres en phosphore soluble (P), car il est très réactif avec d'autres composants du sol, et l'apport excessif des engrais phosphatés cause son accumulation sous formes minérales et organiques. De ce fait, l'assimilation de cet élément par les plantes est très limitée. Ainsi et en vue de libérer l'agriculture des différentes contraintes liées aux apports phosphatés, d'importantes recherches ont été menées afin de bénéficier de ces grandes réserves de phosphate, d'où l'importance de s'intéresser aux microorganismes du sol et qui sont capables de solubiliser le phosphate inorganique. Les champignons endophytes qui sont des microorganismes possédant un potentiel de dissolution du phosphate insoluble. Pour déterminer cette hypothèse un test de l'index de solubilisation doit être effectuée in vitro par l'utilisation du milieu Pikovskaya (**Aarab et al., 2009**).

La sélection des isolats ayant une activité solubilisatrice du phosphate a été effectuée sur le milieu solide de Pikovskaya (PVK) contenant 0,5% de phosphate de calcium comme seule source de phosphore. Des disques de 6 mm de diamètre des champignons endophytes sont déposés sur ce milieu (PVK) et les boîtes sont mises à incuber à 28°C pendant 5 à 7 jours (**Walpola et Yoon, 2013**). Les diamètres des halos de solubilisation entourant les colonies, ont été mesurés et les index de solubilisation ont été calculés (**Neha et al., 2015**) :

$$SI = \frac{\text{Diamètre de la colonie} + \text{Diamètre du halo}}{\text{Diamètre de la colonie}}$$