



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة محمد البشير الإبراهيمي



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 الزراعية  
Département des Sciences Agronomiques

# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Agronomiques

Spécialité : Protection des végétaux

## Intitulé

Etude de l'activité antifongique des champignons endophytes isolés à partir du  
citron *Citrus limon*

Présenté par : DAGHACHE RAOUIA

SOUICI NAHED

Soutenu le 16/09/2021.

Devant le jury :

Président :	M <sup>r</sup> : MERZOUKI Y. M.C.B	UNIV BBA
Encadrant :	M <sup>r</sup> : LAIB D. M.A.A	UNIV BBA
Examineur :	M <sup>r</sup> MOUTASSEM D. M.C.B	UNIV BBA

Année universitaire : 2020-2021

# *Dédicaces*

*A ma chère mère **NACERA** et à mon cher père **NACER**, Vos encouragements et vos prières m'ont toujours soutenue et guidé. En ce jour, j'espère réaliser un de vos rêves et être digne de vous. Veuillez trouver, mes très chers parents, dans cette thèse le fruit de votre dévouement ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour. Que Dieu vous garde mes parents et vous procure santé et longue vie.*

*Ma profonde reconnaissance à mon époux **SALIM** pour son soutien sans faille, sa grande indulgence, sa compréhension et surtout sa contribution dans le partage du stress de la recherche et sans qui, une grande part de ce travail n'aurait pas été accomplie. Je suis heureuse de partager cette thèse avec lui.*

*Je dédie aussi ce travail à ma jolie petite fille **AYLA ROFAN**.*

*A mon frère **AYMEN** et à mes sœurs **KELTOUM** et **KHADIDJA**.*

*A ma belle famille plus particulièrement mes beaux-parents et mes belles sœurs.*

*A toute ma famille et mes amis surtout aux familles **DEGHACHE**, **AGGOUNE** et **GACEM**.*

**RAOUIA**

# Dédicaces

*A mes chères parents **FATIMA** et **ABD EL MALEK** que dieu vous protégés et vous procure santé.*

*A la prunelle de mes yeux, a celle qui a cru en mes capacités et m'encouragé ; à celle qui m'a inondé de ses prières ; à la rose de ma vie ma très chère **Maman** je t'aime tellement.*

*A mon héros, à celui qui me donne toute la confiance et l'encourage ; à mon épaule ferme et mon soutien dans la vie mon **Papa** que dieu te protège et te fasse une couronne sur ma tête je t'aime.*

*A mon seconde moitié je te dédie ce travail avec mes vœux de réussite, de prospérité et de bonheur, pour vos encouragement, ton amour et contribution de l'accès à ce jour-là à mon marie **Fahed**.*

*A mon bras droit mon grand frère **Housseem** et mes petits frères **Abdelbaki** et **Mohammed badis***

*A mes belles mères **Rabiaa** et **Khalida**, mon beau père **Abdelaziz** que dieu vous gardés, tous mes beaux-frères et belles-sœurs.*

*A toute ma famille et mes amis surtout aux familles **SOUICI, BENAISSA. TOUATI** et **ZOUAOUI**.*

**NAHED**

# Remerciements

*Tout d'abord nous remercions Allah tout puissant pour le courage et toute la patience Qui nous a donné pour surmonter toutes les difficultés rencontrées durant tout notre cursus universitaire.*

*On adresse nos remerciements à :*

*Monsieur Merzouki Youcef Maitre de conférences à l'université de Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.d'avoir accepté de présider le jury.*

*Monsieur Moutassem dahou Maitre de conférences à l'université de Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*On adresse nos plus vifs remerciements à Monsieur LAIB djamel eddine qui nous a*

*Proposé cet intéressant thème de travail. On a beaucoup apprécié ses qualités scientifiques,*

*Humaines et surtout son*

*Optimisme tout le long du parcours. On le remercie pour son aide, sa disponibilité, ses précieux conseils.*

*Ce fut un plaisir et une chance de travailler avec lui.*

*Nous tenons à remercier tous ce qui a contribué à ce travail de près ou de loin.*

Remerciements	
Dédicaces	
Liste de figures	
Liste d'abréviations	
Introduction.....	1
Revue bibliographique.....	2
Chapitre 1.Les champignons endophytes .....	2
1. Définition.....	2
2. Diversité des champignons endophytes.....	2
3. L'interaction endophyte-plante hôte.....	2
4. Rôles des champignons endophytes.....	3
4.1. Production de sidérophores .....	4
4.2. Production de phytohormones.....	4
4.3. Tolérance de métaux lourds.....	5
4.4. Tolérance de sécheresse .....	5
4.5. Tolérance de la salinité.....	6
4.6. La tolérance de la compétition interspécifique.....	6
4.7. Protection contre les insectes ravageurs .....	6
4.8. Protection contre les nématodes .....	7
4.9. Protection contre les agents phytopathogènes .....	7
4.9.1. L'épaississement de la paroi cellulaire.....	7
4.9.2. Exclusion de niche écologique.....	7
4.9.3. Production des composants antimicrobiens.....	8
4.9.4. Hyper parasitisme et prédation .....	9
Chapitre 2. <i>A.Niger</i> .....	11
1. Description.....	11
2. Classification.....	12
3. Ecologie .....	12
4. Besoins nutritionnels .....	13
Matériel et méthodes.....	14
1. Matériel biologique.....	14
1.1. Matériel végétal .....	14
2. Méthodes.....	14
2.1. Isolement et purification des champignons endophytes de <i>Citrus limon</i> .....	14
2.2. Calcul de la fréquence de colonisation .....	16
2.3. Identification morphologique des champignons endophytes de <i>Citrus Limon</i> .....	17
2.4. L'activité antifongique des colonies endophytes par la technique de double culture.....	17

## *Table de matières*

---

<b>2.5. Fermentation submergée et production des extraits fongiques</b> .....	17
<b>2.6. Analyse chimique des extraits fongiques</b> .....	19
<b>2.7. Analyse des données</b> .....	19
<b>Résultats et discussion</b> .....	20
<b>1. Résultats</b> .....	20
<b>1.1. Composition et fréquence de colonisation des isolats fongiques endophytes du <i>Citrus limon</i></b> .....	21
<b>1.2. Activité antifongique des champignons endophytes du citron</b> .....	21
<b>1.3. Résultat d'analyse phytochimique des extraits fongiques</b> .....	22
<b>2. Discussion</b> .....	23
<b>Conclusion</b> .....	26
<b>Références bibliographiques</b> .....	27

**Tableau 1.** Métabolites secondaires des extraits fongiques.....22

## *Liste d'abréviations*

---

°C : degrés Celsius

**ml** : millilitres

**mm** : millimètres

**PDA** : Potato dextrose agar

**PDB** : Potato dextrose broth

**μm** : micromètres

**μm**:micrometres



## Liste des figures

---

<b>Figure 1.</b> Colonie d' <i>Aspergillus niger</i> sur PDA.....	11
<b>Figure 2.</b> Tête conidienne d' <i>Aspergillus niger</i> .....	12
<b>Figure 9.</b> Filtration à travers du papier filtre Whatman n ° 1 .....	18
<b>Figure 10.</b> Concentration sous vide à 50 °C au Rotavap.....	18
<b>Figure 11.</b> Composition générale de la mycoflore endophyte détectée chez <i>Citrus limon</i> .....	20
<b>Figure 12.</b> Fréquence de colonisation des champignons endophytes du <i>Citrus limon</i> .....	21
<b>Figure 13.</b> Activité antifongique du champignon endophyte <i>Aspergillus</i> sp1 .....	21
<b>Figure 14.</b> Résultat de la culture double endophyte vs phytopathogène.....	22



# ***INTRODUCTION***

### **Introduction**

Les maladies des plantes sont à l'origine de pertes importantes en agriculture, tant quantitatives (pertes de rendements à la récolte ou au court du stockage) que qualitatives (production de toxines fongiques, d'arômes ou d'odeurs indésirables) (Oerke ,2006).

Parmi ceux ci *A.niger* l'agent responsable de la maladie connue sous le nom de la moisissure noire, considéré comme l'un des espèces fongiques les plus dommageables pour l'agriculture actuelle et un contaminant courant des aliments (Sharma,2012).

Le contrôle de cette maladie repose en grande partie sur l'utilisation des fongicides (Leroux et *al.*, 1999).

Ces produits chimiques sont rentables, mais leur utilisation massive a créé des problèmes tels que le phénomène de résistance, la pollution de l'environnement et des effets indésirables sur la santé humaine et sur les auxiliaires (Ali et *al.*, 2012).

Les risques et les problèmes associés à l'utilisation de produits chimiques conduisent à une réglementation environnementale de plus en plus strictes des pesticides (Pavela et *al.*, 2007).

Il ya donc un besoin urgent de développer des alternatives efficaces respectueuses de l'environnement, plus sûres, faciles à utiliser et ont le potentiel de remplacer les pesticides ou fongicides de synthèse (Taponjoui et *al.*, 2005).

Parmi ces alternatives, les champignons endophytes qui sont considérés actuellement comme un des groupes biologiques les plus prometteurs en matière de protection des plantes contre un bon nombre de pathogènes (Vega et *al.*, 2009).

Dans ce contexte, la présente étude est focalisée dans l'étude de l'activité antifongique des champignons endophytes isolés à partir du citron *Citrus limon* vis-à-vis *A. niger*.

Ce travail est structuré en 3 parties:

- La première partie est consacrée à une revue bibliographique mettant l'accent sur : les champignons endophytes, *A .niger*
- La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisées.
- Ainsi qu'une troisième partie démontrant les résultats obtenus en ce qui concerne les différentes expériences effectuées.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.



***SYNTHESE***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

### **1. Définition**

Le terme endophyte a été inventé par Heinrich Anton de Bary en 1884 (Griffin, 2014), Il est composé de deux mots grecs, endon signifiant au sein et phyton désignant plante (Staniek et *al.*, 2008).ce terme est employé pour définir les microorganismes colonisant les tissus végétaux internes sans causer des symptômes apparents sur la plante hôte (Porras Alfaro et bayman, 2011).

Les études récentes ont prouvé que les microorganismes endophytes sont presque présents dans toutes les plantes (Wang et Dai, 2011).

Ces microorganismes colonisent l'espace intercellulaire ou intracellulaire, au moins pour une partie de leur vie sans causer des symptômes d'infection apparents (Kaul et *al.*,2012).

### **2. Diversité des champignons endophytes**

Les champignons endophytes représentent un groupe très diversifié,avec une estimation de 1,5 millions d'espèces et une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante (Zabalgoeazcoa, 2008)

Les champignons endophytes sont extrêmement ubiquitaires, il a été constaté que la majorité des espèces végétales dans les écosystèmes naturels si ce n'est pas les totalités hébergent des champignons endophytes (Rodriguez et *al.*, 2009).

La diversité des espèces, la fréquence et l'abondance des endophytes dépendantes des conditions climatiques et édaphiques et de l'hétérogénéité des habitats et des niches occupées par leurs hôtes (Sieber ,2002).

Plusieurs espèces végétales herbacées et ligneuses hébergent des endophytes fongiques, une diversité et une spécificité a été constatée à la fois pour les espèces ligneuses ou herbacées (Cohen ,2006).

Les variations géographiques sont les facteurs qui contribuent le plus souvent à la diversité des champignons endophytes (Collado et *al.*, 1999).

Beaucoup d'endophytes colonisent des organes spécifiques, alors que d'autres sont seulement trouvés dans les racines ou dans les organes des surfaces, mais dans tous les cas, chaque organe de l'hôte peut être colonisé (Schulz et Boyle, 2005).

L'âge de la plante hôte influe aussi sur la diversité des champignons endophytes ; il apparait que les plantes âgées hébergent plus d'endophytes dans leur tissus que les plantes jeunes (Arnold et *al.*, 2003).

### **3. L'interaction endophyte-plante hôte**

Selon les espèces concernées, le résultat d'uneinteraction plante-endophytes peut aller de l'antagonisme au mutualisme (Zabalgoeazcoa,2008).

Les champignons endophytes englobent des saprophytes latentes ,des espèces mutualistes et des pathogènes latents (Zabalgoeazcoa,2008).

Parmi les champignons endophytes les pathogènes latents qui sont co-évoluées avec leurs hôtes et ne sont donc pas très virulents, ne causent aucun symptôme à leurs hôtes, mais si la plante est stressée ou bien la sénescence des feuilles commence, la sporulation de ces agents pathogènes commence (Sieber,2007).

Plusieurs études récentes confirment que certaines espèces endophytes sont également décomposeurs de la litière (Hirose et *al.*,2013).

Il est à signaler que certains des endophyte sont la capacité de continuer à exister en tant que saprophytes dans les feuilles mortes (Unterseher et *al.*,2013).

L'association mutualistique des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes est asymptomatique (Ting,2014),agissant contre les prédateurs, les agents pathogènes, les herbivores et les insectes nuisibles (Lacava et Azevedo,2014).

Ces champignons endophytes augmentent la résistance des plantes aux agents pathogènes par la production des agents antimicrobiens et des régulateurs de croissance. Ils améliorent également la tolérance du stress biotique et abiotique (Lacava et Azevedo,2014).

En retour, les plantes hôtes fournissent la structure spatiale,la protection contre la dessiccation, les éléments nutritifs,la fourniture des photosynthétats et dans le cas de la transmission verticale,la diffusion dans la prochaine génération des plantes hôtes(Rudgers et *al.*,2004).

#### **4. Rôles des champignons endophytes**

Les endophytes fongiques peuvent fournir plusieurs bénéfices aux plantes tels que la protection contre les maladies (Redman et *al.*,2001), la production de métabolites secondaires efficaces contre les agents pathogènes de l'hôte (Liu et *al.*, 2001), la protection contre des insectes ravageurs (Liu et *al.*, 2001).

Il a été rapporté également que les endophytes ont une action sur la stimulation de la croissance végétale (Ernst et *al.*, 2003).

De ce fait, quelques endophytes peuvent améliorer l'absorption du phosphore par l'hôte (Sieber, 2002), augmenter l'efficacité photosynthétique (Obledo et *a.l.*, 2003) ou augmenter la tolérance de l'hôte aux stress abiotiques (Bacon et Hill, 1996), tels que la sécheresse (Bacon et Hill, 1996), les métaux lourds (Languereau-Leman, 2002), les températures élevées (Redman et *al.*, 2002) et la salinité (Rodriguez et Redman, 2008).

#### 4.1. Production de sidérophores

Les sidérophores sont des molécules produites par les microorganismes ayant des capacités de fixation du fer. Ces molécules peuvent stimuler d'une façon directe la croissance des plantes, par l'augmentation de la disponibilité du fer soluble autour des racines ou indirectement par l'inhibition de la croissance des pathogènes quant au phénomène de compétition pour le fer (Marek-Kozaczuk et *al.*, 1996).

La plupart des espèces de champignons endophytes du genre *Aspergillus* sont connues pour leur production de plusieurs types de sidérophores.

De nombreuses études ont permis de caractériser les sidérophores et d'élucider leur implication dans les interactions plantes-endophytes (Machuca et Milagres, 2003).

#### 4.2. Production de phytohormones

La promotion de la croissance végétale par les champignons endophytes est partiellement due à leur production de phytohormones telles que les auxines (AIA), les cytokinines, les gibbérellines et d'autres substances de croissance.

La sécrétion de gibbérellines par les champignons endophytes a été mise en évidence par de nombreuses recherches qui montrent l'importance de ces métabolites produits par les endophytes dans la promotion et le développement des plantes et spécialement lors des conditions de stress nutritionnels (Waqas et *al.*, 2014).

Des résultats de travaux révèlent l'efficacité d'application des cultures de *Phoma glomerata* LWL2 et de *Penicillium* sp. LWL3 dans la promotion de la croissance du concombre en présence de stress salin à travers la synthèse de gibbérellines et d'acide indole acétique (Waqas et *al.*, 2012).

Les gibbérellines possèdent un rôle prépondérant dans la production végétale, la reproduction, le métabolisme et la réponse à différentes conditions de stress environnemental (Rodriguez et *al.*, 2012 ;Khan et *al.*, 2013).

Les champignons endophytes ont la capacité de produire des auxines qui sont des hormones végétales impliquées dans plusieurs aspects de la croissance et du développement des plantes. Elles contrôlent d'importants processus physiologiques comprenant l'élongation, la division cellulaire et la différenciation des tissus (Davies, 2004).

La concentration de l'acide indole acétique (AIA), la principale auxine produite au niveau des apex, est la clé de la régulation de la croissance et du développement de la plante (Müller, 2003).

La production d'AIA et de ces dérivés a été rapportée chez plusieurs champignons endophytes (Costacurta et Vanderleyden, 1995 ;Khan et *al.*, 2016). Des espèces appartenant aux genres

*Colletotrichum* sp. et *Penicillium* sp. sont réputées pour la production d'AIA (Chague et al., 2009), ainsi que les espèces des genres *Neotyphodium* sp. et *Balansia* sp. (De Battista et al., 1990 ; Yue et al., 2000).

L'AIA microbien peut jouer un rôle clé dans les différentes interactions plantes-microorganismes du fait qu'il est utilisé en tant qu'élément indispensable pour la stratégie de colonisation.

D'autre part, l'AIA intervient dans l'induction des mécanismes de défense chez les plantes en les rendant plus résistantes aux stress oxydatif (Subbarayan et al., 2010).

#### 4.3. Tolérance de métaux lourds

Le champignon endophyte *Neotyphodium gansuense* améliore la croissance de sa plante hôte *Achnatherum inebrians* sous une concentration élevée de cadmium par un mécanisme qui implique des activités enzymatiques anti-oxydantes (Zhang et al., 2010b).

De façon similaire, le champignon endophyte des racines de *Triticum aestivum* (variété Sardari ,39) *Piriformospora indica* réduit la teneur en cadmium dans le sol entourant les racines de sa plante hôte et améliore sa croissance (Shahabivand et al., 2012).

Il en est de même pour les champignons du genre *Neotyphodium* capable d'améliorer la croissance, la production de la biomasse et le potentiel d'accumulation du cadmium dans les racines de *Festuca arundinacea* et *Festuca pratensis* (Soleimani et al., 2010a,b).

D'autres travaux ont montré que le champignon endophyte *Sordariomycetes* sp. isolé à partir de feuilles de *Suaeda salsa* et introduit dans le riz *Oryza sativa*, améliore la croissance du riz sous une concentration modérée de plomb par un mécanisme qui implique l'amélioration de la photosynthèse et de l'activité anti-oxydante (Li et al., 2012).

Il est à mentionner aussi que le champignon endophyte *Exophiala pisciphila* H93 favorise la croissance des racines et des pousses du maïs et améliore sa tolérance sous le stress due à la présence des métaux lourds (plomb, zinc et cadmium) (Li et al., 2011).

#### 4.4. Tolérance de sécheresse

La tolérance de la sécheresse des plantes infectées par des champignons endophytes a été démontrée dans plusieurs études (Arechavaleta et al., 1992; Lewis et Vaughan, 1997; Malinowski et al., 1998; Lewis, 2004; Malinowski et al., 2005).

Par exemple les deux champignons endophytes du concombre *Phoma glomerata* LWL2 et *Penicillium* sp. LWL3 augmentent la biomasse végétale dans des conditions de stress hydrique (Waqas et al., 2012).



Le même effet est observée pour les champignons endophytes des graminées qui augmentent le taux et la durée de croissance des racines contribuant à la protection de leurs plantes hôtes contre la sécheresse (Kuldau et Bacon.,2008).

De même les champignons endophytes *Neotyphodium* sp.,*Acremonium* sp.,*Phialophora* sp.et *Curvularia* sp. Confèrent aux graminées une tolérance de la sèche (Singh et al., 2011).

Dans des conditions de stress hydrique, les champignons endophytes de la famille des *Clavicipitaceae* augmentent l'élasticité des parois cellulaires (White et al, 1992), augmentent le taux de croissance des racines et des poils absorbants et diminuent le diamètre des racines (Malinowski et al.,1997).

#### **4.5. Tolérance de la salinité**

La salinisation des sols est une menace étendue de la productivité des cultures (Singh et al.,2011).

Environ 7% de la surface du globe terrestre est couverte par de sols salins (Ruiz Lozano et al, 1996), et 5% des terres cultivées ont un excès en teneur des sels (Munn et al, 1999).

Le champignon endophyte de l'orge *Piriformospora indica* élimine les effets du stress salin chez sa plante hôte par l'augmentation de l'activité métabolique dans les feuilles, l'induction de changements dans la composition des acides gras dans les feuilles, la régulation positive de l'activité des enzymes anti-oxydantes (Baltruschat et al., 2008)

L'augmentation de la biomasse (Waller et al., 2005) et l'induction de la biosynthèse de l'éthylène dans les racines d'orge (Cao et al., 2006).

Le champignon endophyte du concombre *Paecilomyces formosus* LHL10 améliore la croissance et la tolérance de sa plante hôte de la salinité par l'accumulation de proline et des antioxydants (Khan et al, 2012).

#### **4.6. La tolérance de la compétition interspécifique**

*Centaurea stoebe* est une plante herbacée envahissante en Amérique du Nord ; la présence des champignons endophytes du genre *Alternaria* améliore sa capacité concurrentielle sans augmenter sa taille et le mécanisme par lequel ces endophytes augmentent la compétitivité de sa plante hôte est inconnue, mais elle n'est pas liée à la croissance accrue (Aschehoug et al.,2012).

#### **4.7. Protection contre les insectes ravageurs**

Plusieurs endophytes ont des propriétés insecticides (Kaul et al., 2012).

Des études ont mentionné que les métabolites secondaires des champignons endophytes tels que les alcaloïdes contribuent à la toxicité des insectes, en particulier la péramine (Ball et

*al.*,1995; Rowan et *al.*,1986), l'ergovaline (Siegel et *al.*, 1990;Wilkinson et *al.*, 2000;Riedell et *al.*, 1991).

Il est à souligner que les endophytes du genre *Neotyphodium* contribuent dans la résistance de leurs plantes hôtes contre *Agrotis ipsilon* par la sécrétion de la N-acetyl norloline et la peramine et l'ergovaline (Baldauf et *al.*, 2011).

Deux autres champignons endophytes *Claviceps purpurea* et *Claviceps* sp.et *Chaetomium*sp.de *Achnatherum inebrians* en Chine possèdent une activité insecticide significative contre *Aphis gossypii* (Zhang et *al.*, 2010 a,b).

#### **4.8. Protection contre les nématodes**

Le champignon endophyte de la tomate *Fusarium oxysporum* souche 162 induit la résistance systématique contre le nématode *Meloidogyne incognita* (Martinuz et *al.*, 2012) et *R. similis* dans la banane par application combinée avec le champignon *Paecilomyces lilacinus* souche 251 et la bactérie *Bacillus firmus* (Mendoza et Sikora, 2009).

*N. coenophialum* un champignon endophyte de la fétuque élevée provoque un épaissement des parois cellulaires endodermiques qui réduit la capacité de pénétration des racines par le nématode *Meloidogyne marylandi* (Gwinn et Bernard, 1993; Kimmons et *al.*, 1990).

L'inoculation du *Fusarium oxysporum* et à un moindre degré, des espèces de *Trichoderma spp* dans les racines de la tomate et du bananier réduit les populations de nématodes (Sikora et *al.*,2008).

#### **4.9. Protection contre les agents phytopathogènes**

Plusieurs mécanismes sont utilisés par les endophytes pour la protection de leurs plantes hôtes contre les agents phytopathogènes (Reinhold-Hurek et Hurek 2011). Parmi eux :

##### **4.9.1. L'épaissement de la paroi cellulaire**

est due au dépôt de callose et l'accumulation de composés phénoliques sur le site de contact avec l'agent pathogène (Benhamou et *al.*, 1998).

Les enzymes sont également impliqués dans la synthèse de lignine qui forme une barrière de protection supplémentaire contre la pénétration par des agents pathogènes (Pankhurst et *al.*, 1979).

Certains champignons endophytes de l'orge provoquent un épaissement des parois des cellules chez leur plante hôte et par conséquent limitent la pénétration par l'agent pathogène *Verticillium longisporum* (Narisawa et *al.*, 2004).

##### **4.9.2. Exclusion de niche écologique**

Étant donné que les populations biologiques d'un écosystème interagissent les uns avec les autres, des interactions positives (commensalisme, mutualisme et synergie) peuvent permettre

à certaines populations de fonctionner comme une communauté au sein de cet habitat (Liarzi et Ezra, 2014).

Les interactions positives entre les populations autochtones sont généralement plus développées dans les communautés matures que dans les communautés nouvellement établies (Liarzi et Ezra, 2014).

Ainsi, le nouveau agent pathogène sera confrontée à des réactions négatives de la part des populations autochtones (Sturz et *al.*, 2000).

Les champignons endophytes protègent leurs plantes hôtes par la colonisation rapide et l'épuisement des substrats disponibles et limitées de sorte qu'aucune source nutritive ne soit disponible pour les agents pathogènes (Pal et Gardener, 2006).

Dans les tissus de la plante hôte la diversité des champignons endophytes est principalement limitée par la concurrence entre eux pour l'alimentation ou le microhabitat, ce qui limite l'invasion des tissus par d'autres micro-organismes endophytes ou des agents pathogènes (Albrechtsen et Witzell, 2012).

#### **4.9.3. Production des composants antimicrobiens**

Ces champignons produisent une variété de composés antimicrobiens provoquant une anomalie de croissance des hyphes de l'agent pathogène (Ting, 2014).

Les composants antimicrobiens sont des substances de faible poids moléculaire, actifs à de faibles concentrations contre d'autres micro-organismes (Guo et *al.*, 2000).

Par exemple *Trichoderma virens* souche 223 produit un chitinase contre le pathogène *Ceratocystis paradoxa* sur la canne à sucre (Romão-Dumaresq et *al.*, 2012). Il en est de même pour le champignon endophyte *Phoma* sp. isolé à partir de différentes plantes médicinales qui a été signalé comme une source prometteuse de composés antimicrobiens (Kaul et *al.*, 2012).

Parmi ces composés antimicrobiens produits par *Phoma* sp. isolé à partir *Arisaema erubescens* le 3,6,7- trihydroxy-a-tétralone, cercosporamide, b-sitostérol, le trichodermine (Wang et *al.*, 2012).

Ces composés isolés ont démontré une activité antifongique contre *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* et *Magnaporthe oryzae* et antibactérienne contre les bactéries pathogènes *Xanthomonas campestris* et *Xanthomonas oryzae* (Wang et *al.*, 2012).

Les sesquiterpènes, diterpènes et triterpénoïdes sont les principaux terpénoïdes produites par les champignons endophytes et qui possèdent une activité antimicrobienne (Kaul et *al.*, 2012).

Le champignon endophyte *Phomopsis cassiae* isolé à partir de *Cassia spectabilis* produit cinq sesquiterpènes de cadinane, le 3,9,12-trihydroxycalamenènes; 3,12-dihydroxycalamenène; 3,12-dihydroxycadalène et 3,11,12-trihydroxycadalène. ce dernier est le composé le plus actif contre les champignons phytopathogènes (Silva et al., 2010).

Le champignon *Xylaria* sp. isolé à partir de *Piper aduncum* également produit deux sesquiterpènes de presilphiperfolane ayant une activité antifongique (Silva et al., 2010). Le champignon endophyte *Chaetomium globosum* isolé à partir *G. biloba* produit les chaetomugiline D, chaetomugiline A et chaetoglobosine C (Qin et al., 2009).

Ces composés sont des dérivés de l'azaphilone chlorée et ont une activité significative contre *Artemia salina* et *Mucor miehei* (Qin et al., 2009).

*F. solani* isolé à partir de *Taxus baccata* produit le 1-tétradécène et le 8 octadécane, ,8 pentadécane, octylcyclohexane et le 10 nonadécane avec une activité antibactérienne et antifongique (Tayung et al., 2011).

Li et al. (2012) ont rapporté deux alcaloïdes qui possèdent une activité antifongique le 12b-hydroxy-13a-méthoxyverruculogène TR-2 et le 3- hydroxyfumiquinazoline A produites par le champignon endophyte du *Melia azedarach* *A. fumigatus* LN-4.

Deux métabolites l'asperfumoïde et l'asperfumine isolés à partir d'*Aspergillus fumigatus* CY018 un champignon endophyte du *Cynodon dactylon* inhibent le développement de *Candida albicans* (Liu et al., 2004).

*Acremonium zeae* un endophyte de maïs a montré une activité antifongique significative contre *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* et une activité antibactérienne contre la plupart des bactéries Gram-positives (Wicklow et al., 2005).

Cette activité est due à la production par ce champignon des métabolites antibiotiques qui sont les pyrrocidines A (C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>4</sub>) et B (C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>) (Wicklow et al., 2005). Le naphthaquinone antibactérien Javanicine (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) présentant une activité contre *Pseudomonas* sp. a été isolé à partir de *Chloridium* sp. un endophyte d'*Azadirachta indica* (Kharwar et al., 2008).

Le cryptocandin (C<sub>15</sub>H<sub>82</sub>N<sub>8</sub>O<sub>17</sub>) est un composant produit par le champignon endophyte *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* a effet antifongique contre *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* (Strobel et al., 1999).

#### 4.9.4. Hyper parasitisme et prédation

L'hyperparasitisme est une stratégie écologique utilisé par les endophytes pour protéger leurs plantes hôtes pendant laquelle l'agent pathogène est directement attaqué et détruit par un

endophyte particulier (Tripathi et *al.*, 2008). Il a été observé que les champignons endophytes parasitent les hyphes des champignons phytopathogènes en pénétrant ces derniers et en sécrétant la lyase pour décomposer leurs parois cellulaires (Grosch et *al.*, 2006).

Par exemple, *Trichoderma* sp. est capable de parasiter les hyphes de *Rhizoctonia solani* (Grosch et *al.*, 2006). La prédation microbienne est une manière plus générale de suppression des agents phytopathogènes où certains endophytes montrent un comportement de prédation dans des conditions nutritives limitées (Benhamou et Chet, 1997).

Par exemple, *Trichoderma* sp. produit une série d'enzymes capables d'attaquer directement contre les parois cellulaires de champignons phytopathogènes (Benhamou et Chet, 1997).

### 1. Description

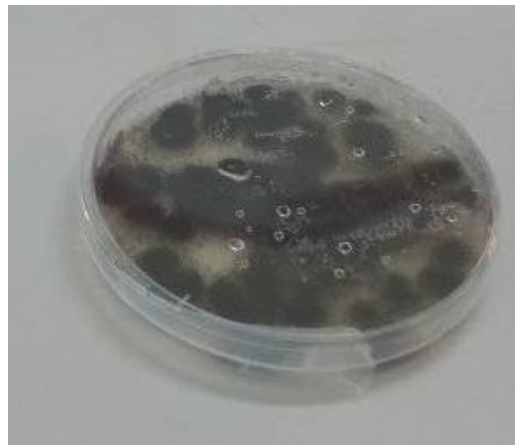
*Aspergillus niger* est un champignon cosmopolite, isolé de tous les continents et n'est pas très sélectif par rapport aux conditions environnementales. Il se développe dans des températures entre 6 et 47 °C, un pH entre 1,5 et 9,8 et une activité hydrique de  $\geq 0,77$  (Pitt et Hocking 2009).

Il se trouve dans le sol et sur les végétaux en décomposition et dans les environnements artificiels (Flannigan et al, 2011).

Il est aussi utilisé comme source pour la production d'enzymes comme les pectinases, Les protéases et les amylo glucosidases (Schuster et al, 2002).

Ce champignon pousse rapidement (2 - 3 jours), la température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A.niger* peut se développer jusqu'à 42°C.

Les colonies d'*A.niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunâtres et à maturité elles deviennent noires, le revers des colonies est incolore ou jaune pale montrant parfois des zones concentrées (Guillaume, 2006) ( Figure . 10)



**Figure 1.** Colonie d'*Aspergillus niger* sur PDA (Originale,2019).

Selon Pasqualotto (2010) Les têtes conidiennes ( Figure.11), bisériées et radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres à noires, Les conidiophores sont longs atteignant 1.5 - 3 mm, lisses à stipes non cloisonnés, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure, formés d'une cellule courte appelée cellule podale avec un hyphe fertile.

Les vésicules (50 - 70  $\mu\text{m}$ ) sont globuleuses avec des têtes aspergillaires hémisphériques volumineuses, à panache radié.

Les phialides (7-3  $\times$  3-3.5  $\mu\text{m}$ ) sont portées par des metules brunâtres, de dimensions variables (10-15  $\mu\text{m}$ ). Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement

aplaties de couleur brunâtre et qui mesurent 3.5 à 4.5  $\mu\text{m}$  ; parfois légèrement aplatis de couleur brunâtre et qui mesurent 3.5 à 4.5  $\mu\text{m}$  ; parfois jusqu'à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre.



**Figure 2.** Tête conidienne d'*Aspergillus niger* (Originale,2021).

## **2. Classification**

D'après Bocquet (1993) *Aspergillus niger* est classé comme suit

Règne : Mycètes

Embranchement Amastigomycota

Sous-embranchement : Deutéromycotina

Classe : Deutéromycètes

Ordre : Moniliales

Famille : Mniaceae (mucedinaceae)

Genre : *Aspergillus*

Espèce : *Aspergillus niger*

## **3. Ecologie**

*A.niger* est cosmopolite et d'occurrence très commune. Il peut se développer sur les matières organiques en conditions aérobies et d'autres substrats tels que le sol, dans le compost et sur la matière végétale en décomposition (Schuster et *al.*, 2002).

De même, elle peut se trouver sur les sols glacés et dans les environnements marins, mais elle préfère habituellement les sols secs et chauds (Schuster et *al.*, 2002; Samson et *al.*, 2004).

Ces capacités est l'abondante production de conidies qui sont distribués par l'intermédiaire de l'air, garantissent l'occurrence omniprésente de l'espèce avec une fréquence plus élevée aux lieux chauds et humides (Schuster et *al*, 2002).

#### **4. Besoins nutritionnels**

*Aspergillus niger* peuvent métaboliser plusieurs composés carbonés, tel que, glucose, fructose, mannose, saccharose et maltose, les sucres réducteurs (fructose et glucose) sont inclus dans le cycle de la glycolyse par contre, le saccharose et le maltose doivent être hydrolysés en sucre simple. les substances carbonées sont soit assimilées ou fermentées (Pazouki et *al*, 2000).

Les sources d'azote utilisées par ce champignon en fermentation sont le sulfate d'ammonium, le nitrate de sodium, le nitrate de potassium et l'urée ,Ainsi, une teneur élevée en azote a pour effet, une augmentation de la croissance cellulaire et de la consommation des sucres (Mattey, 1992).

Les sels minéraux sont des éléments indispensables pour la croissance et la multiplication des aspergillus et leurs déficiences ou leurs excès ont des répercussions négatives sur la fermentation. A cet effet, une forte teneur en phosphore conduit à une élévation de la croissance cellulaire (Kubicek et Rohr, 1997).





***MATERIEL***  
***ET***  
***METHODES***

### **Matériel et méthodes**

#### **1. Matériel biologique**

##### **1.1. Matériel végétal**

Des feuilles du citron *Citrus limon* sont collectées avec un scalpel à partir de 5 plantes saines dans la wilaya de B.B.A en février 2021.

#### **2. Méthodes**

##### **2.1. Isolement et purification des champignons endophytes de *Citrus limon***

L'isolement des champignons endophytes a été effectué après 48 heures suivant le prélèvement de l'échantillon en utilisant le protocole décrit par (Li et al). 2015

Les échantillons sont :

- Lavées soigneusement sous l'eau courante pour éliminer les particules du sol (Figure .3)
- Coupées en segments de 5X5 mm pour les feuilles avec une lame de rasoir stérilisée à la flamme (Figure.4)
- Les champignons émergents ou sortant des extrémités des segments (tissu végétal) sont isolés immédiatement et repiqués dans un nouveau milieu PDA sans antibiotiques pour obtenir des cultures pures après incubation à 25°C pendant 3 à 6 jours (Figure.8 ).

## ***Matériel et méthodes***

---

- Subissent une stérilisation superficielle pour l'élimination des hyphes et des spores des champignons épiphytes ;cette étape est réalisée par l'immersion dans l'éthanol à 75% pendant 1 min puis rincés 2 fois dans de l'eau distillée stérile pendant quelques minutes pour éliminer le produit stérilisant en excès (Figure.5 )
- Les segments sont ensuite séchées sur un papier filtre stérile dans des conditions aseptiques puis transférés uniformément et d'une manière aseptique dans des boites de pétri contenant un milieu PDA(Figure.6)
- Ces boites sont scellées en utilisant un para film puis incubées à température ambiante (25-30 C°) pendant 21 jours pour assurer la croissance des champignons endophytes (Figure.7 ).



## 2.2. Calcul de la fréquence de colonisation

**La fréquence de colonisation (FC):** La fréquence de colonisation ou d'infection, exprimée en % est calculée en se basant sur la méthode de Fisher et Petrini (1987), donnée comme suit:

$$FC \% = (N_c / N_t) \times 100$$

Sachant que:

**N<sub>c</sub>:** le nombre de segments colonisés par une espèce ou un groupe fongique.

**N<sub>t</sub>**: le nombre total des segments.

### **2.3. Identification morphologique des champignons endophytes de *Citrus Limon***

Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements  $\times 10$ ,  $\times 40$  à l'aide d'un microscope optique.

L'identification de souches fongiques a été basée sur la morphologie ou caractères phénotypiques (couleur, aspect) et la vitesse ou taux de croissance de la colonie, les caractéristiques des spores et les structures de reproduction si ces fonctions étaient perceptibles

### **2.4. L'activité antifongique des colonies endophytes par la technique de double culture**

L'activité antifongique a été évalué par la technique de double culture (Skidmore et Dickinson, 1976). un disque de gélose (6X6 mm) associé au mycélium des champignons endophytes âgées de 4 jours de chaque isolat

Un autre disque de gélose de la même taille de *A.niger* a également été placé à la périphérie mais à l'extrémité opposée de la même boîte de Pétri.

Tous les appariements ont été effectués en quatre exemplaires et incubés à 28 ° C.

L'activité antagoniste a été testée du premier au septième jour après incubation en mesurant le diamètre de la colonie endophyte en direction de la colonie antagoniste et le rayon d'endophyte dans la boîte de contrôle. Les deux lectures ont été transformées en pourcentage d'inhibition de croissance radiale (PICG) en utilisant la formule suivante :

$$\text{P. I. C. C (\%)} = ((D_t - D_e) / D_t) \times 100$$

P.I. C. C. (%) = pourcentage d'inhibition de la croissance des colonies.

D<sub>t</sub> = diamètre de la colonie endophyte dans la boîte témoin.

D<sub>e</sub> = diamètre de la colonie endophyte en contact avec la colonie antagoniste

L'activité antifongique a été évaluée en fonction du pourcentage d'inhibition de la croissance radiale: 30 à 40%: faible activité; 50 à 60%: activité modérée; 60 à 70%: bonne activité;> 70%: excellente activité.

### **2.5. Fermentation submergée et production des extraits fongiques**

Cette étape à comme objectif la production des extraits fongiques des champignons endophytes associés aux feuilles de *C.limon* et effectuée en utilisant le protocole décrit par Dolatabad et *al.*2017.

Des disques d'agar associés avec les mycéliums des champignons endophytes ont été placés dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml du milieu PDB et fermés hermétiquement pour éviter toute contamination .

## ***Matériel et méthodes***

---

Les cultures ont été incubées pendant 21 jours à  $25 \pm 2$  ° C avec agitation pendant une heure (1 h) à l'aide d'un agitateur va et vient afin d'homogénéiser le milieu et la biomasse fongique. Après 21 jours de croissance et une fois atteignant une biomasse importante, les mycéliums ont été séparés du milieu par filtration à travers du papier filtre Whatman n ° 1 (Figure.9).



**Figure 9.** Filtration à travers du papier filtre Whatman n ° 1 (Originale, 2021)

Le filtrat est mélangé pendant 15 minutes avec un volume égal de chloroforme et laissé reposer pendant 10 minutes pour être séparé en deux couches organique et aqueuse non miscibles. Ensuite le chloroforme a été évaporé en utilisant un évaporateur rotatif (figure .10)



**Figure 10.** Concentration sous vide à 50 °C au Rotavap (Originale, 2021)

Les extraits sont dissous dans 1 ml de l'eau distillée et conservé à 4 ° C pour une utilisation ultérieure.

### **2.6. Analyse chimique des extraits fongiques**

Cette étape est réalisée pour connaître la nature chimique des extraits fongiques ainsi que les métabolites secondaires responsables de l'activité antifongique.

La détection de principales classes de métabolites secondaires a été réalisée en utilisant les techniques décrites précédemment par Harborne, 1998.

Les extraits fongiques ont été dissous individuellement dans de l'acide chlorhydrique HCL dilué, filtrés puis traités avec le réactif de Mayer (iodure mercurique de potassium)  $HgI_4K_2$ , la formation d'un précipité de couleur jaune a indiqué la présence d'alcaloïdes.

Pour la détection des flavonoïdes, les extraits fongiques ont été traités avec quelques gouttes de solution d'hydroxyde de sodium NaOH, la formation d'une couleur jaune intense, devenue incolore lors de l'ajout d'acide dilué HCL, indique la présence de flavonoïdes.

Pour la détection des phénols, les extraits fongiques ont été dissous dans 5 ml d'eau distillée et quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique  $FeCl_3$  à 5% ont été ajoutées, une couleur verte foncée obtenue indique la présence de composés phénoliques.

Pour les saponines, l'extrait fongique est vigoureusement agité avec de l'eau distillée puis laissé au repos pendant 10 minutes, la formation d'une émulsion assez stable indique la présence de saponines.

Pour la détection des terpénoïdes, l'extrait fongique brut a été traité avec le chloroforme et d'acide sulfurique, la formation d'une couleur marron-rouge indique la présence des terpénoïdes.

Pour la détection de tanins, l'extrait fongique brut a été traité avec un réactif alcoolique  $FeCl_3$ , et une couleur noire bleuâtre qui a disparu lors de l'ajout d'un peu de  $H_2SO_4$  dilué suivie de la formation d'un précipité brun jaunâtre a indiqué la présence de tanins.

### **2.7. Analyse des données**

Pour cette étude l'analyse de la variance (Anova) et le test de Newman et Keuls sont effectués pour comparer et classer tous les les moyennes d'inhibitions enregistrés en groupes homogènes.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées par l'utilisation du module XLSTAT 2009 de Microsoft Office.



***RESULTATS***  
***ET***  
***DISCUSSION***

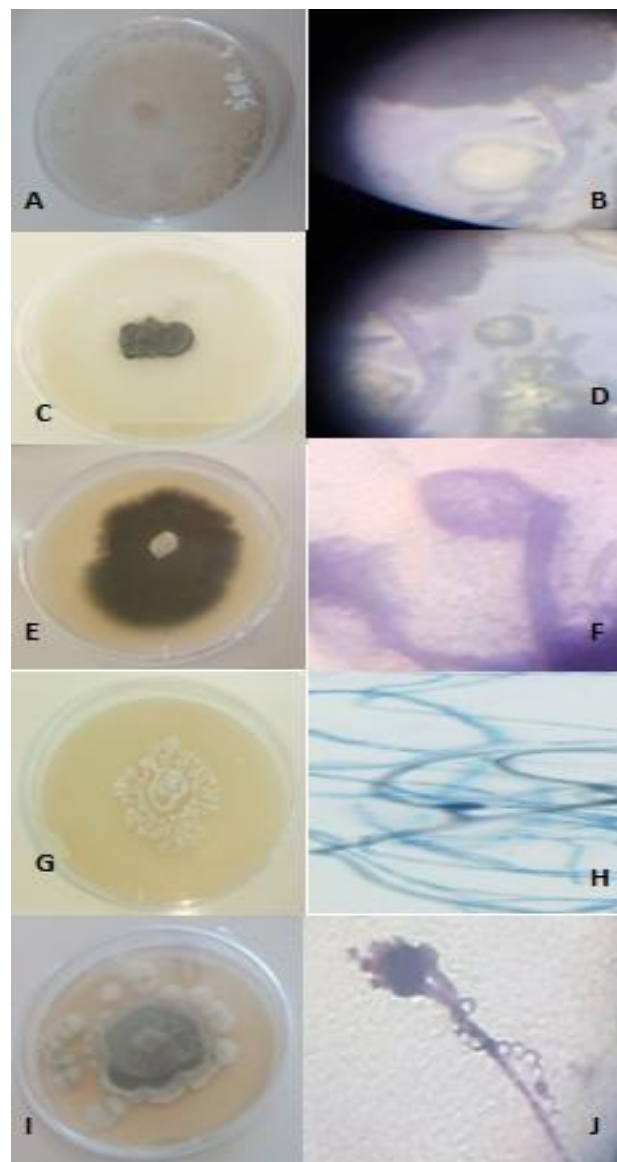


### Résultats et discussion

#### 1. Résultats

##### 1.1. Composition et fréquence de colonisation des isolats fongiques endophytes du *Citrus limon*

On a pu isoler taxons différents de champignons endophytes à partir des feuilles du citron (Figure .11), le genre le plus dominant est *Aspergillus* sp 1 avec une fréquence de colonisation totale de 33,33% suivie par *Aspergillus* sp 2 avec 33,33%, *Colletotrichum* sp avec 25%, *Nigrospora* sp avec 16,66% et *Penicillium* sp avec 8,33% (Figure.12)



**Figure 11.** Composition générale de la mycoflore endophyte détectée chez *Citrus limon* A. colonie d'*Aspergillus* sp 1 ,B.*Aspergillus* sp 1 photo microscopique,C. colonie d'*Aspergillus* sp 2, D.*Aspergillus* sp 2 photo microscopique,E. colonie de *Colletotrichum* sp ,F.*Colletotrichum* sp photo microscopique,G. colonie de *Nigrospora* sp , H. *Nigrospora* sp photo microscopique,I. colonie de *Penicillium* sp J. *Penicillium* sp photo microscopique

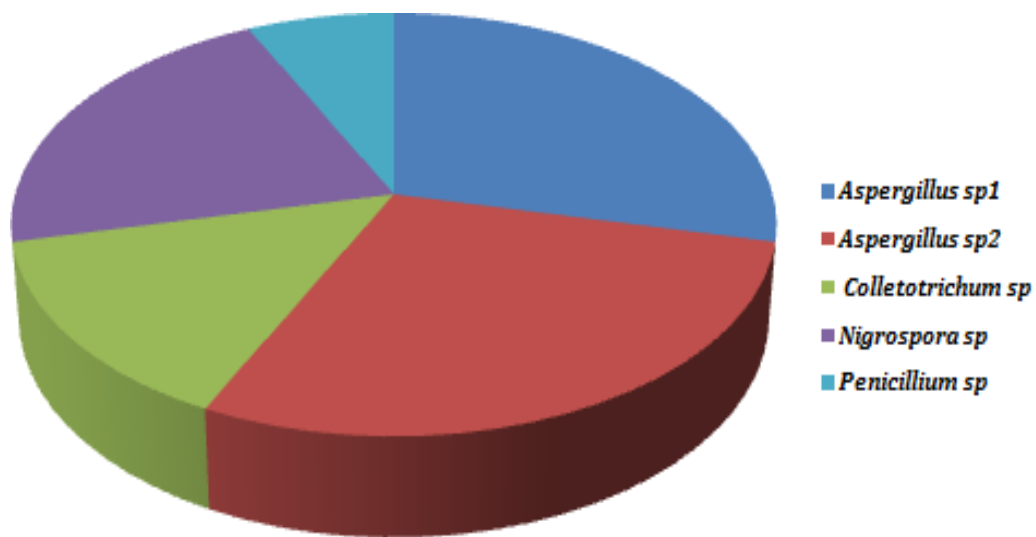


Figure 12. Fréquence de colonisation des champignons endophytes du *Citrus limon*

### 1.2. Activité antifongique des champignons endophytes du citron .

Parmi les champignons endophytes isolés seulement *Aspergillus sp1* est doté d'une activité antifongique, avec un taux d'inhibition maximale de 62,5% d'*Aspergillus niger*, pour l'Analyse de la variance (Anova) et le test Tukey (avec un intervalle de confiance à 95%). Les lettres majuscules A, B, C, D,E,F,G indiquent une différence significative entre les valeurs d'activité antifongique à des jours différents (Figure .13,14)

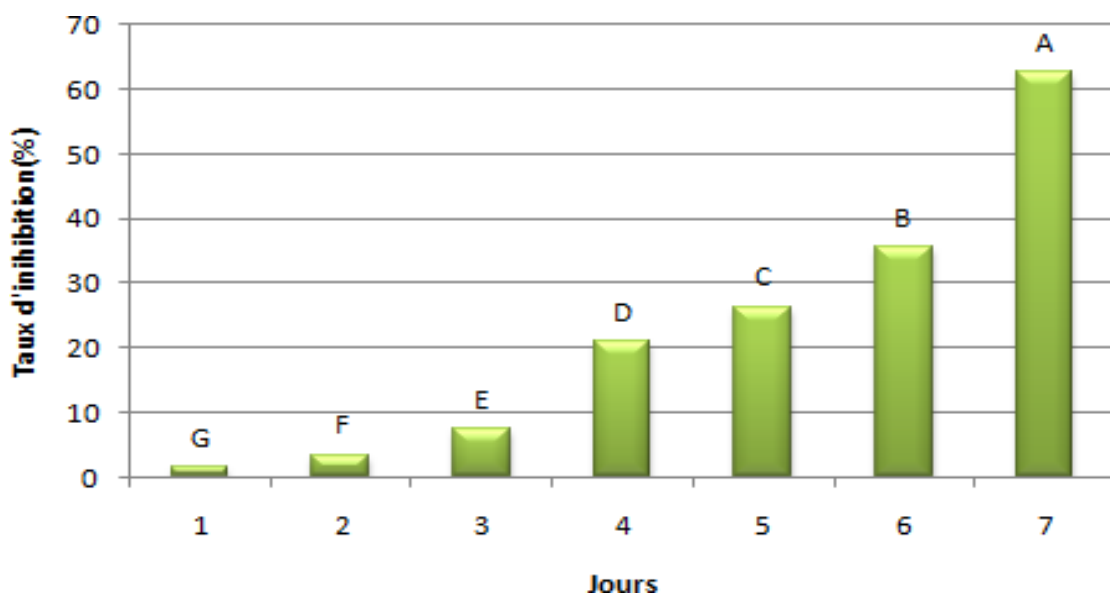
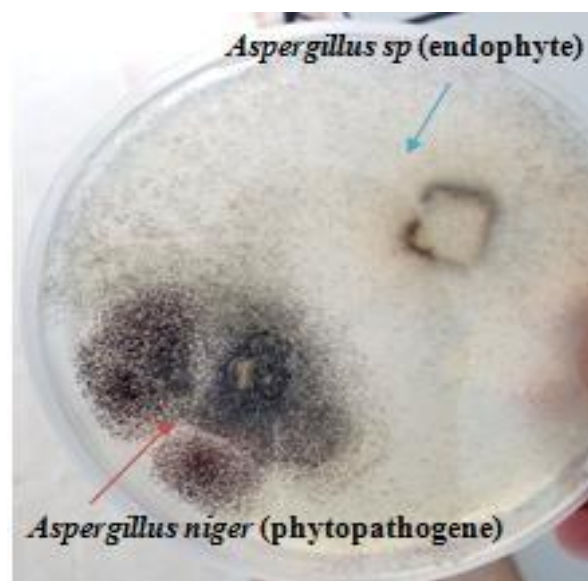


Figure 13. Activité antifongique du champignon endophyte *Aspergillus sp1*



**Figure 14.**Résultat de la culture double endophyte vs phytopathogene

### 1.3. Analyse chimique des extraits fongiques

**Tableau 1.** Métabolites secondaires des extraits fongiques.

Champignon endophyte	polyphenols	Alcaloïdes	Terpenoïdes	Saponines	Tanins
<i>Aspergillus sp1</i>	+	+	-	-	-
<i>Aspergillus sp 2</i>	-	+	-	-	-
<i>Colletotrichum sp</i>	-	+	-	-	-
<i>Nigrospora sp</i>	-	-	-	-	-
<i>Penicillium sp</i>	-	-	-	-	-

**+ : Présence**

**- : Absence**

Les résultats du test phytochimique (Tableau.1) montrent pour l'extrait d'*Aspergillus sp1* la présence de polyphénols et les alcaloïdes.

Pour l'extrait d' *Aspergillus* sp1 et *Colletotrichum* sp la présence d' alcaloïdes

Pour les champignons *Nigrospora* sp et *Penicillium* sp l'absence de tous les types de métabolites secondaires.

### **2. Discussion**

Les champignons endophytes protègent les plantes par un processus d'hyper parasitisme par l'emploi des enzymes hydrolytiques et par la production des métabolites secondaires antifongiques(Gunatilaka, 2006 ;Ting, 2014).

L'hyperparasitisme est une stratégie écologique utilisée par les endophytes pour protéger leurs plantes hôtes pendant laquelle l'agent pathogène est directement attaqué et détruit par un champignon endophyte particulier (Tripathi et *al.*, 2008).

La plupart des champignons phytopathogènes ont une paroi cellulaire avec de la chitine comme squelette structurel disposé en couches régulièrement ordonnées et des b-1,3-glucanes comme matériau de remplissage disposé de manière amorphe (Chemin et chet, 2002).

Les enzymes extracellulaires sont synthétisées à l'intérieur de la cellule puis sécrétées à l'extérieur de la cellule, où leur fonction est de décomposer les macromolécules complexes en unités plus petites pour être absorbées par les organismes comme seule source de carbone, d'énergie et de nutriments (Yadav et *al.*, 2015).

Les champignons endophytes parasitent les hyphes des champignons phytopathogènes en pénétrant les parois cellulaires des derniers par l'action des enzymes comme les chitinases et les b-1,3-glucanases et extraire ensuite des nutriments pour leur propre croissance (Limon et *al.*, 1999).

Actuellement la recherche de nouvelles substances naturelles à bonne activité biologique contre les maladies fongiques deviennent une des plus grandes préoccupations scientifiques.

Les champignons endophytes produisent une variété de composés antimicrobiens ou métabolites secondaires de faible poids moléculaire, actifs à de faibles concentrations provoquant une anomalie de croissance des hyphes de l'agent pathogène (Guo et *al.*, 2000 ;Ting, 2014).

Parmi ces métabolites les composés phénoliques (Rigane et *al.*, 2016) ,agissant en privant les champignons des éléments nutritifs du milieu de culture soit en établissant des ponts hydrogènes avec les protéines (les adhésines) des parois cellulaires ou les protéines de transport de la membrane cytoplasmique ou avec les enzymes (protéases, carbohydrases) (Scalbert 1991 ; Cowan 1999).

En comparaison avec des études portant sur l'activité antifongique des métabolites secondaires produites par les champignons endophytes.

## ***Résultats et Discussion***

---

La trichodermine a été isolée à partir de le champignon endophyte *Trichoderma brevicompactum* souche 0248 obtenue d'*Allium sativum* a montré une puissante activité inhibitrice contre *Rhizoctonia solani*, avec une CE50 de 0,25 µg / mL et contre *B. cinerea*, avec une CE50 de 2,02 µg / mL (Shentu et al., 2014).

La trichothécine secrétée par le champignon endophyte *Trichothecium* sp isolé des feuilles de *Phyllanthus* sp, présente une activité antifongique variable contre *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma viride*, *Paecilomyces varioti* et *Aspergillus niger* avec une concentration minimale inhibitrice de 10, 30, 40, 20 et 12 µg / mL, respectivement (Taware et al., 2015).

Le phoménone produit par le champignon endophyte *Xylaria* sp.isolé à partir *Piper aduncum* et 3,12-dihydroxycadalène produit par *Phomopsis cassiae* isolé à partir *Cassia spectabilis* possèdent une bonne activité antifongique contre *Cladosporium cladosporioides* *C. sphaerospermum* (Silva et al., 2006,Silva et al., 2010).

Les composés stéroïdes 3b, 5 α -dihydroxy-6 β -acétoxy-ergosta-7,22-diène , 3 β, 5 α -dihydroxy-6 β -phénylacétyloxy-ergosta-7,22-diène, 3 β -hydroxy-ergosta-5-ène , 3-oxo-ergosta-4,6,8 , 22-tétraène isolés du filtrat du champignon endophyte *Colletotrichum* sp isolés à partir des tiges d'*Artemisia annua* sont dotés d'une activité antifongique contre *Phytophthora capsici*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia cerealis* et *Helminthosporium sativum* (Lu et al., 2000).

Le champignon endophyte *Rhizopycnis vagum* Nitaf 22 isolé à partir de la racine de *Nicotiana tabacum* est la source de *Rhizopycnine* D et TMC-264 qui ont montré une forte inhibition de la germination des spores de *Magnaporthe oryzae* avec des valeurs IC50 de 9,9 et 12,0 µg / mL, respectivement (Lai et al., 2016).

La chaétoglobosine A et D ont été isolées *Chaetomium globosum* CDW7, un endophyte de *Ginkgo biloba* a montré une bonne activité antifongique contre *Sclerotinia sclerotiorum* avec des valeurs IC50 de 0,35 et 0,62 µg / mL respectivement (Zhao et al., 2017).

Le bipolamide B isolé de *Bipolaris* sp. MU34,un champignon endophyte associé aux feuilles de *Gynura hispida* Thwaites a montré une activité antifongique moyenne avec des valeurs MIC de 16, 32, 32, 64 et 64 µg / mL, contre *Cladosporium cladosporioides*, *C. cucumerinum*, *Aspergillus niger* et *Rhizopus oryzae* respectivement (Siriwach et al., 2014).

La koningiopsisine C produite du champignon endophyte *Trichoderma koningiopsis* YIM PH30002 isolé à partir *Panax notoginseng* a montré une activité antifongique contre *F. oxysporum*, *A. panax*, *F. solani* et *P. cucumerina* avec des CMI à 32, 64, 32 et 16 µg / mL, respectivement (Liu et al., 2016).

## ***Résultats et Discussion***

---

Le champignon endophyte *Cytospora sp* produit le seiricardine D antifongique contre *Magnaporthe oryzae* avec une CIM de 839  $\mu$ M (Deng et al., 2018).

Le champignon endophyte *Trichothecium crotocinigenum* est la source de trichothecrotocines A ,B ,C à capacité antifongique contre *A. solani* et *F. oxysporum* avec une CI50 entre 8 à 32  $\mu$ g/mL (Yang et al. 2018a).

Les emericelactones A-D produites par le champignon *Emericella sp.* XL029 isolées des feuilles de *Panax otoginseng* ont montré une activité antifongique contre les champignons phytopathogènes *Verticillium dahliae* , *R. solani*, *Gibberella saubinetii* (Pang et al., 2018).

Le champignon endophyte *Aspergillus tubingensis* isolé à partir *Decaisnea insignis* produit l'acide propanoïque antifongique contre *F. graminearum* à une CIM de 16  $\mu$ g/mL (Yang et al., 2018b).



***CONCLUSION***  
***ET***  
***PERSPECTIVES***

## Conclusion

---

### Conclusion

La présente étude a pour objet l'étude de l'activité antifongique des champignons endophytes isolés à partir le citron *Citrus limon* contre *A.niger*

On a pu isoler 5 taxons différents de champignons endophytes à partir des feuilles du citron le genre le plus dominant est *Aspergillus* sp 1 avec une fréquence de colonisation totale de 33,33% suivie par *Aspergillus* sp 2 avec 33,33%, *Colletotrichum* sp avec 25%, *Nigrospora* sp avec 16,66% et *Penicillium* sp avec 8,33%.

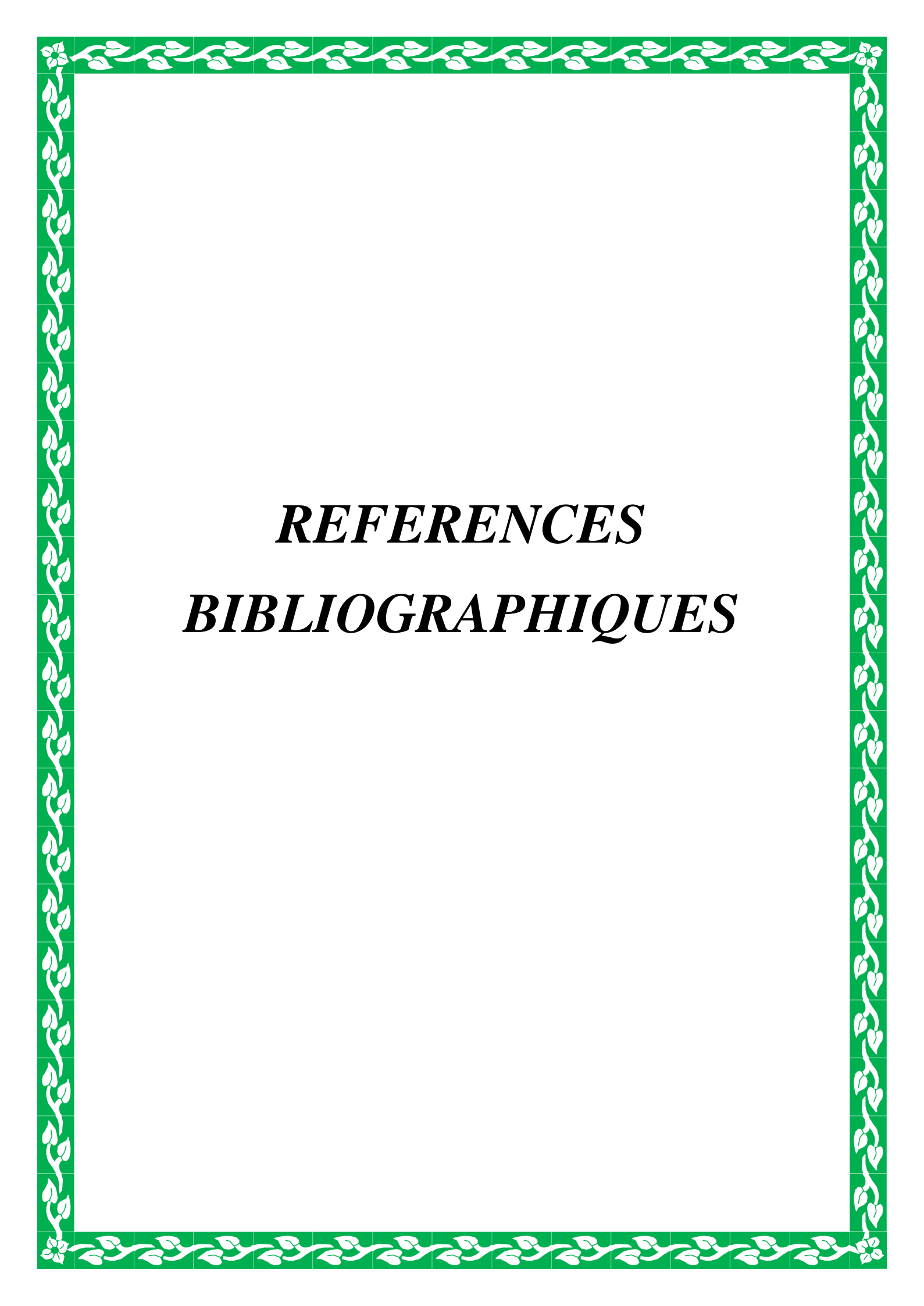
Parmi les champignons endophytes isolés seulement *Aspergillus* sp1 est doté d'une activité antifongique, avec un taux d'inhibition maximale de 62,5% d'*Aspergillus niger*.

Les résultats du test pythochimique montrent pour l'extrait d'*Aspergillus* sp1a présence de poly phénols et les alcaloïdes,pour l'extrait d' *Aspergillus* sp1 et *Colletotrichum* sp la présence d' alcaloïdes,pour les champignons *Nigrospora* sp et *Penicillium* sp l'absence de tous les types de métabolites secondaires.

Il est recommandé dans les futures études de réaliser des travaux plus approfondis qui auront pour objectifs:

- Réaliser davantage des études sur la mycoflore endophyte du citron et également diversifier les parties du végétal à investiguer (racines, fruits,fleurs) ;
- Cibler d'autres champignons phytopathogènes afin d'évaluer le spectre d'action des filtrats ;
- Enfin,il serait plus fiable et plus productif de caractériser la nature chimique des substances impliquées dans l'activité antifongique ce qui nécessite l'implication des méthodes plus performantes comme la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase liquide (HPLC) .





***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

## ***Références bibliographiques***

---

- Albrechtsen B.R.,Witzell J.,2012.**Disentangling functions of fungal endophytes in forest trees. In: Silva A.P.,Sol M.(eds).Fungi types,environmental impact and role in disease.Nova Science Publishers Inc, New York.pp:235-246.
- Ali A.,Ahmad F., Biondi A.,Wang Y.,Desneux N.,2012.**Potential for using *Datura alba* leaf extracts against two major stored grain pests,the khapra beetle *Trogoderma granarium* and the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Journal of Pest Science.*,**85**:359-366.
- Arechavaleta M.,Bacon C.W.,Plattner R.D.,Hoveland C.S.,Radcliffel D.E.,1992.** Accumulation of ergopeptide alkaloids in symbiotic tall fescue grown under deficits of soil water and nitrogen fertilizer. *Applied and Environmental microbiology.*,**58**:857-861.
- Arnold A.E.,Herre E.A.,2003.**Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes:ecological pattern and process in *Theobroma cacao*(*Malvaceae*). *Mycologia.*,**95**:388-398.
- Aschehoug E.T.,Metlen K.L.,Callaway R.M.,&Newcombe G.,2012.**Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Ecology.*,**93**:3-8.
- Bacon C.W.,Hill N.S.,1996.**Symptomless grass endophytes.In:Redkin S.C.,Carris L.M .(eds).Endophytic fungi in grasses and woody plants products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses.APS Press,St. Paul,pp:155-178.
- Baldauf M.W.,Mace W.J.,Richmond D.S.,2011.**Endophyte mediated resistance to black cutworm as a function of plant cultivar and endophyte strain in tall fescue.*Environmental Entomology.*,**40**:639-647.
- Ball O.J.P.,Prestidge R.A.,Sprosen J.M.,1995.**Interrelationships between *Acremonium lolii* ,peramine and lolitrem B in perennial ryegrass.*Applied and Environmental Microbiology.*,**61**:1527-1533.
- Baltruschat H.,Fodor J.,Harrach B.D.,Niemczyk E.,Barna B.,Gullner G.,Janeczko A., Kogel K.H.,Schäfer P.,Schwarczinger I.,Zuccaro A.,Skoczowski A.,2008.**Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist.*,**180**:501-510.
- Benhamou N.,Kloepper J.W.,Tuzun S.,1998.**Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with and endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response.*Planta.*,**204**:153-168.
- Benhamou N.,Chet I.,1997.**Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*.*Applied and Environmental Microbiology.*,**63**:2095-2099.

## ***Références bibliographiques***

---

- Bocquet J.,1993.** Généralités sur les microorganismes en biotechnologies. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.
- Cao W.H., Liu J.,He X.J.,Mu R.L.,Zhou H.L.,Chen S.Y.,Zhang J.S.,2006.** Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology.*,**140**:707-719.
- Chague V., Maor R.,Sharon A., 2009.** A putative oligopeptide transporter from *Colletotrichum gloeosporioides* that is involved in responses to auxin and pathogenicity. *BMC Microbiology. Systematics.*, **21**: 275-297.
- Chemin L., Chet I.,2002.** Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. In: Dick RP, Burns RG (eds) *Enzyme in the environment*. Marcel Dekker, New York, pp: 171-225.
- Cohen Y., Wang W., Ben-Daniel B. H., Ben-Daniel Y., 2006.** Extracts of *Inula viscosa* control downy mildew of grapes caused by *Plasmopora viticola*. *Phytopathology*, **96 (4)**: 417-424.
- Collado J., Platas G., González I.,Peláez F., 1999.** Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist.*, **144**: 525-532.
- Costacurta A. ,Vanderleyden J., 1995.** Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* ., **21**: 1-18.
- Cowan M M .,1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12(4)**: 564-582.
- Davies P. J., 2004.** *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal production, Action*, 3rd edn., Springer, Dordrecht, The Netherlands, 63-94.
- De Battista J., Bacon C., Severson R., Plattner R. et Bouton J., 1990.** Indole acetic acid production by the fungal endophyte of tall fescue. *Agronomy Journal.*, **82**: 878-880.
- Deng Q., Li G., Sun M .,Yang X.,Xu J.,2018.** A new antimicrobial sesquiterpene isolated from endophytic fungus *Cytospora* sp. from the Chinese mangrove plant *Ceriops tagal*. *Natural Product Research* .,**34(10)** :1404-1408.
- Dolatabad H.K.,Nikkhah M.J.,Shier W.T.,2017.** Evaluation of antifungal, phosphate solubilisation, and siderophore and chitinase release activities of endophytic fungi from *Pistacia vera*. *Mycology Progress*:**16(8)** : 777-790.
- Ernst M., Mendgen K. W.,Wirsal S. G. R., 2003.** Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*, **16**: 580-587.
- Fisher P.J.,PetriniO.,1987.** Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticola*: a preliminary study. *Mycological Research.*,**89**: 246-249.

## ***Références bibliographiques***

---

- Flannigan B., Samson R.A., Miller J.D.,2011.** Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control. CRC Press, Boca ,539 p
- Griffin M.R.,2014.**Biocontrol and Bioremediation:Two Areas of Endophytic Research Which Hold Great Promise. *Advances in Endophytic Research.*,**14**:257-277.
- Grosch R.,Scherwinski K.,Lottmann J.,Berg G.,2006.**Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*:selection,control efficacy and influence on the indigenous microbial community. *Mycological Research.*,**110**:1464-1474.
- Guillaume V.,2006.** Mycologie auto-évaluation et manipulation, Ed De Boeck & Lacier, Bruxelles, 62 p.
- Gunatilaka A.A.L.,2006.**Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products.*, **69**: 509-526.
- Guo B.,Dai J.R.,Ng S.,Huang Y.,Leong C.,Ong W.,Carte B.K.,2000.**Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of HCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species.*Journal of Natural Products.*,**63**:602-604.
- Guo B.,Dai J.R.,Ng S.,Huang Y.,Leong C.,Ong W.,Carte B.K.,2000.**Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of HCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species.*Journal of Natural Products.*,**63**:602-604.
- Gwinn K.D.,Bernard E.C.,1993.**Interactions of endophyteinfected grasses with the nematodes *Meloidogyne marylandi* and *Pratylenchus scribneri*.Proceedings of 2nd international symposium *Acremonium* grass interact,pp:156-160.
- Harborne, J.B.,1998.** Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 3. Springer Netherlands, Netherlands,302p.
- Hirose D.,Matsuoka S.,Osono T.,2013.**Assessment of the fungal diversity and succession of ligninolytic endophytes in *Camellia japonica* leaves using clone library analysis.*Mycologia* .,105:837-843.
- Kaul S.,Gupta S.,Ahmed M.,Dhar M.K.,2012.**Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews.*,**11**:487-505.
- Khan A.L.,Hamayun M.,Kang SM.,Kim Y.H.,Jung H.Y.,Lee J.H.,Lee I.J.,2012.** Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10.*BMC Microbiol* .,12:3.

## ***Références bibliographiques***

---

- Kharwar R.N., Verma V.C., Kumar A., Gond S.K., Harper J.K., Hess W.M., Lobkovosky E., Ma C., Ren Y., Strobel G.A., 2008.** Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *Chloridium* sp. *Current Microbiology*, **58**:233-238.
- Kubicek C.P., Rohr M., 1977.** Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **4**: 167-168.
- Kuldau G., Bacon C. W., 2008.** Clavicipitaceous endophytes: their ability to enhance grass resistance to multiple stresses. *Biological Control*, **46**: 57-71.
- Lacava P.T., Azevedo J.L., 2014.** Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. *Advances in Endophytic Research*, **13** :231-248.
- Lai D., Wang A., Cao Y., Zhou K., Mao Z., Dong X., Tian J., Xu D., Dai J., Peng Y., Zhou L., Liu Y., 2016.** Bioactive dibenzopyrone derivatives from the endophytic fungus *Rhizopycnis vagum* Nitaf22. *Journal of Natural Products*, **79**: 2022-2031.
- Leroux P., 1999.** Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*, **18**: 687-697.
- Li T., Liu M.J., Zhang X.T., Zhang H.B., Sha T., Zhao Z.W., 2011.** Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte *Exophiala pisciphila*. *Science of Total Environment*, **409**:1069-1074.
- Li X., Bu N., Li Y., Ma L., Xin S., Zhang L., 2012.** Growth, photosynthesis and antioxidant responses of endophyte infected and non-infected rice under lead stress conditions. *Journal of Hazardous Materials*, **213-214**:55-61.
- Li Y.L., Xin X.M., Chang Z.Y., Shi R.J., Miao Z.M., Ding J., Hao G.P., 2015** .The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* BGE. f. *alba* are a potential source of natural antioxidants. *Botanical Studies*, **56(1)**:5.
- Liarzi O., Ezra D., 2014.** Endophyte-Mediated Biocontrol of Herbaceous and Non-herbaceous Plants. *Advances in Endophytic Research*, **18**:335-356.
- Limon M.C., Pintor T.J.A., Benitez T., 1999.** Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. *Phytopathology*, **89**:254-261
- Liu C. H., Zou W. X., Lu H. et Tan R. X., 2001.** Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*, **88**: 277-282.
- Machuca A., Milagres A. M. F., 2003.** Use of cas-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology*, **36**: 177-181.

## ***Références bibliographiques***

---

- Liu J.Y., Song Y.C., Zhang Z., Wang L., Guo Z.J., Zou W.X., Tan R.X., 2004. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, **114**:279-287.
- Liu K., Yang Y., Miao C.P., Zheng Y.K., Chen J.L., Chen Y.W., Xu L.H., Guang H.L., Ding Z.T., Zhao L.X., 2016. Koningiopisins A-H, polyketides with synergistic antifungal activities from the endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis*. *Planta Medica*, **82**: 371-376.
- Lu H., Zou W.X., Meng J.C., Hu J., Tan R.X. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, **151**: 67-73
- Malinowski D., Leuchtman A., Schmidt D., & Nösberger J., 1997. Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* endophyte may increase the competitive ability of meadow fescue. *Agronomy Journal*, **89**:833-839.
- Martinuz A., Schouten A., Menjivar R.D., Sikora R.A., 2012. Effectiveness of systemic resistance toward *Aphis gossypii* (Hom., *Aphididae*) as induced by combined applications of the endophytes *Fusarium oxysporum* Fo162 and *Rhizobium etli* G12. *Biological Control*, **62**:206-212.
- Mattey M., 1992. The production of organic acids. *Critical Reviews in Biotechnology*, **12**: 87-132.
- Mendoza A.R., Sikora R.A., 2009. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *Biocontrol*, **54**:263-272.
- Munn R., Cramer G.R., Ball M.C., 1999. Interactions between rising CO<sub>2</sub>, soil salinity and plant growth. In: Luo Y., Mooney H.A. (eds). *Carbon dioxide and environmental stress*. Academic, London, pp:139-167.
- Narisawa K., Usuki F., Hashiba T., 2004. Control of *Verticillium* yellows in Chinese cabbage by the dark septate endophyte fungus LTVB3. *Phytopathology*, **94**:412-418.
- Oerke E.C., 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, **144**: 31-43.
- Pal K.K., Gardener B.M., 2006. Biological control of plant pathogens the plant health instructor. *APS Net*, **2**: 1117.
- Pang X.J., Zhang S.B., Chen H.L., Zhao W.T., Yang, D.F., Xian P.J., Xu L.L., Tao, Yan D., Fu H.Y., Yang X.L., 2018. Emericelactones A–D: Four novel polyketides produced by *Emericella* sp. XL 029, a fungus associated the leaves of *Panax notoginseng*. *Tetrahedron Letters*, **59**:4566-4570.

## ***Références bibliographiques***

---

- Pankhurst C.E., Craig A.G., Jones W.T., 1979.** Effectiveness of root nodules rhizobia. *Journal of Experimental Botany.*, **30**:1085-1093.
- Pasqualotto A. C., 2010.** *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Ed Springer Science & Business Media, New York, 1027p.
- Pavela R., 2007.** Possibilities of botanical insecticide exploitation in plant protection. *Pest Technology.*, **1** :47-52.
- Qin J.C, Zhang Y.M, Gao J.M., Bai M.S., Yang S.X, Laatsch H., Zhang A.L., 2009.** Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum* an endophyte isolated from Ginkgo biloba. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **19**:1572-1574.
- Redman R.S, Sheehan K.B., Stout R.G., Rodriguez R.J., Henson J.M., 2002.** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science.*, **298**:1581.
- Reinhold-Hurek B., Hurek T., 2011.** Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology.*, **14**:435-443.
- Rigane G., Ghazghazi H., Aouadhi C., Ben Salem R., Nasr Z., 2016.** Phenolic content, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from *Pistacia atlantica*. *Natural Product Research* : 1-4.
- Romão-Dumaresq A.S., De Araújo W.L., Talbot N.J., Thornton C.R., 2012.** RNA interference of endochitinases in the sugarcane endophyte *Trichoderma virens* 223 reduces its fitness as a bio-control agent of pineapple disease. *Plos One.*, **7**:47888.
- Rudgers J.A., Koslow J.M., Clay K., 2004.** Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters.*, **7**: 42-51.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., 2004.** Introduction to food and airborne fungi. Centralalbureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, 389p
- Scalbert A., 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.*, **30(12)**: 3875-3883.
- Schuster E., Dunn-coleman N., Frisvad J. C., Van dijck P.W. 2002.** On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Appl microbiol biotechnol*, **59 (4-5)**: 426-435.
- Shahabivand S., Maivan H.Z., Goltapeh E.M., Sharifi M., Aliloo A.A., 2012.** The effects of root endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and cadmium accumulation in wheat under cadmium toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry.*, **60**:53-58.
- Sharma, R., 2012.** Pathogenicity of *Aspergillus niger* in plants. *Cibtech Journal of Microbiology.*, **1(1)**:47-51

## ***Références bibliographiques***

---

- Shentu X., Zhan X., Ma Z., Yu X., Zhang C.,2014. Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brazilian Journal of Microbiology* .,45 (1) : 248-254.
- Sieber T.,2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. *Fungal biology reviews*.,21:75-89.
- Siegel M.R., Latch G.C.M., Bush L.P., Fannin F.F., Rowan D.D., Tapper B.A., Bacon C.W., Johnson M.C.,1990. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of Chemical Ecology* .,16:3301-3315.
- Silva G.H., De Oliveira C.M., Teles H.L., Pauletti P.M., Castro-Gamboa I., Silva D.H.S., Silva G. H., Oliveira C.M. D ., . Teles H. L., Pauletti P.M., Gamboa I. C., Bolzani D. H.S., Silva V. S., Young M.C.M., Costa-Neto C.M., Pfenning L.H., Berlinck R.G.S., Araujo A. R., 2010. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*.,3:164-167.
- Silva G.H., Oliveira C.M., Teles H.L., Pauletti P.M., Gamboa I.C., Silva H.S., Bolzani V.S., Young M.C.M., Costa-Neto C.M., Pfenning L.H., Berlinck G.S., Araujo A.R., 2010. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp. an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*.,3:164-167.
- Silva G.H., Teles H.L., Zanardi L.M., Young M.C.M., Eberlin M.N., Hadad R., Ludwig H. P. , Neto C .M.C., Gamboa I.C., Bolzani V. D. S. , Araujo A. R., 2006. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). *Phytochemistry* .,67:1964-1969.
- Singh L.P., Gill S.S., & Tuteja N., 2011. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behaviour*.,6:175-191.
- Siriwach R., Kinoshita H., Kitani S., Igarashi Y., Pansuksan K., Panbangred W., Nihira T., 2014. Bipolamides A and B, triene amides isolated from the endophytic fungus *Bipolaris* sp. MU34. *Journal of Antibiotics* .,67: 167-170.
- Skidmore A. M., Dickinson C. H. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria Nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*,66:57-64.
- Soleimani M., Hajabbasi M.A., Afyuni M., Mirlohi A., Borggaard O.K., & Holm P.E., 2010a. Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. *International Journal of Phytoremediation*.,12:535-549.



## ***Références bibliographiques***

---

- Soleimani M., Afyuni M., Hajabbasi M.A., Nourbakhsh F., Sabzalian M.R., & Christensen J.H.,2010b.**Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* ., **81**:1084-1090.
- Strobel G.A.,Miller R.V.,Martinez-Miller C.,Condron M.M.,Teplov D.B.,Hess W.M.,1999.**Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiology*., **145**:1919-1926.
- Sturz A.V.,Christie B.,Nowak J.,2000.**Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable system of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*., **19**:1-30.
- Tapondjou A.L.,Adler C.,Fontem D.A.,Bouda H.,Reichmuth C.,2005.**Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Pest Science*., **41**: 91-102.
- Taware R.,Abnave P.,Patil D., Rajamohananan P.R., Raja R., Soundararajan G.,Kundu G.C.,Kharat M.K.D., Pai K., Ahmad A., 2015.**Trichothecin from endophytic fungus *Trichothecium* sp. and its anticancer effect on murine melanoma and breast cancer cell lines. *Current Biochemical Engineering*., **2**: 73-80.
- Tayung K., Barik B.P.,Jha D.K.,Deka D.C.,2011.**Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere*., **3**:203-213.
- Ting A.S.Y.,2014.**Biosourcing Endophytes as biocontrol Agents of Wilt Diseases. *Advances in Endophytic Research*., **15**:283-296.
- Tripathi S.,Kamal S.,Sheramati I.,Oelmuller R.,Varma A.,2008.**Mycorrhizal fungi and other root endophytes as biocontrol agents against root pathogens. *Mycorrhiza*., **3**:281-306.
- Unterseher M.,Gazis R.,Chaverri P.,Guarniz C.F.G.,Tenorio D.H.Z.,2013.**Endophytic fungi from Peruvian highland and lowland habitats form distinctive and hostplant-specific assemblages. *Biodiversity and Conservation*., **22**:999-1016.
- Vega F.E., Goettel M.S., Blackwell M., Chandler D., Jackson M.A., Keller S., Koike M., Maniania N.K., Monzon A., Ownley B.H., Pell J.K., Rangel D.E.N., Roy H.E., 2009.**Fungal entomopathogens: new insights on their ecology, *Fungal Ecology*., **2**: 149-159.
- Waller F.,Achatz B.,Baltruschat H.,Fodor J.,Becker K.,Fisher M., Heier T.,Huckelhoven R.,Neumann C.,Von Wettstein D.,Franken P.,Kogel K.H.,2005.**The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. . *Proceedings of the National Academy of Sciences*., **102**:13386-13391.

## ***Références bibliographiques***

---

- Wang L.W.,Xu B.G.,Wang J.Y.,Su Z.Z.,Lin F.C.,Zhang C.L.,Kubicek C.P.,2012.Bioactive metabolites from *Phoma* species,an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*.*Applied Microbiology and Biotechnology*.,**93**:1231-1239.
- Wang Y.,Dai C.C.,2011.Endophytes:A potential resource for biosynthesis,biotransformation and biodegradation. *Annual Review of Microbiology*.,**61**:207-215.
- Waqas M., Khan A.L.,Kamran M.,Hamayun M.,Kang S.M.,Kim Y.H.,Lee I.J.,2012. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host- plant growth during stress. *Molecules*.,**17**:10754-10773.
- White R.H.,Engelke M.C.,Morton S.J.,Johnson-Cicalese J.M.,Ruemmele B.A.,1992.*Acremonium* endophyte effects on tall fescue drought tolerance.*Crop Science* .,**32**:1392-1396.
- Wicklow D.T.,Roth S.,Deyrup S.T.,Gloer J.B.,2005.A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*.,**109**:610-618.
- Yadav R., Singh A.V, Joshi S., Kumar M., 2015.Antifungal and enzyme activity of endophytic fungi isolated from *Ocimum sanctum* and *Aloe vera*., *African Journal of Microbiology Research* .,**9(29)**: 1783-1788.
- Yang H.X.,Ai H.L.,Feng T., Wang W.X ., Wu B., Zheng Y.S., Sun H., He J., Li Z.H. , Liu J.K., 2018a.Trichothecrotocins A– C, antiphytopathogenic agents from potato endophytic fungus *Trichothecium crotocinigenum*. *Organic Letters* .,**20**:8069-8072.
- Yang X.f., Wang N.N.,Kang Y.F., Ma Y.M.,2018b.A new furan derivative from an endophytic *Aspergillus tubingensis* of *Decaisnea insignis* (Griff.) Hook.f. & Thomson.*Natural Product Research*.,**33**:2777-2783.
- Zabalgoeazcoa I.,2008.Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*.,**6**:138-146.
- Zhang C.L.,Wang G.P.,Mao L.J.,Komon-Zelazowska M.,Yuan Z.L.,Lin F.C.,Druzhinina I.S.,Kubicek C.P.,2010a.*Muscodor fengyangensis* sp. nov. from southeast China: morphology,physiology and production of volatile compounds.*Fungal Biology* .,**114**:797-808.
- Zhang X.X.,Li C.J.,&Nan Z.B.,2010b.Effects of cadmium stress on growth and anti-oxidative systems in *Achnatherum inebrians* symbiotic with *Neotyphodium gansuense*.*Journal of Hazardous Materials*.,**175**:703-709.

## ***Références bibliographiques***

---

- Zhao S.S., Zhang Y.Y., Yan W., Cao L.L., Xiao Y., Ye Y.H., 2017.** *Chaetomium globosum* CDW7, a potential biological control strain and its antifungal metabolites. *FEMS Microbiology Letters.*,**364 (3)**:1-6.
- Marek-Kozaczuk M., Deryto M. et Skorupska A., 1996.** The insertion mutants of *Pseudomonas* sp.267 defective in siderophore production and their effect on clover (*Trifolium pretense*) nodulated with *Rhizobium leguminosarum* Trifolli. *Plant Soil.*, 179: 269-274.
- Müller L. J., 2003.** From auxin homeostasis to understanding plant pathogen and plant symbiotic interaction: editor's research interests. *Journal of Plants Growth Regulators.*, **23**: 1-8.
- Obledo E. N., Barragan-Barragan L. B., Gutierrez-Gonzalez P., Ramirez- Hernandez B. C., Ramirez J. J. et Rodriguez-Garay B., 2003.** Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, **74**: 237-241.
- Redman R. S., Dunigan D. D.,Rodriguez R. J., 2001.** Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader ? *New Phytologist.*, **151**: 705-716.
- Rodriguez R. J., White J. F., Arnold A. E. et Redman R. S., 2009.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, **182 (2)**: 314-330.
- Rodriguez R. J., Woodward C. J.,Redman R. S., 2012.** Fungal Influence on Plant Tolerance to Stress. In *Biocomplexity of Plant-Fungal Interactions*; Southworth, D. (Ed.); Wiley-Blackwell: Oxford, United Kingdom,232 p
- Rodriguez R. J., Henson J., Van Volkenburgh E., Hoy M., Wright L., Beckwith F., Kim Y. et Redman R. S., 2008.** Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME Journal.*, **2**: 404-416.
- Schulz B., Boyle C., 2005.** The endophytic continuum. *Mycological Research.*, **109**: 661-687.
- Sieber T. N., 2002.** Fungal root endophytes. In: Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. (eds). *Plant Roots: The Hidden Half*, 3rd ed., rev. and expanded ,New York, Basel: Marcel Dekker, PP:887-917.
- Subbarayan K., Varadharajan N. et Kalyanaraman R., 2010.** Indole-3-acetic acid from contaminant fungus and potential application for cell cultures of *Alternanthera sessilis*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.*, **1(4)**: B-262.
- Waqas M., Khan A. L. et Lee I. J., 2014.** Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. *J Plant Interac.*, **9 (1)**: 478-487.

## ***Références bibliographiques***

---

- Khan A. L., Hussain J., Al-Harrasi A., Al-Rawahi A., Lee I. J., 2013.** Endophytic fungi: a source of gibberellins and crop resistance to abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology.*, 1-13.
- Khan A. L., Gilani S. A., Waqas M., Al-Hosni K., Al-Khiziri S., Kim Y. H., Ali L., Kang S. M., Asaf S., Shahzad R., Hussain J., Lee I. J., Al-Harrasi A., 2016.** Endophytes from medicinal plants and their potential for producing in-dole-acetic acid, improving seed germination and mitigating oxidative stress. *Journal of Zhejiang University-Science B Biomedicine & Biotechnology.*, **18 (2)**: 125-137.
- Kimmons C.A., Gwinn K.D., Bernard E.C., 1990.** Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte free tall fescue. *Plant Disease* ., **74**:757-761.
- Lewis G.C., Vaughan B., 1997.** Evaluation of a fungal endophyte (*Neotyphodium lolii*) for control of leather jackets (*Tipula* spp.) in perennial ryegrass. *Annals Applied Biology Supplement.*, **130**:34-35.
- Lewis G.C., 2004.** Effects of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Annals of Applied Biology.*, **144**:53-63.
- Li X., Bu N., Li Y., Ma L., Xin S., Zhang L., 2012.** Growth, photosynthesis and antioxidant responses of endophyte infected and non-infected rice under lead stress conditions. *Journal of Hazardous Materials.*, **213-214**:55-61.
- Malinowski D.P., Belesky D.P., Hill N.S., Baligar V.C., Fedders J.M., 1998.** Influence of phosphorus on the growth and ergot alkaloid content of *Neotyphodium coenophialum*-infected tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). *Plant and Soil.*, **198**:53-61.
- Malinowski D.P., Belesky D.P., Lewis G.C., 2005.** Abiotic stresses in endophytic grasses. In : Roberts C.A., West C.P., Spiers D.E. (eds). *Neotyphodium* in Cool-Season Grasses. Blackwell Publishing, Iowa, pp:187-199.
- Porrás Alfaro A., Bayman P., 2011.** Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology.*, **49**:291-315.
- Riedell W.E., Kieckhefer R.E., Petroski R.J., Powell R.G., 1991.** Naturally occurring and synthetic loline alkaloids derivatives: insect feeding behavior modification and toxicity. *Journal of Entomological Science.*, **26**:122-129.
- Rowan D.D., Hunt M.B., Gaynor D.L., 1986.** Peramine, a novel insect feeding deterrent from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium lolii*. *Journal of Chemical Society Chemical Communications.*, **1**:935-936.

## ***Références bibliographiques***

---

- Ruiz-Lozano J.M.,Azcon R.,Palma J.M.,1996.**Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress.*New Phytologist.*,**13**:327-333.
- Sikora R.A.,Pocasangre L.,Zum Felde A.,Niere B.,Vu T.T.,&Dababat A.A.,2008.**Mutualistic endophytic fungi and *in planta* suppressiveness to plant parasitic nematodes.*Biological Control.*,**46**:15-23.
- Staniek A.,Woerdenbag H.J.,Kayser O.,2008.**Endophytes exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery.*Journal of Plant Interactions.*,**3**:75-98.
- Wilkinson H.H.,Siegel M.R.,Blankenship J.D.,Mallory A.C.,Bush L.P.,Schardl C.L.,2000.**Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in grassendophyte mutualism. *Molecular Plant Microbe Interaction.*,**13**:1027-1033.
- Yue C., Miller J., White J. et Richardson M., 2000.** Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloe festucae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*,**48**: 4687-4692.

## Résumé

La présente étude a pour objet l'étude de l'activité antifongique des champignons endophytes isolés à partir le citron *Citrus limon* contre *A.niger*

On a pu isoler 5 taxons différents de champignons endophytes à partir des feuilles du citron le genre le plus dominant est *Aspergillus* sp 1 avec une fréquence de colonisation totale de 33,33% suivie par *Aspergillus* sp 2 avec 33,33%, *Colletotrichum* sp avec 25%, *Nigrospora* sp avec 16,66% et *Penicillium* sp avec 8,33%.

Parmi les champignons endophytes isolés seulement *Aspergillus* sp1 est doté d'une activité antifongique, avec un taux d'inhibition maximale de 62,5% d'*Aspergillus niger*.

Les résultats du test phytochimique montrent pour l'extrait d'*Aspergillus* sp1a présence de poly phénols et les alcaloïdes, pour l'extrait d' *Aspergillus* sp1 et *Colletotrichum* sp la présence d' alcaloïdes, pour les champignons *Nigrospora* sp et *Penicillium* sp l'absence de tous les types de métabolites secondaires.

**Mots clés :** champignons endophytes, activité antifongique, *Citrus limon*.

## ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو دراسة الفعالية المضادة للفطريات الفطرية المعزولة من الليمون الحامض والليمون ضد *A.niger*.

كان من الممكن عزل 5 أصناف مختلفة من الفطريات الداخلية من أوراق الليمون ، والجنس الأكثر انتشارًا هو *Aspergillus* sp 1 مع تكرار استعمار إجمالي قدره 33.33% يليه *Aspergillus* sp 2 بنسبة 33.33% ، *Colletotrichum* sp بنسبة 25% ، *Nigrospora* sp بنسبة 16.66% والبنسيليوم 8.33% . من الفطريات الداخلية المعزولة فقط *Aspergillus* sp1 تتمتع بنشاط مضاد للفطريات ، مع أقصى معدل تثبيط 62.5% من *Aspergillus niger*.

أظهرت نتائج الاختبار الكيميائي لمستخلص *Aspergillus* sp1 وجود البوليفينول والقلويدات ، بالنسبة لمستخلص *Aspergillus* sp1 و *Colletotrichum* sp وجود قلويدات ، بالنسبة للفطريات *Nigrospora* sp و *Penicillium* sp غياب جميع أنواع الثانوية. المستقبلات.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات الداخلية ، نشاط مضاد للفطريات ، ليمون الحمضيات.

## Abstract

The purpose of the present study is to study the antifungal activity of endophytic fungi isolated from lemon *Citrus limon* against *A.niger*

5 different taxa of endophytic fungi were isolated from the leaves of lemon ,the most dominant genus is *Aspergillus* sp 1 with a total colonization frequency of 33.33% followed by *Aspergillus* sp 2 with 33.33%, *Colletotrichum* sp with 25%, *Nigrospora* sp with 16.66% and *Penicillium* sp with 8.33%.

Of the isolated endophytic fungi only *Aspergillus* sp1 is endowed with antifungal activity, with a maximum inhibition rate of 62.5% of *Aspergillus niger*.

The results of the phytochemical test show for the extract of *Aspergillus* sp1 the presence of polyphenols and alkaloids, for the extract of *Aspergillus* sp1 and *Colletotrichum* sp the presence of alkaloids, for the fungi *Nigrospora* sp and *Penicillium* sp the absence of all types of secondary metabolites.

**Keywords:** Endophytic fungi, antifungal activity, *Citrus limon*.