

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mohamed El Bachir El-Ibrahimi –Bordj
Bou Arreridj
Faculté des sciences de la nature et de la vie et
sciences de la terre et de l'univers
Département Sciences biologiques

جامعة محمد البشير الإبراهيمي « برج بوعريبيج »
كلية علوم الطبيعة والحياة و علوم الأرض و الكون
قسم علوم البيولوجية



Mémoire de fin d'études

EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE : **Master 2**

Filière : Biologie

Option: Phytopathologie

Thème

**Effet antagoniste des champignons endophytes isolés à
partir de la plante médicinale « *Pistacia lentiscus* »**

Présenté par

- Bouhacida Sara
- Loukriz Bouchra

Encadré par

M^{me}. Zerroug Amina

Soutenu le : 04 /07/2013

Jury de soutenance

Président: Mr. Sadrati Nouari

Encadreur: M^{me}. Zerroug Amina

Examinatrice: M^{me}. Saidi Samira

Année Universitaire: 2012-2013



Mémoire de fin d'études

EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE : **Master 2**

Filière : Biologie

Option: Phytopathologie

Thème

**Effet antagoniste des champignons endophytes isolés à
partir de la plante médicinale « *Pistacia lentiscus* »**

Présenté par

- Bouhacida Sara
- Loukriz Bouchra

Encadré par

M^{me}. Zerroug Amina

Soutenu le : 04 /07/2013

Jury de soutenance

Président: Mr. Sadrati Nouari

Encadreur: M^{me}. Zerroug Amina

Examinatrice: M^{me}. Saidi Samira

Année Universitaire: 2012-2013

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Zerroug Amina, pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Notre vive reconnaissance va à Mr. SADRATI NOUARI et Mme. SAIDI SAMIRA, d'avoir accepté de juger ce modeste travail

A nos enseignants qui ont toujours cru en nous, nous les remerciant de tout nos cœurs pour leurs aides indéfinies afin d'accomplir nos études dans de bonnes conditions. On nommera Mr. ALIATTOUFIQUE, Mr. MERZOUGUI YUCEF et Mr. MERIBEI.

Et également on remercie le chef de département d'agronomie DAHOO MOAATASSEM pour son aide et son soutien durant la préparation de notre mémoire.

Sans oublier aussi tous les ingénieurs des laboratoires qui nous ont donné de l'aide et des conseils durant la période de notre travail dans les laboratoires.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*A nos chers parents et à
chacun des amours*

Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but d'évaluer l'activité antimicrobienne, et enzymatique des champignons endophytes isolés à partir des racines, rameaux, feuilles et fruits de la plante médicinale *Pistacia lentiscus*, où les pourcentages de colonisation étaient de 62,5%, 51,25%, 42,5%, 70% respectivement. Le pouvoir antimicrobien de 69 champignons endophytes isolés a été testé contre six bactéries pathogènes, dont trois à Gram négatif; *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* et trois à Gram positif; *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* et celui de 79 isolats contre trois champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans* et *Fusarium solani* var. *coeruleum* par la méthode de la double culture, tous les champignons endophytes ont démontré une activité sur au minimum un microorganisme pathogène, où les zones d'inhibition allaient de 0 à 27,5 mm, cette dernière a été obtenue par l'isolat *Fusarium* sp.2 contre *Bacillus cereus*. Ainsi que des pourcentages d'inhibition variant de 0 à 81,48% et atteignant les 81,48% avec l'isolat *Penicillium* (sp.5 et sp.6) et *Aspergillus* sp.3 contre *Fusarium solani* var. *coeruleum*.

Les tests qualitatifs de la production d'enzymes extracellulaires par ces endophytes ont démontré que 51% d'entre eux produisaient de l'amylase, 50,63% de la protéase, 43% de la cellulase, 38% de la lipase et 20% produisaient de l'estérase. Ces résultats nous ont permis de sélectionner les isolats actifs afin de les identifier au niveau du genre, et les genres dominants étaient *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., tous ceci nous permet de dire que ces champignons pourraient être une source prometteuse de composés bioactifs.

Mots clés : Champignon endophyte, plante médicinale, *Pistacia lentiscus*, taux de colonisation, activité antimicrobienne, activité enzymatique.

الملخص

أجريت هذه الدراسة لتقييم النشاط المضاد للميكروبات والنشاط الأنزيمي للفطريات الداخلية المعزولة من جذور وساق وأوراق وثمار من نبتة الصنوبر الطبية *Pistacia lentiscus* ، بحيث ان النسب المئوية الاستيطان كانت 62.5 %، 51.25%، 42.5 %، 70% على التوالي. تم اختبار 69 نوع من الفطريات الداخلية المعزولة لمعرفة قدرتها المضادة للميكروبات على ستة أنواع من البكتيريا الممرضة ، ثلاثة سالبة الغرام ، *Salmonella typhimurium* ، *Bacillus cereus*، *Enterococcus* وثلاثة موجبة الغرام ، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* و *faecalis* و 79 من هذه الفطريات على ثلاثة فطريات ممرضة للنبات *Fusarium solani* var. *coeruleum* ، *Phytophthora infestans* ، *oxysporum* f.sp. *albedinis*.

من خلال طريقة المزارع المزدوجة، أظهرت جميع الفطريات الداخلية نشاط ضد ميكروبي على الأقل على كائن مجهري ممرض واحد، حيث ان مناطق التثبيط تراوحت بين 0-27,5 ملم، بمساحة تثبيط اكبر تصل إلى 27.5 ملم التي حصل عليها *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* ضد *Bacillus cereus*. اما نسب تثبيط نمو الفطريات الممرضة فتراوحت من 0 الى 81,48% حيث اكبر نسبة تثبيط حصل عليها وصلت الى 81,48% ضد *Fusarium solani* var. *coeruleum* بواسطة *Penicillium* sp. 5 ، *Penicillium* sp. 6 و *Aspergillus* sp. 3.

أظهرت الاختبارات النوعية لإنتاج الإنزيمات الخارج خلوية بواسطة هذه الفطريات الداخلية أن 51% منها منتجة الأميلاز، 50.63% منتجة للبروتياز ، 43% منتجة للسيلياز، 38% منتجة للليباز و 20% منتجة للاستيراز. وقد سمحت هذه النتائج لنا بتحديد الفطريات النشطة التي تم تحديدها لمستوى جنس، وكانت الأجناس المهيمنة هي *Penicillium* ، *Fusarium* ، *Alternaria* و *Aspergillus* ، كل هذا يسمح لنا ان نقول أن هذه الفطريات يمكن أن يكون مصدرا واعدة للمركبات الحيوية النشطة.

الكلمات المفتاحية

فطر داخلي، *Pistacia lentiscus*، نبتة طبية ، معدلات الاستعمار، النشاط الميكروبي ،النشاط الأنزيمي .

Liste des abréviations

CYA Czapek Yeast extract Agar

Foa *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*

Fso *Fusarium solani* var. *coeruleum*

GN Gélose Nutritive

GYP Glucose Yeast extract Peptone

IAA Acide Indole-3-Acétique

IPYA Acide Indole-3-Pyruvique

MEA Malt Extract Agar

NI Non Identifié

PDA Potato Dextrose Agar

Pi *Phytophthora infestans*

SDA Sabouraud Dextrose Agar

Liste des figures

Figure 1. Quelques substances antibactériennes produites par les champignons endophytes (Zerroug, 2011).....	9
Figure 2. Certains caractères botaniques chez <i>Pistacia lentiscus</i> (Ait Said, 2011).....	11
Figure 3. L'effet des champignons endophytes actifs contre <i>Bacillus cereu</i>	19
Figure 4. L'effet des champignons endophytes actifs contre <i>Enterococcus faecalis</i>	20
Figure 5. L'effet des champignons endophytes actifs contre <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Figure 6. L'effet des champignons endophytes actifs contre <i>Salmonella typhimurium</i>	21
Figure 7. L'effet des champignons endophytes actifs contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figure 8. L'effet des champignons endophytes actifs contre <i>Escherichia coli</i>	22
Figure 9. Les zones d'inhibitions obtenues par quelques champignons endophytes contre certaines bactéries pathogènes.	23
Figure 10. Les zones d'inhibitions obtenues par quelques champignons endophytes contre trois champignons phytopatogènes	26
Figure 11. La production de l'amylase par les champignons endophytes actifs.....	28
Figure 12. La production de la protéase par les champignons endophytes actifs.....	28
Figure 13. La production de cellulose par les champignons endophytes actifs.....	29
Figure 14. La production de la lipase par les champignons endophytes actifs.....	29
Figure15. La production de l'estérase par les champignons endophytes actifs.....	30
Figure 16. Les halos obtenus pour certaines activités enzymatiques	30
Figure17. Caractérisation macroscopique et microscopique de cinq champignons endophytes les plus dominants.....	35

Liste des tableaux

Tableau I. Les pourcentages de colonisations des différents tissus de <i>Pistacia lentiscus</i>	18
Tableau II. Les pourcentages d'inhibition des trois champignons phytopathogènes par les champignons endophytes.....	25
Tableau III. Les différents isolats fongiques identifiés et leur source.....	31

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	
I.1 Généralité sur les endophytes.....	2
I.1.1 Définition des endophytes.....	2
I.1.2 Diversité des endophytes.....	2
I.1.3 La relation plante - endophyte.....	3
I.1.4 Spécificité de l'hôte.....	4
I.1.5 Spécificité tissulaire.....	5
I.1.6 Mode de reproduction et de transmission.....	5
I.1.7 Le rôle physiologique et écologique des champignons endophytes.....	6
I.1.7.1 Promotion de la croissance.....	6
I.1.7.2 Protection contre les herbivores, les insectes et les agents pathogènes.....	7
I.1.7.3 Le rôle des endophytes dans la tolérance aux stress abiotique...	8
I.1.8 Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs.....	8
I.1.8.1 Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes.....	9
I.1.8.2 Champignons endophytes comme source de substances antifongiques.....	10
I.2 Généralités sur <i>Pistacia lentiscus</i>	10
I.2.1 Classification.....	10
I.2.2 Aire de répartition.....	10
I.2.3 Caractères botaniques et écologiques.....	10
I.2.4 Intérêts pharmacologiques, nutritionnels et industriels.....	11
Chapitre II. Matériels et Méthodes	
II.1 Matériels.....	12
II.1.1 Matériel Végétale.....	12
II.1.2 Matériel microbien.....	12
II.1.3 Produits chimiques.....	12
II.2 Méthodes.....	12
II.2.1 Echantillonnage.....	12
II.2.2 Isolement des champignons endophytes.....	13
II.2.3 Dépistage de l'activité antibactérienne.....	13
II.2.4 Dépistage de l'activité antifongique.....	14
II.2.5 Dépistage de la production des enzymes extracellulaires.....	15
II.2.5.1 Amylase.....	15
II.2.5.2 Cellulase.....	15
II.2.5.3 Lipase.....	15
II.2.5.4 Protéase.....	16
II.2.5.5 Estérase.....	16
II.2.6 Identification.....	16
II.2.6.1 L'observation des critères morphologiques.....	16

II.2.6.2	L'observation microscopique des champignons.....	17
-----------------	--	----

Chapitre III. Résultats et Discussion

III.1	Isolement des champignons endophytes.....	18
III.2	Evaluation de l'activité antimicrobienne	19
III.2.1	Activité antibactérienne.....	19
III.2.2	Activité antifongique.....	24
III.3	Détermination de l'activité enzymatique.....	27
III.4	Identification des champignons isolés.....	31
	Conclusion et perspectives.....	36

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Introduction

L'ensemble des atteintes des pesticides à l'environnement et la santé a conduit les autorités à interdire un nombre grandissant de produits phytosanitaires, à tel point que le recours à un autre moyen de lutte devient parfois une obligation. La lutte biologique peut alors offrir des outils alternatifs. A cet égard, plusieurs groupes de recherche utilisent les champignons endophytes pour lutter contre les maladies des plantes. Plus récemment, des champignons endophytes et des bactéries sont appliquées pour le contrôle des maladies des plantes comme la maladie du balai de sorcières et celle de la rouille du café (Rubini et *al.*, 2005; Shiomi et *al.*, 2006). Grâce à leur capacité à protéger leur hôte contre des microorganismes pathogènes et dans certains cas induire des résistances systémiques dans les plantes hôtes, ils sont maintenant utilisés comme une nouvelle approche pour lutter contre les maladies des plantes (Waller et *al.*, 2005).

Toutes les plantes abritent une flore fongique constituée de champignons non pathogènes dits "endophytes". 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, neurotoxiques contre les herbivores, ou encore hormonales pour stimuler la croissance de la plante (Combès et *al.*, 2012)

L'objectif de notre présent travail consiste en l'étude des champignons endophytes isolés de *Pistacia lentiscus*, une plante médicinale de la famille des *Anacardiaceae* ainsi que leurs différentes activités antibactérienne, antifongique et enzymatique.

Les objectifs à réaliser dans cette étude sont les suivants :

- L'isolement et la purification des champignons endophytes.
- La détermination de leurs activités antibactérienne et antifongique par le teste de l'antagonisme.
- La détermination de la production de certaines enzymes extracellulaires par les champignons endophytes.
- Identification des champignons ayant des résultats positifs.

Chapitre I.

Synthèse bibliographique

I.1. Généralité sur les endophytes

I.1.1. Définition des endophytes

Le terme «endophytes», initialement introduit par De Bary en 1866, concerne tous les organismes qui se reproduisent dans les tissus végétaux, distincts des épiphytes qui vivent à la surface des plantes, («endo-» signifie à l'intérieur; «phyte» est dérivé du mot grec phyto, qui signifie plante) (Rodrigues, 1996). Depuis la découverte des champignons endophytes dans l'ivraie (*Lolium temulentum*) en Allemagne, en 1904, plusieurs chercheurs ont défini les endophytes de différentes manières (Tan et Zou, 2001) :

Carroll (1986) a défini les endophytes comme suit «les endophytes mutualistes, sont des champignons qui colonisent les parties aériennes des tissus végétaux vivants et ne provoquent pas de symptômes de maladie". Petrini (1991) a proposé une extension de la définition pour inclure «tous les organismes vivant dans les organes végétaux qui à un certain moment de leur vie, peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommage apparent à l'hôte".

Wilson (1995) a souligné que les «endophytes sont des champignons ou des bactéries qui, pendant tout ou une partie de leur cycle de vie, envahissent les tissus des plantes vivantes et provoquent des infections inapparentes et entièrement asymptomatiques dans les tissus végétaux, mais ne provoquent aucun symptôme de maladie".

Bacon et White (2000) donnent une définition inclusive et largement acceptée des endophytes, « microbes qui colonisent, les tissus internes vivants des plantes sans causer des effets négatifs qui se manifestent immédiatement», ce qui inclut pratiquement tout organisme résidant à l'intérieur d'une plante hôte (Zhang et *al.*, 2006)

I.1.2. Diversité des endophytes

la plupart des Champignons endophytes appartiennent à l'embranchement des Ascomycètes et plusieurs d'autres espèces peuvent également être incluses dans l'embranchement des Basidiomycètes, Zygomycètes, et Oomycètes (Guo, 1999; Fröhlich et *al.*, 2000; Huang, 2004). Plusieurs microorganismes existent comme des endophytes dans les plantes, mais les champignons endophytes représentent un élément très important et très diversifié (Zhang et *al.*, 2006).

La présence des champignons endophytes dans le règne végétale a été bien établie, ils ont été trouvés dans toutes les espèces végétales étudiées, y compris les algues marines, les fougères, les lichens, les mousses et les plantes vasculaires (Arnold et al., 2001; Tan and Zou, 2001; Li et al., 2007). Les champignons endophytes sont également détectés dans des plantes des régions tropicales, subtropicales, tempérées et les forêts boréales (Zhang et al., 2006).

Les études sur les endophytes des arbres et arbustes montrent que les champignons endophytes possèdent de nombreuses espèces et une taxonomie diversifiée, et que les champignons endophytes des plantes tropicales diffèrent nettement de celle de la zone tempérée (Rodrigues et Petrini, 1997; Guo, 1999; Osono, 2006), par exemple : *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans* et *Alternaria alternata* sont des champignons endophytes communs dans les régions tempérées, mais rarement dans les tropiques. En revanche, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Phomopsis* et *Phyllosticta* sont fréquemment isolés à partir de plantes tropicales mais rarement dans les régions tempérées (Rodrigues et Petrini, 1997; Guo, 1999; Fröhlich et al., 2000; Unterseher et al., 2007).

I.1.3. La relation plante-endophyte

Les endophytes sont caractérisés par différents modes de vie, selon les espèces des champignons et les plantes hôtes. L'interaction plante-endophyte peut aller de l'antagonisme au mutualisme, c'est pourquoi la gamme d'interactions a été désignée comme un continuum (Zabalgoitia, 2008).

Des études ont montré que les endophytes sont plus susceptibles d'être mutualistes lors de la reproduction verticale (systémique) via les semences, et hostile à l'hôte lors de la transmission horizontale (non systémique) par l'intermédiaire des spores (Schardl et al., 1991; Saikkonen et al., 1998).

Certains endophytes peuvent être isolés à partir des plantes et sont considérés comme des agents pathogènes latents (Mostert et al., 2000; Photita et al., 2004). Toutefois, ces derniers ne constituent pas une fraction importante des endophytes, la plupart des endophytes de ce type ne causent pas de symptômes sur les plantes hôtes (Zabalgoitia, 2008).

Certains champignons saprophytes trouvés couramment dans les parties sénescentes des plantes ont été isolés comme endophytes à partir des tissus sains. Ces espèces endophytes se comportent comme des saprophytes latents, et colonisent de façon asymptomatique des espaces restreints tant que leurs hôtes se développent, lorsque les tissus de l'hôte sont infectés ou décèdent les endophytes se développent et se reproduisent (Zabalgoitia, 2008).

À l'autre extrémité du continuum, il y a les endophytes qui sont bénéfiques pour leurs hôtes, les plus connus dans ce groupe sont les espèces des genres *Neotyphodium* et *Epichloë* qui peuvent fournir une défense contre les herbivores, ainsi que la tolérance à la sécheresse et une meilleure utilisation des éléments nutritifs à leurs hôtes (Schardl et al., 2004). En plus il existe d'autres espèces mutualistes qui protègent leurs plantes hôtes contre les agents pathogènes et d'autres améliorent la croissance de ces dernières. (Zabalgogazcoa, 2008).

I.1.4. Spécificité de l'hôte

Les relations des endophytes avec des plantes hôtes uniques ou multiples peuvent être décrites en termes de spécificité, récurrence, sélectivité, ou de préférence de l'hôte (Cohen, 2006).

La première est la relation dans laquelle un champignon est limité à un seul hôte ou un groupe d'espèces apparentées, mais ne se trouve pas dans d'autres plantes non apparentées se trouvant dans le même habitat (Huang, 2005). En général, les communautés fongiques endophytes démontrent une spécificité de l'hôte seulement au niveau de l'espèce (Cohen, 2004).

La deuxième c'est la fréquence ou la prédominance d'un champignon endophyte sur un hôte particulier ou une gamme de plantes hôtes, et peut également se trouver mais rarement sur d'autres plantes hôtes du même habitat (Zhou et Hyde, 2001).

Quand une seule espèce fongique endophyte peut former des relations avec deux espèces de plantes apparentées mais montrer une préférence pour l'une d'elle, le phénomène est dit sélectivité de l'hôte (Cohen, 2004, 2006).

La dernière relation c'est la préférence de l'hôte, elle est souvent utilisée pour indiquer la dominance ou la survenance unique d'un champignon sur un hôte particulier; elle est aussi utilisée pour indiquer les différences dans les compositions des communautés fongiques et les fréquences d'isolement des différentes plantes hôtes (Bettucci et al., 2004; Suryanarayanan et Kumaresan, 2000). La préférence de l'hôte pourrait être associée à l'interaction hôte-endophyte au cours de l'infection et les processus de colonisation (Guo, 1999).

I.1.5. Spécificité tissulaire

Les endophytes sont trouvés dans une grande variété de type de tissus végétaux, comme l'écorce, les bourgeons, les fleurs, les fruits, les feuilles, les ovules, les racines, les graines, les tiges, les tubercules, et le xylème (Huang, 2005; Zhang et *al.*, 2006). Beaucoup d'endophytes infectent localement des parties de la plante, c'est à dire se limitent à une petite zone du tissu (Zabalgogazcoa, 2008). La différence dans les assemblages des endophytes dans divers tissus indique que les endophytes sont spécifiques des tissus (Huang, 2005).

De nombreuses enquêtes sur les communautés endophytes confirment que de nombreux champignons endophytes présentent un certain degré de spécificité tissulaire (Collado et *al.*, 2001; Taylor et *al.*, 2001; Kumar et Hyde, 2004; Santamaria et Diez, 2005; Ganley et Newcombe, 2006), souvent, plusieurs espèces endophytes sont récupérés à partir de différents fragments de la même plante par exemple *Neotyphodium* et *Epichloë* sont des espèces systémiques infectant l'espace intercellulaire des feuilles, des tiges reproductives et des graines de leurs hôtes, Ces endophytes systémiques peuvent être isolés à partir de plusieurs fragments de la même plante (Zabalgogazcoa, 2008).

Parfois, la chimie de certains tissus peut altérer la colonisation de différents champignons endophytes, cependant certains de ces endophytes peuvent tolérer certaines toxines produites par l'hôte, ce qui influe sur l'abondance, la diversité et la composition en espèces des communautés fongiques. Il y a aussi l'âge de l'hôte ; avec le temps, les tissus âgés des plantes accumulent de plus en plus d'endophytes contrairement aux tissus jeunes (Zerroug, 2011).

I.1.6. Mode de reproduction et de transmission

Il existe deux principaux modes de reproduction chez les champignons endophytes:

Le premier mode de reproduction se fait via la croissance végétative du champignon, où son développement est complètement interne (Selosse et scardl, 2007). La transmission de ce champignon est appelé transmission verticale par ce que les hyphes de ce dernier sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les graines (Saikkonen et *al.*, 2004).

Le second se fait via les spores qui peuvent être disséminées par le vent et / ou des insectes vecteurs, ces champignons endophytes se transmettent horizontalement par reproduction sexuée. Ils se propagent d'une manière similaire à des agents pathogènes, les

endophytes transmis horizontalement sont souvent étroitement liées à des champignons pathogènes, même s'ils ne sont pas pathogènes eux-mêmes (Saikkonen et *al.*, 2004).

I.1.7. Le rôle physiologique et écologique des champignons endophytes

Il est généralement admis que les communautés des champignons endophytes jouent un rôle important, et bénéfique dans la physiologie et la capacité d'adaptation écologique des plantes hôtes (Tan et Zou, 2001). Les plantes infectées par des champignons endophytes résistent mieux à l'environnement hostile, et ont donc souvent un avantage distinct contre le stress biotiques et abiotiques par rapport aux plantes qui ne sont pas infectés par les endophytes.

Les endophytes symbiotiques confèrent plusieurs avantages, y compris la promotion de la croissance, la résistance à la sécheresse, une meilleure résistance aux ravageurs, les insectes et les herbivores, l'augmentation de la compétitivité, l'amélioration des taux de photosynthèse et la tolérance aux facteurs stressants comme la présence de métaux lourds, le faible pH, la salinité élevée, et les infections microbiennes (Lewis, 2004; Mandyam et Jumpponen, 2005; Waller et *al.*, 2005; Zhang et *al.*, 2006).

I.1.7.1. Promotion de la croissance

Les plantes infectées par des endophytes poussent souvent plus vite que celles non-infectées (Tan et Zou, 2001). Par exemple, Nassar et *al.*, (2005) et Sirrenberg et *al.*, (2007) ont constaté que les endophytes (*Williopsis saturnus* et *Piriformospora indica*) peuvent améliorer la croissance de nombreuses espèces végétales. L'effet de la promotion de la croissance de l'hôte est en partie due à la production de phytohormones tels que l'acide indole-3-acétique (IAA), l'acide indole-3-pyruvique (IPYA), les cytokines et d'autres substances qui permettent la promotion de la croissance de la plante (les vitamines), et en partie en raison du fait que les endophytes peuvent améliorer l'absorption des éléments nutritifs en fixant de l'azote et du phosphore pour les plantes hôtes.

Les endophytes peuvent aussi ajuster la gestion du carbone par l'association de ces derniers avec des cellules photosynthétiques des plantes hôtes, et aussi augmenter l'absorption d'azote (Guo, 1999; Barrow et *al.*, 2007).

I.1.7.2. Protection contre les herbivores, les insectes et les agents pathogènes

Les champignons endophytes sont connus pour être une source riche de substances antimicrobiennes. Il a été démontré que ces derniers peuvent augmenter la capacité des plantes hôtes à résister à l'invasion des herbivores, des insectes et des agents pathogènes (Richmond et *al.*, 2004; Valkama et *al.*, 2005; Lambert et Casagrande, 2006; Goggin, 2007). Les endophytes induisent également ou activent chez les plantes hôtes des mécanismes de défense (Arnold, 2003). Il a été observé que les plantes symbiotiques activeraient leur système de défense plus rapidement que les plantes non symbiotiques (Rodriguez et *al.*, 2004).

Les mécanismes de défenses activées par des endophytes sont principalement portés sur le métabolisme oxydatif, une mort cellulaire rapide et localisé (réponses hypersensitives), accumulation de phytoalexines, et la synthèse de protéines liées à la pathogénèse. Par exemple, Arnold (2003) a démontré une corrélation significative entre la présence d'endophytes et la réduction de l'incidence de la maladie causée par *Phytophthora* sp. Un agent pathogène commun qui cause la maladie de la pourriture brune sur *Theobroma Cacao* (Khana, 2007).

Par ailleurs, la plante infectée par des endophytes produit certains métabolites qui induisent la résistance systémique par l'intermédiaire de la réaction d'hypersensibilité, y compris une réaction de mort cellulaire de l'hôte, ainsi qu'une défense de la paroi cellulaire associée (Arnold, 2003). *Piriformospora indica*, un champignon endophyte induit une résistance chez l'orge et réduit l'infection par le mildiou une maladie systémique causée par le champignon pathogène de l'orge *Blumeria graminis* f.sp. *Hordei*. L'orge dépourvue d'endophytes a montré une augmentation de chlorose des feuilles et une croissance réduite par rapport à celle des plants d'orge infectés (Waller et *al.*, 2005).

Dans les graminées et d'autres plantes herbacées, les endophytes dominants sont connus pour produire des substances toxiques, tels que les alcaloïdes, diterpènes indole, lolitremes, paxilline, peramine, et stéroïdes tetraenone, qui peuvent inhiber les substances toxiques d'herbivores (par exemple, les cerfs, les chèvres, les chevaux, et bœufs) et les insectes nuisibles (par exemple, les nématodes et les pucerons) (Richmond et *al.*, 2004; Goggin, 2007).

Chez les plantes ligneuses, les endophytes peuvent également fonctionner dans des rôles de défense spécifiques, et d'agir de façon plus générale à diminuer ou éviter les dommages causés par des agents pathogènes par des métabolites secondaires bioactifs

biosynthétisés par des endophytes in vivo (Tan et Zou, 2001; Zhang et al., 2006). Ces métabolites sont également des produits chimiques antifongiques (Wang et al., 2006; Firakova et al., 2007; Lin et al., 2008).

I.1.7.3. Le rôle des endophytes dans la tolérance aux stress abiotique

De nombreux facteurs environnementaux influencent la croissance et la survie des plantes. Il a été observé que les plantes infectées par les champignons endophytes ont une plus grande tolérance à la sécheresse, la chaleur, la toxicité des métaux et à la salinité élevée (Waller et al., 2005; Rodriguez et al., 2004; Lewis, 2004).

Il a été rapporté que certains champignons endophytes protègent leur hôte de la sécheresse (Clay et Schardl, 2002). Par exemple, l'infection de la fétuque élevée par les endophytes développerait un potentiel osmotique faible.

Une tolérance au sel a aussi été observée chez les plantes infectées par des endophytes. Redman et ces collaborateurs (2002) ont démontré que les endophytes augmentent également la tolérance à la chaleur de leur hôte. La tolérance thermique a été observée chez la plante *Lanuginosum dichanthelium* infectée par l'endophyte *Curvularia* sp, et exposée à une forte température de 65°C pendant 10 jours, alors que les plantes non infectées ne résistaient même pas à une température de 40°C.

Alternativement, il est suggéré que les endophytes fonctionnent comme un «déclencheur biologique» pour les plantes pour activer leur réponse au stress plus rapidement et plus fortement que les plantes non symbiotiques ou non infectées (Redman et al., 2002).

I.1.8. Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs

La prolongation et la persistance de l'utilisation des pesticides, des fongicides et des herbicides provoquant un développement de résistance à ces produits chimiques, et augmentant également la pollution de l'environnement, poussent les scientifiques à chercher des substances bioactives produites par des champignons endophytes pouvant non seulement être impliqué dans la relation hôte-endophytes, mais ils peuvent avoir une application dans la médecine, l'agriculture et l'industrie (Strobel, 2002).

le nombre de métabolites secondaires produits par des champignons endophytes est plus grand que celui de n'importe quelle autre classe de microorganismes endophytes (Zhang et al., 2006). Une récente étude approfondie a indiqué que 51% des substances biologiquement

actives ont été isolés à partir des champignons endophytes (Stierle et *al.*, 1999; Strobel, 2002; Weber et *al.*, 2004; Shen et *al.*, 2006).

En effet, les champignons endophytes sont une source très prometteuse de nouveaux composés biologiquement actifs (Schulz et *al.*, 2002), comprenant des composés antibiotiques, antifongiques, antioxydants, insecticides et autres substances biologiquement actives (Strobel et *al.*, 2004; Strobel et Daisy, 2003).

I.1.8.1. Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes

L'apparition croissante des souches pathogènes multirésistantes a limité l'effet du traitement antimicrobien traditionnel, par conséquent, il ya un besoin urgent de nouveaux agents thérapeutiques alternatifs pour le contrôle des maladies infectieuses (Strobel et Daisy, 2003; Larsen et *al.*, 2005).

Les Guanacastepenes, illustrée par Guanacastepene A (Fig.1), représentent une grande diversité de diterpénoïdes produits par un champignon endophyte non identifié isolé de *Daphnopsis americana*. Ils présentent une activité antibactérienne prononcée contre les souches résistantes de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium* (Brady et *al.*, 2001).

Il y a aussi Chaetoglobosin A et l'acide Rhizotonique (Fig. 1), produites par *Chaetomium globosum* et *Rhizoctonia* sp. endophytes de *Maytenus Hookeri* et de *Cynodon dactylon*, respectivement, qui ont été signalés comme actifs contre la bactérie impliqué dans l'ulcère gastrique *Helicobacter pylori* (Tikoo et *al.*, 2000; Ma et *al.*, 2004).

En outre, altersetin (Fig. 1) purifié à partir de l'endophyte *Alternaria* sp. affichant une activité puissante contre des bactéries pathogènes à Gram positif (Hellwig et *al.*, 2002).

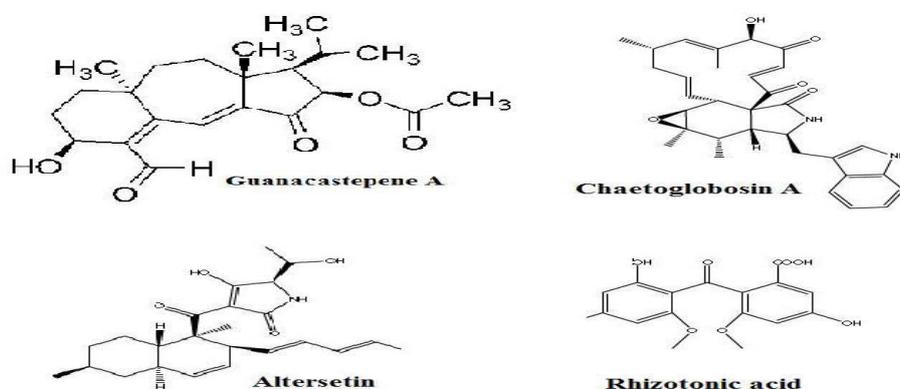


Figure 1. Quelques substances antibactériennes produites par les champignons endophytes (Zerroug, 2011).

I.1.8.2. Champignons endophytes comme source de substances antifongiques

Les infections fongiques dans le domaine de l'agriculture deviennent un problème de plus en plus difficile en raison de l'augmentation des épidémies et du nombre des maladies dans les cultures, donc il est nécessaire de trouver des nouvelles substances antifongiques pour lutter contre ces problèmes (Strobel, 2002).

Plusieurs métabolites fongiques inhibiteurs de la croissance de certains champignons phytopathogènes des cultures, Un exemple est l'acide tétramique, connue sous le nom cryptocin, produit par l'endophyte *Cryptosporiopsis quercina* dans la plante médicinale *Tripterigeum wilfordii*, montre une puissante activité contre *Pyricularia oryzae*, champignon pathogène causant la pyriculariose du riz (Li et al., 2000).

I.2. Généralités sur *Pistacia lentiscus*

Pistacia lentiscus est nommé en arabe: tharou, en Français: lentisque, en anglais: mastic tree, lentisc.

I.2.1. Classification

Pistacia lentiscus est une espèce appartenant au règne des *Plantae*, embranchement des *Spermatophyta (Angiospermae)*, la classe des *Dicotyledones*, famille des *Anacardiaceae (Pistaciaceae)*, ordre des *Sapindales*.

I.2.2. Aire de répartition

L'aire du lentisque s'étend sur tout le bassin méditerranéen et se rencontre dans les Canaries et au Portugal. En Algérie, il occupe l'étage thermo-méditerranéen. Sa limite méridionale se situe aux environs de Saida, sa présence au sud de l'Atlas saharien n'est pas signalée (Ait Said, 2011)

I.2.3. Caractères botaniques et écologiques

Le lentisque est un arbuste sclérophylle à feuilles persistantes, à odeur de résine fortement âcre et à croissance très lente. D'une hauteur de 2 m, il peut cependant atteindre la taille d'un arbre lorsqu'il est dans des sites humides et protégés. Les feuilles ont une durée de vie de deux ans à rachis ailé, paripennées, composées de deux à trois paires de folioles coriaces, vert sombre qui sont largement lancéolées, obtuses au sommet, brillantes au dessus et de taille allant de 1,5 à 3 cm (Ait Said, 2011).

Les fleurs sont sessiles, composées de trois à cinq sépales. Les fleurs mâles étant pourvues de cinq étamines. Elles sont regroupées en inflorescences de huit à dix fleurs. Les fleurs femelles possèdent un ovaire à trois carpelles uniloculaires, avec un ovule anatrope uniovulé, surmonté d'un style court à trois stigmates. Elles sont regroupées en inflorescence de 4 à 21 fleurs. (Ait Said, 2011).

Le fruit est une drupe de 3 à 4 mm de diamètre, de forme ovoïde globuleuse et peu comprimé. Il est de couleur rouge au début puis devient noirâtre à maturité à la fin de la saison hivernale. Les images de certains caractères botaniques de cette espèce sont rapportées dans la Figure 2.



Figure 2. Certains caractères botaniques chez *Pistacia lentiscus*.

A : inflorescence mâle, **B :** arbuste en stade de fructification, **C :** fruits en stade de développement (Ait Said, 2011).

I.2.4. Intérêts pharmacologiques, nutritionnels et industriels

L'espèce de *Pistacia lentiscus* sont utilisées en traitement de l'eczéma, la paralysie, diarrhée, les infections de gorge, la jaunisse, l'asthme et les douleurs d'estomac et des calculs rénales (Belfadel, 2009). Elles ont diverses activités biologiques, antiathérogénique, hypoglycémique, antioxydant, anti-inflammatoire et insecticide (Belfadel, 2009).

La résine de l'espèce de *Pistacia lentiscus* est traditionnellement utilisée comme une gomme à mâcher et protège les lèvres contre la sécheresse, contre certaines maladies d'estomac et comme antiseptique pour le système respiratoire (Belfadel, 2009).

Les *Pistacia lentiscus* ont une large utilisation dans l'industrie alimentaire (Belfadel, 2009). La résine est utilisée comme un rafraîchissant dans les boissons alcoolisées et non alcoolisées, dans certains mélanges de cosmétiques et de parfumerie, et dans la production de dentifrice (Belfadel, 2009).

Chapitre II.

Matériels et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Matériels Végétales

Il consiste en les racines, les rameaux, les feuilles et les fruits de la plante médicinale <<*Pistacia lentiscus*>> rassemblés en février 2013 du forêt d'Oueled Hannache de Bordj El Ghadir, Bordj Bou Arreridj.

II.1.2. Matériels microbiens

Il comprend six bactéries pathogènes à Gram négatif *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. et à Gram positif *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* provenant de l'hôpital de Sétif et trois champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans* et *Fusarium solani* var. *coeruleum* provenant du laboratoire de microbiologie appliquée de Sétif.

II.1.3. Produits chimiques

Les produits et les réactifs utilisés sont: Ethanol, tween20, tween80, hydroxyde de sodium (NaOH), Glucose (C₆H₁₂O₆), Agar, Chlorure de sodium (NaCl), Chlorure de calcium dihydrate (CaCl₂ 2H₂O), Peptone, Extrait de levure, Sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄), Rouges congo, Gélatine, Amidon soluble,

Les milieux de cultures utilisés sont: Gélose nutritive(GN), glucose yeast extract peptone(GYP), yeast extract peptone agar, peptone agar, Czapek yeast extract agar, (CYA), Malt extract agar (MEA) et Sabouraud(SDA).

II.2. Méthodes

II.2.1.Echantillonnage

Les échantillons de rameaux, feuilles, fruits et tiges de la plante *Pistacia lentiscus* ont été collectés à partir de plantes saines et de façon aléatoire, et ramené au laboratoire dans des sacs en plastiques stériles pour être utilisé dans un délai ne dépassant pas les 24 heures (Khan, 2007).

II.2.2. Isolement des champignons endophytes

Les échantillons rassemblés de la plante médicinale ont été nettoyés à l'eau douce du robinet afin d'enlever les saletés et les débris. Les rameaux, feuilles, fruits et racines de la plante ont été coupés en fragments de 1cm approximativement ensuite ils ont été immergés dans de l'éthanol 70% pendant 1 minute, puis dans l'hypochlorite de sodium 2% pendant 3 minutes, puis dans l'éthanol 70% pendant 30 secondes et finalement ils ont été rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile pendant une minute chaque fois et séchés sur du papier filtre stérile (Selvanathan et *al.*, 2011).

Les extrémités des segments ont été coupés à l'aide d'un ciseau stérilisé par la flamme avant d'être placés dans des boîtes de Pétri contenant le potato dextrose agar (PDA) et supplémenté avec de la gentamicine 80mg/l, à raison de 8 segments par boîte. Après scellement des boites avec du parafilm, elles ont été mises à incuber à 26±1°C et à l'obscurité. Les boites ont été contrôlées chaque jour pendant 20 à 30 jours, chaque champignon poussant sur les fragments (rameaux, racines, feuilles et fruit) a été isolé et purifié sur une nouvelle boîte contenant du PDA, et finalement conservé dans des tubes de PDA inclinés à 4°C (Khan, 2007).

Pour chaque type de tissus de plante un pourcentage de colonisation a été calculé selon la formule suivante (Khan, 2007) :

$$\text{Pourcentage de colonisation (\%)} = \frac{\text{Nombre de segments infectés}}{\text{Nombre total des segments examinés}} \times 100$$

II.2.3. Dépistage de l'activité antibactérienne

Les champignons endophytes isolés ont été testés contre six bactéries pathogènes dont trois à Gram positif : *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* et trois à Gram négatif : *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

A partir d'une culture de 6 jours des disques de 6mm de diamètre ont été mis dans des boites de Pétri contenant de la gélose nutritive préalablement ensemencé avec les bactéries pathogènes, à raison de 7 disques fongiques par boîte, les boites ont ensuite été mises à incuber pendant 24 heures à 37°C (Sriubolmas et *al.*, 2001)

Le diamètre des zones claires autour des disques fongiques ont été mesurés en millimètre.

II.2.4. Dépistage de l'activité antifongique

L'activité antifongique des champignons endophytes à été testé contre trois champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans* et *Fusarium solani* var. *coeruleum*. Deux disques de 6 mm de diamètre des champignons endophytes et phytopathogènes préalablement cultivés sur du PDA à 28°C pendant 5 jours ont été prélevés et mis aux extrémités des boites de Pétri contenant du PDA à une distance de 50 mm l'un de l'autre. Ces boites ainsi que les boites témoins ne contenant que les champignons phytopathogènes ont été mises ensuite à incuber à l'obscurité et à 28°C pendant 5 jours.

Un pourcentage d'inhibition à été calculé suivant la formule :

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

R₁ représente la croissance radiale de la colonie du champignon pathogène dans la boite contrôle.

R₂ est la croissance radiale de la colonie du champignon pathogène dans la boite qui contient les deux champignons.

Le pourcentage d'inhibition a été classé en quatre catégories selon le niveau de l'inhibition de la croissance fongique en activité basse, modérée, haute et très haute.

- Un pourcentage d'inhibition < 30 correspond à une activité antifongique basse
- 30% > un pourcentage d'inhibition < 50% correspond à une activité antifongique modérée
- 50% > un pourcentage d'inhibition < 70% correspond à une activité antifongique haute,
- Un pourcentage d'inhibition ≥ 70% correspond à une activité antifongique très haute.

(Rahman et al., 2009).

II.2.5. Dépistage de la production des enzymes extracellulaires

Dans ce test, les champignons endophytes ont été évalués qualitativement pour leur production de cinq enzymes extracellulaires différentes ; la cellulase, l'amylase, la protéase, la lipase (Maria et *al.*, 2005), et l'estérase (Carrim et *al.*, 2006), en se basant sur la digestion du substrat approprié dissous dans les milieux de bases par l'enzyme extracellulaire produite par les champignons endophytes qui ont été incubée pendant 3-5 jours à la température ambiante, et les zones claires formée autour de la colonie fongique démontrant la digestion du substrat et donc la production de l'enzyme testée ont été mesurées, à partir desquelles un index enzymatique a été calculé comme suit (Taskin et *al.*, 2008) :

$$\text{Index enzymatique } R = \frac{D_h}{D_c}$$

D_h = le diamètre de halo claire (mm)

D_c = le diamètre de colonie d'endophyte. (mm)

II.2.5.1. Amylase

L'activité de l'amylase a été déterminée en inoculant le milieu glucose yeast extract peptone (GYP) auquel à été ajouté 2% d'amidon soluble avec des disques mycéliens de champignons endophytes. Après 3 à 5 jours d'incubation, les boites ont été inondées avec une solution de lugole (1% de l'iode et 2% d'iodure de potassium). Les halos clairs autours des colonies fongiques démontrent la digestion du substrat et donc la production de l'amylase (Amirita et *al.*, 2012).

II.2.5.2. Cellulase

Pour l'activité cellulolytique, des disques mycéliens ont été inoculés sur le milieu yeast extract peptone agar additionné avec 0,5% de celluloses Na-carboxyméthyliques, après 3 à 5 jours d'incubation, les boites ont été inondés avec le rouge Congo (0,1%) et décoloré avec le chlorure de sodium 1M pendant 15 minutes. Des halos clairs autour des colonies indiquent l'activité cellulolytique (Amirita et *al.*, 2012).

II.2.5.3. Lipase

L'activité lipolytique a été testé par la mise en croissance des disques de champignons endophytes sur le milieu peptone agar supplémenté avec le Tween 20 stérilisé séparément est

ajouté pour avoir une concentration finale de 1% (v/v). Après incubation 3 à 5 des jours. Des halos sont observés autour des colonies indiquent que les endophytes ont l'activité lipolytique (Amirita et *al.*, 2012).

II.2.5.4. Protéase

L'activité protéolytique a été déterminée en faisant croître les isolats sur le milieu gélosé, le GYP supplémenté avec 0,4% de gélatine (8g de gélatine dissous dans 100ml d'eau distillée) stérilisée séparément du milieu de culture stérile. Après incubation les boîtes ont été inondées avec le sulfate d'ammonium aqueux saturé. L'apparition de zones claires autour des colonies indique que l'hydrolyse de la gélatine dans les milieux. La gélatine non hydrolysée a été précipitée par le sulfate d'ammonium et apparaît en plus opaque (Amirita et *al.*, 2012).

II.2.5.5. Estérase

Pour l'activité estérasique on a utilisé le milieu peptone agar dont le pH a été ajusté à 6,5). Le Tween 80 précédemment stériles est ajouté pour avoir une concentration final de 1% (v/v). Les milieux ont été inoculés avec les isolats après 3 à 5 jours d'incubation, des halos sont observés autour de la colonie (Ishida et *al.*, 2012).

II.2.6. Identification

Les isolats fongiques ayant démontré une activité antimicrobienne et enzymatique élevées ont été identifié au niveau du genre, en utilisant quatre milieux, PDA, Czapek yeast extract agar (CYA), Malt extract agar (MEA) et Sabouraud. Et en se basant sur :

II.2.6.1. L'observation des critères morphologiques

L'observation des critères morphologiques se fait en se basant sur :

- Le diamètre des colonies qui a été mesuré sur le fond de la boîte.
- La texture du thalle (velouté, laineux poudreux, etc.).
- La détermination de la couleur de la colonie, du revers de la culture ainsi que celle du milieu à la lumière du jour.
- La vitesse de croissance.
- L'exsudat (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien) (Zerroug, 2011).

II.2.6.2. L'observation microscopique des champignons

Elle consiste en la préparation des frottis au bleu de méthylène sur une lame et observer les critères suivant :

- La morphologie du thalle (cloisoné ou non), sa couleur ainsi que la production des fructifications, les pycnides, asques, zygosporés, sclérotés, chlamydosporés et basides sont identifiés.
- Les spores, s'ils existent, (internes ou externes, thaliques ou blastiques, isolées ou en Chaînette: phialosporés, alieusporés, blastosporés), leurs dispositions (solitaires, chaîne, bouquet) ainsi que leurs formes et leurs couleurs sont observées,

Ces critères macroscopiques et microscopiques ont été comparés à des clés d'identification tels que pitt et hoking, (1985) ; Bedossa, (2002); Dufresne, (2013), afin d'arriver à identifier les isolats fongiques au niveau du genre.

Chapitre III.

Résultats et discussion

III.1. Isolement des champignons endophytes

Après quelques jours d'incubation, les champignons endophytes commençaient à pousser à partir des segments de plantes, chaque champignon a été repiqué en prélevant avec une anse stérile un fragment mycélien ou quelques spores sur du PDA, certains champignons ont été repiqué plusieurs fois afin de les purifier. A partir d'un total de 270 segments de racines, rameaux, feuilles et fruits provenant de notre plante (80 segments pour tous les tissus sauf pour les fruits où seulement 30 segments ont été utilisés) ,100 isolats fongiques différents ont été isolés, ce qui nous a permis d'obtenir les pourcentages de colonisations figurant dans le tableau I.

Tableau I. Les pourcentages de colonisations des différents tissus de *Pistacia lentiscus*.

	Types de tissus			
	Racines	Rameaux	Feuilles	Fruits
Nombre d'isolats	50	41	34	21
Pourcentage de colonisation	62,5%	51,25%	42 ,5%	70%

On observe des différences de colonisation et d'isolement des champignons endophytes entre les différents types tissulaires où au niveau des fruits le pourcentage de colonisation atteignait les 70%, pour les racines, il était de 62.5% alors que pour les rameaux et les feuilles on observait des pourcentages de 51.25% et 42.5% respectivement.

Des différences dans des taux de colonisation et d'isolement ont été montrées dans plusieurs autres études et sont en accord avec nos résultats, une différence entre racines et rameaux observée par (Bayman laminaires et *al.*, 1997; Naik et *al.*, 2006), entre la veine et le pseudostème observée par Photita et ses collaborateurs (2001), et entre l'écorce et les brindilles par Tejesvi et ses collaborateurs (2007). Ces différences d'assemblages des endophytes avec des tissus différents pourrait être liée à leur capacité d'utiliser certains substrats (Rodrigues, 1994), ainsi qu'à des facteurs comme les physiologies et la nature chimique des tissus (Petrini et Carroll, 1981; Photitaet et *al.*, 2001). La différence entre ces pourcentages peut être aussi expliquée par la différence entre l'espèce de l'hôte, le nombre d'échantillon ainsi qu'aux milieux de cultures utilisés (Gong et Guo, 2009).

III.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Après l'isolement et la purification, les isolats fongiques ont été dépistés sur leur pouvoir antimicrobien et antifongique en utilisant la technique de la double culture.

III.2.1. Activité antibactérienne

Les zones d'inhibitions autour des blocs fongiques ont été mesurées après 24 heures d'incubation. A partir des 69 champignons endophytes testés; 17,4 % ont montrés une forte activité antimicrobienne contre *Bacillus cereus* comme *Fusarium* sp.2 et *Alternaria* sp.6 avec des diamètres de 27.5 et 21 mm respectivement, ainsi que *Fusarium* sp.3 et *Scopulariopsis* sp.1 avec des zones de 20 mm de diamètre. 30,4% des champignons ont montrés une faible activité contre cette bactérie et 52,2% n'avaient aucun effet (Fig. 3).

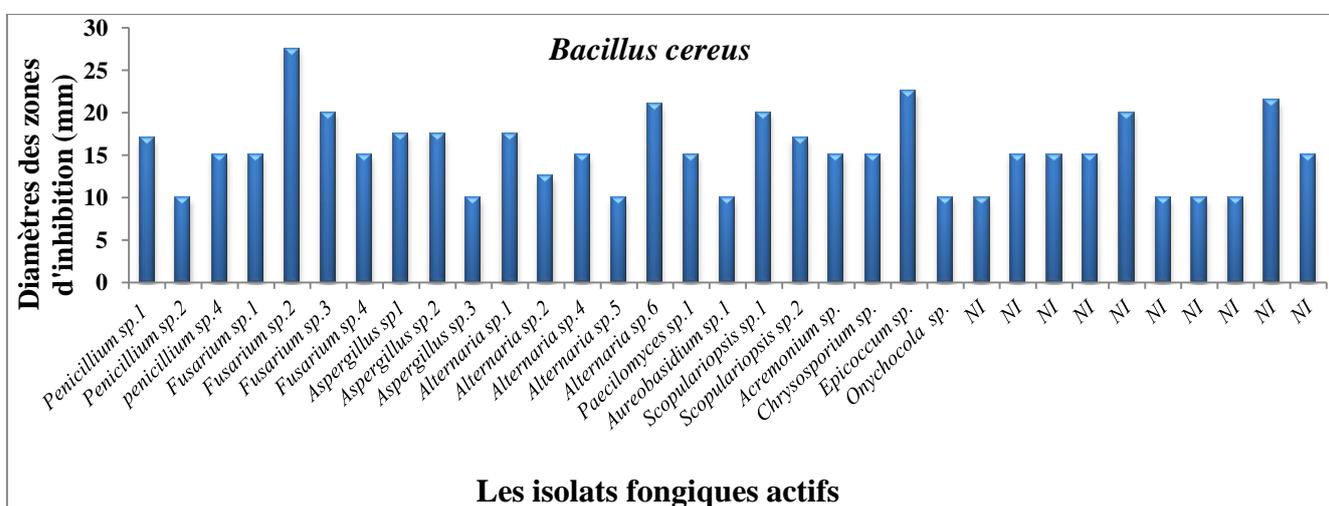


Figure 3. L'effet des champignons endophytes actifs contre *Bacillus cereus*.

NI : Non Identifier

Contre *Enterococcus faecalis* ; 4% des champignons endophytes ont montrés une activité, les plus actifs étant *Epicoccum* sp. (25 mm) et *Scopulariopsis* sp.1 (20 mm), les 96% isolats fongiques restants n'ont démontrés aucun effet (Fig. 4).

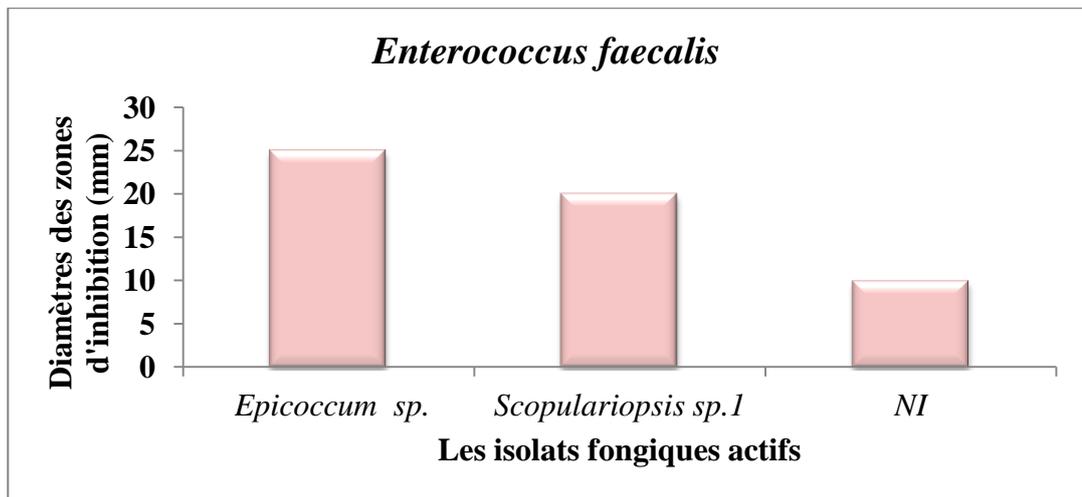


Figure 4. L'effet des champignons endophytes actifs contre *Enterococcus faecalis*.

NI : Non Identifier

Une forte activité contre la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* a été démontrée par 4% des champignons tels que *Epicoccum sp.* Avec un diamètre de la zone d'inhibition atteignant les 25 mm ainsi que *Fusarium sp.1* et *sp.4* et *Alternaria sp.1*, avec des diamètres des zones d'inhibitions de 20 mm. 39% ont démontré une activité modérée tels que *Alternaria sp.1* et *Fusarium sp.2*. Les 57% restant ont une activité nulle (Fig. 5).

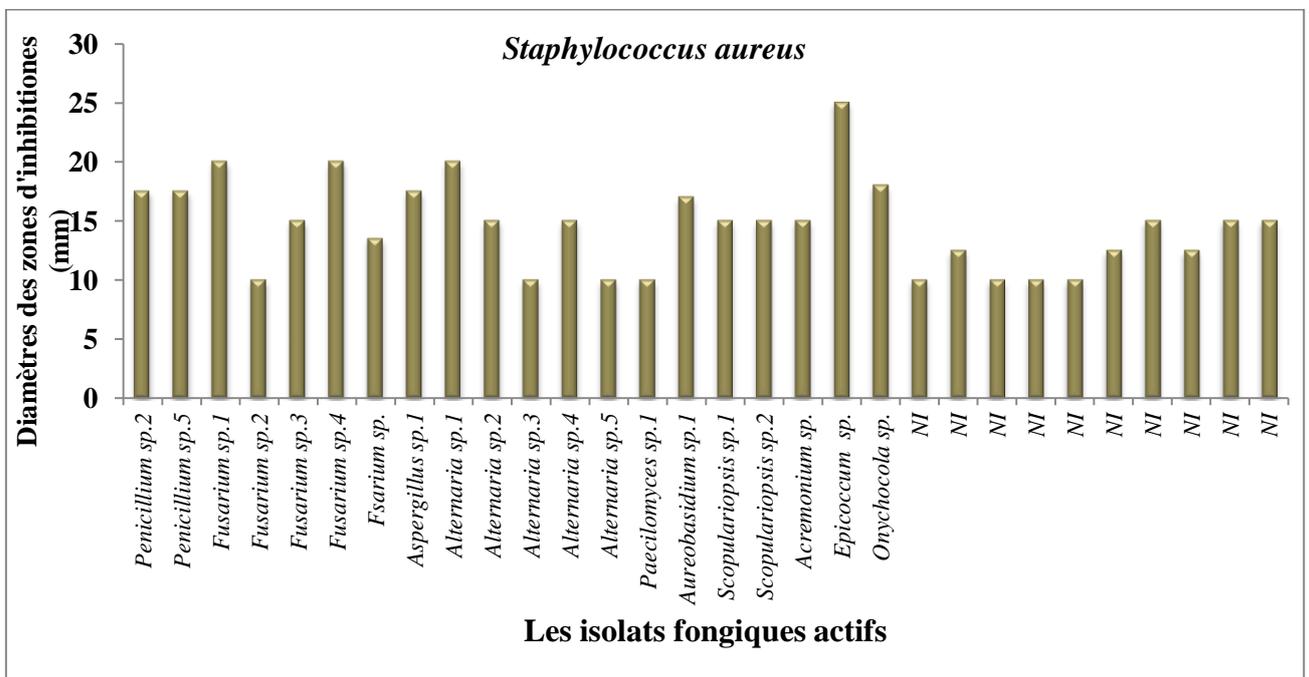


Figure 5. L'effet des champignons endophytes actifs contre *Staphylococcus aureus*.

NI : Non Identifier

10% des champignons endophytes ont démontrés une grande activité antibactérienne contre *Salmonella typhimurium*, tels que *Alternaria* sp.5 (20 mm), *Epicoccum* sp. (17.5 mm). 25% ont une activité modérée et les 65% n'ont démontrés aucune activité (Fig.6).

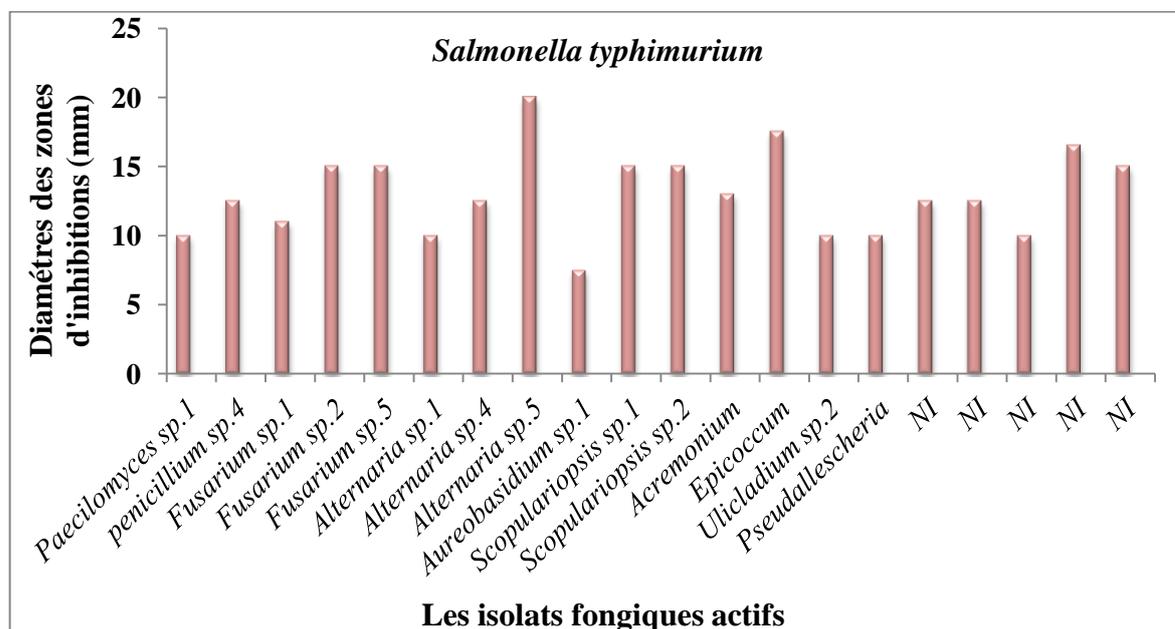


Figure 6. L'effet des champignons endophytes actifs contre *Salmonella typhimurium*.

NI : Non Identifier

Pour *Pseudomonas aeruginosa* ; 46% des champignons ont démontré une activité antibactérienne comme *Alternaria* sp.4 (25.5 mm), *Fusarium* sp.4, *Scopulariopsis* sp.1 et un champignon non identifier démontraient des diamètres des zones d'inhibition de 20 mm, ainsi qu'un diamètre de 19 mm observé avec *Epicoccum* sp. 19. Et les 54% restant ont une activité nulle (Fig.7).

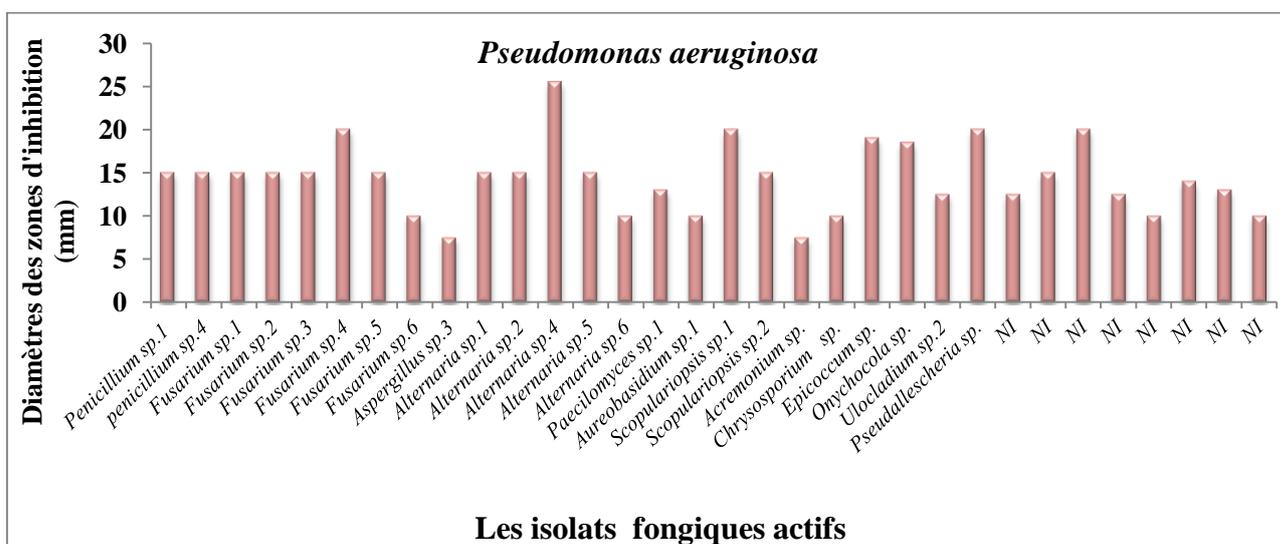


Figure 7. L'effet des champignons endophytes actifs contre *Pseudomonas aeruginosa*.

NI : Non Identifier

22% des champignons ont démontré une activité contre la bactérie à Gram négatif *Escherichia coli* ; le champignon le plus actif est *Epicoccum* sp., avec un diamètre de la zone d'inhibition de 20 mm. Et 78% ne démontrent aucune activité (Fig. 8).

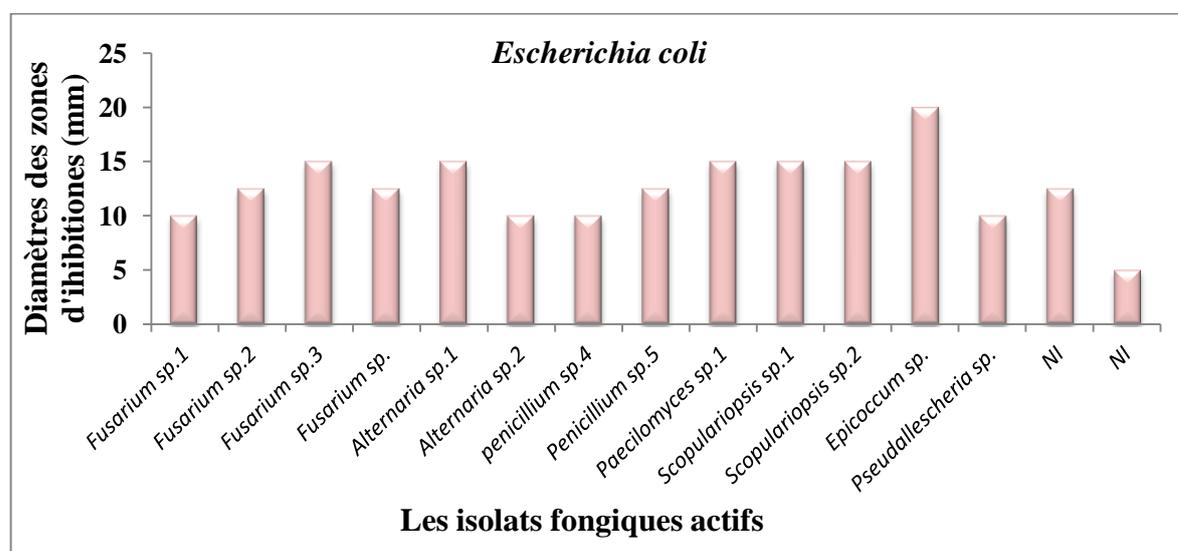


Figure 8. L'effet des champignons endophytes actifs contre *Escherichia coli*.

NI : Non Identifier

De façon général, 40% des isolats ont démontré une activité contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, dont 15% de ces endophytes ont été les plus actifs, parmi eux on peut citer les isolats de *Alternaria* sp., de *Fusarium* sp., de *Epicoccum* sp., et de *Penicillium* sp. Cependant les bactéries à Gram positif étaient plus sensibles aux composés inhibiteurs des champignons endophytes que les bactéries à Gram négatif, où 55% d'entre eux ont démontré une activité sur les bactéries à Gram positif alors que contre les bactéries à Gram négatif 50% seulement des endophytes isolés ont démontré une activité.

Plusieurs études ont démontré que les champignons endophytes, peuvent avoir une activité antimicrobienne grâce à la production des métabolites secondaires bioactifs, selon Dreyfuss et Chapela (1994), environ 4000 métabolites secondaires d'origine fongique ont été décrits comme biologiquement actifs. Ils peuvent aussi inhiber les microorganismes potentiellement pathogènes en induisant des réponses chimiques de leurs hôtes ou en empêchant directement la colonisation par l'intermédiaire de la concurrence (Schu-lthess et Faeth, 1998).

Sadrati et ses collaborateurs (2013), ont trouvé que les champignons endophytes montraient des activités antibactériennes, dont *Penicillium* sp. Où il était actifs contre des bactéries à Gram positif comme *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*,

ainsi que contre des bactéries à Gram négatifs comme *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*.

La différence de sensibilité entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif a pu être attribuée aux différences morphologiques entre ces micro-organismes. Les bactéries à Gram négatif ont une membrane externe de polysaccharide qui porte les composants structuraux de lipopolysaccharide. Ce qui rend la cellule imperméable aux corps dissous lipophiles (Sadrati et al., 2013). Les bactéries à Gram positif devrait être plus sensibles ayant seulement une couche de peptidoglycane externe qui n'est pas une barrière efficace de perméabilité (Pandey et al., 2004; Ogundare et al., 2006).

Quelques zones d'inhibition obtenues par certains champignons endophytes contre certaines bactéries pathogènes sont illustrées dans la figure 9.

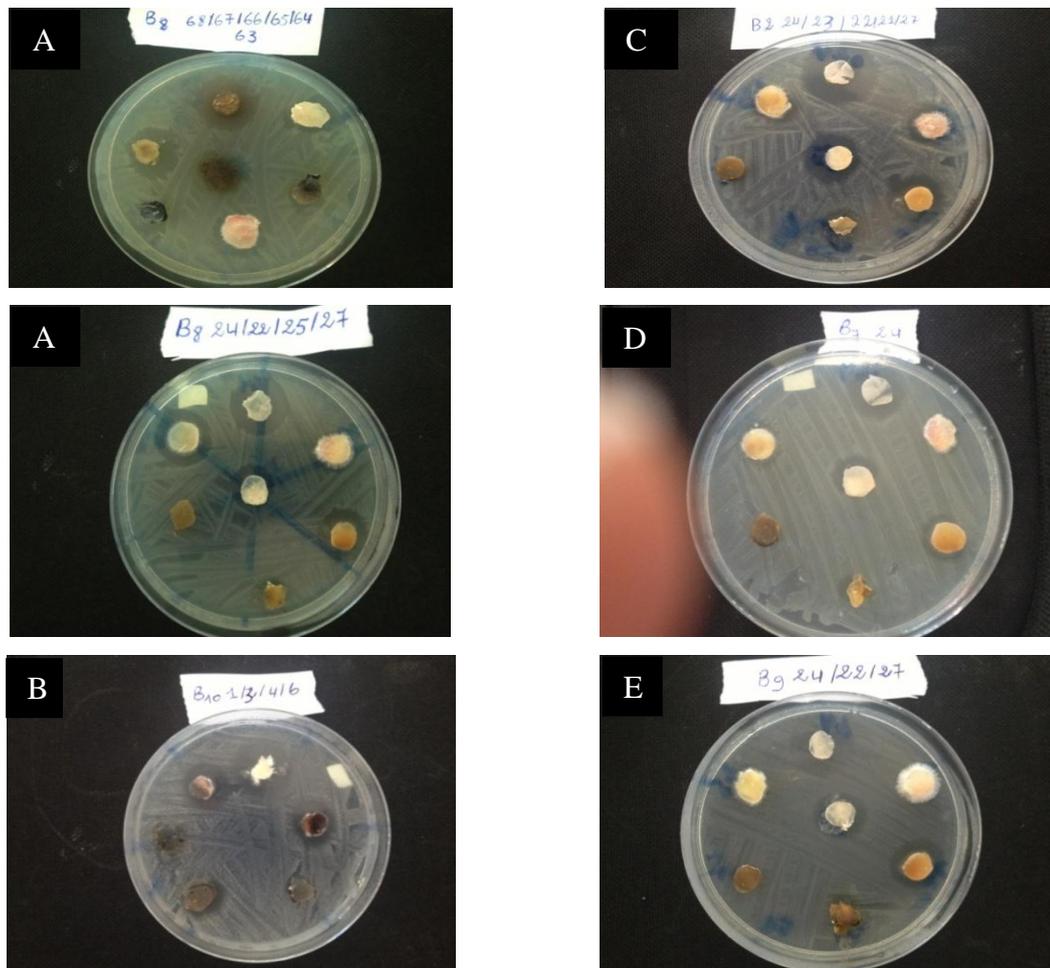


Figure 9. Les zones d'inhibitions obtenues par quelques champignons endophytes contre certaines bactéries pathogènes.

A: *Pseudomonas aeruginosa*, **B:** *Staphylococcus aureus*, **C:** *Bacillus cereus*, **D:** *Salmonella typhimurium*, **E:** *Escherichia coli*.

III.2.2. Activité antifongique

Dans cette activité 79 champignons parmi les 100 isolats ont été testé contre trois champignons phytopathogènes ; *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* var. *coeruleum*. Un pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant les rayons des champignons phytopathogènes dans les boites contrôles et en double culture après 5 jours d'incubation.

6,32% d'endophytes avaient une activité antifongique très haute contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, où les pourcentages d'inhibition de 70.55% et 71.42% ont été atteints avec les isolats de *Aspergillus* sp.1 et *Penicillium* sp.3 respectivement. 76,32% des isolats ont une haute activité, 16,45% ont démontré une activité modérée et 57% des champignons ont une activité antifongique basse.

Pour le deuxième champignon *Phytophthora infestans* ; 1,3% d'endophytes démontraient une très haute activité antifongique, 15% d'entre eux avaient une activité haute, 14% ont une activité antifongique modérée et les 56% d'endophytes restants ont une activité très basse. le pourcentage le plus haut contre *Phytophthora infestans* est de 75,55% chez *Penicillium* sp.5.

En ce qui concerne *Fusarium solani* var. *coeruleum* ; 6,3% des champignons endophytes ont une activité antifongique très haute, le pourcentage d'inhibition le plus haut (81,48%) a été observé avec les isolats de *Penicillium* (sp.5 et sp.6) et *Aspergillus* sp.3, le même pourcentage de 6.3% de champignons ont une activité haute, 16,5% démontré une activité modérée, et le restes des champignons (58%) ont une activité basse.

Les différents pourcentages d'inhibition des trois champignons phytopathogènes par les champignons endophytes sont représentés dans le tableau II, et quelques images représentant l'activité antagoniste sont résumées dans la figure 9.

Plusieurs études ont montré que les champignons endophyte ont une activité antifongique (Khruayyu, Pilantanapak, 2012). Sadrati et ces collaborateurs (2013), ont démontré que 54,07% des champignons endophytes montraient une activité contre *Phytophthora infestans*, et 63,89% contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*,

L'antagonisme pourrait être dû à la production des composés biologiquement actifs dans les milieux qui sont capables d'inhiber les champignons phytopathogènes (Castillo et al., 2002).

La différence entre les résultats obtenus par des même espèces de champignons endophytes contre les différentes espèces de champignons phytopathogènes du même genre, peut être expliqué par la spécificité des champignons endophytes vis-à-vis des champignons phytopathogènes (Arnold et *al.*, 2000), c'est à dire les métabolites secondaires produites par l'endophyte sont spécifiques au niveau de l'espèce.

Tableau II. Les pourcentages d'inhibition des trois champignons phytopathogènes par les champignons endophytes.

Isolats fongique	Pourcentage d'inhibition (%)			Isolats fongique	Pourcentage d'inhibition (%)		
	Foa	Pi	Fso		Foa	Pi	Fso
<i>Alternaria sp.1</i>	14,28	7,14	7,4	<i>Aureobasidium sp.1</i>	31,42	31,11	37,03
<i>Alternaria sp.2</i>	8,57	60	25	<i>Aureobasidium sp.2</i>	0	6,66	20
<i>Alternaria sp.3</i>	5,71	13,33	11,11	<i>Scopulariopsis sp.1</i>	2,85	2	8
<i>Alternaria sp.4</i>	14,28	26,66	44,44	<i>Scopulariopsis sp.2</i>	0	24,44	40,74
<i>Alternaria sp.5</i>	8	2	11,11	<i>Epicoccum sp.</i>	28,57	0	22,22
<i>Alternaria sp.6</i>	2,85	24,44	40,74	<i>Onychocola sp.</i>	8,57	22,22	7,4
<i>Penicillium sp.1</i>	60	08	62,96	<i>Scytalidium sp.</i>	54,28	46,66	44,44
<i>Penicillium sp.2</i>	2,85	20	4,41	<i>Pseudallescheria sp.</i>	42,85	8,88	44,44
<i>Penicillium sp.3</i>	71,42	68,88	62,96	<i>Acremonium sp.</i>	20	60	11,11
<i>penicillium sp.4</i>	11,42	20	22,22	Mycélium stérile1	48,57	26,66	59,25
<i>Penicillium sp.5</i>	57,14	75,55	81,48	Mycélium stérile 2	42,8	60	33,33
<i>Penicillium sp.6</i>	60	22,22	81,48	Mycélium stérile 3	14,28	42,22	55,55
<i>Penicillium sp.7</i>	70,57	66,66	70,45	Mycélium stérile 4	37,14	33,33	40,74
<i>Aspergillus sp.1</i>	70,57	66,66	70,45	Mycélium stérile 5	40	46,66	22,22
<i>Aspergillus sp.2</i>	7,4	4	11,42	Mycélium stérile 6	34,28	53,33	33,33
<i>Aspergillus sp.3</i>	47,14	40	81,48	Mycélium stérile 7	37,14	48,88	29,62
<i>Fusarium sp.1</i>	17,14	46,66	29,62	Mycélium stérile 8	42,85	24	25,92
<i>Fusarium sp.2</i>	25,71	46,66	18,51	Mycélium stérile 9	42,85	53,33	40,74
<i>Fusarium sp.3</i>	0	2,22	7,4	Mycélium stérile 10	14,28	33,33	37,03
<i>Fusarium sp.4</i>	0	0	0	NI	2,85	20	25,92

<i>Fusarium sp.5</i>	34,28	35,55	29,62	NI	48,57	50,66	60
<i>Fusarium sp.6</i>	28,57	33,33	44,44	NI	42,85	12	37,03
<i>Fusarium sp.7</i>	14,28	28,88	7,4	NI	40	20	29,62
<i>Paecilomyces sp.1</i>	0	20	25,92	NI	2,85	24,44	18,51
<i>Paecilomyces sp.2</i>	80,4	60,66	70	NI	2	20	8
<i>Paecilomyces sp.3</i>	42,57	30,13	28,57	NI	14,28	31,11	37,03
<i>Ulocladium sp.1</i>	0	16	20	NI	22,85	44,44	11,11
<i>Ulocladium sp.2</i>	2,85	4,44	29,62	NI	31,42	35,55	29,62
NI	28,57	28,88	37,03	NI	28,57	8	3,7
NI	37,14	28	7,4	NI	14,28	11,11	25,92
NI	42,85	20	40,74	NI	0	11,11	44,44
NI	37,14	40	25,92	NI	8,57	28,88	37,03
NI	28,57	4	5	NI	8,57	0	11,11
NI	37,14	8	29,62	NI	57,14	66,66	37,03
NI	42,58	26,66	44,44	NI	0	37	8.8
NI	28,57	16	7,4	NI	33.33	28.88	42.44
NI	5,71	40	7,4	NI	2.2	0	4
NI	42,85	20	40,74	NI	40	35.55	25.92
NI	37,14	28	7,4	NI	28,57	28,88	37,03
NI	8.57	33.33	3.7				

- **Foa**: *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. - **Pi**: *Phytophthora infestans*. - **Fso**: *Fusarium solani* var. *coeruleum*, **NI**: non identifier

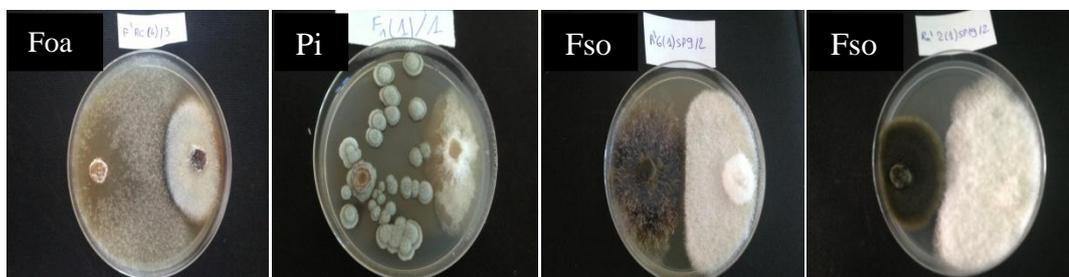


Figure 10. Les zones d'inhibitions obtenues par quelques champignons endophytes contre trois champignons phytopatogènes.

Foa : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. - **Pi** : *Phytophthora infestans*. - **Fso** : *Fusarium solani* var. *coeruleum*.

III.3. Détermination de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de 79 champignons parmi les 100 isolats à été testé, permettant de démontrer la production de cinq enzymes extracellulaires ; l'amylase, la protéase, la cellulase, la lipase et l'estérase.

Après cinq jours d'incubation les résultats étaient comme suit :

Pour l'amylase 51% des champignons endophytes produisaient cette enzyme, la dégradation de l'amidon a été déterminée par une grande zone obtenus avec le mycélium stérile.4, et les *Penicillium* (sp.5, sp.1, sp.6), *Aspergillus* sp.1, *Aureobasidium* sp., avec des index amylolytiques de 4, 2,4, 2,15, 2, 2 respectivement (Fig. 11).

50,63% des champignons endophytes produisaient la protéase où des grandes zones de dégradation du substrat ont été observées avec les isolats de mycélium stérile 4, *Penicillium* sp.1, *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp.4, mycélium stérile 10, *Paoecilomyces* (sp.3, sp.2) avec des index protéolytiques de 5,7, 3,12, 3,1, 3, 2,6, 2,28 respectivement (Fig. 12).

Le pourcentage des champignons qui produisaient la cellulase était de 43%. Les plus grandes zones de dégradation de la cellulose ont été observées avec *Penicillium* (sp.5, sp.7, sp.6, sp.3), *Aspergillus* (sp.1, sp.3), qui ont presque dégradé l'intégralité de la cellulose présente dans les boîtes de Pétri avec des index cellulose de 7,5, 7, 5,5, 3,3, 7, 5,4 respectivement, ainsi que *Fusarium* (sp.4, sp.5) et *Aureobasidium* sp.2, et un champignon non identifier avec des index de 4,8, 2,5, 3,75, 4 respectivement (Fig. 13).

Pour la lipase 38% des champignons endophytes démontraient une activité enzymatique par la dégradation des lipides et l'apparition des zones claires autour des colonies. Les plus grandes activités ont été observées avec le Mycélium stérile.7 et *Scopulariopsis* sp.1 avec des index enzymatique de 4, 3 respectivement la figure 14 ci-dessous résume cette activité.

Pour l'estérase 20% des champignons endophytes produisaient cette enzyme, *Scopulariopsis* sp.1 et *Alternaria* sp.4, et présentaient des index estérasique les plus grands de 2,8 et 2,27 respectivement (Fig. 15).

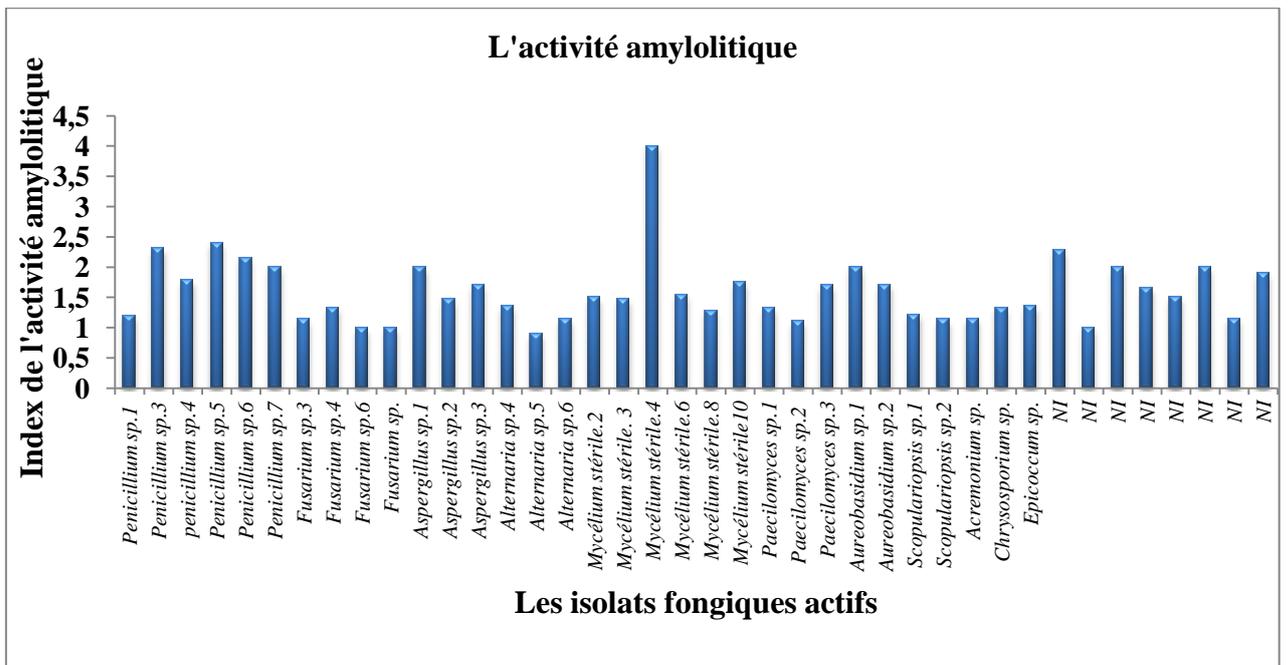


Figure 11. La production de l'amylyase par les champignons endophytes actifs.

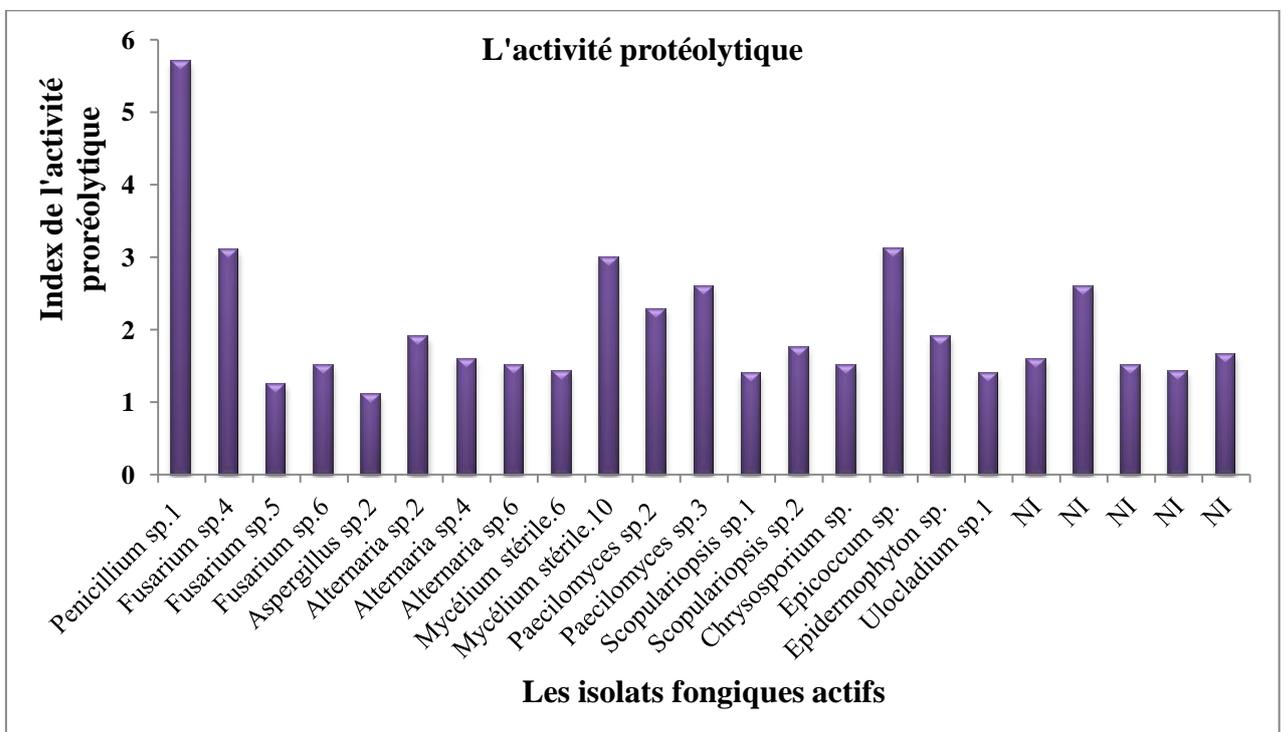


Figure 12. La production de la protéase par les champignons endophytes actifs.

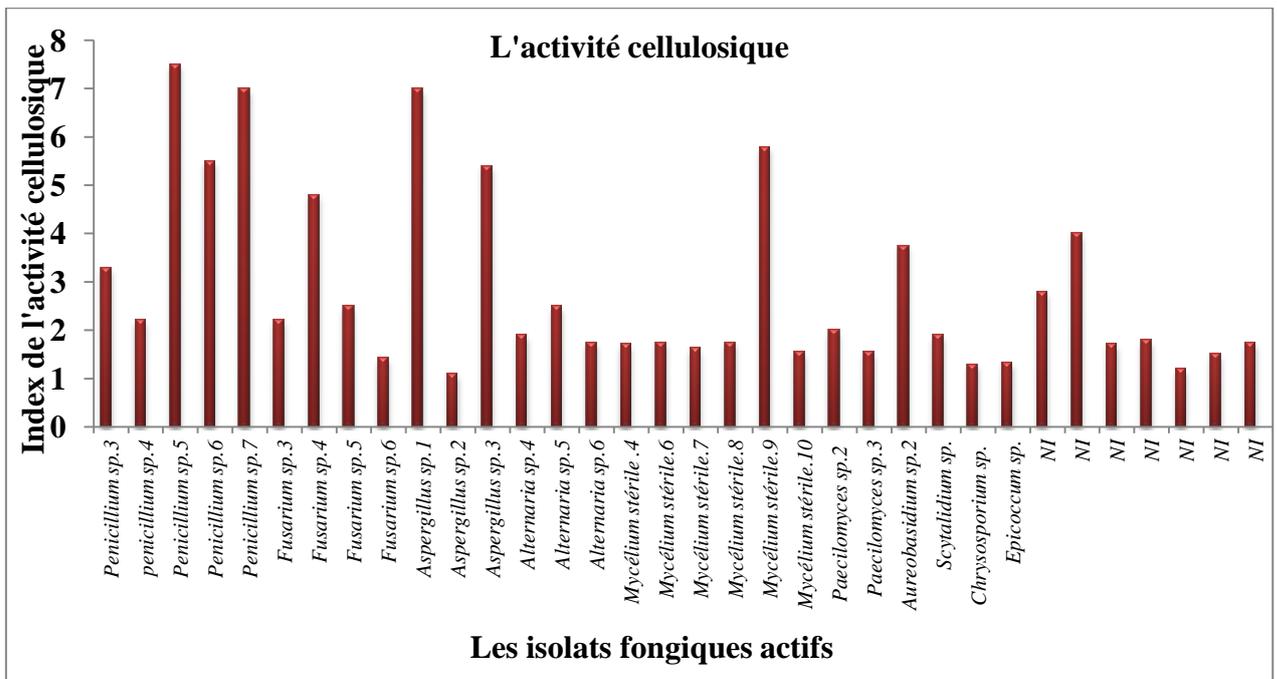


Figure 13. La production de la cellulase par les champignons endophytes actifs.

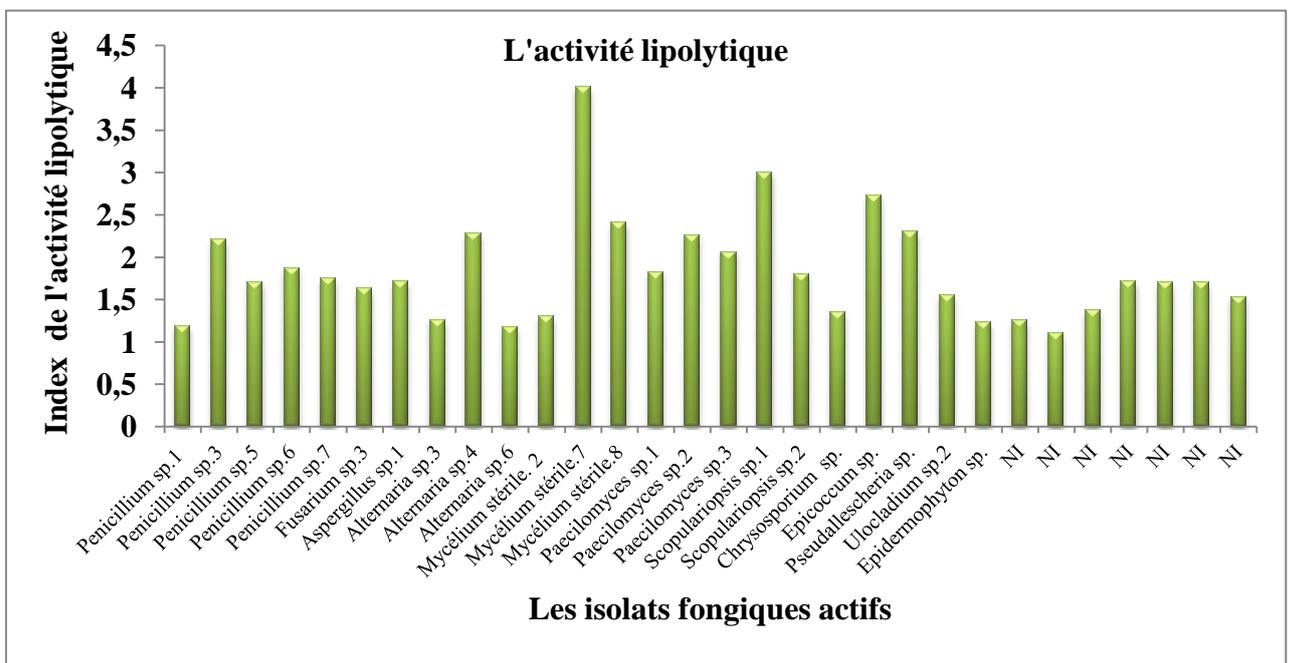


Figure 14. La production de la lipase par les champignons endophytes actifs.

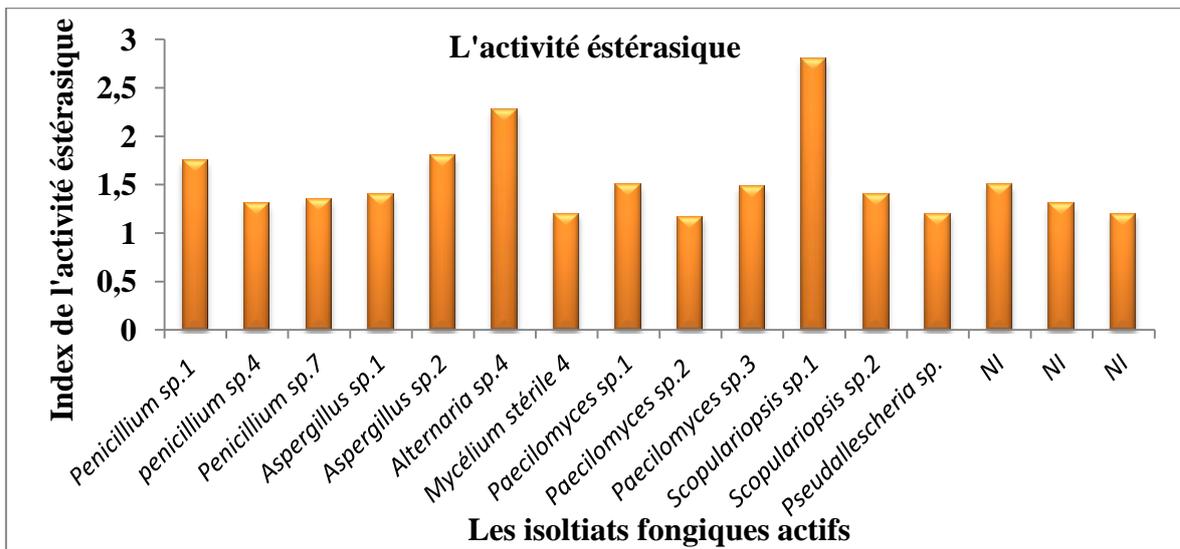


Figure15. La production de l'estérase par les champignons endophytes actifs.

D'après ces résultats on peut dire que la plupart des champignons endophytes produisent au minimum une enzyme extracellulaire. *Aspergillus* (sp.1, sp.3), *Penicillium* (sp.5, sp.6, sp.7, sp.6), le mycélium stérile et *Aureobasidium* sp.2 produisent presque la majorité des cinq enzymes testées.

Il y certains champignons endophytes tels que l'*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., mycélium stérile, *Fusarium* sp. démontraient une production de presque toutes les enzymes testées c'est résultats sont similaires à ceux obtenus par Tan et ses collaborateurs (2001), (Fig.16)

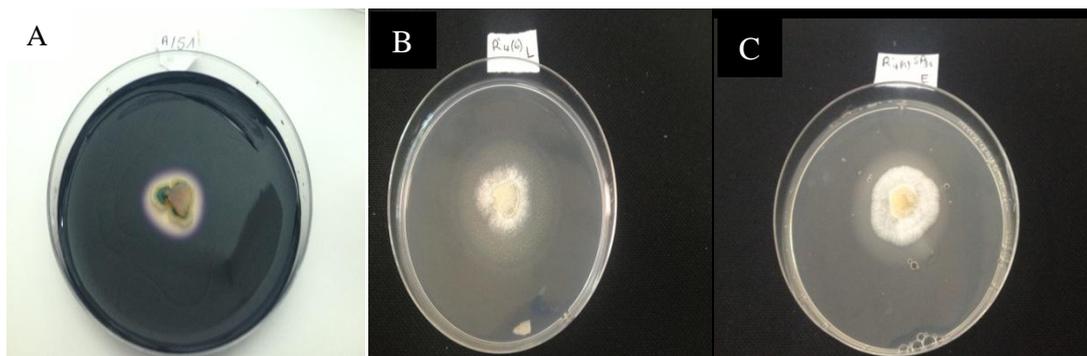


Figure 16. Les halos obtenus pour certaines activités enzymatiques.

A: Amylase, **B:** Lipase, **C:** Estérase

Les enzymes fongiques sont plus stables que les enzymes obtenues à partir des plantes et des animaux. Elles sont employées dans la transformation des produits alimentaires, des industries de boissons, de textile et de cuir (Maria et al, 2005). Ces champignons mènent à l'amélioration biotechnologique.

Approximativement 4000 métabolites secondaires dont des enzymes obtenus à partir d'espèces fongiques sont des composés biologiquement actifs produits principalement par *Penicillium*, *Aspergillus* et *Acremonium* (Dreyfuss et Chapela, 1994). La cellulase produite par beaucoup de champignons terrestres est employé dans l'industrie du papier (Eriksson, 1993). L'activité lipasique indique que le cholestérol peut être employé comme source d'énergie (Maria et al., 2005). Certains endophytes sont incapable de produire quelques enzymes pour certaines raisons comme empêcher des dommages à l'hôte (Maria et al., 2005).

L'avantage de cette activité est apprendre si ces endophytes peuvent offrir des possibilités intéressantes et de servir de nouveaux agents pharmacologiques.

III. 4. Identification des champignons isolés

La comparaison des caractéristiques culturelles et microscopiques aux clés d'identifications nous a permis d'identifier les champignons actifs au niveau du genre

Sur 79 isolats de champignons endophytes testés, 64 isolats ont été actifs, dont 50 ont été identifiés, comme appartenant à 16 genres différents. Huit isolats appartiennent au genre *Penicillium*, sept au genre *Fusarium*, six à *Alternaria*, trois au genre *Aspergillus* et trois autres à *Paecilomyces*, deux à *Scopulariopsis*, ainsi qu'à *Ulocladium* et *Eureobasidium*. Le reste des isolats identifiés appartiennent aux genres *Pseudallescheria*, *Epicoccum*, *Epidermophyton*, *Scytolidium*, *Onychocola*, *Chrysosporium* et *Acremonium*. Les autres isolats (14) appartiennent à des genres divers qui n'ont pas pu encore être déterminés (Tab. III).

Tableau III. Les différents isolats fongiques identifiés et leur source.

Genre des isolats	Source	Genre des isolats	Source	Genre des isolats	Source
<i>Alternaria</i> sp.1	Fruits	Mécylum sterile 1	Racines	<i>Penicillium</i> sp.7	Racines
<i>Alternaria</i> sp.2	Fruits	Mécylum sterile 2	Feuilles	<i>Scopulariopsis</i> sp.1	Racines
<i>Alternaria</i> sp.3	Rameaux	Mécylum sterile 3	Racines	<i>Scopulariopsis</i> sp.2	Racines
<i>Alternaria</i> sp.4	Fruits	Mécylum sterile 4	Racines	<i>Ulocladium</i> sp.1	Feuilles
<i>Alternaria</i> sp.5	Fruits	Mécylum sterile 5	Racines	<i>Ulocladium</i> sp.2	Fruits
<i>Alternaria</i> sp.6	Fruits	Mécylum sterile 6	Racines	<i>Aureobasidium</i> sp.1	Feuilles
<i>Fusarium</i> sp.1	Racines	Mécylum sterile 7	Racines	<i>Aureobasidium</i> sp.2	Feuilles
<i>Fusarium</i> sp.2	Racines	Mécylum sterile 8	Rameaux	<i>Paecilomyces</i> sp.1	Racines

<i>Fusarium</i> sp.3	Racines	Mécylium sterile 9	Racines	<i>Paecilomyces</i> sp.2	Racines
<i>Fusarium</i> sp.4	Racines	Mécylium sterile 10	Racines	<i>Paecilomyces</i> sp.3	Racines
<i>Fusarium</i> sp.5	Racines	<i>Penicillium</i> sp.1	Feuilles	<i>Pseudallescheria</i> sp.	Feuilles
<i>Fusarium</i> sp.6	Racines	<i>Penicillium</i> sp.2	Racines	<i>Chrysosporium</i> sp .	Racines
<i>Fusarium</i> sp.7	Racines	<i>Penicillium</i> sp.3	Racines	<i>Epicoccum</i> sp.	Rameau
<i>Aspergillus</i> sp.1	Racines	<i>Penicillium</i> sp.4	Rameaux	<i>Epidermophyton</i> sp.	Fruits
<i>Aspergillus</i> sp.2	Racines	<i>Penicillium</i> sp.5	Racines	<i>Onychocola</i> sp.	Racines
<i>Aspergillus</i> sp.3	Racines	<i>Penicillium</i> sp.6	Rameaux	<i>Acremonium</i> sp.	Fruits

Parmi les champignons actifs identifiés on site les cinq champignons les plus dominants (Figure 17) :

Aspergillus

Les conidiophores de quelques espèces sont courts, lisses et incolores, les phialides portées directement par des vésicules hémisphériques, les conidies globuleuses, vertes et petites avec une tête aspergillaire unisériées, en colonnes compactes, assez grande. et d'autres espèces ont des conidiophores lisses, hyalines et très long et des conidies de petites taille, lisses, globuleuses à légèrement elliptiques, le tête aspergillaire bisériée, en colonne évasée (aspect d'éventail).

Les couleurs des colonies des espèces sur les différents milieux PDA, CYA et MEA varient de brun cannelle à vert foncé et noire, il y a des espèces dont la croissance est très rapide (2 à 3 jours), et d'autres rapides (3 à 5 jours).

Fusarium

Les conidiophores de quelques espèces sont simples ou disposés en verticilles courts, ils portent de longues monophialides d'aspect cylindrique. Pour les caractères macroscopiques sur milieu Sabouraud, les colonies sont duveteuses ou cotonneuses blanches à crème, avec un verso pâle. Pour d'autres espèces, les conidiophores sont courts et ramifiés, les phialides sont courtes et solitaires, les colonies sur Sabouraud sont duveteuses à floconneuses, avec une couleur blanche au départ, puis devenant rosées à pourpres, et le revers est foncé.

Penicillium

Les hyphes septés, hyalins, portent des conidiophores simples ou ramifiés. Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores, elles sont insérées directement ou par l'intermédiaire d'une rangée de métules. Les phialides sont serrées les unes contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau (pénicille).

Pour l'aspect macroscopique, la croissance de ces espèces est rapide, la colonie est habituellement duveteuse, poudreuse, de couleur variable, le plus souvent verte, et parfois grise ou jaune, le revers est foncé. Ils diffusent comme des pigments dans les milieux utilisés (Sabouraud, CYA, MEA).

Alternaria

Les hyphes septés, sont ramifiés et tardivement certains filaments sont pigmentés en brun, les conidiophores sont cloisonnés, septés et simples, plus ou moins droits. Les conidies sont bruns, pluricellulaire, d'aspect piriforme ou ovoïde avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée. Les colonies sont de croissance rapide sur milieu Sabouraud, sont de couleur blanc-gris au départ, et deviennent rapidement foncé (vert foncé à noire).

Ulocladium

Les hyphes septés, bruns, donne naissance à de courts conidiophores septés, non ramifiés. Les conidies sont brunes, ovoïdes, à paroi lisse ou rugueuse, produites isolément et sont cloisonnées à la fois longitudinalement et transversalement.

La croissance de ces espèces est modérément rapide dans les milieux (Sabouraud, PDA, CYA, MEA). Les colonies présentent une texture laineuse, duveteuse à poudreuse, leur couleur est brune vert olive à noire et le revers est noir.

La plupart de nos isolats qu'on a identifiés et décrits ci-dessus appartient de la classe de Deutéromycètes et aussi les classes des Ascomycètes et des Basidiomycètes

Le premier genre décrit ci-dessus *Aspergillus* est un genre de champignons imparfaits (Deutéromycètes) qui comprend environ 180 espèces (Gam et *al.*, 1986), certaines d'entre elles sont pathogènes, et/ou produisent des métabolites toxiques (Bedossa, 2002). Le genre *Aspergillus* a déjà été isolé comme champignon endophyte à partir des plantes médicinales, dont *Retama raetam* une plante de la famille des *Fabaceae* par Zerroug, (2011), ainsi qu'à partir de différentes autres plantes médicinales par (Hassan, 2007 ; Hundley, 2005 ; Huang, 2008).

D'autres souches ont été isolées appartenant au genre *Penicillium*, un genre faisant partie des champignons imparfaits (Deutéromycètes) et qui comprend environ 300 espèces. Ces espèces sont très répandues dans l'environnement, ce sont des contaminants alimentaires fréquents, mais certaines espèces sont utilisées par l'industrie (affinage des fromages) comme *P. roqueforti*, *P. camemberti*, *P. nalgiovense*. Ils entrent dans la dégradation des produits et certaines espèces produisent des métabolites d'intérêt médical ; Fleming en 1928, a été à l'origine de la découverte de la pénicilline à partir d'une souche de *P. notatum* (Samson et al., 2004). Certaines de ces espèces peuvent être isolés comme des endophytes à partir des plantes médicinales comme il a été le cas avec (Abdel-Motaal et al., 2010; Khan et al., 2010 ; Zerroug, 2011).

Il y a aussi des isolats appartenant au genre de *Fusarium*, un autre genre de champignons imparfaits, qui comprend plus de 100 espèces. La plupart des espèces de *Fusarium* sont capables de se développer comme saprophytes dans le sol, les espèces de *Fusarium* peuvent persister pendant plusieurs années grâce à la formation de chlamydospores ou par le développement d'hyphes sur des résidus organiques. (Burgess et al., 1994). Des espèces de *Fusarium* ont été isolé à partir de la plante médicinale *Pistacia lentiscus* comme l'ont fait d'autre chercheurs (Huang, 2008 ; Khan, 2007).

Les espèces d'*Alternaria* sont des saprophytes ou des parasites des plantes très répandus dans la nature. Leurs spores sont dispersées par les courants d'air (Develoux et Feuilhade, 2012). Ils ont été déjà isolés comme endophytes à partir de plusieurs plantes médicinales par Huang (2008).

Le dernier genre est *Ulocladium* dont les espèces ressemblent étroitement à certaines espèces d'*Alternaria*. Le genre *Ulocladium* comprend des mycètes saprophytes omniprésents; ils sont largement distribués dans le sol, sur le bois et sur des végétaux en décomposition. Quelques espèces sont des pathogènes s'attaquant aux plantes et des agents détériorant les aliments (Runa et al., 2009). Dans notre étude on a isolés les espèces d'*Ulocladium* comme des champignons endophytes.

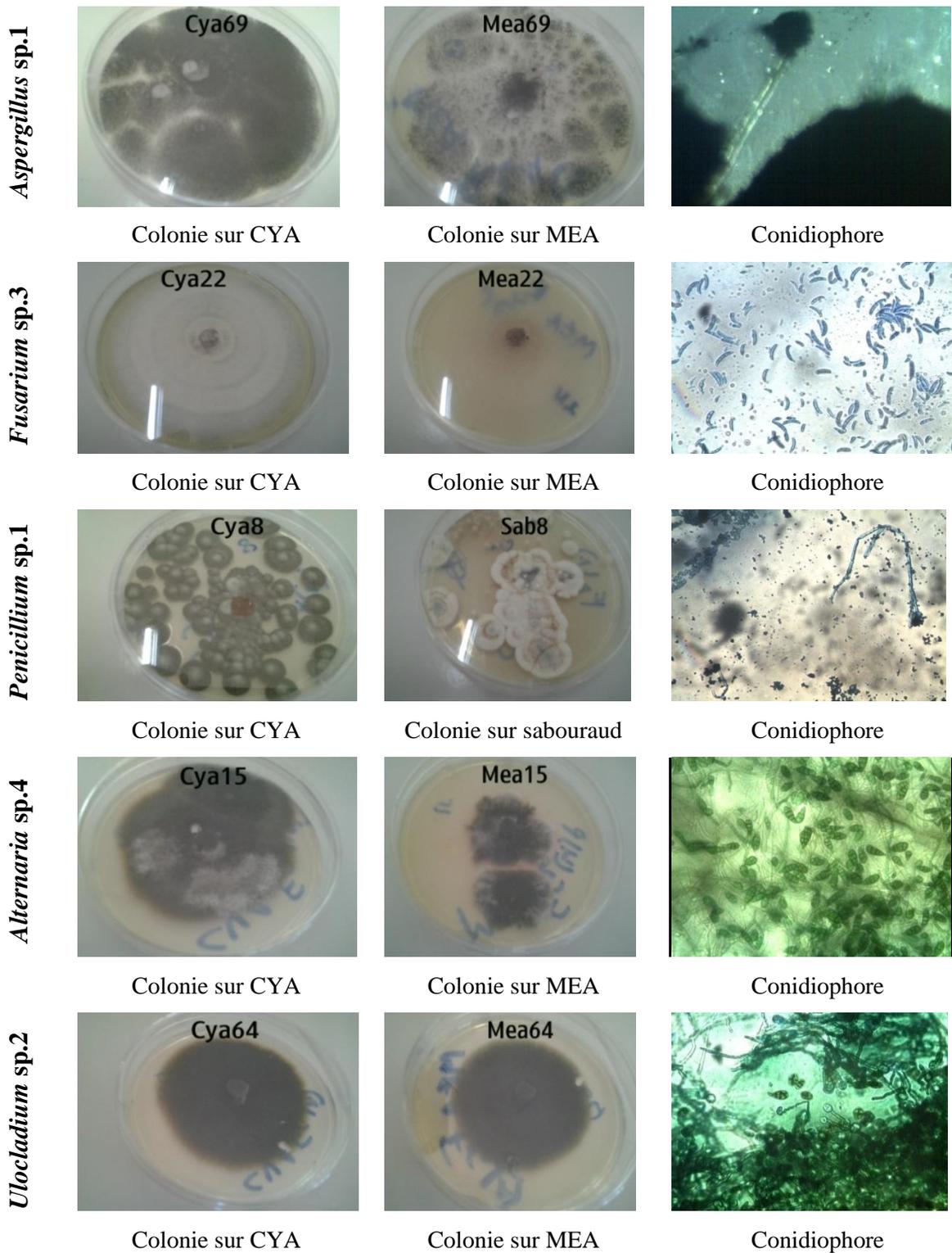


Figure17. Caractérisation macroscopique et microscopique de cinq champignons endophytes les plus dominants.

Conclusion et perspectives

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).

C'est ce qui rend la recherche de nouveaux composés produits par des microorganismes endophytes offre des perspectives prometteuses pour résoudre certains problèmes de santé, comme l'émergence des bactéries résistantes à certains médicaments d'usage courant, ces composés sont plus efficaces, moins toxiques et moins dangereux pour l'environnement (Yu et *al.*, 2009).

Dans ce travail, Les champignons endophytes ont été isolés à partir de différents tissus de la plante médicinale *Pistacia lentiscus*, un dépistage de leur pouvoir antagoniste contre les bactéries pathogènes ainsi que les champignons phytopathogènes a démontré leur pouvoir antibactérien. Cette efficacité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte contre les maladies humaines, ainsi que dans la lutte biologique contre les microorganismes phytopathogènes surtout les champignons.

D'un autre coté la production de cinq enzymes extracellulaires à été testé, et presque tous les endophytes ont démontré leur capacité de produire ces enzymes, qui peuvent avoir une importance au niveau industriel.

En perspective,

Nos travaux sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- ✓ Une identification moléculaire des espèces fongiques isolées.
- ✓ Une étude quantitative et plus approfondie des activités antimicrobiennes et enzymatiques de ces isolats.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdel-Motaal F. F., Nassar M. S. M., El-Zayat S. A., El-Sayed M. A. & Ito S. I.** (2010). Antifungal activity of endophytic fungi isolated from egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Pakistan Journal of Botany*; **42**: 2883-2894.
- Ait Said S.** (2011). Strategies adaptatives de deux especes du genre (*Pistacia* (*P.lentiscus* L. ET *P.atlantica* Desf.) Aux conditionc d'altitude des alinite et d'aridite : approches macro-anatomiques, phytochimiques et ecophysiologiques. *Universite Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou* ; pp. 180.
- Amirita A., Sindhu P., Swetha J., Vasanthi N.S. & Kannan K.P.** (2012). Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes Department of Biotechnology, *World Journal of Science and Technology India* **2**(2):13-19.
- Arnold A. E., Mejía L. C., Kylo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. & Herre E. A.** (2000). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:15649-15654.
- Arnold A.E., Maynard Z. & Gilbert G.S.** (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research***105**: 1502-1507.
- Arnold A.E., Mejía L.C., Kylo D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N. & Herre E.A.** (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of National Academy Sciences of the United States of American* **100**: 15649-15654.
- Bacon C. W. & White J. F.** (2000). Microbial Endophytes. *Marcel Dekker Inc., NewYork, USA*.
- Barrow J.R., Lucero M., Osuna-Avila P., Reyes-Vera I. & Aaltonen, R.E.** (2007). Fungal genomes that influence basic physiological processes of black grama and fourwing saltbush in arid southwestern rangelands. In: Sosebee, R.E., Wester, D.B., Britton, C.M., McArthur, E.D., Kitchen, S.G. (Eds.), Proceedings: Shrubland Dynamics-Fire and Water. *USDA Forest Service Rocky Mountain Research Station Proceddings* **47**: 123-131.
- Bayman B. P., Lebron L. L., Tremblay R. L. & Lodge D. J.** (1997). Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Le-panthes* (Orchidaceae). *New Phytologist* **135**:143–9.
- Bedossa A.** (2002). Les moisissures d'intéret medical, *Cahier 25 de formation de la biologie medical* pp.160.
- Belfadel FZ.** (2009). Huile de fruits de Pistacia lentiscus Caractéristiques physico-chimiques et effets biologiques (Effet cicatrisant chez le rat). *Universite Mentouri Canstantine. Magister en chimie organique* pp. 144.
- Bettucci L., Simeto S., Alonso R. & Lupo S.** (2004). Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. *Sydowia* **56**: 8-23.
- Brady S. F., Bondi S. M. & Clardy J.** (2001). The guanacastepenes: A highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. *Journal of the American Chemical Society* **123**(40): 9900-9901.
- Burgess L. W., Summerell B.A., Bullock S., Gott K.P. & Backhouse D.** (1994). Laboratory manual for *Fusarium* research, 3rd ed. *University of Sydney, Sydney, Australia*.
- Carrim A. J. I., Barbosa E. C. & Vieira J. D. G.** (2006). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**: 353-359.

- Carroll G. C.** (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **69**(1): 2-9.
- Carroll G.C.** (1986). The biology of endophytism in plants with particular reference to woody plants. In: Fokkema, N.J., van den Heuvel, J. (Eds.), *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, UK pp. 205-222.
- Castillo U. F., Strobel G. A., Ford E. J., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Albert H. & Robison R.** (2002). Munumbicins wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology* **148**:2675–2685
- Clay K. & Schardl C.** (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*; **160 Suppl 4**: 99-127.
- Cohen S.D.** (2004). Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelia compatibility. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 713-721.
- Cohen S.D.** (2006). Host selectivity and genetic variation of *Discula umbrinella* isolates from two oak species: Analyses of intergenic spacer region sequences of ribosomal DNA. *Microbial Ecology* **52**: 463-469.
- Collado J., Platas G. & Pelaez F.** (2001). Identification of an endophytic *Nodulisporium* sp from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. *Mycologia* **93**: 875-886.
- Combès A. I. Ndoye C. Bance J. Bruzard C. Djedjat J. Dupont B. Nay S. and Prado.** (2012). Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variable* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS One*, 15 octobre 2012.
- Develoux M. and Feuilhad M.** (2012). Alternarioses. Thérapeutique dermatologique.
- Dreyfuss M.M. & Chapela I.H.** (1994). Potential of fungi in the discovery of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. In: *The discovery of Natural Products with therapeutic Potential* (ed Gullo, V.P.). Butterworth-Heinemann, Boston: 49-80.
- Dufresne P.** (2013). identification des champignons d'importance médicale, *Stage au Laboratoire de Santé Publique Qubec*.
- Firakova S., Sturdikova M. and Muckova M.** (2007). Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biology* **62**: 251-257.
- Fröhlich J., Hyde K.D. and Petrini O.** (2000). Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* **104**: 1202-1212.
- Gams W., Christensen M., Onions A.H.S., Pitt J.I. and Samson R.A.** (1986) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In R.A. Samson & J.I. Pitt (eds.), *Advances of Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum Publishing., London & New-York pp. 55-62.
- Ganley R.J. and Newcombe G.** (2006). Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* **110**: 318-327.
- genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Annals of Applied Biology* **144**: 53-63.
- Goggin F.L.** (2007). Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 399-408.

- Gong L. J. and Guo S. X.** (2009). Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology* **8**: 731-736.
- Guo L.D.** (1999). Identification of endophytic fungi in *Livistona chinensis* (PALMAE). Unpublished Ph.D. thesis. The University of Hong Kong.
- Hassan A. E. H. A.** (2007). Novel Natural Products from Endophytic Fungi of Egyptian Medicinal Plants - Chemical and Biological Characterization. *University of Egypte* pp. 283.
- Hellwig V., Grothe T., Mayer-Bartschmid A., Endermann R., Geschke F. U., Henkel T. and Stadler M.** (2002). Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *The Journal of Antibiotics* **55**(10) : 881-892.
- Huang W .** (2008). Traditional Chinese medicinal plants and their endophytic fungi: isolation, identification and bioassay .*University of Hong Kong* pp. 232.
- Huang W.Y.** (2004). Distribution of endophytic fungi in *Trachelospermum jasminoides* and the bioactive metabolites from an endophyte Tj5R. Unpublished M.Sc. thesis. *Nanjing University*.
- Hundley N. J.** (2005). Structure elucidation of bioactive compounds isolated from endophytes of *Alestonia scholaris* and *Acmena graveolens*. *University of Brigham Young* pp. 98 .
- Ishida K., Alviano D.S., Silva B.G., Guerra C.R., Costa A.S., Nucci M., Alviano C.S. & Rozentel S.** (2012). Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates . *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, May 2012; **45**(5): 411-416.
- Khan R.** (2007). Isolation and identification and cultivation of endophytic fungi from medicinal plants for the production., and characterization of bioactive fungal metabolites. *University of Karachi . Pakistan* pp. 246.
- Khan R., Shahzad S., Choudhary M. I., Khan S. A. & Ahmad A.** (2010) Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pakistan Journal of Botany* **42**: 1281-1287.
- Khan R., Shahzad S., Iqbal choudhary M., Khan S. A. & Ahmed A.** (2007). Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Pakistan Journal of Botany* **39**: 2233-2239.
- Khrueayu D. & Pilantanapak A.** (2012). Antifungal activity of bioactive compound from endophytic fungi isolated from mangrove leaves, Department of Microbiology, Chonburi 20131, Thailand.
- Kirk P.M., Cannon P.F. & David J.C.** (2001). Dictionary of the fungi, 9th ed., *Egham U.K., CAB Ed.*; 655 p., 0 85199 377X.
- Kumar D.S.S. & Hyde K.D.** (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* **17**: 69-90.
- Lambert A.M. & Casagrande R.A.** (2006). No evidence of fungal endophytes in native and exotic *Phragmites australis*. *Northeastern Naturalist* **13**: 561-568.
- Larsen T. O., Smedsgaard J., Nielsen K. F., Hansen M. E. & Frisvad J. C.** (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports* **22**(6): 672-695.

- 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* 2004; **144**: 53-63.
- Li J. Y., Strobel G. A., Harper J. K., Lobkovsky E. & Clardy J.** (2000). Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Organic Letters* **2**(6): 767-770.
- Li W.C., Zhou J., Guo S.Y. & Guo L.D.** (2007). Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity* **25**: 69-80.
- Lin Z.H., Lu Z.Y., Zhu T.H., Fang Y.C., Gu Q.Q. & Zhu W.M.** (2008) Penicillenols from *Penicillium* sp GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **56**: 217-221.
- Ma Y. M., Li Y., Liu J. Y., Song Y. C. & Tan R. X.** (2004). Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia* **75**(5): 451-456.
- Mandyam K. & Jumpponen A.** (2005). Seeking the elusive function of the rootcolonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology* **53**: 173-189.
- Maria G.L., Sridhar K.R. & Raviraja N.S.** (2005). 'Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India'. *Journal of Agricultural Technology* **1**: 67-80.
- Mostert L., Crous P.W. & Petrino O.** (2000). Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* **54**: 46-58.
- Naik B.S., Shashikala J. & Krishnamurthy Y.L.** (2006). Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. *Microbiological Research* **164** (3): 290-296.
- Nassar A.H., El-Tarabily K.A. & Sivasithamparam K.** (2005). Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* **42**: 97-108.
- Ogundare A.O., Adetuyi F.C. & Akinyosoye F.A.** (2006). Antimicrobial activities of *Vernonia tenoreana*. *African Journal of Biotechnology* **5** (18): 1663-1668.
- Osono T.** (2006). Fungal decomposition of lignin in leaf litter: Comparison between tropical and temperate forests. *8th International Mycological Congress of the International-Mycological-Association. Aug 20-25, 2006, Cairns, Australia.*
- Pandey B., Ghimire P. & Agrawal V.P.** (2004). Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. *Journal Biological of Science* **23**: 44-53.
- Petrini O. & Carroll G. C.** (1981). Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. *Canadian Journal of Botany* **59**:629-36.
- Petrini O.** (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (Eds.), *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York, USA pp. 179-197.

- Photita W., Lumyong S., Lumyong P. & Hyde K. D. (2001).** Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthop Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* **105**(12): 1500–13.
- Photita W., Lumyong S., Lumyong P., Mckenzie E.H.C. & Hyde K.D. (2004).** Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fung Divers* **16**: 131-140.
- Pitt J. I. and Hocking A. D. (1985).** Fungi and food spoilage. Academic Press Inc, Sydney. Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montréal, Tokyo pp. 414.
- 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 endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorganisation of Medical Chemistry Letters* **19**: 1572-1574.
- Rahman M.A., Begum M.F. & Alam M.F. (2009)** Screening of *Trichoderma* isolates as a biological control agent against *Ceratocystis paradoxa* causing pineapple disease of sugarcane. *Mycobiology* **37**:277-285.
- Redman R. S., Sheehan K. B., Stout R. G., Rodriguez R. J. and Henson J. M. (2002).** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*; doi: 10.1126/ science.1078055.
- Richmond D.S., Kunkel B.A., Somasekhar N. & Grewal P.S. (2004).** Top-down and bottom-up regulation of herbivores: *Spodoptera frugiperda* turns tables on endophyte-mediated plant defence and virulence of an entomopathogenic nematode. *Ecological Entomology* **29**: 353-360.
- Rodrigues K. F. (1994).** The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycology* **86**:376–85.
- Rodrigues K.F. & Petrini O. (1997).** Biodiversity of endophytic fungi in tropic regions. In: Hyde, K.D. (Eds.), Biodiversity of Tropical Microfungi. *Hong Kong University Press, Hong Kong, China* pp. 57-70.
- Rodrigues K.F. (1996).** Fungal endophytes of palms. In: Redlin, S.C., Carris, L.M. (Eds.), Endophytic Fungi in Grass and Woody Plants: Systematics, *Ecology, and Evolution*. *APS Press, St. Paul, Minnesota, USA* pp. 31-65.
- Rodriguez R. J., Redman R. S. & Henson J. M. (2004).** The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Migration and Adaptation Strategies for Global Change* **9**: 261-272.
- Rubini M. R., Silva-Rebeiro R. T., Pomella A. W. V., Maki C. S., Araujo W. L., Sautos D. R. & Azevedo J. L. (2005).** Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom disease. *International Journal of Biological Science* **1**: 24-33.
- Sadrati N., Daoud H., Zerroug A., Dahamna S. & Bouharati S. (2013).** Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). University Ferhat Abbas Sétif. *Journal of Plant Protection Research* **53**(2) pp. 128
- Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M. & Sullivan T. J. (1998).** Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 319-343.
- Saikkonen K., Wali P., Helander M. & Faeth S.H. (2004).** Evolution of endophyte plant symbioses. *Trends in Plant Science* **9**: 275-280.
- Samson R.A., Hoeksta E.S. & Frisvad J.C. (2002)** Introduction to food and airborne fungi, *Utrecht, CBS éd.*, p. 389. ISBN 90-70351-42 -0.

- Santamaria O. & Diez J.J.** (2005). Fungi in leaves, twigs and stem bark of *Populus tremula* from northern Spain. *Forest pathology* **35**: 95-104.
- Schardl C. L., Leuchtman A. & Spiering M. J.** (2004). Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 315-340.
- Schulthess F. M. & Faeth S. H.** (1998). Distribution, abundances and association of the endophytic fungal community of *Arizona fescue* (*Festuca arizonica* Vasey). *Mycology* **90**:569–78.
- Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A.K. and Krohn K.** (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* **106**(9): 996-1004.
- Selosse M. A. & Schardl C. L.** (2007). Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist* **173**: 452-458.
- Selvanathan S., Indrakumar I. & Johnpaul M.** (2011). 'Biodiversity Of The Endophytic Fungi Isolated From *Calotropis gigantea* (L.) R.Br'. *Recent Research in Science and Technology* **3**(4); 94-100.
- Shankar N.B., Shashikala J. & Krishnamurthy Y.R.** (2009). Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro Department of P.G.Studies and Research in Applied Botany, *Microbiological Research* **164**: 290-296.
- Shen L., Ye Y. H., Wang X. T., Zhu H. L., Xu C., Song Y. C., Li H. & Tan R. X.** (2006). Structure and total synthesis of aspernigerin: A novel cytotoxic endophyte metabolite. *Chemistry - A European Journal* **12**(16): 4393-4396.
- Shiomi H. F., Silva H. S. A., Melo I. S., Nunes F. V. and Bettiol W.** (2006). Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola* **63**(1): 32-39.
- Sirrenberg A., Goebel C., Grond S., Czempinski N., Ratzinger A., Karlovsky P., Santos P., Feussner I. & Pawlowski K.** (2007). Piriformospora indica affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum* **131**: 581-589.
- Sriubolmas N., Tung A., Sawatchupong R., Ruangrunsi N. & Wiyakrutta S.** (2001). Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from selected Thai medicinal plants, Proceedings of the 4th Asia-Pacific Biotechnology Congress & 30th Annual PSM Conventio., Cebu City, Philippines 228-237.
- Stierle A., Stierle D. & Bugni T.** (1999). Sequoiatones A and B: Novel antitumor metabolites isolated from a redwood endophyte. *Journal of Organic Chemistry* **64**(15): 5479-5484.
- Strobel G. & Daisy B.** 2003 Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(4): 491-502.
- Strobel G. A.** (2002). Microbial gifts from rain forests. *Can. J. Plant Pathol.* **24**(1): 14-20.
- Strobel G., Daisy B., Castillo U. & Harper J.** (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* **67**: 257-268.
- Suryanarayanan T. S. & Kumaresan V.** (2000). Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. *Mycological Research* **104**: 1465-1467.
- Tan R. X. & Zou W. X.** (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* **18**: 448-459.

- Taskin E., Eltem R., Erica S., Silva. & João V. B. S.** (2008). Screening of *Aspergillus* strains isolated from vineyards for pectinase production, *Journal of Food, Agriculture & Environment* **6** (Set 4) : 412 - 414.
- Taylor J.E., Denman S. and Crous P.W.** (2001). Endophytes isolated from three species of *Protea* in a nature reserve in the Western Cape, *South Africa. Sydowia* **53**: 247- 260.
- Tejesvi M.V., Kini K.R., Prakash H.S., Subbiad V. & Shetty H.S.** (2007). Genetic diversity and antifungal activity of species pestalotiopsis isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Divers.* **24**: 37–54.
- Tikoo A., Shakri R., Conolly L., Hirokawa Y., Shishido T., Bowers B., Ye L., Kohama K., Simpson R. J. and Maruta H.** (2000). Treatment of ras-induced cancers by the Factin-bundling drug MKT-077. *Cancer Journal* **6**(3): 162-168.
- Unterseher M., Reiher A., Finstermeier K., Otto P. and Morawetz W.** (2007). Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Research* **6**: 201-212.
- Valkama E., Koricheva J., Salminen J.P., Helander M., Saloniemi I., Saikkonen K. and Pihlaja K.** (2005). Leaf surface traits: overlooked determinants of birch resistance to herbivores and foliar micro-fungi? *Trees-Structure and Function* **19**: 191-197.
- Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., von Wettstein D., Franken P. and Kogel, K.H.** (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of National Academy Sciences of the United States of American* **102**: 13386-13391.
- Wang F.W., Ye Y.H., Chen J.R., Wang X.T., Zhu H.L., Song Y.C. and Tan, R.X.** (2006). Neoplaether, a new cytotoxic and antifungal endophyte metabolite from *Neoplaconema napellum* IFB-E016. *FEMS Microbiology Letters* **261**: 218-223.
- Weber D., Sternere O., Anke T., Gorzalczancy S., Martino V. and Acevedo C.** (2004). Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *Journal of Antibiotibioics* **57**(9): 559-563.
- Wilson D.** (1995). Endophyte-the evolution of a term, a clarification of its use and definition. *Oikos* **73**: 274-276.
- Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P. and Qin L.** (2009). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes . *Microbiological Research* doi:10.1016/j.micres..11.009.
- Zabalgogeaazcoa I.** (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6**: 138-146.
- Zerroug A .** (2011). Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk). Université Ferhat Abbas-Setif pp. 89.
- Zhang H. W., Song Y. C. and Tan R. X.** (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* **23**: 753-771.
- Zhou D. and Hyde K. D.** (2001). Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research* **105**: 1449-1457.

Annexe

Glucose Yeast extract Peptone (GYP)

Glucose.....	1 g
Extrait de levure.....	0.1g
Peptone.....	0.5g
Agar.....	16 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH 6	

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre épluchées et coupées.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH 5.6	

Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Dextrose.....	40 g
Peptone.....	10 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH 5.6	

Malt Extract Agar (MEA)

Poudre d'extrait de malt.....	20g
Peptone.....	1g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

Czapek Yeast extract Agar (CYA)

K ₂ HPO ₄	1g
Czapek concentré.....	10ml
Extrait de levure en poudre.....	5g
Sucrose.....	30g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

Czapek concentré

NaNO ₃	30g
KCl.....	5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	5g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.1g
Eau distillée.....	100ml

Lugol's iodine

Iode.....	5g
Iodure de potassium.....	10g
Eau distillée.....	100ml