

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
-  
UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF

# MEMOIRE

Présenté

A LA FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET BIOLOGIE VEGETALE

Pour obtenir

Le Diplôme de Magister en Biologie végétale

OPTION : Valorisation des ressources végétales

Par

LADJAL Soumia

THEME :

**Activité antimicrobienne des métabolites secondaires  
des champignons endophytes isolés du pin d'Alep  
(*Pinus halepensis* Mill.) de la région de M'sila**

Soutenu le : 24 / 01/ 2012

Soutenu devant le Jury :

Président :	Mr. LAROUS Larbi	Professeur, UFA SETIF
Directeur de thèse:	Mr. HARZALLAH Daoud	Professeur, UFA SETIF
Examineur :	Mr. ARRAR Lekhmici	Professeur, UFA SETIF
Examineur :	Mr. ZERROUG Mohamed mihoub	Docteur, UFA SETIF

Promotion : 2011/2012

# Dédicaces

*À mes très chers parents, source de mon bonheur;*

*Mon père, et ma mère, en témoignage de ma reconnaissance  
envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour  
mon éducation ainsi que ma formation, qui m'ont toujours aidé et  
guidé vers le chemin de la réussite.*

*À mes chers frères et sœurs, pour leurs soutiens et encouragements.*

*À mes proches et toute ma famille.*

*....Je dédie ce travail*

## **Remerciements**

*Je tiens à remercier tous ceux qui ;*

*D'une façon ou d'une autre, m'ont aidé pendant mon travail de mémoire...*

*Certains par leurs conseils et leurs connaissances scientifiques...*

*D'autres par leur soutien et leur présence dans les moments les plus pénibles.*

*Mes premiers remerciements vont à mon promoteur Monsieur **Pr. HARZALLAH Daoud**, Professeur à l'université Ferhat Abbas de Sétif. Pour avoir accepté de m'encadrer et de me suivre tout au long de la réalisation de ce mémoire. Et Par son caractère de noblesse incomparable, pour sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.*

*Je pourrai cordialement lui exprimé mes profonds remerciements.*

*Mes remerciements s'adressent également à Mm. **Pr. STERFLINGER-GLEIXNER Katja**, Professeur au département de Biotechnologie, Institut de microbiologie appliquée, Université Bodenkulture, Vienne, Autriche, Par son esprit scientifique de haut niveau, sa gentillesse de lire et corriger mes questions et de m'orienter vers le plus appropriée.*

*Je voudrais également rendre un hommage particulier à ma sœur **Dr. BENTOUMI Nora**, Médecin d'unité de réanimation à l'EPH de M'sila. Pour son soutien et son aide, sa présence dans les moments les plus pénibles. Pour me permettre d'accomplir ce travail. Qu'elle reçoive à cette occasion l'expression de tout mon amour, de mes sentiments effectueux.*

*Je tiens à exprimé ma gratitude au **Pr. LAROUS Larbi**, professeur à l'université Ferhat Abbas de m'avoir fait honneur de présider le jury de soutenance. Je remercie vivement **Pr. ARRAR Lekhmici**, professeur à l'université Ferhat Abbas, Et **Dr. ZERROUG Mohamed Mihoub**, maitre de conférences à l'université Ferhat Abbas. D'avoir accepté de juger ce mémoire de magister.*

*Tous ceux qui m'ont accueilli et aidé un moment ou à un autre de mon travail. Merci à tous mes collègues pour tous les bons moments passés, pour leurs gentillesse, leurs disponibilités et leurs compétences, merci du fond du cœur. Je terminerais en rendant hommage à tous les enseignants de l'université de M'sila et de Sétif qui m'ont donné le goût des études. Leurs tâche est ingrate et trop peu souvent reconnue.*

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Exemples de mycotoxines de certaines moisissures	21
<b>Tableau 2</b>	Mycètes productrices d'antibiotiques	22
<b>Tableau 3</b>	Les caractéristiques de la station météorologique de M'sila	35
<b>Tableau 4</b>	Précipitations moyennes mensuelles et annuelles (mm)	35
<b>Tableau 5</b>	Répartition mensuelle des températures moyennes, minimales et maximales (°C)	36
<b>Tableau 6</b>	Dispositif expérimental conçu pour l'étude	41
<b>Tableau 7</b>	Le nombre moyen des segments infectés par les champignons endophytes et la fréquence de colonisation en fonction de l'âge des fragments d'aiguilles de <i>Pinus halepensis</i> .	48
<b>Tableau 8</b>	Composition générale de la mycoflore endophyte du pin d'Alep identifiée au niveau de station étudiée.	53
<b>Tableau 9</b>	La classification taxonomique des mycotaxons endophytes isolés à partir de station.	54
<b>Tableau 10</b>	Les mycotaxons endophytes identifiées et sélectionnées pour la station étudiée	58
<b>Tableau 11</b>	Test d'antagonisme d' <i>Aspergillus niger</i> S1/Antagonistes	66
<b>Tableau 12</b>	Test d'antagonisme d' <i>Aspergillus flavus</i> S2/Antagonistes	67
<b>Tableau 13</b>	Activité antibactérienne développée par l'ensemble des isolats fongiques sur les bactéries Test.	68
<b>Tableau 14</b>	Activité antibactérienne développée par l'ensemble des isolats fongiques sur <i>Candida albicans</i>	69

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Illustrations microscopiques de quelques champignons endophytes	4
<b>Figure 2</b>	Cycle de vie et modes de transmission (horizontale et verticale) du champignon endophyte systémique <i>Neotyphodium</i> (anamorphe d' <i>Epichloë</i> ) sur son hôte <i>Festuca arundinacea</i>	16
<b>Figure 3</b>	Aiguilles et pièces reproductrices du pin d'Alep ( <i>Pinus halepensis</i> Mill)	25
<b>Figure 4</b>	Carte touristique représente la situation géographique de la zone d'étude El-Haourane (M'sila)	31
<b>Figure 5</b>	Extrait de la carte géologique de Tarmount représente la zone d'étude El-Haourane de M'sila.	32
<b>Figure 6</b>	La représentation de site d'échantillonnage d'El-Haourane de M'sila.	37
<b>Figure 7</b>	Les étapes conçues pour la stérilisation superficielle et l'ensemencement des aiguilles de ( <i>Pinus halepensis</i> Mill.), selon le protocole d'HELANDER et al., (1994).	40
<b>Figure 8</b>	L'extraction des métabolites secondaires des isolats fongiques	45
<b>Figure 9</b>	Technique du test d'antibiogramme	47
<b>Figure 10</b>	Représentation graphique de taux d'infection des fragments d'aiguilles de <i>P. halepensis</i> par les mycoendophytes en fonction de l'âge des aiguilles.	49
<b>Figure 11</b>	Statut général des fréquences de colonisation après 3 jours d'observation, par les champignons endophytes des aiguilles de <i>Pinus halepensis</i> en fonction de l'âge de ces dernières.	49
<b>Figure 12</b>	Evolution du nombre de fragments d'aiguilles de pin d'Alep, infectés par les champignons endophytes durant les 3 premiers jours d'observation des unités de cultures. <b>a</b> : Les aiguilles jeunes; <b>b</b> : Les aiguilles adultes.	50
<b>Figure 13</b>	Statut taxonomique générale (en %) de la mycoflore endophyte détectée de la partie foliaire de <i>Pinus halepensis</i>	55

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AcEt</b>	Acetate d'Ethyle
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AF</b>	Aflatoxine
<b>AIA</b>	Acide 3-indolacétique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>C</b>	Chloramphénicol
<b>C.P.C.S</b>	Commission pédologique de la classification du sol
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CIT</b>	Citrinine
<b>CPG</b>	Chromatographie en phase gazeuse
<b>Dn</b>	Diamètre moyen du champignon pathogène en présence de champignon endophyte
<b>Do</b>	Diamètre moyen du champignon pathogène témoin
<b>DMSO</b>	Diméthyle solfoxyde
<b>DSE</b>	Dark septate endophyte
<b>F.A.O</b>	Food and agriculture organization
<b>FC</b>	Fréquence de colonisation
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>HR</b>	Hypersensitivity reaction
<b>I%</b>	Taux d'inhibition en (%)
<b>IARC</b>	International agency for research on cancer
<b>KET</b>	Kétoconazole
<b>MEA</b>	Malt extract agar
<b>MH</b>	Muller Hinton
<b>MS</b>	Mass of spectrophotometry
<b>NaOCl</b>	Eau de Javel
<b>Nc</b>	Nombre de segments colonisés par les champignons endophytes
<b>N.C.C.L.S</b>	National comity for clinical laboratory standards
<b>Nt</b>	Nombre total de segments colonisés par les champignons endophytes

<b>O.M.S</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>OTA</b>	Ochratoxine A
<b>PAL</b>	Phénylalanine ammonium lyase
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar

## Résumé

Les champignons endophytes, représentent une trame fongique importante qui vient juste d'être étudiée comme modèle symbiotique des végétaux supérieurs. Ces microorganismes *discrets* vivent en interaction complexes avec les plantes, colonisant toutes les parties de ces dernières, et jouent un rôle essentiel dans l'amélioration de leurs performances écologiques et physiologiques (résistance aux maladies, aux ravageurs, et aux stress physiques). A la lumière de la connaissance des traits de plus en plus intéressants des symbioses plante/champignon endophyte, nous avons jugé utile de débiter un travail portant sur l'isolement, et l'identification, et l'activité antimicrobienne des champignons endophytes à partir de la trame foliaire de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) au niveau de site du canton d'El-Haourane de M'sila. A titre d'information, ces champignons viennent d'être isolés pour la première fois à partir de ce site.

L'étude été conduite en utilisant des aiguilles aléatoirement échantillonnées à partir de sujets asymptomatiques, portant sur deux catégories foliaires. Nous constatons que les aiguilles adultes sont plus densément colonisées par les mycoendophytes que les jeunes aiguilles par une fréquence de colonisation exprimée en (FC% égale à 68.5%). Vingt-neuf mycotaxons endophytes ont été identifiés, dont la grande part taxinomique est prédominée par le groupe des champignons mitosporiques, ce qui démontre une couverture «écophysiologique» de l'interaction plante/champignons endophytes. L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la technique de contact direct par le test d'antagonisme contre *A. niger* et *A. flavus* et par le test d'antibiogramme contre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, et *C. albicans*. Les résultats démontrèrent une différence dans la sensibilité des espèces microbiennes aux composants des métabolites secondaires des mycoendophytes étudiés. Pour cela l'*E. coli* a montré une grande sensibilité, alors que *S. aureus* et *C. albicans* ont montré moins de sensibilité, et sensibilité presque limité pour le *P. aeruginosa* multi-résistant. D'autre coté, la plupart des mycoendophytes présentent des activités antifongiques plus importantes sur les deux *Aspergillus*. Et donc les mycoendophytes de genres de *Penicillium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichosporon*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*. Ont manifesté un effet antagoniste et antibiotique assez plus important contre les microorganismes pathogènes pour l'homme et pour les plantes.



# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	i
LISTE DES TABLEAUX .....	ii
LISTE DES FIGURES .....	iii
LISTE DES ABREVIATIONS .....	iv
INTRODUCTION GENERALE .....	1

## CHAPITRE. I

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. 1 LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES .....</b>	<b>3</b>
I.1.1 Théorie de l'origine endogène des endophytes .....	3
I.1.2 La biologie et la diversité écologique .....	5
I.1.3 La colonisation au sein des phytotaxans dans les tissus des végétaux .....	5
I.1.3.1 Les mycoendophytes colonisateurs des feuilles et des pousses.....	7
I.1.3.2 Les mycoendophytes colonisateurs du phloème.....	7
I.1.3.3 Les mycoendophytes colonisateurs du xylème.....	7
I.1.3.4 Les mycoendophytes colonisateurs des racines.....	7
I.1.4 La nature de l'interaction Plante/Champignons endophytes.....	9
I.1.5 Classification et diversité.....	9
I.1.5.1 Groupe des Balansieae.....	9
I.1.5.2 Les endophytes non-clavicipitacées.....	10
I.1.5.3 Les endophytes non-systémiques des poacées.....	11
I.1.5.4 Les endophytes des plantes ligneuses pérennes.....	11
I.1.6 Rôles écologiques et physiologiques.....	12
I.1.7 La virulence du partenaire fongique.....	13
I.1.8 Les réactions défensives du partenaire végétal.....	14
I.1.8.1 La résistance mécanique induite.....	14
I.1.8.2 La résistance biochimique induite.....	15
I.1.9 Transmission des champignons endophytes.....	16
I.1.9.1 Transmission verticale.....	16
I.1.9.2 Transmission horizontale.....	16

I.1.10 Les principales techniques d'isolement des champignons endophytes .....	17
I.1.10.1 Techniques d'isolement simple.....	17
<b>I.2 LES METABOLITES SECONDAIRES FONGIQUES.....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Mycotoxine.....	20
1.2.2 Antibiotiques.....	22
1.2.3 Mécanismes d'action des substances antibactériennes.....	23
1.2.4 Méthodes de séparation et identification des métabolites secondaires fongiques..	23
<b>I.3 LE PIN D'ALEP (<i>Pinus halepensis</i> Mill.).....</b>	<b>24</b>
I.3.1 Description de l'espèce.....	25
I.3.2 Critères phénologiques et croissance.....	26
I.3.3 Répartition géographique de l'espèce.....	27
I.3.4 Statut écologique du pin d'Alep.....	27
I.3.4.1 La zone altitudinale .....	27
I.3.4.2 Exigences bioclimatiques .....	28
I.3.4.3 Exigences géomorphologiques et édaphiques .....	29
<b>I.4 PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE EL-HAOURANE DE M'SILA .....</b>	<b>30</b>
I.4.1 Géologie .....	30
I.4.2 Pédologie .....	33
I.4.3 Végétation .....	33
I.4.4 Climat.....	34

## CHAPITRE. II

### **MATERIELS ET METHODES**

<b>II.1 MATERIELS.....</b>	<b>38</b>
II.1.1 Matériel végétal.....	38
II.1.2 Matériels du test d'activité antimicrobienne .....	38
II.1.2.1 Les souches microbiennes.....	38
II.1.2.2 Les milieux de cultures et les produits chimiques.....	39
II.1.2.3 L'antibiotique .....	39
II.1.2.4 L'antifongique.....	39
<b>II.2 METHODES EXPERIMENTALES.....</b>	<b>39</b>
II.2.1 La stérilisation superficielle.....	39

II.2.2 Mise en culture.....	41
II.2.3 Etude de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> des champignons endophytes.....	43
II.2.3.1 Test d'antagonisme .....	43
II.2.3.2 La fermentation fongique en milieu liquide .....	44
II.2.3.3 Test d'antibiogramme .....	46

### CHAPITRE. III

#### **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

III.1 Mise en évidence des champignons endophytes des aiguilles de pin d'Alep .....	48
III.1.1 Le taux d'infection des mycoendophytes selon l'âge des aiguilles.....	48
III.1.2 Discussion.....	51
III.2 Composition générale de la mycoflore endophyte détectée.....	52
III.2.1 L'identification des isolats fongiques .....	52
III.2.2 Discussion.....	55
III.3 La sélection des isolats fongiques producteurs des substances antimicrobiennes.....	58
III.3.1 Test d'antagonisme.....	66
III.3.2 Test d'antibiogramme.....	67
III.3.3 Discussion .....	70
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	74
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	76

#### **ANNEXES**

## INTRODUCTION GENERALE

Les plantes, en tant qu'éléments pionniers du fonctionnement des écosystèmes terrestres, vivent universellement en symbiose avec d'autres organismes microscopiques. Ces symbioses jouent des rôles extrêmement déterminants et décisifs dans le succès et la conquête des divers biotopes par le partenaire végétal.

Les champignons endophytes, représentent une trame fongique importante qui vient juste d'être étudiée comme modèle symbiotique des végétaux supérieurs. Ces microorganismes *discrets* vivent en interaction complexe avec les plantes, colonisant toutes les parties de ces dernières, Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement, et jouent ainsi un rôle essentiel dans l'amélioration de leurs performances écologiques et physiologiques (amélioration du statut nutritif, résistance aux maladies, aux ravageurs, et aux stress physiques). On outre, ils présentent un intérêt économiques, en raison à la fois de leur utilité et de leurs activités néfastes multiples: altérations des produits alimentaires et détériorations de nombreux autres domaines (production de mycotoxines, vie parasitaire aux dépend de l'homme, des animaux et des plantes).

Par ailleurs, elles synthétisent un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes: acides organiques, alcaloïdes, antibiotiques, terpènes et enzymes. Aujourd'hui, la connaissance de la biologie des moisissures est encore partielle; cependant, la compréhension des métabolismes primaires et secondaires et de la génétique de ces microorganismes permet de maîtriser de mieux en mieux leurs capacités de biosynthèse et leur mise à profit pour l'homme.

A la lumière de la connaissance des traits devenant de plus en plus intéressants des symbioses plantes/champignons endophytes, nous avons jugé utile de débiter un travail portant sur l'étude de ces mycètes chez le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.); essence forestière d'une extrême importance en Algérie, et qui se trouve dans une situation critique dans le canton d'El-Haourane de M'sila. D'autant plus, la zone d'étude caractérise par une diversité biologique importante notamment sur le plan écologique et floristique, avec dominance du pin d'Alep. Ces données laissent croire que, des souches fongiques productrices des métabolites secondaires stables à utilités biologiques peuvent être isolées et identifiées à partir d'une région considérée comme une zone de transition entre la région tellienne et steppique.

Ce travail a pour objectif: la recherche des champignons endophytes isolés du pin d'Alep et développant une activité antimicrobienne.

Le travail s'articule sur:

- Caractériser la mycoflore endophyte chez les aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. échantillonnées à partir de site du canton d'El-Haourane situé au Nord Ouest de M'sila;
- Etudier la dynamique de colonisation des aiguilles par cette trame fongique suivant la situation géographique de l'hôte et l'âge de la partie foliaire;
- Détection et isolement des mycoendophytes des aiguilles du pin d'Alep;
- Purification et l'identification des isolats fongiques obtenus;
- Sélection des isolats produisant de substances à effet antimicrobienne ;
- Production de métabolites secondaires fongiques sur un milieu liquide de fermentation;
- Extraction des métabolites secondaires fongiques bruts d'après les isolats fongiques (utilisation de solvants organiques);
- Mise en évidence d'activité antagoniste et antibiotique des isolats fongiques sur un milieu solide;

Cette étude est illustrée dans un cadre de recherche de nouvelles stratégies visant à renforcer les performances biotiques des espèces forestières menacées, notamment en matière de résistance aux maladies, insectes nuisibles et plus particulièrement à la sécheresse, eu égard aux rôles très importants que jouent les symbioses endophytes dans la protection et le maintien de la vigueur et la vitalité des hôtes sous conditions défavorables.

A photograph of a pine forest with sunlight filtering through the trees. The scene is bright and airy, with a clear blue sky and a sun flare on the right side. The trees are tall and thin, with dense green foliage. The ground is covered in grass and shadows from the trees.

*CHAPITRE. I*

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I.1 LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES

DE BARY, (1866) in WILSON (1997) utilise le terme « endophytes » pour la première fois, comme ils ont été découverts en grand nombre dans les différents tissus de diverses plantes. Outre les mycorhizes, les champignons endophytes ont été les plus étudiés dans les herbes et les feuilles des arbres.

CARROLL, (1986) définit l'endophyte comme étant un organisme qui cause des infections asymptomatiques des tissus végétaux. Ainsi, PETRINI, (1991) in WILSON (1997) développa cette définition en incluant l'ensemble des microorganismes occupant les organes du végétal, et qui pour une période du cycle de vie peuvent coloniser les tissus internes de l'hôte sans apparition de symptômes (WILSON, 1997; STROBEL *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2007; RADJI *et al.*, 2011).

En traduction littérale, le mot endophyte est dérivé du grec: «Endo» ou «Endon» c'est-à-dire «intérieur», et «phyte» ou «phyton» c'est-à-dire « plante ». Selon (HAWKSWORTH *et al.*, 1995) dans «The dictionary of the fungi», le mot "Endophyte" désigne « l'organisme qui vit dans la plante » (PIRTTILA, 2001; SCHULZ et BOYLE, 2006).

Les champignons endophytes sont des microorganismes qui sont présents dans diverses plantes; et qui sont capables de coloniser les tissus sains internes des plantes; se développent de façon intercellulaire ou intracellulaire; sans y causer des symptômes des maladies (STROBEL *et al.*, 1999), ni d'affecter négativement ou altérer le statut biologique et physiologique du partenaire végétal et former donc un type particulier d'infection dite « asymptomatique » dessine l'une des images de la symbiose mutuelle établies dans l'environnement.

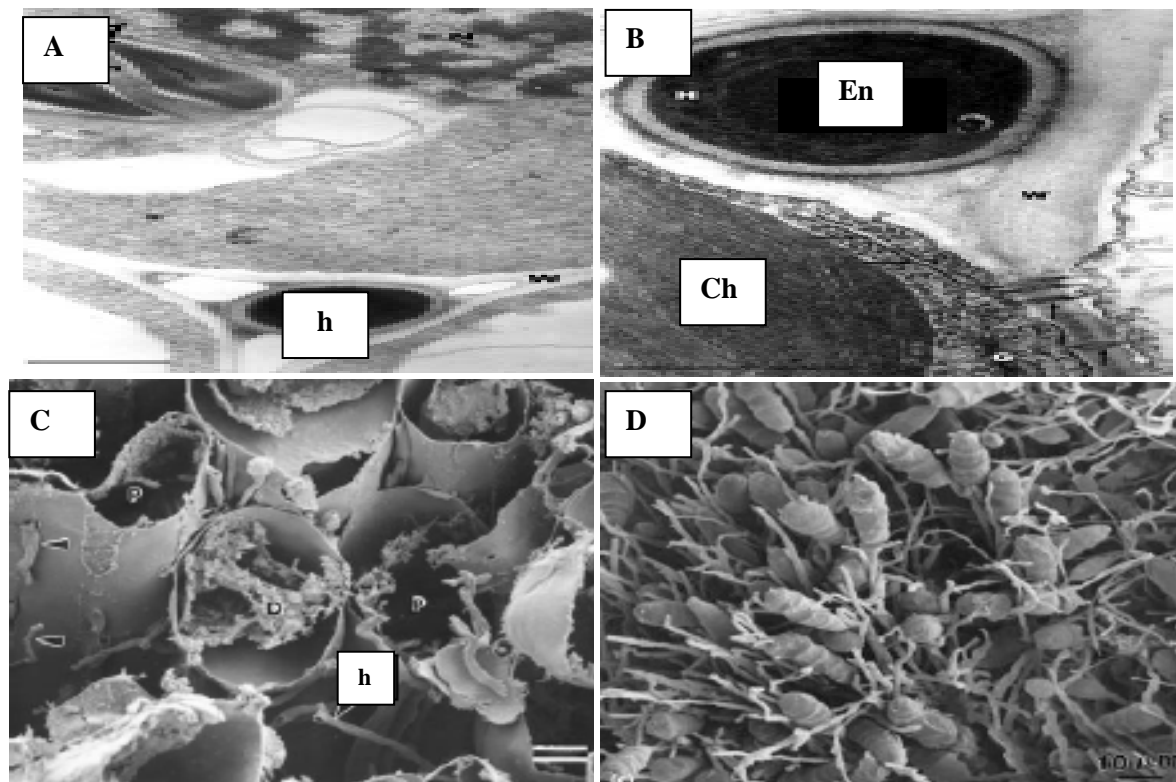
### I.1.1 THEORIE DE L'ORIGINE ENDOGENE DES ENDOPHYTES

Bien que les microbes apparaissant dans les cultures de tissus végétaux sont souvent évidentes contaminants provenant de l'extérieur des cultures, certains scientifiques ont suggérés que certains d'entre eux peuvent être des endophytes d'origine des tissus de la plante elle-même (CASSELLS, 1991; HOLLAND, 1997). La figure.1, représente quelques endophytes colonisant les tissus végétaux.

D'autre part; beaucoup d'espèces fongiques phytopathogènes sont endophytes d'origine; et d'autres étant associées aux végétaux supérieurs sont considérés comme

agents phytopathogènes quiescents ou latents, pouvant induire ainsi des maladies sur la plante-hôte une fois que cette dernière soit fragilisée dans son environnement par un ou plusieurs facteurs de nature abiotique ou biotique (CARROLL, 1988).

Indépendamment de ces théories, l'existence et l'emplacement de tous les microbes trouvés dans les cultures de tissus n'a pas été constatée dans les tissus végétaux. Ces investigations permirent la déduction d'une hypothèse énonçant que l'interaction plante/endophyte est généralement de nature « antagoniste équilibrée » entre le végétal et son agent pathogène (TAN et ZOU, 2001).



**Figure 1** : Illustrations microscopiques de quelques champignons endophytes (YATES *et al.*; 1997 STROBEL *et al.*, 1999; MOON *et al.*, 2002).

**A:** Coupe transversale dans une feuille d'*Echinopogon ovatus* infectée par l'endophyte *Neotyphodium aotearoa*, (**h**: hyphe);

**B:** Section transversale dans une feuille d'*E. ovatus* infecté par *N. australiense*; (**En**: noyau de l'endophyte, **Ch**: chloroplaste);

**C:** *Fusarium moliniforme* endophyte infectant des cellules radiculaires de Maïs ;

**D:** Conidiophores et conidies de *Cryptosporiopsis quercina*, mycoendophyte isolé de *Tripterigeum wilfordii* (Cleistocaceae).



### **I.1.2 LA BIOLOGIE ET LA DIVERSITE ECOLOGIQUE**

Les traits biologiques et écologiques des champignons endophytes sont encore mal élucidés; « la diversité, la distribution, les cycles biologiques et les interactions des champignons endophytes avec leurs plantes-hôtes et les autres groupes microbiens, ainsi que leurs actions chimiques, physiologiques et écologiques viennent juste d'être étudiées et appréciées» (ARLOND et HERRE, 2003).

La présence de ce groupe fongique particulier à la fois dans les tissus sains et altérés souligne l'incertitude des limites séparant les formes endophytes des pathogènes facultatifs (SIEBER et HOLDENRIEDER, 1999; JURC *et al.*, 2000; STONE *et al.*, 2004).

Sur le plan global, les différences comportementales entre les espèces endophytes et « pathogènes latentes » sont insignifiantes (STONE *et al.*, 2004), reflétant ainsi des contrastes en matière de durée de phases latentes ou quiescentes ainsi que les niveaux des préjudices subi par la plante-hôte courant la phase active de la croissance du champignon.

Certains champignons phytopathogènes capables d'induire des symptômes modérés sur leurs hôtes pendant une phase du cycle biologique, ainsi que des souches avirulentes ou atténuées sont considérés dans certains cas comme endophytes (FISHER et PETRINI, 1990; STONE *et al.*, 2004; D'AMICO *et al.*, 2008; FINLAY *et al.*, 2009), de même que pour une gamme d'espèces commensales et mutuelles, ayant des traits cryptiques de colonisation des plantes.

Les champignons endophytes exhibent généralement –et typiquement– une vie discrète le plus souvent entière et quelques fois partielle, courant laquelle la colonisation et la croissance peuvent cesser temporairement, mais qui reprennent à nouveau après un changement induit de la part du végétal hôte ou de l'environnement physique ou biotique (STONE *et al.*, 2004). Ce rythme de croissance épisodique est une caractéristique déterminante des endophytes en général.

### **I.1.3 LA COLONISATION AU SEIN DES PHYTOTAXANS DANS LES TISSUS DES VEGETAUX**

La colonisation des membres du règne des *Planta* par les champignons endophytes est ubiquiste. Ces organismes furent découverts pour la première fois chez les graminées fourragères par DE BARY, (1866), et chez les espèces ligneuses (*Picea canadiensis*) par LEWIS, (1924) (PIRTTILÄ, 2001). Dès lors, ce groupe fongique fut caractérisé chez une

large gamme de phytotaxons, non seulement chez les angiospermes, dans lesquels sont rangés la majorité des espèces, mais également chez les algues, mousses, hépatiques, fougères, et les gymnospermes (WILSON, 1997; SIEBER *et al.*, 1991; ARNOLD *et al.*, 2001; ARNOLD et HERRE, 2003; SURYANARAYANAN *et al.*, 2005; LUCERO *et al.*, 2006).

Les études portées sur les champignons endophytes ont été réalisées sur un large spectre de biotopes (ARNOLD *et al.*, 2001; STONE *et al.*, 2004; WILSON, 1997; SURYANARAYANAN *et al.*, 2005).

Eut égard à l'universalité des infections endophytes, la diversité des espèces fongiques en la matière est significative à l'échelle interspécifique ou intraspécifique de l'hôte. De ce fait, il est admet que les mycoendophytes peuvent représenter une trame substantielle d'espèces non découvertes encore. La spécificité des champignons endophytes à l'égard de la plante-hôte est déterminée par plusieurs facteurs: des régulateurs de nature chimique, le génotype de l'hôte, la période de l'année, et des facteurs physico-chimiques environnants (STONE *et al.*, 2004).

La colonisation des tissus internes des plantes-hôtes par les endophytes, peut être intracellulaire et limitée à quelques cellules individualisées, intercellulaire localisée ou systémique, ou bien à la fois intra- et intercellulaire (STONE *et al.*, 2004), elle peut s'avérer limitée au système racinaire comme pour les endophytes bruns cloisonnés ou DSE (*Dark Septate Endophytes*) (JUMPPONEN, 2001; SIEBER, 2002), confinée aux feuilles et aiguilles, cas de *Lophodermium* sp. ou *Rhabdocline parkeri* (SCHULZ et BOYLE, 2005), intercellulaire à la fois au niveau des racines et des jeunes pousses (cas du *Fusarium moniliforme*), ou adaptée à une croissance au niveau de l'écorce, tel est l'exemple de *Melanconium apiocarpum* chez *Alnus* (FISHER et PITRINI, 1990).

Le champignon peut infecter souvent son hôte en développant des structures particulières: les appressoriums et les haustoriums, tel est le cas pour *Discula umbrinella* (STONE *et al.*, 2004), ou en pénétrant directement la paroi cellulaire, cas de *Rhabdocline parkeri*, ou bien à travers les ouvertures naturelles du végétal (stomates et les chambres sous-stomatiques) cas de l'espèce *Phaeosphaeria juncicola* (SCHULZ et BOYLE, 2005).

A l'échelle de la partie colonisée de la plante-hôte, les champignons endophytes sont ainsi répartis en:

### I.1.3.1 LES MYCOENDOPHYTES COLONISATEURS DES FEUILLES ET DES POUSSES

Ils sont cosmopolites, c'est le type de colonisation prédominant de ce groupe. Les genres *Neotyphodium*, *Epichloë*, *Lophodermium*, *Phialophora* et *Rhabdocline* sont cités à titre d'exemples (STONE *et al.*, 2004 ; LI *et al.*, 2007).

L'infection peut être localisée ou systémique à travers les différentes parties foliaires. Bien que la colonisation des organes aériens est considérée comme étant localisée en premier ordre, cette hypothèse est basée seulement sur quelques études histologiques. Par exemple, chez les aiguilles du sapin de douglas, *Pseudotsuga menziesii*, l'endophyte *Rhabdocline parkeri* existe à une échelle d'infection discrète intracellulaire, limitée à quelques cellules épidermiques individualisées (HOFF *et al.*, 2004).

Contrairement aux Balansieae, d'autres groupes de mycoendophytes foliaires renferment des espèces qui peuvent devenir pathogènes pour la plante après une période de latence et se reproduisent même après la sénescence et la mort de l'hôte (PETRINI, 1991).

### I.1.3.2 LES MYCOENDOPHYTES COLONISATEURS DU PHLOEME

Ils sont rangés notamment dans la famille des *Arthopyreniaceae* qui renferme des espèces importantes comme *Arthopyrenia plumbaria* et *Mycoglaena subcoerulescem*. D'autres membres appartiennent essentiellement à la famille des *Rhytismataceae*. Ils sont surtout signalés chez les conifères (SIEBER, 2002).

### I.1.3.3 LES MYCOENDOPHYTES COLONISATEURS DU XYLEME

Très divers, ils incluent principalement des *Xylariaceae*: (Tels les genres *Hypoxylon* et *Xylaria*), des Diaporthales (*Phragmoportha*, *Phomopsis*...), des Hypocréales (*Nectria*,...) et quelques Basidiomycota (*Coniophora*,...) (STONE *et al.*, 2004).

### I.1.3.4 LES MYCOENDOPHYTES COLONISATEURS DES RACINES

Les champignons endophytes des racines ou « Rhizoendophytes » décrits dans le présent texte se réfèrent aux champignons non-mycorhiziens. Ces derniers sont nettement distincts de ce groupe bien qu'ils colonisent la même partie.

Les DSE ont pu être isolés à partir des racines de presque toutes les espèces végétales étudiées, les études ont été focalisées essentiellement sur des plantes cultivées (Poacées, Légumineuses) des essences forestières, ainsi que sur des membres de la famille des Ericacées (SIEBER, 2002).

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

Les genres *Cryptosporiopsis*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Microdochium*, *Phialocephala* et *Phialophora* dominent les rhizoendophytes (SIEBER, 2002), *Phialophora frontinii* est une espèce souvent inféodée aux membres des Ericacées et des Pinacées. D'autre part, *Fusarium sp.*, *Phialophora sp.*, trois races de *Gaeumanomyces graminis* (agent causal du piétin échaudage des Graminées) ainsi que *Microdochium bollelyi* peuvent prendre un aspect pathogène en plus du mode de vie endophyte (STONE *et al.*, 2004). Une catégorie distincte des champignons endophytes associés aux racines est communément appelée dans la littérature anglo-saxonne « *Dark Septate Endophytes* » ou DES. JUMPPONEN, (2001); définirent récemment les DSE comme étant des Ascomycètes stériles colonisant les racines d'une vaste gamme de plantes supérieures.

Contrairement aux espèces liées aux autres parties de la plante, la croissance des endophytes dans les racines est souvent plus marquante. Ainsi, les rhizoendophytes peuvent parfois générer des structures « ecto-mycorhizoïdes », nous ajoutons également qu'au niveau des racines de beaucoup d'espèces de la famille des *Orchidaceae* (Orchidées), la colonisation est exclusivement systémique par les espèces appartenant au genre *Rhizoctonia* et *Leptodontidium* (SCHULZ et BOYLE, 2005).

En conclusion, nous pouvons dire que la colonisation des tissus de la plante par les champignons endophytes semble différer entre la partie aérienne et la partie racinaire. Pour la majorité des endophytes étudiés, la colonisation des jeunes pousses est généralement intracellulaire, confinée à quelques cellules individuelles, ou intercellulaires mais localisées. La colonisation des racines, d'autre part, est plus ou moins extensive mais elle peut être à la fois intra- ou intercellulaire.

Des structures spécialisées lesquelles sont présumées à améliorer les échanges des métabolites, ont été observées au niveau de toutes les strates infectées de la plante. Nous pouvons déduire que les différences qui marquent l'aspect de la colonisation des tissus entre la partie aérienne et souterraine de la plante-hôte, sont des résultantes de l'action

combinée de plusieurs facteurs, entre autres: les différences anatomiques et la qualité des flux bidirectionnels des nutriments entre les deux partenaires.

#### **I.1.4 LA NATURE DE L'INTERACTION PLANTE / CHAMPIGNONS ENDOPHYTES**

Au sein des interactions champignons phytopathogènes / plantes-hôtes, il est connu ainsi que le partenaire fongique est capable de synthétiser des substances toxiques destinées contre la plante-hôte. Cette dernière, à son tour, peut disposer d'un arsenal de métabolites de défense et, à la rencontre d'un champignon envahisseur, peut également activer une gamme de réactions défensives, qui englobe non seulement une résistance mécanique (exemple: dépôts de calloses et formation des papilles), mais également une activation des métabolites inducteurs de défense tels que l'acide jasmonique (TAN et ZOU, 2001; KOHN, 2005).

Il est donc fort nécessaire de poser deux principales questions : dans quelle mesure nous pouvons considérer ou évaluer la virulence potentielle d'un champignon endophyte dans une telle interaction asymptomatique entre ce dernier et la plante-hôte ? Ainsi, l'hôte, répond-il à la colonisation de l'endophyte par réaction de défense comme il l'exhibe à l'égard d'un pathogène ?

#### **I.1.5 CLASSIFICATION ET DIVERSITE**

Les champignons endophytes représentent un groupe écologique et taxinomique extrêmement diversifié, nous nous limiterons dans cette revue bibliographique, à traiter seulement quelques groupes majeurs.

A l'échelle taxonomique des partenaires fongiques et végétaux, on distingue :

##### **I.1.5.1 GROUPE DES BALANSIEAE**

Deux genres de la tribu des Balansieae (*Clavicipitaceae*, Ascomycota) renferment des membres endophytes: *Epichloë* et *Balansia* (STONE et al., 2004), associés essentiellement aux membres de la famille des Poacées, Cypéracées et des Juncacées (WILSON, 1997; MÜLLER et KRAUSS, 2005).

Le genre *Balansia* comprend également une phase de vie asexuée ou anamorphe, et de se fait, ces formes imparfaites sont rangées au sein du genre *Ephelis* (STONE et al., 2004). Les *Epichloë* développent leurs structures reproductrices au niveau des méristèmes des inflorescences de la plante-hôte, mais ils peuvent également coloniser une partie des

feuilles avoisinantes, ainsi, les mycéliums sont généralement détectés sur toutes les parties du végétal (MALINOWSKY et BELESKY, 2000; STONE *et al.*, 2004).

MORGAN-JONES et GAMS, (1982) in MALINOWSKI et BELESKY, (2000) catégorisèrent la section des *Albo-lanosa* pour décrire les anamorphes de *Epichloë* rangés au sein du genre *Acremonium* inféodé notamment aux membres de la sous-famille des *Poidae*. En se basant sur la biologie et les affinités phylogénétiques avec le genre *Epichloë*, les membres anamorphes ont été récemment attribués au genre *Neotyphodium* (STONE *et al.*, 2004). Cette nouvelle révision de la classification vers le genre *Neotyphodium* vise à séparer les *Acremonium* aux affinités endophytes (*E-endophytes*) des *Acremonium* aux affinités saprophytes.

Les espèces appartenant au genre *Neotyphodium* sont rencontrées généralement chez les Poacées (notamment la sous-familles des *Poidae*) des zones tempérées de l'hémisphère Nord (STONE *et al.*, 2004). Les espèces *Neotyphodium coenophialum* et *N. uncinatum* sont spécifiquement associées à *Festuca arundinacea* et *F. pratensis*, respectivement (MALINOWSKI et BELESKY, 2000).

Les endophytes Balansieae produisent une gamme diverse de métabolites secondaires dont plusieurs furent l'objet d'études pour leurs implications dans l'apparition des syndromes toxiques chez les mammifères herbivores qui s'alimentent de fourrages infectés par *Neotyphodium* et *Epichloë* (LANE *et al.*, 2000; SCHULZ et BOYLE, 2005). Ce sont principalement des alcaloïdes insecticides tels que la Péramine et les Lolines, et des alcaloïdes anti-vertébrés comme la Lolitrème B et l'Ergovaline (SCHARDL, 2001, FAETH *et al.*, 2002). Bien que la plus part des métabolites sont d'origine fongique, il ya pourtant évidence à une interaction biosynthétique dont les acteurs sont à la fois le partenaire endophyte et la plante-hôte (SCHULZ et BOYLE, 2005).

#### **I.1.5.2 LES ENDOPHYTES NON-CLAVICIPITACEES**

D'autres mycoendophytes non-Clavicipitacées sont signalés chez les Poacées en particulier. L'espèce *Pseudocercospora trichachnicola* est abondante chez des Poacées spécifiques aux zones chaudes du globe; cas de *Trichachne insularis* (STONE *et al.*, 2004).

Ce groupe renferme également les champignons du genre *Glicocladium* et *Phialophora* (*Glicocladium-like endophytes* et *Phialophora-like endophytes*) isolés à partir des semences de diverses Poacées prairiales (MALINOWSKI et BELESKY, 2000; STONE *et al.*, 2004). Ces types sont connus sous le nom d'endophytes «P» (*P-Endophytes*; P pour

*Phialophora*). Les *P-Endophytes* diffèrent des *E-Endophytes* au niveau des aspects de croissance mycélienne, la colonisation des tissus foliaires, et leur restriction au niveau des semences, la colonisation des racines, ainsi que leurs aptitudes à sporuler sur l'hôte et la synthèse des alcaloïdes qui est souvent insignifiante. Ils peuvent coexister chez la même plante-hôte (STONE *et al.*, 2004).

#### **I.1.5.3 LES ENDOPHYTES NON-SYSTEMIQUES DES POACEES**

Ils sont attribuées aux formes épiphytes ou pathogènes qui sont largement signalées, entre autres: *Alternaria alternata*, *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Epicoccum purpurascens*, *Didymella phleina*, *Stemphyllium botryosum*, *Arthrinium sp.*, et *Cladosporium tenuissimum* (SIEBER, 2002; FISHER et PETRINI, 1990; STONE *et al.*, 2004).

#### **I.1.5.4 LES ENDOPHYTES DES PLANTES LIGNEUSES PERENNES**

Une grande proportion de champignons endophytes est fréquemment signalée chez les arbres et les arbustes. Ils appartiennent essentiellement à la classe des Ascomycètes (phylum des Ascomycota). Les espèces sont souvent attribuées sur le plant taxonomique aux ordres des Rhytismatales, et des Leotiales (notamment les familles des *Phacidiaceae* et *Hemiphacidiaceae*). Des exemples typiques concernent: *Fabrella tsugae*, spécifique des *Tsuga*, et *Lophodermium* qui est très fréquent chez les conifères (DECKERT, 2000).

Cependant, ces informations doivent être prise avec prudence car plusieurs études indiquent qu'une grande trame mycoendophyte est composée essentiellement par des membres appartenant aux champignons mitosporiques (ou Deutéromycètes) (DECKERT, 2000; SURYANARAYANAN et THENARASAN, 2004).

Les champignons appartenant au genre *Rhytisma* (comme *R. punctata* sur Acéracées) et *Coccomyces*, sont signalés chez plusieurs espèces feuillus, ainsi que d'autres arbustes et arbrisseaux. Ces champignons sont caractérisés par l'initiation de structures fructifères parallèlement à la période de sénescence des feuilles, leur émergence débute via les spores asexuées avec le déclenchement de l'activité physiologique de l'hôte (DECKERT, 2000).

Des espèces fongiques endophytes de la famille des *Xylariaceae* sont également fréquentes et représentent un groupe typique chez les espèces ligneuses, bien qu'ils soient également présents chez certaines espèces herbacées (ARNOLD *et al.*, 2001 ; PETRINI, 1991).

Les *Xylariaceae* anamorphes comme ceux appartenant aux genres *Hypoxylon*, *Biscogniauxia*, *Camillea* et *Nemania* colonisent fréquemment des espèces de différentes familles botaniques, essentiellement en zones tempérées, mais leur présence est de moins en moins signalée au niveau des zones tropicales, où le genre *Xylaria* prédomine (STONE *et al.*, 2004).

Le rôle essentiel des Xylariacées endophytes est encore mal élucidé, une des hypothèses en la matière énonce que ces champignons sont des colonisateurs quiescents et qui changent ensuite de comportement trophique en dégradant la cellulose et la lignine des feuilles du végétal infecté une fois qu'il arrive à la phase de sénescence (DAVIS *et al.*, 2003).

### **I.1.6 ROLES ECOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES**

L'ubiquité et l'hyperdiversité des mycoendophytes supposent que ces derniers peuvent jouer des rôles extrêmement importants dans le fonctionnement des écosystèmes, ainsi, il est probable que leurs actions au sein d'un biotope donné sont multiples (DECKERT, 2000; RUDGERS *et al.*, 2005).

DECKERT, (2000) considère que l'endophytisme peut refléter une stratégie caractéristique des organismes opportunistes d'être présents et actifs lorsque les conditions deviennent convenables pour le développement éventuel d'une maladie sur l'hôte.

Pour beaucoup d'espèces forestières, notamment les conifères, la communauté mycoendophyte renferme une vaste gamme d'espèces potentiellement pathogènes, ou modérément commensales. Mais le spectre de leur interaction symbiotique mutuelle avec leurs hôtes est encore mal compris (DECKERT, 2000).

En contre partie de la nutrition offerte par la plante-hôte, les champignons endophytes confèrent à cette dernière la capacité de maintenir et d'améliorer ses performances biotiques même sous conditions écologiques sévères par la protection contre beaucoup de ravageurs et d'agents phytopathogènes et même contre des facteurs de stress abiotiques (stress hydrique, salin, radiatif, pollution,...) (CARROLL, 1986; AZEVEDO *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Les champignons endophytes jouent également un rôle déterminant en matière d'assimilation des éléments minéraux (N et P notamment) (MALINOWSKI et BELESKY, 2000).



Dans ce contexte de bioprotection, il a été constaté que les plantes colonisées par ce groupe fongique se développent mieux, ceci est dû en partie à la synthèse de certains types de régulateurs de croissance tels que l'acide 3-indolacétique (AIA) et des cytokinines (TAN et ZOU, 2001).

Il est admet que le statut quantitatif et notamment qualitatif des champignons endophytes foliaires et la sénescence des feuilles sont étroitement corrélés. Bien que la nature de cette relation demeure mal élucidée, il est apparent, que les endophytes sont parmi les premiers microorganismes à envahir les tissus morts des feuilles, et de ce fait, contribuent dans le cycle biogéochimique dans les écosystèmes forestiers (DECKERT, 2000).

Avant l'abscission et la tombé des feuilles sur le sol, les champignons endophytes ayant-les premiers- l'opportunité d'exploiter les ressources nutritives à partir des feuilles mortes, avant qu'elles soient disponibles pour les autres trames microbiennes du sol. Selon WILSON, (1997) ce changement marquant de l'aspect trophique de ces organismes contribue dans le succès de l'endophytisme.

### **I.1.7 LA VIRULENCE DU PARTENAIRE FONGIQUE**

Au sein de la communauté fongique, seulement quelques espèces (8000 parmi les 60000 espèces étudiées) ayant les capacités d'induire des maladies chez les végétaux supérieures, ces organismes doivent franchir plusieurs barrières et surmonter les réactions défensives de la plante. Ceci est rendu possible par la mise en disposition de certains facteurs de virulence, notamment les métabolites phytotoxiques et les exo-enzymes (VIDHYASEKARAN, 2004).

Nous avons déjà mentionné que beaucoup d'endophytes synthétisent des métabolites secondaires qui sont ainsi efficaces contre une large gamme de phytotaxons testés. Dans un test pour le potentiel de virulence, effectué *in vivo* par SCHULZ, une inoculation en série par une gamme de champignons endophytes sélectionnés avait été appliquée sur des plantules de haricot (*Phaseolus vulgaris*), il a été observé que certaines espèces exhibent une forte activité sécrétrice épiphyte de certaines substances phytotoxiques et/ou d'exo-enzymes, causant par conséquence des symptômes pathogéniques, ce qui « suggère que les métabolites actifs sont également produits après

l'inoculation » (SCHULZ\*, Communication personnelle, Mai 2005). Des résultats similaires ont été obtenus par GUSKE *et al.*, (1996) in SCHULZ et BOYLE, (2005).

Les exo-enzymes sont considérées également comme facteurs de virulence. Tel est le cas pour les champignons phytopathogènes, les champignons endophytes sont capables de métaboliser les substrats qui se localisent sur la surface de l'hôte ou sur ses parois cellulaires, par la synthèse des protéases, amylases, phénol-oxydases, lipases, laccases, polyphénoloxydases, cellulases, mannases, xylanases et des pectines lyases (SIEBER *et al.*, 1991 ; PETRINI, 1991 ; SCHULZ et BOYLE, 2005).

Les limites d'implication des exo-enzymes et des toxines dans les phénomènes de colonisation des végétaux sont inconnues. Une question est ainsi posée: pourquoi ne se développe pas la maladie chez la plante durant sa colonisation par les endophytes ?

### **I.1.8 LES REACTIONS DEFENSIVES DU PARTENAIRE VEGETAL**

STONE *et al.*, (2004) in SCHULZ et BOYLE, (2005) signalèrent que les réactions défensives actives de la plante-hôte déclenchées par l'invasion initiale, sont responsables de la restriction de la colonisation endophyte, surtout lorsque des études prouvèrent l'induction et l'activation de la résistance de la plante à l'égard des champignons, traduite par différents mécanismes (FAETH, 2002).

Les mécanismes sont ainsi présentés comme suit:

#### **I.1.8.1 LA RESISTANCE MECANIQUE INDUITE :**

Dans la plupart des interactions champignons endophytes/plantes, aucune des réactions défensives mécaniques n'a pu être observée (STONE *et al.*, 2004; BOYLE *et al.*, 2001; SCHULZ et BOYLE, 2005). Cependant, la formation des papilles a été signalée au niveau des cellules adjacentes des sites d'infection par *Stagonospora innumerosa* et *Drechslera* sp. Sur *Juncus effusus* (Juncacées). Ainsi, NARISAWA *et al.*, (2004) in SCHULZ et BOYLE, (2005) ont recordé un épaissement des parois cellulaires des racines du chou chinois colonisé par des DSE non identifiés. Alors que YATES *et al.*, (1997) ont marqué un dépôt accéléré de la lignine chez des plantules de maïs infectées par la forme endophyte de *Fusarium moniliforme*.

---

\* Barbara SCHULZ: Institute of Microbiology, Technical University of Braunschweig, Spielmannstr. 7, D-38106, Germany.

### I.1.8.2 LA RESISTANCE BIOCHIMIQUE INDUITE :

L'activité des peroxydases et la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont diagnostiques pour une telle réponse défensive rapide. Des réactions d'hypersensibilité (HR) ont été attribuées à l'accumulation des électrolytes au niveau des cellules épidermiques des feuilles de hêtre (*Fagus sylvatica*) colonisées par *Discula umbrinella* (SCHULZ et BOYLE, 2005). BISHOP *et al.*, (2002) démontrèrent que l'augmentation de l'activité peroxydasique est fortement corrélée à l'induction de trois nouvelles isoenzymes lorsque des plantules de blé avait été inoculées par un endophyte, mais pas après colonisation par un pathogène.

Il semble également que l'induction et le déclenchement rapide qui marque la réaction défensive biochimique contribue dans la limitation de la croissance et la virulence de certains types de champignons endophytes.

Les métabolites phénoliques, généralement toxiques pour les microorganismes, sont très fréquemment produits par les plantes et souvent impliqués dans les réactions défensives de ces dernières. La déposition des substances phénoliques comme réponse à l'infection par les endophytes a été observée par STONE, (1988) et par CABRAL *et al.*, (1993) ayant indiqué également la pigmentation des tissus adjacents aux sites d'infection, on note également que ces composés sont connus généralement pour leurs activités inhibitrices des enzymes fongiques (DEACON, 2006).

La phénylalanine ammonium lyase (PAL) est l'une des enzymes marquantes de la réaction défensive de la plante qui met en implication les composés phénoliques (VIDHYASEKARAN, 2004). En effet, PETERS *et al.*, (1998) in SCHULZ et BOYLE (2005) ont trouvé que l'activité des PAL et la concentration des métabolites phénoliques solubles sont revues à la hausse suite à une confrontation dans des cultures mixtes de quelques champignons endophytes et des plantules de *Lamium purpureum*. Ceci revient à la réponse cellulaire de la plante au contact des composés de la paroi cellulaire fongique (des glycoprotéines, des glycolipides ou des oligosaccharides...) Chez les racines d'orge, l'augmentation de la concentration en phényl-propanoïdes est d'autant plus marquante suite à une infection endophyte par rapport à l'infection pathogène (SCHULZ et BOYLE, 2005), ainsi, BISHOP *et al.*, (2002) ont pu détecter la présence d'aldéhydes aromatiques au niveau des points de contact entre des mycoendophytes et les tissus épidermiques, mésophylles et vasculaires de l'hôte.

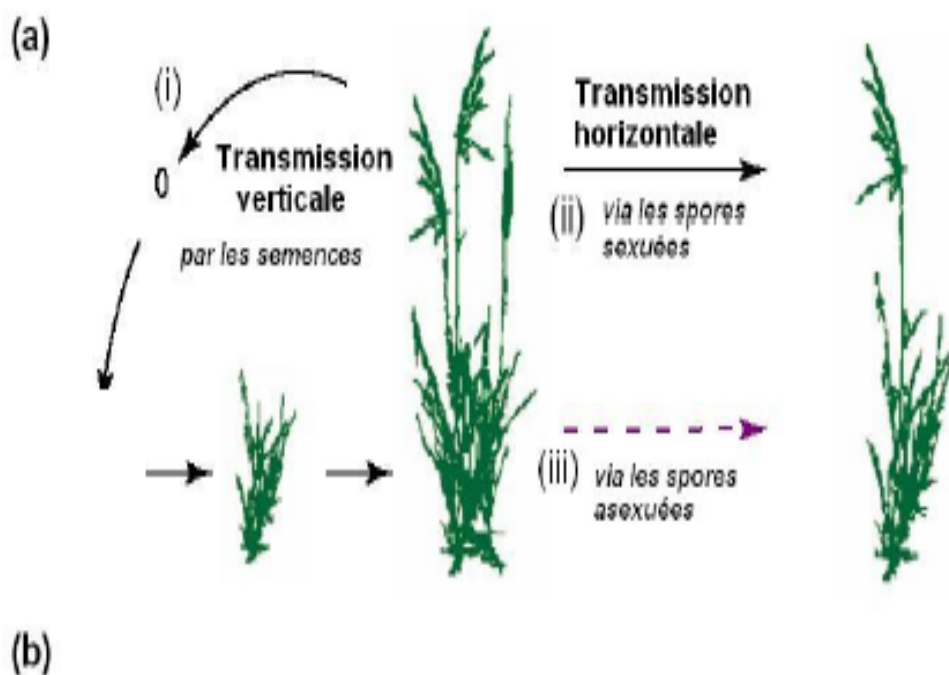
## I.1.9 TRANSMISSION DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES

### I.1.9.1 TRANSMISSION VERTICALE

Les champignons endophytes se transmettent à partir de la plante-hôte vers la descendance. Les semences du végétal portent elles-mêmes leurs propres inoculum d'endophytes. La transmission est effectuée généralement via les formes végétatives du champignon. Ce mode de transmission est connu notamment chez les Graminées (FAETH, 2002), comme il est montré dans la figure.2.

### I.1.9.2 TRANSMISSION HORIZONTALE

Elle s'effectue entre les plantes de la même espèce ou d'espèces différentes via les spores. Ces spores sont déposées sur les différentes parties du végétal, en particulier les feuilles. Sur cacaoyer, on estime à plus de 10000 le nombre moyen de spores déposées quotidiennement sur une feuille bien développée (ARNOLD *et al.*, 2001). (Figure.2).



**Figure 2:** Cycle de vie et modes de transmission (horizontale et verticale) du champignon endophyte systémique *Neotyphodium* (anamorphe de *Epichloë*) sur son hôte *Festuca arundinacea* (SAIKKONEN *et al.*, 2004).

### **I.1.10 LES PRINCIPALES TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES**

Les investigations concernées aux champignons endophytes focalisent généralement l'autécologie, la synécologie et la biodiversité de ces organismes au niveau des environnements naturels. Les études écologiques ciblent en principe les différents aspects de l'environnement mycologique des plantes-hôtes, ou des types spécifiques d'habitats, ainsi que la distribution des mycotaxons endophytes au sein de l'hôte (PETRINI, 1991).

D'autres études se concentrent sur des interactions symbiotiques plus compliquées, impliquant à la fois: les champignons endophytes, leurs hôtes et les insectes (CLEMENT *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2000).

Parmi les principales méthodes utilisées pour l'étude des champignons endophytes, on trouve:

- Techniques d'isolement simple;
- Techniques d'électrophorèse des protéines et zymogrammes;
- Techniques immunologiques;
- Techniques histologiques;
- Techniques moléculaires.

La méthode envisagée pour l'étude des champignons endophytes dans notre travail est représentée comme suit :

#### **I.1.10.1 TECHNIQUES D'ISOLEMENT SIMPLE**

Ce sont les méthodes les plus communes, appliquées pour la détection et l'isolement des champignons à partir des tissus végétaux ayant subi une stérilisation (désinfection) superficielle préalable. Cette dernière est portée sur des fragments échantillonnés de la plante-hôte (feuilles, fleurs, fruits, semences, tiges, écorce, racines,...), le principal objectif de cette opération est l'élimination de la microflore épiphyte qui renferme des organismes fongiques et bactériens notamment, qui exhibent une croissance spectaculaire et un développement concurrentiel pouvant ainsi rendre l'étude peu fiable; on procède ensuite à la fixation de ces fragments sur milieux de cultures synthétiques ; et l'incubation sous conditions données (température, humidité et lumière, pH...).

La procédure de la stérilisation superficielle varie selon les objectifs visés, de l'espèce végétale étudiée, et des types des tissus choisis. Elle consiste à des traitements en série du tissu végétal échantillonné par des agents désinfectants: des oxydants tels que l'Eau de Javel (NaOCl); l'Eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); et le Permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>) (STONE *et al.*, 2004). Des agents humidifiant aux effets antiseptiques moindres (l'éthanol 70-95%). Ces traitements sont effectués généralement par alternance avec des lavages à l'Eau distillée stérilisée (Voir Annexe. II).

La caractérisation des colonies fongiques développées sur les milieux de cultures (boîtes de Pétri) est effectuée après quelques temps d'incubation. Ainsi, il est possible d'identifier les différents mycotaxons endophytes sur des bases morphologiques, biochimiques et moléculaires.

#### **MILIEUX DE CULTURE ET INCUBATION**

Généralement, les milieux de culture conçus pour l'étude des champignons endophytes sont pareils à ceux envisagés dans les études mycologiques générales. Le MEA (*Malt Extract Agar*) et le PDA (*Potato Dextrose Agar*) sont typiquement utilisés (STONE *et al.*, 2004; SURYANARAYANAN *et al.*, 2002; DEACON, 2006). Certains auteurs, en revanche, préfèrent utiliser des milieux appauvris, tels que les géloses nutritives simples (*Nutrient Agar*) afin de réduire les contaminations éventuelles.

Les conditions d'incubation optimale varient selon le tissu étudié. Eut égard que la croissance des champignons endophytes et souvent lente, des périodes d'incubation plus ou moins prolongées sont recommandées.

L'efficacité de l'incubation est liée aux conditions thermiques, hygrométriques et photoniques de celle-ci. Même si peu de connaissances concernant l'influence de ces facteurs physiques sur l'émergence des endophytes, la température d'incubation doit refléter les conditions naturelle, ainsi, le spectre thermique souvent adopté se situe entre 18 et 25°C (STONE *et al.*, 2004).

## I.2 LES METABOLITES SECONDAIRES FONGIQUES

Beaucoup de mycètes et de bactéries peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires (DEMAIN et FANG, 2000). Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que, leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même et ils sont de structure et d'activité biologique très diverses. Habituellement, ils sont sécrétés sous forme de mélange qui représente une structure chimique unique (HAWKSWORTH *et al.*, 1995; BOIRON, 1996).

Les microorganismes ne produisent pas leurs métabolites secondaires avant d'avoir terminé leur phase de croissance et d'avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase. En effet, le métabolite secondaire peut être un produit d'un métabolite primaire du même microbe (CALVO *et al.*, 2002; TORTORA *et al.*, 2003), qui se forme (le métabolite primaire) au moment où les cellules se divisent durant la phase de croissance logarithmique appelée trophophase (TORTORA *et al.*, 2003).

Les métabolites secondaires peut avoir des activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressive et toxiques (mycotoxine et phytotoxine) (JAE-HYUK et KELLER, 2005; KELLER et WOOBOK, 2005).

Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation (HAPWOOD, 1988; MAPLESTON *et al.*, 1992; STONE et WILLIAMS, 1992; DEMAIN et FANG, 2000; CALVO *et al.*, 2002). Les métabolites secondaires peuvent avoir certaines activités:

- Métabolites qui activent la sporulation (Acide linoléique et ses dérivés produit par *Aspergillus nidulans*) (CHAMP *et al.*, 1987; CHAMP et EL-ZAYAT, 1989; MAZUR *et al.*, 1991; CALVO *et al.*, 2001);
- Pigments nécessaires (mélanine) pour la formation des spores sexuelles et asexuelles (KAWAMURA *et al.*, 1999);
- Métabolites toxiques sécrétés par des colonies à la période approximative de la sporulation (la biosynthèse des mycotoxines) (TRAIL *et al.*, 1995; HAPWOOD, 1988; ALSPAUGHT *et al.*, 1997).

Ultérieurement, les métabolites secondaires peuvent :

- Retarder la germination des spores jusqu'à ce que les conditions environnementales soient favorables;
- Protégent les spores en dormance contre des amibes;

- Eliminer les microorganismes concurrents pendant la germination dans l'environnement (DEMAIN et FANG, 2000).

### I.2.1 MYCOTOXINES

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires peu volatiles, de faible poids moléculaire, élaborés par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales. A l'heure actuelle plusieurs milliers de molécules toxiques de certaines espèces de moisissures connues comme ayant la capacité de produire des toxines ont été identifiées, mais seule, une vingtaine de familles posent des problèmes en nutrition humaine ou animale (CAHAGNIER *et al.*, 1998).

L'origine chimique des mycotoxines est très diverses. Il y aurait, selon les auteurs, jusqu'à 400 mycotoxines répertoriés (ETZEL, 2002), certaines dérivent, des acides aminés (Alcaloïdes de l'Ergot, Acide aspergillique, Acide cyclopiazonique, Slaframmine, Gliotoxine, Roquefortine, Sporodesmine), des polycétoacides (Aflatoxines, Ochratoxines, Patuline, Citrinine. Acide pénicillique, Stérigmatocystine, Earalénone), des dérivés terpéniques (Diacétoxyscirpénol, Fusarénone, Désoxyrnivalénol, Roridines, Toxine T-2, Verrucarine) ou encore des dérivés d'acides gras (Fumonisines, Alternariol) (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999). Leur biosynthèse est dépendante de plusieurs facteurs, dont la température, l'intensité lumineuse, le dioxyde de carbone dans l'air, les éléments nutritifs disponibles et la présence d'autres espèces en compétition (HENDEY et COLE, 1993).

Les mycotoxines se retrouvent dans le mycélium et les spores et peuvent diffuser dans le substratum. Plusieurs de ces toxines sont relativement stables et leur toxicité peut persister longtemps et ce même lorsque les cellules fongiques ne sont pas viables. Il faut toutefois noter qu'il n'existe actuellement pas de données sur la durée précise de cette toxicité.

Chaque mycotoxines n'est pas nécessairement spécifique à une moisissure donnée. La gliotoxine, par exemple: peut aussi bien être produite par *Aspergillus fumigatus* que par *Trichoderma viridae*. De même, une moisissure donnée peut produire plusieurs toxines; *Aspergillus fumigatus*, agent étiologique de certaines atteintes pulmonaires, fabrique plus de huit toxines différent (MAHEUX, 1998).

Six groupes de mycotoxines sont produits par trois principaux types de champignons: *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Parmi elles, les plus connues les Aflatoxines (AFs) sont des substances hautement toxiques car elles sont cancérogènes et



tératogènes, provoquant des cancers hépatiques et extra hépatiques humains (IARC, 1993; MASSEY *et al.*, 1995; CASTEGNARO, 1999; HUSSEIN et BRASEL, 2001; INSPQ, 2002). l'Ochratoxine A (OTA) et la Citrinine (CIT) sont produites par les *Aspergillii* (*Aspergillus ochraceus*, *A.carbonarius*, *A. niger*) ou *Penicillia* (*Penicillium viridicatum*, *P.verrucosum*, et *P.cyclopium*). Il a été rapporté que l'OTA est hautement cancérigène pour le rein et tératogène (IARC, 1993; PFOHL-LESZKOWICZ, 1999; MANDERVILLE et PFOHL-LESZKOWICZ, 2006; PFOHL-LESZKOWICZ et MANDERVILLE, 2007). Plusieurs études ont démontré l'implication de l'OTA et de même la CIT dans certaines néphropathies épidémiques à l'homme et à l'animal (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999, BENNETT et KLICH, 2003, CASTEGNARO *et al*, 2006). De plus, la CIT amplifie l'effet cancérigène induit par l'OTA (KANIZAWA, 1984). Le Tableau.1; récapitule la majorité des mycotoxines répertoriées.

**Tableau 1:** Exemples de mycotoxines de certaines moisissures (HALEWYN *et al.*, 2001).

GENRE	ESPECES	PRINCIPALES MYCOTOXINES
<i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>	Altertoxine I, II, alterariol, altenuisol, acide tenuazoïque
<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	Aflatoxine B1 et B2, citrine
	<i>A. fumigatus</i>	Fumigaclavine, fumigatoxine, fumitremorgène, gliotoxine, acide helveolique, etc.
	<i>A. niger</i>	Acide oxalique
	<i>A. versicolor</i>	Aspercolorine, sterigmatocystine, versicolorine
<i>Chaetomium</i>	<i>C. spp</i>	Chaetomine
	<i>C. globosum</i>	Chasetoglobosine
<i>Cladosporium</i>	<i>C. spp</i>	Cladosporine, émodine, acide épycladosporique
<i>Fusarium</i>	<i>F. spp</i>	Trichotécènes (type B), toxine T2, fumonisine, vomitoxine, zearalenone
<i>Memnoniella</i>	<i>M. spp</i>	Griseofulvines, trichotécènes, (trichodermol, trichodermine)
<i>Penicillium</i>	<i>P.brevicom pactum</i>	Brevianamide A, acide mycophénolique
	<i>P. expansum</i>	Citrinine, patuline
	<i>P. viridiatum</i>	Acide pénicillique, griseofulvines, ochratoxines, brevianamide A, acide mycophenolique
<i>Stachybotrys</i>	<i>S.chartarum</i>	Trichotécènes: satratoxine F, G et H, lacone, roridine, trichoverrine, sporidesmine G, verrucarine J
<i>Trichoderma</i>	<i>T.viride</i>	Trichodermine, trichoverrine, stratoxine, gliotoxine, fumitremorgène, iso-cyanide, toxine T-2.

## I.2.2 ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des substances chimiques et/ou organiques produites par un petit nombre de microorganismes et exerçant une action toxiques envers d'autres microorganismes dont principalement les bactéries. Cette action peut être seulement inhibitrice de la croissance, elle est alors bactériostatique et réversible, mais elle peut aussi être létale et dans ce cas elle est bactéricide et irréversible. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (PRESCOT *et al.*, 1995).

Parmi un total de quelques 10700 antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent des champignons. La répartition des organismes producteurs dans les différentes classes ou ordres fongiques est fonction non seulement des capacités de synthèse mais aussi de la fréquence des diverses espèces dans la nature et de leur aptitude à se développer facilement en culture. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ainsi que les espèces de l'ordre des Monilliales constituent les réservoirs les plus importants (BOTTON *et al.*, 1990). Le tableau.2 : représente des antibiotiques produits par certains champignons.

**Tableau 2:** Mycètes productrices d'antibiotiques (LARPANT LARPANT–GOURGUAND, 1996).

ORGANISMES PRODUCTEURS	ANTIBIOTIQUES
<i>Aspergillus flavus</i>	Acide aspergillique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilline
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Céphalosporine
<i>Cephalosporium caerulens</i>	Cérulinine
<i>Fusidium coccineum</i>	Acide fusidique
<i>Helminthosporium siccans</i>	Siccanine
<i>Paecilomyces variotti</i>	Variotine
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pénicilline
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griséofluline

Bien que les antibiotiques ne soient pas obligatoires pour la sporulation chez les mycètes, cependant, certains d'eux stimulent la formation de spores et empêchent la germination (DEMAIN et FANG, 2000).

### **I.2.3 MECANISMES D'ACTION DES SUBSTANCES ANTIBACTERIENNES**

Les facteurs les plus importants de l'activité biologique dans composé donné sont ses propriétés physico-chimiques, sa structure chimique, arrangement stérique de ses atomes et la présence des parties bioactifs dans sa structure (BETINA, 1989).

Biochimiquement, les modes d'action des substances antimicrobiennes peuvent être divisées en quatre catégories (RILY et NORRED, 1996):

- L'interaction avec l'ADN;
- L'inhibition des différentes étapes de la synthèse de protéines;
- Les effets sur les membranes cytoplasmiques;
- L'effet sur le métabolisme énergétique;
- Par ailleurs, ces différents modes d'action peuvent être étudiés par les méthodes suivantes (BETINA, 1989);
- Interaction avec des biomolécules (ADN; au niveau moléculaire);
- Interaction avec des enzymes dans des réactions enzymatiques;
- Interaction avec les cellules libérant les systèmes de défenses (effet sur ARN, synthèse d'ARN ou de protéine);
- Interaction avec des composants de la cellule (mitochondries ou membranes);
- Interaction au niveau cellulaire (culture cellulaire);
- Interaction au niveau des tissus et des organes après l'administration a un organisme vivant.

### **I.2.4 METHODES DE SEPARATION ET IDENTIFICATION DES METABOLITES SECONDAIRES FONGIQUES**

Parmi les méthodes les plus utilisées dans ce genre de recherche est la chromatographie. Les techniques de chromatographie sont développées avec une rapidité, au cours de ces 40 dernières années, que leur utilisation en chimie analytique est devenues incontournables tant au laboratoire de recherche qu'au laboratoire de contrôle. A l'origine, ces techniques sont utilisées pour la séparation des substances colorées (d'où son nom), la chromatographie est aujourd'hui une méthode puissante d'analyse qualitative et quantitative comme la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (NEILSON, 2000).

### I.3 LE PIN D'ALEP (*Pinus halepensis* Mill.)

Le Pin d'Alep ou *Pinus halepensis* est un conifère de la famille des Pinacées fut décrit par le botaniste écossais PHILIP MILLER en 1768. C'est un arbre circumméditerranéen que l'on trouve à l'état spontané autour du bassin méditerranéen, sauf en Egypte. Mais c'est en Afrique du Nord qu'il semble avoir actuellement son centre de gravité, et surtout en Algérie et en Tunisie où il constitue les massifs les plus importants. Du point de vue bioclimatique, on le rencontre dans les étages bioclimatiques méditerranéens (au sens d'EMBERGER) arides supérieurs, semi-arides, subhumides et humides. Cependant, il reste néanmoins principalement une essence de l'étage semi-aride et de la forme moyenne de cet étage (PANETSOS, 1980).

Les pins sont des essences sociales de pleine lumière, qui supportent bien la sécheresse, et les sols pauvres et pour plusieurs espèces les embruns salés. Ils peuvent former des peuplements importants, mais craignent la concurrence des autres essences quand ils sont plantés hors de leur optimum en termes de stationnel.

Les pins du genre *Pinus* de loin le plus important des conifères caractériser par le nombre d'au moins de 111 espèces ont été décrites dont beaucoup sont des essences forestières importantes. Et le genre *Pinus* de groupe Halepensis sont des pins à deux feuilles qui habitent la Région Méditerranéenne et sont souvent connus sous le nom de pins méditerranéens du groupe Halepensis. Ils appartiennent à la famille des *Pinacées* (*Abiétacées*), au genre *Pinus*, au sous-genre *Pinus* (*Eupinus*<sup>\*</sup>) à la section *Halepensis*<sup>\*</sup> et au sous-groupe *halepensis* qui renferme *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus brutia* Ten. (GAUSSEN, 1960). Ces pins sont les suivants:

- *Pinus halepensis* Mill.
- *Pinus brutia* Ten.
- *Pinus eldarica* Medw.
- *Pinus stankewiezii* Sukaczew.
- *Pinus pithyusa* Stevenson.

---

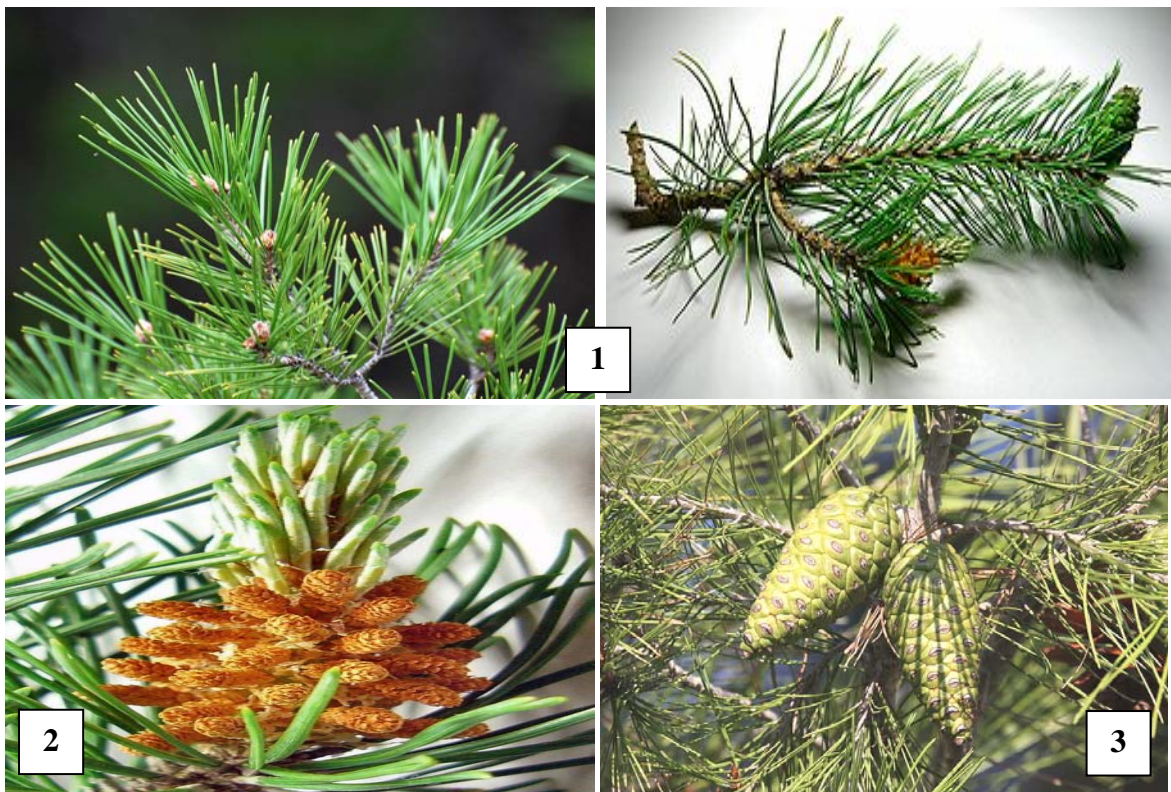
\* *Eupinus* in GAUSSEN, 1961; mais d'après l'article 21 du Code International de la nomenclature Botanique 1959 qui dit : « - l'épithète d'un sous-genre ou d'une section ne doit pas être formée du nom du genre auquel elle appartient avec la désinence *oides* ou *opsis* ou le préfixe *Eu-* », le sous-genre *Eupinus* doit s'écrire *Pinus*.

### I.3.1 DESCRIPTION DE L'ESPECE

Les aspects morphologiques et anatomiques du pin d'Alep firent l'objet d'un certain nombre d'études (CZECZOTT, 1954; MIROV, 1955; NAHAL, 1962; DEBAZAC *et* TOMASSONE, 1965; BELLEFONTAIN, 1979; QUEZEL, 2000; GHANMI *et al.*, 2005).

**NOMS COMMUNS:** Pin blanc, pin blanc de Provence, pin d'Alep, pin de Jérusalem

Arbre qui peut atteindre 20 à 30 m de haut, au tronc généralement tortueux droit et uniforme avec des branches larges sur sa partie médiane. Les branches poussant près de la cime sont courbées vers le haut, créant des silhouettes ovales. Dans les forêts, le tronc du pin blanc pousse habituellement droit et sans branche sur au moins les deux tiers de sa hauteur. L'écorce lisse et grise au début, puis épaisse et crevassée tournant au rouge-brun avec les années. La figure.3 représente les aiguilles et les pièces reproductrices du pin d'Alep. Où Les **aiguilles** sont fines et souples et groupées par deux ; elles mesurent de 5 à 10 cm de long; d'un vert clair. **Chatons mâles** oblongs, roussâtres, longs de 6-7 mm. **Les cônes** oblongs-coniques aigus, longs de 8-12 cm, rouge-brun luisant, à pédoncule très épais. Les arbres jeunes ont une forme assez régulière. Les plus âgés, dégarnis à la base, ont un houppier plus dispersé, une cime irrégulière et peu dense.



**Figure 3:** Aiguilles et pièces reproductrices du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.)

1: Aiguilles; 2: Chatons mâles; 3: Cône femelle

Le pin d'Alep, est une essence monoïque, le cône femelle à d'écailles, qui s'ouvrent temporairement pour recevoir le pollen, puis se referment pendant la fécondation qui se fait sous l'action de l'humidité ou suite à une immersion dans l'eau. La maturation de la graine prend 6 à 8 mois après la pollinisation dans la plupart des genres de Pinaceae, mais 18 à 24 mois (rarement plus) pour la plupart des pins. Les graines, triangulaires, sont de 10 à 15 mm de long, prennent des couleurs ternes tendent vers la marron, et munies d'aile languée, elles sont riches en résines (particularité des Pinacées).

### **I.3.2 CRITERES PHENOLOGIQUES ET CROISSANCE**

Le pin d'Alep est marqué également par des variations intraspécifiques et interspécifiques du polycyclisme chez les jeunes arbres. Ce polycyclisme est fortement lié aux conditions climatiques de l'année de croissance. Selon SABATIER *et al.*, (2003) le polycyclisme est un critère morphologique permettant de séparer les provenances.

Chez les jeunes arbres, La forme du pin blanc est différente selon qu'il pousse dans un champ dégagé ou un peuplement abrité. À découvert, le pin blanc a généralement un tronc droit et uniforme avec des branches larges sur sa partie médiane. Les branches poussant près de la cime sont courbées vers le haut, créant des silhouettes ovales. Dans les forêts, le tronc du pin blanc pousse habituellement droit et sans branche sur au moins les deux tiers de sa hauteur.

Le réchauffement climatique se traduit par d'importantes modifications phénologiques, et notamment des variations du polycyclisme. Le pin d'Alep a montré une activité quasiment ininterrompue sur toute l'année : le premier cycle de croissance printanier a ainsi démarré dès les mois de novembre ou décembre, au lieu de février-mars.

En raison d'automnes chauds, des cycles de croissance très tardifs sont apparus en octobre ou début novembre, conduisant à des pousses inachevées, sans aiguilles ou portant des aiguilles très petites. La fréquence de ce phénomène semble avoir augmenté dans les 10 dernières années. Il a conduit à de nombreux avortements de pousses mal lignifiées suite à des dégâts de gel ou de champignons en hiver. L'exclusion de pluie a diminué le nombre annuel de cycles de croissance des pousses et la durée de ces cycles. Elle a aussi diminué la vitesse de croissance des aiguilles. L'irrigation a augmenté le nombre et la durée des cycles, qui ont été plus précoces. Elle a permis une croissance active et continue des aiguilles et d'une partie des pousses en été. L'analyse rétrospective sur 15 ans de nombreuses branches le long du transept a permis de quantifier l'évolution temporelle du

polycyclisme. Elle montre que la phénologie est contrainte à la fois par la longueur et la précocité de la sécheresse d'été, et aux plus hautes altitudes par le froid qui limite la durée de la saison de végétation. Le changement climatique joue de façon opposée sur ces deux contraintes (VENNETIER, et *al.*, 2011).

### **I.3.3 REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE L'ESPECE**

Cet arbre occupe une aire morcelée sur tout le pourtour méditerranéen. Sur les rivages européens, il est présent en Espagne, France (dans la région méditerranéenne, jusqu'à 600- 800 m sur les versants sud), Italie, et en Grèce. En Afrique du Nord, il occupe une place importante en Algérie (sur le littoral, dans l'Ouarsenis, les mesetas Oranaise et Constantinoise, les Aurès et l'Atlas saharien), il est également présent dans les montagnes et la dorsale Tunisienne et au Maroc. On le rencontre dans le Rif, le Moyen et le grand Atlas, on le trouve aussi à l'est: Palestine, Jordanie, Liban, Syrie, Turquie, Albanie, Croatie, Ukraine, etc... Et a été introduit en Californie. Le pin d'Alep est pourtant le seul grand arbre à pousser facilement et naturellement dans la roche calcaire au sol pauvre et sec. Il résiste très bien sur le littoral méditerranéen, en plein soleil et face aux embruns. Il apparaît même en régions semi-désertiques, notamment en Libye, où sa tolérance à la sécheresse est remarquable (il supporte des moyennes annuelles de précipitations de seulement 250 mm). Il craint en revanche les périodes prolongées de gel et se trouve très vulnérable face aux chutes de neige importantes; ses branches sont fragiles et cassent facilement, l'arbre peut même être déraciné (ARBEZ, 1987).

### **I.3.4 STATUT ECOLOGIQUE DU PIN D'ALEP**

Nous envisagerons ici successivement le statut écologique lié à la zonation altitudinale, aux exigences édaphiques et à la valeur bioclimatique.

#### **I.3.4.1 LA ZONE ALTITUDINALE**

Les pins du groupe « *halepensis* » comme d'ailleurs les autres essences, ont tendance à occuper certaines ceintures altitudinales correspondant à des étages de végétation, et bien entendu à des ensembles bioclimatiques, qui se retrouvent sur tout le pourtour de la Méditerranée. Cette notion d'étage de végétation a été précisée par GAUSSEN (1926), par SCHMID (1966), et par de nombreux autres auteurs (OZENDA, 1974). Sans entrer dans le détail rappelons qu'il est possible d'envisager sur le pourtour méditerranéen. Ces étages correspondent surtout à des critères thermiques, dont les rapports avec les variantes thermiques définies par EMBERGER. Les étages altitudinaux suivants:

- Etage infra-méditerranéen ;
- Etage thermo-méditerranéen ou méditerranéen inférieur;
- Etage eu-méditerranéen ou mésoméditerranéen;
- Etage supra-méditerranéen ou méditerranéen supérieur;
- Etage montagnard méditerranéen;
- Etage oro-méditerranéen.

Le pin d'Alep ou *Pinus halepensis* pénètre largement dans le supra-méditerranéen et atteint localement des altitudes beaucoup plus élevées. C'est ainsi que dans les pays du Maghreb, *Pinus halepensis* s'élève à 2600 m dans le Haut Atlas central, tandis que la limite inférieure part entre 300-600 m en Méditerranée septentrionale, et 1200-1400 m en Méditerranée méridionale (QUEZEL, 1980). En Algérie, les peuplements sont communs entre 1400 et près de 2000 m (l'Aurès, limite supérieure).

Dans le canton d'El-Haourane, le pin d'Alep évolue dans une tranche allant de 900 à 1200 m d'altitude (MAAROUF, 2000).

#### I.3.4.2 EXIGENCES BIOCLIMATIQUES

Il n'est pas toujours très aisé définir avec précision les exigences bioclimatiques des pins du groupe « *halepensis* », même en se cantonnant aux espèces types de loin les mieux connues de ce point de vue. En effet leur répartition très vaste rend souvent hasardeuses certaines généralisations qui ne tiennent pas compte de la variabilité génétique de ces espèces; d'autre part les documents météorologiques sont rares, voire absents de vastes portions de ce territoire, et en particulier des massifs montagneux et l'on est amené à établir des extrapolations parfois discutables ou tout au moins incertaines. Par ailleurs, si les critères thermiques et les précipitations peuvent être chiffrées ou appréciées, l'utilisation effective de l'eau par les conifères reste généralement inconnue sauf dans de rares cas fort ponctuels, dont il serait prématuré de tirer des conclusions à l'échelon de l'espèce (NAHAL, 1962).

Le pin d'Alep étudié par divers auteurs et en particulier par NAHAL, (1962) à l'échelon circumméditerranéen, figure parmi les essences dont les exigences écologiques sont plus amples. En effet, il apparaît dans des zones où les précipitations sont comprises entre 200 mm (en Algérie et en Tunisie arides), et au moins 1500 mm. C'est en fait entre 350 et 700 mm qu'il présente son développement optimal.



Nous pouvons catégoriser –par référence à la classification d’EMBERGER– Le climagramme établi pour le pin d’Alep nous montre donc qu’il est présent à l’aride dans les variantes thermiques froide, fraîche et tempérée, dans le semi-aride dans les variantes froide, fraîche, tempérée et chaude, dans le sub-humide froid, frais, tempéré et chaud, et dans l’humide frais et tempéré.

Il faut remarquer d’ailleurs que le pin d’Alep au niveau de station étudiée, reçoit une trame modeste de pluviométrie, de 395 à 477 mm annuellement, ainsi, il est confronté aux influences sahariennes et aux contrastes thermiques considérables, marquant la continentalité du climat de la région.

### **I.3.4.3 EXIGENCES GEOMORPHOLOGIQUES ET EDAPHIQUES**

Le pin d’Alep peut végéter sur des substrats extrêmement variés, il est cependant possible de mettre en évidence certaines préférences pour cette espèce (QUEZEL, 1980).

Le pin d’Alep affectionne essentiellement, sur toute l’étendue de son aire, les substrats marneux et calcaro-marneux (calcaires en plaquettes) où il trouve en particulier des sols profonds, facilement accessibles à son système racinaire. Toutefois, cette essence existe aussi sur les calcaires compacts et surtout sur les calcaires diaclasés à terra rossa, notamment en Provence, mais aussi en de nombreuses localités d’Algérie (Oranie tout spécialement). Il apparaît également sur les substrats non calcaires, mais essentiellement sur les schistes et les micaschistes (Provence cristalline, littoral Algérois). Il fait par contre à peu près totalement défaut sur les granites et les gneiss.

Par contre le pin d’Alep tolère très mal les substrats sablonneux sans doute surtout en raison d’un assèchement trop intense en été des horizons supérieurs. Il fait également défaut sur tous les substrats où existent des nappes aquifères permanentes provoquant l’asphyxie de son système racinaire. Soulignons également que cet arbre ne tolère pas les bas fonds limoneux ou limono-argileux à sol compact. Sur les hauts plateaux Nord-Africains les steppes à Armoise champêtre ou à Armoise blanche (*Artemisia herba alba*) constituent en effet pour lui un milieu fondamentalement hostile, comme l’ont d’ailleurs montré les échecs survenus à ce niveau lors de la mise en place du barrage vert en Algérie.

## I.4 PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE EL-HAOURANE DE M'SILA

La zone d'étude El-Haourane fait partie de la forêt domaniale de Dréat, qui comprend 23 cantons (superficie totale: 16879 ha). Elle est localisée au Nord de la commune de Hammam Dalaâ à environ 15Km. Le canton d'El-Haourane est situé entre les coordonnées cartographiques et les coordonnées LAMBERT suivantes:

Latitude: (35°56'-35°59') Nord.	X: (651,80 - 657,85) Km.
Longitude: (4°23'-4°27') Est.	Y: (295,15 -299,55) Km.

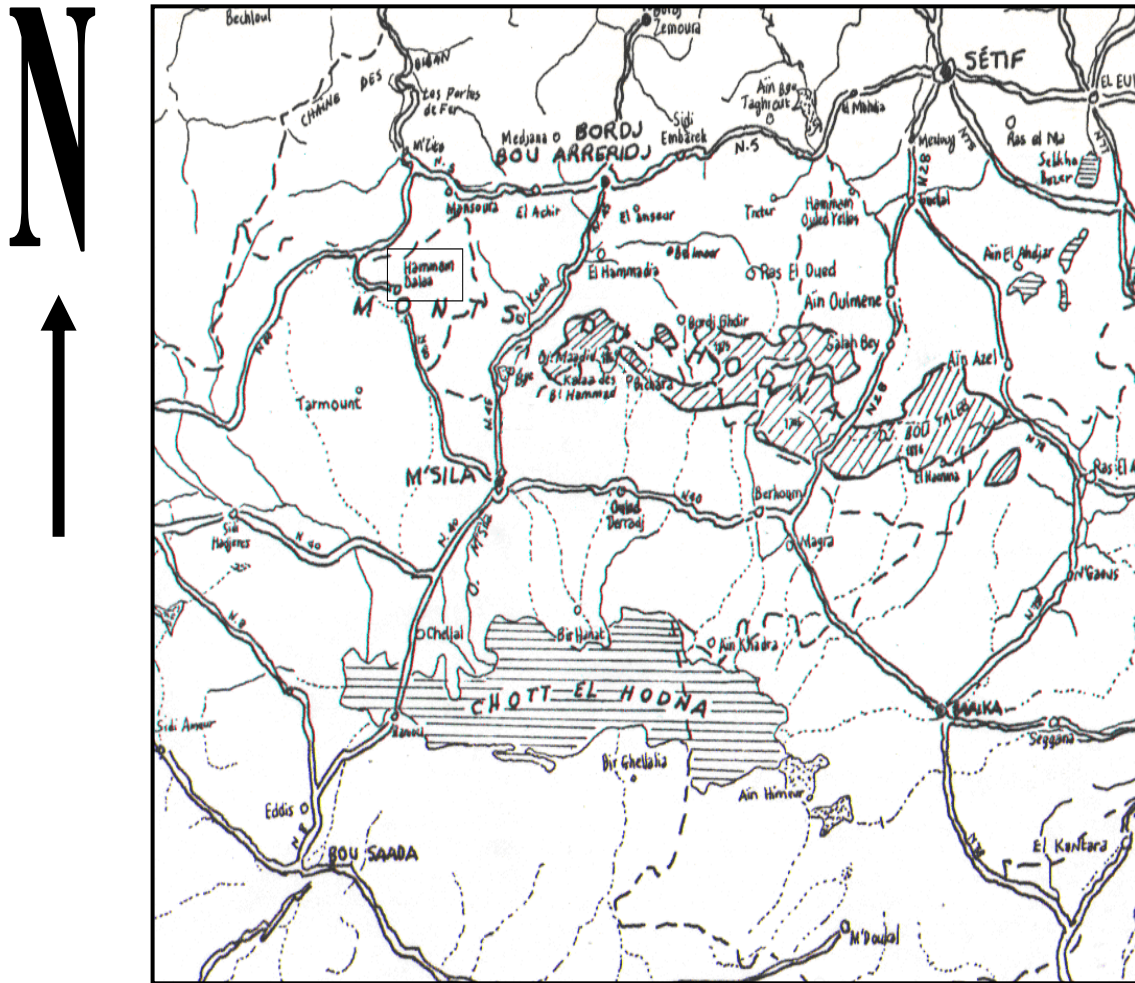
La zone d'étude s'étend sur une superficie de 994,56 ha, soit 5.9 % de la superficie totale de la forêt de Dréat; limitée au Nord par le canton d'Ogribissa, à l'Est par Douar Dréat, à l'Ouest par le canton de Sidi Amar et le canton de Mechrarine, et au Sud par le canton Boustéila. La Figure.4 indique la situation géographique de la zone d'étude.

### I.4.1 Géologie

La zone d'étude El-Haourane et ses environs sont formés par un cadre montagneux composant la partie Nord-Est de la carte géologique du Tarmount (N°140, 1963-1964) représentée dans la Figure.5.

#### Stratigraphie :

- **Quaternaire récent:** Il s'installe sur les alluvions récentes, il couvre des surfaces importantes où des argiles provenant de la décomposition des affleurements cénomaniens, albien et miocène.
- **Tertiaire:** Elle englobe:
  - **Miocène inférieur:** s'installe sur des substrats marneux, grisseuses du 2ème cycle du Miocène inférieur et de grés calcaire fins du 1ere cycle du Miocène inférieur.
  - **Cénomaniens-vraconien (Eocène):** c'est une série presque totalement marneuse, le sommet est constituée par une séquences calcaréo-dolomitique des marnes vertes à gypse.
- **Secondaire:** Elle englobe:
  - **Crétacée:** il est formé de grés dolomies et argiles siliceuses d'Albien inférieur et moyen.

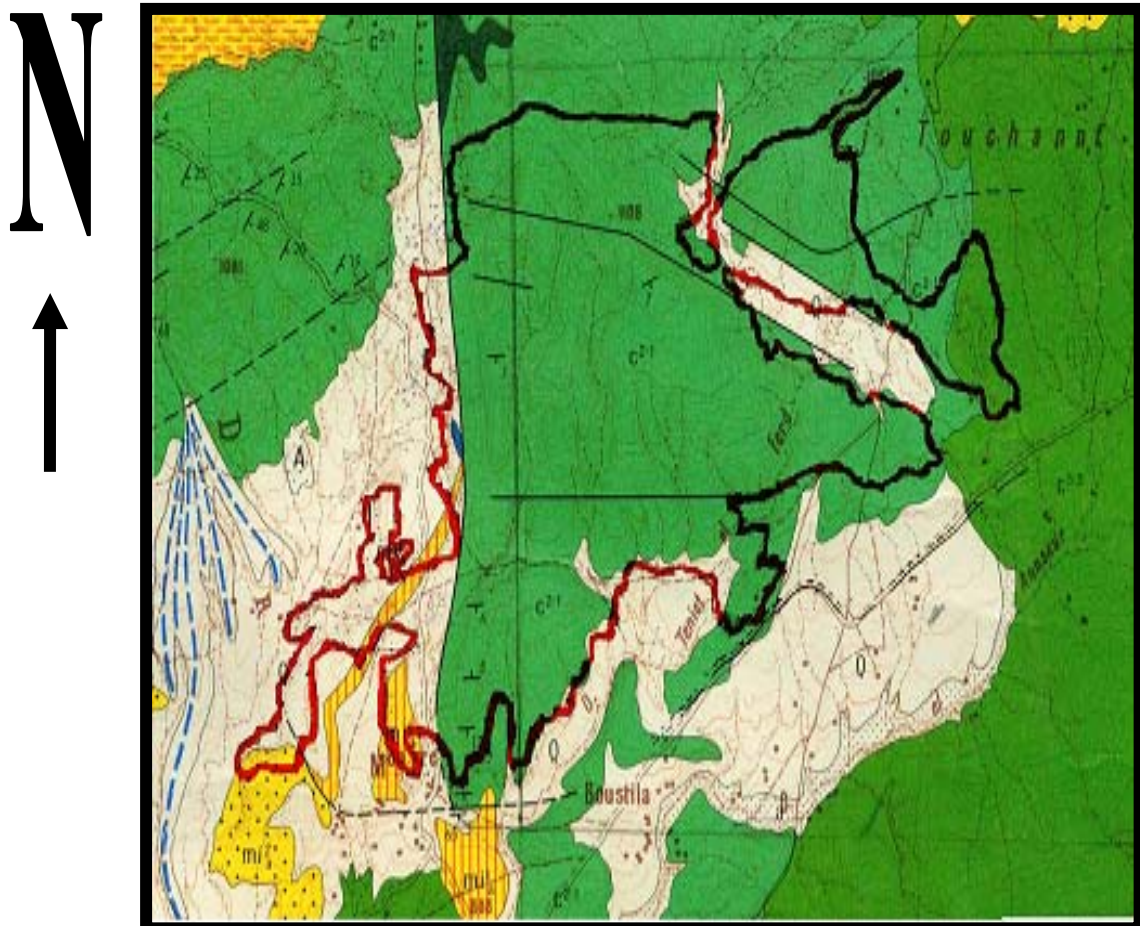


Légende :

Echelle : 1/1000 000

- Limite de Wilaya
- Chef lieu de Wilaya
- ⊙ Chef lieu de Daira
- Chef lieu de Commune
- ==== Route Principale
- N. 40 Numéro des routes-N. principale
- ~~~~ Cours d'eau permanent
- ..... Cours d'eau périodique
- ▭ Marais, Sebkha, Chott
- ▨ Sables humides, Daïa
- ▩ Forêt
- Zone d'étude

Figure 4: Carte touristique représente la situation géographique de la zone d'étude El-Haurane de M'sila.



Légende :

Echelle : 1/50 000

- Albien (Secondaire ; Crétacé)
- Cénomaniens (Tertiaire)
- Miocène (Tertiaire)
- Miocène (Tertiaire)
- Miocène (Tertiaire)
- Limite du canton El-Haourane

Figure 5 : Extrait de la carte géologique de Tarmount (N°140) représente la zone d'étude El-Haourane de M'sila.

#### I.4.2 PEDOLOGIE

D'après les données de la conservation des forêts de la wilaya de M'sila, les principaux types de sols qui se repose dans la zone d'étude sont: les sols minéraux bruts ; les sols calcimagnésiques ; les sols isohumiques et les vertisols.

##### Description générale pour chaque type du sol:

- **Les sols minéraux bruts:** Ce sont des sols contenant que des traces de matière organique dans les 20 cm supérieure. Elles sont définies par une altération chimique et biologique nulle ou quasi nulle.
- **Les sols isohumiques:** Cette classe est représentée par des sols de couleur noire, liée à la matière organique profonde et caractérisés par un taux élevée d'argile.
- **Les sols calcimagnésiques:** ce sont des sols évolués avec une coloration rougeâtre liée aux Oxydes de Fer. Ce type de sol peut se former à partir d'une roche mère calcaire ou enrichie en calcaire par altération des minéraux constitutifs.
- **Les vertisols:** Ce sont des sols argileux à dominance d'argiles gonflantes dont les proportions avoisinent le plus souvent 35-40%. Ils se gonflent et se rétractent alternativement sous l'action successive des périodes très humides et très sèches, en général, les vertisols sont en couleur foncée relativement à leurs teneurs en matière organique (C.P.C.S, 1969) (Commission Pédologique de la Classification du Sol).

#### I.4.3 VEGETATION

La formation végétale est ensemble des végétaux qui présentent un caractère physiologique commun. Ce caractère peut être un critère de taille, de stratification, de densité, d'étendue spatiale, d'aspect, de biomasse (MAAROUF, 2000).

##### A. Matorrals :

LE HOUEROU *et al.*, (1975) in IONESCO et SUAVAGE (1962), définissent le matorral comme une formation de végétaux ligneux n'excèdent pas 7 m de hauteur qui dérivent directement ou indirectement d'une forêt climatique par dégradation anthropozoogène, IONESCO ET SUAVAGE, (1962) distinguent:

##### ➤ Selon la hauteur:

- Matorrals élevées dont la hauteur est comprise entre 2 m et 6 à 7 m.
- Matorrals moyens dont la hauteur est comprise entre 0,6 m à 2 m.
- Matorrals bas dont la hauteur est inférieure à 0,6 m.

➤ **Selon le recouvrement:**

- Matorrals denses pour  $R > 75 \%$ .
- Matorrals troués pour  $75 \% > R > 50\%$ .
- Matorrals clairs pour  $50\% > R > 25\%$ .

➤ **Selon la structure:**

Des matorrals arborées, comportant la présence d'arbres sociologiquement isolées, systèmes racinaires non concurrentiels.

**B. Formations basses:**

Ce sont en général des formations naturelles herbacées de différents types; soit sont des pelouses, prairies ou steppes.

- **Pelouse:** C'est une formation naturelle herbacée rase à base d'hémi-cryptophytes mésophiles et en particulier de graminées.
- **Prairie:** C'est une formation naturelle herbacée, à base d'hémi cryptophytes et de géophytes mésophiles et hygrophiles (en particulier de graminées et de cypéracées) et qui couvre le sol d'une manière continue toute l'année. Elle se rencontre dans tous les étages bioclimatiques (BOULAACHEB, 2000).
- **Steppes:** En Afrique du Nord, les steppes sont des formations basses et très ouvertes à base de graminée et/ou de chamaephytes vivaces (POUGET, 1980). Il existe les formations suivantes: Steppes à Alfa; Steppes à chamaephytes et graminées; et Steppes crassulescentes.

Les principaux types de formations qui dominent la zone d'étude sont des matorrals à *Pinus halepensis* et *Juniperus phoenicea*, et des formations steppiques à *Stipa tenacissima*.

Dans la zone d'étude El-Haourane; *Pinus halepensis* Mill., se trouve sous forme d'un matorral moyen ou élevée (reboisement), elle occupe l'étage bioclimatique semi aride.

**I.4.4 CLIMAT**

Vu l'inexistence de station météorologique dans la zone d'étude. On prise une station de référence représentative, et on utilise les données récentes fournies par la station météorologique de M'sila et de même, on procède à une extrapolation des données de la station de M'sila à la zone d'étude (base altitude: 900 m, moyenne altitude: 1000 m, et haute altitude: 1130 m). D'après le rapport de la F.A.O, sur la région de l'El-Hodna, on relève un gradient de 40 mm pour 100 mètres pour la partie Nord et un gradient de 20 mm pour 100 mètres pour la partie Sud (DJEBAÏLI, 1984). Et selon SELTZER, (1946) pour

l'Algérie non littorale; la température maximale diminue de 0,7°C pour une augmentation de 100 m d'altitude, et la température minimale diminue de 0,4°C pour une augmentation de 100 m d'altitude. A titre de comparaison nous avons utilisé les données anciennes de SELTZER pour la même station qui sont représentées dans le tableau.3.

**Tableau 3 :** Les caractéristiques de la station météorologique de M'sila (DJEBAÏLI, 1984).

Caractéristique de la station	Coordonnées géographiques		Altitude (m)	Données disponibles	Périodes	Sources des données.
	Latitude	Longitude				
M'SILA	35°40' Nord	4°30' Est.	441 m	P-T	1988/2004	Station météorologique
	35°42' Nord	4°33' Est	469 m	P	1923/1938	SELTZER

P= Pluviométrie (mm). T=Température (°C).

#### I.4.4.1 Les précipitations:

Les données pluviométriques sur 17 ans sont regroupées dans le tableau.4 :

**Tableau 4:** Précipitations moyennes mensuelles et annuelles (mm) (RAMADE, 1994).

Mois	J	F	M	A	M	J	Jt	A	S	O	N	D	TOTAL
<b>Station météorologique de M'SILA (1988-2004)</b>													
441 m	21,1	10,7	16,6	19,8	<u>30,0</u>	10,1	<u>03,1</u>	09,6	27,8	23,6	21,0	20,7	<b>214</b>
<b>La zone d'étude EL-HAOURANE</b>													
900 m	39	19,8	30,7	36,6	<u>55,5</u>	18,6	<u>05,7</u>	17,6	51,4	43,6	38,8	38,2	<b>395</b>
1000 m	43	21,8	33,8	40,3	<u>61,2</u>	20,6	<u>06,3</u>	19,5	56,7	48,1	42,8	42,2	<b>438</b>
<u>1130 m</u>	47	23,8	37	<u>44,1</u>	<u>66,9</u>	22,5	<u>06,9</u>	21,4	61,9	52,6	46,8	46,1	<b>477</b>

Les quantités pluviométriques sont réparties d'une manière relativement assez homogène pour les périodes pluvieuses, c'est à dire du mois de Septembre jusqu'au mois de Janvier où nous remarquons que le mois qui a la plus forte pluviosité est Septembre.

Mais si nous considérons les quantités pluviométriques mensuelles, nous constatons une hétérogénéité des précipitations mensuelles où elles atteignent la plus forte valeur au mois de Mai avec 30 mm pour la station de M'sila et respectivement 55 mm à 900 m, 61 mm à 1000 m et 66 mm à 1130 m d'altitude au niveau de la zone d'étude. On outre; les précipitations mensuelles montrent que le mois le plus sec est Juillet avec une valeur de 03.1 mm pour la station de M'sila, et respectivement 05.7 mm à 900 m, 06.3 mm à 1000 m et 06.9 mm à 1130 m d'altitude au niveau de la zone d'étude.



### I.4.4.2 Les températures

La température représente un facteur limitant de première importance car elle conditionne la répartition de la totalité des espèces et des communautés d'êtres vivants dans la biosphère. (RAMADE, 1994). Les températures moyennes, minimales et maximales (1988–2004) sont consignées dans le tableau.5 suivant:

**Tableau 5** : Répartition mensuelle des températures moyennes, minimales et maximales (°C)  
(RAMADE, 1994).

#### Station météorologique de M'SILA (1988-2004)

mois	J	F	M	A	M	J	Jt	A	S	O	N	D	Moy.
------	---	---	---	---	---	---	----	---	---	---	---	---	------

#### A 441 m d'altitude

<b>T min</b>	<u>03,6</u>	04,4	07,7	10,2	15,8	20,8	24,3	24,2	19,3	14,4	08,5	04,9	13,1
<b>T max</b>	13,8	16,4	20,1	22,6	28,3	33,2	<u>38,2</u>	36,9	31,7	25,9	18,8	13,9	25,0
<b>M+m/2</b>	08,7	10,4	13,9	16,4	22,1	27,0	31,3	30,5	25,5	20,1	13,6	09,4	<b>19,1</b>

#### La zone d'étude EL-HAOURANE

mois	J	F	M	A	M	J	Jt	A	S	O	N	D	Moy.
------	---	---	---	---	---	---	----	---	---	---	---	---	------

#### A 900 m d'altitude

<b>Tmin</b>	<u>01,7</u>	02,5	05,8	08,3	13,9	18,9	22,4	22,3	17,4	12,5	06,6	03	11,2
<b>Tmax</b>	10,6	13,1	16,8	19,3	25,1	29,9	<u>34,9</u>	33,6	28,4	22,6	15,5	10,6	21,7
<b>M+m/2</b>	06,1	07,8	11,3	13,8	19,5	24,4	28,6	27,9	22,9	17,5	11	06,8	<b>16,4</b>

#### A 1000 m d'altitude

<b>Tmin</b>	<u>01,3</u>	02,1	05,4	07,9	13,5	18,5	22,1	22	17	12,1	06,2	02,6	10,9
<b>Tmax</b>	09,8	12,5	16,2	18,7	24,4	29,3	<u>34,3</u>	33	27,8	22	14,9	10	21
<b>M+m/2</b>	05,5	07,3	10,8	13,3	18,9	23,9	28,2	27,5	22,4	17	10,5	06,3	<b>15,9</b>

#### A 1130 m d'altitude: Zone d'échantillonnage

<b>Tmin</b>	<u>00,9</u>	01,7	05	<u>07,5</u>	13,1	18,1	21,6	21,5	16,6	11,5	05,8	02,2	10,4
<b>Tmax</b>	09,2	11,8	15,6	<u>18</u>	23,7	28,6	<u>33,6</u>	32,3	27,1	21,3	14,2	09,3	20,4
<b>M+m/2</b>	05	06,7	10,3	12,7	18,4	23,3	27,6	26,9	21,8	16,5	10	05,7	<b>15,4</b>

M+m/2 : les moyennes mensuelles des températures

Les données thermiques sur 17 ans (Tableau.5) ci-dessus nous permettent de tirer les observations suivantes :

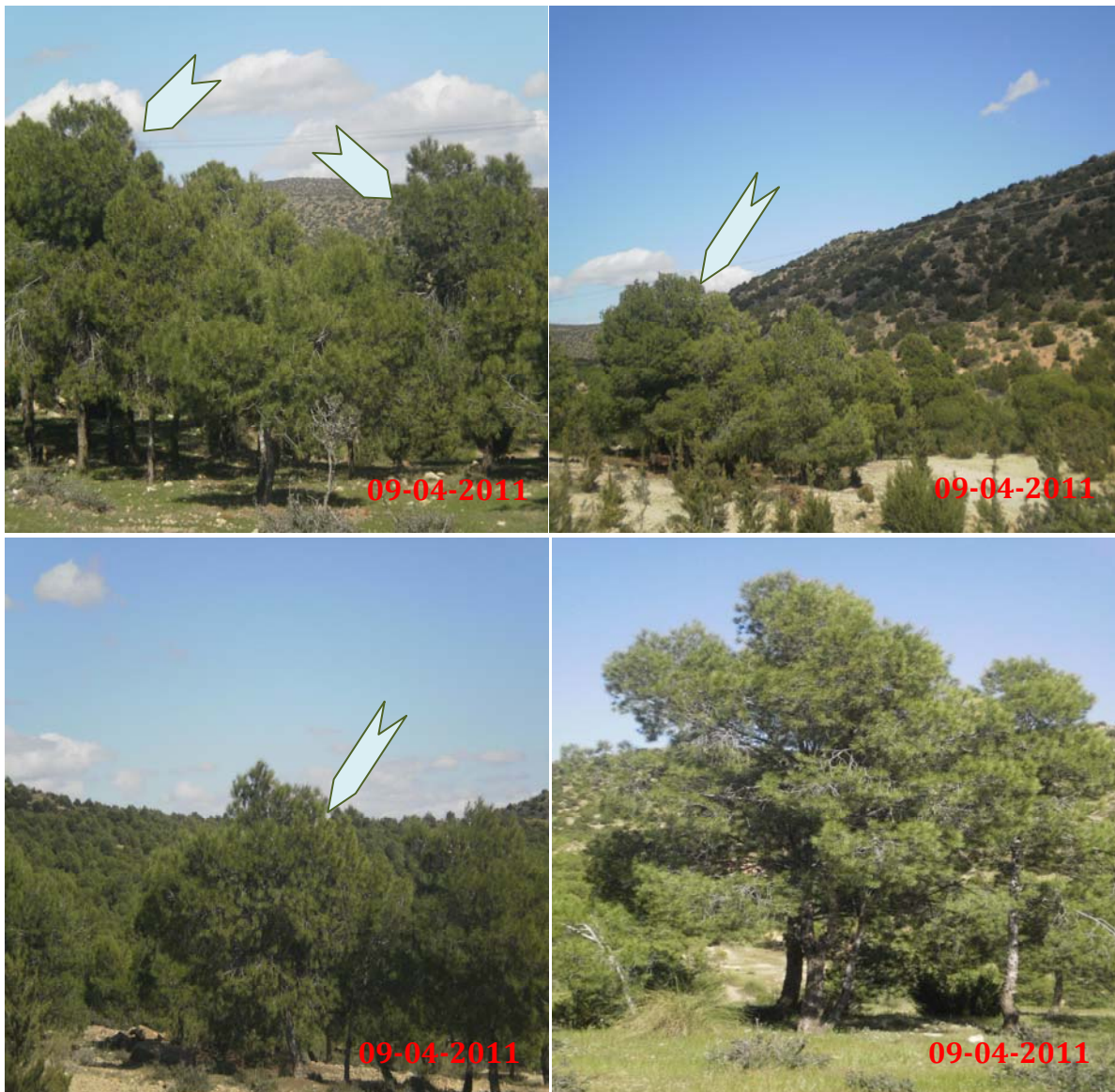
- La température moyenne maximale la plus élevée est en Juillet;
- Les moyennes thermiques mensuelles pour la zone d'étude sont les plus basses en Janvier (le mois le plus froid) et les plus élevées en Juillet (le mois le plus chaud).

Les données chiffrées des différentes composantes climatiques (températures, pluies, enneigement, vents, humidité, pression atmosphérique) doivent être lues comme des



indices climatiques peuvent donner non seulement une image sur le statut général du climat, mais permettre également une estimation rapide à propos de l'influence des principaux éléments climatiques sur les traits bioécologiques du Pin d'Alep.

Au niveau de la zone d'échantillonnage à 1130 m d'altitude durant la série (1988-2004), il reçoit une trame modeste de pluviométrie, de 477 mm annuellement, et de 44.1 mm au mois d'Avril (la date d'échantillonnage pour cette étude), et un contraste thermique considérable, de 15.4°C annuellement, et de valeur comprise entre (07.5-18°C) au mois d'Avril, ainsi; il est confronté aux conditions *in vitro* et *in vivo* des champignons endophytes des aiguilles du pin d'Alep. Les sites d'échantillonnage sont mentionnés dans la figure.6 ci-dessous.



**Figure 6 :** La représentation de site d'échantillonnage d'El-Haourane de M'sila.



*CHAPITRE. II*

**MATERIELS ET METHODES**

## II.1 MATERIELS

### II.1.1 MATERIEL VEGETAL

La station d'El-Haourane est considérée comme une zone de transition entre la région tellienne et steppique, elle se caractérise par une diversité biologique importante notamment sur le plan écologique et floristique générale, Avec dominance du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) qu'il se présente sous forme de peuplements purs ou/en association avec le Chêne vert, le Lentisque, le Genévrier rouge et l'Alfa, la Globulaire, le Romarin

L'échantillonnage des aiguilles est porté sur des sujets de *Pinus halepensis* qui ont été choisis aléatoirement, quinze arbres sont échantillonnés pour la station. Les sujets échantillonnés sont hétérogènes sur le plan dendrométriques, appartenant aux différentes classes d'âges. Le choix doit être porté sur des sujets qui sont en bon état physiologique, et dont les aiguilles sont toujours vertes, (des sujets asymptomatiques).

Pour chaque arbre choisi, cinq rameaux sont sélectionnés, ils doivent renfermer deux catégories d'aiguilles; une première représentant les aiguilles jeunes, la deuxième représentant les aiguilles adultes ou âgées. Il est admet que le taux de colonisation des aiguilles par les champignons endophytes est plus marquant chez les aiguilles âgées (WILSON, 1997).

Une fois récoltées, les aiguilles doivent être maintenues à l'état frais, elles sont ainsi mises dans des sacs à papier et enfermés dans une enceinte froide (glacière). Ainsi, il n'est pas recommandé un temps prolongé entre la récolte des aiguilles et l'initiation des traitements au laboratoire (24 h à 36 h au maximum).

### II.1.2 MATERIELS DU TEST D'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

#### II.1.2.1 LES SOUCHES MICROBIENNES

L'activité antibactérienne et antifongique des champignons endophytes de *Pinus halepensis* a été évaluée sur trois souches bactériennes (Gram positif et Gram négatif); isolées des prélèvements humains et identifiées au niveau du laboratoire de Bactériologie et de Parasito-mycologie du l'Annexe de l'Institut Pasteur d'Alger de M'sila. Ces souches sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et une levure *Candida albicans*; et deux moisissures isolés et identifiés au niveau du laboratoire de

Bactériologie et de Parasito-mycologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Sétif; sont *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*.

### II.1.2.2 LES MILIEUX DE CULTURES ET LES PRODUITS CHIMIQUES

Nous avons opté pour un ensemencement sur le milieu PDA (*Potato Dextrose Agar*) préparé (Voir Annexe.I), car il s'avère plus universellement utilisé pour l'isolement des mycoendophytes liés aux conifères (WILSON, 1997; DECKERT, 2000; GANLEY et NEWCOMBE, 2006). Ce milieu est amendé à la Chloramphénicol 30 µg. Un antibiotique général d'action pour éliminer la croissance des bactéries endophytes. La culture des bactéries nécessite l'utilisation de la gélose Mueller Hinton (MH), et Sabouraud additionné de Chloramphénicol sert à la culture des levures, proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger.

La culture de la fermentation fongique est effectuée en milieu liquide dont sa composition chimique se trouve dans ce chapitre. On a aussi, l'Acétate d'Ethyle (AcEt) comme un solvant d'extraction des métabolites secondaires, et le Diméthyle Solfoxide (DMSO).

### II.1.2.3 L'ANTIBIOTIQUE

Le choix de la Chloramphénicol (C) comme seul témoin positif s'est effectué après des tests préliminaires sur une gamme d'antibiotiques sélectifs. Le disque d'antibiotique provient de l'Institut Pasteur d'Alger et la charge de disque est de 30 µg.

### IV.3.2.4 L'ANTIFONGIQUE

Le choix de la Kétoconazole (KET) utilisés pour l'antifongigramme, comme seul témoin positif pour la levure *Candida albicans*, s'est effectué après des tests préliminaires sur une gamme d'antifongiques sélectifs. Le disque d'antifongique provient de laboratoire Sanofi Diagnostics Pasteur d'Alger.

## II.2 METHODES EXPERIMENTALES

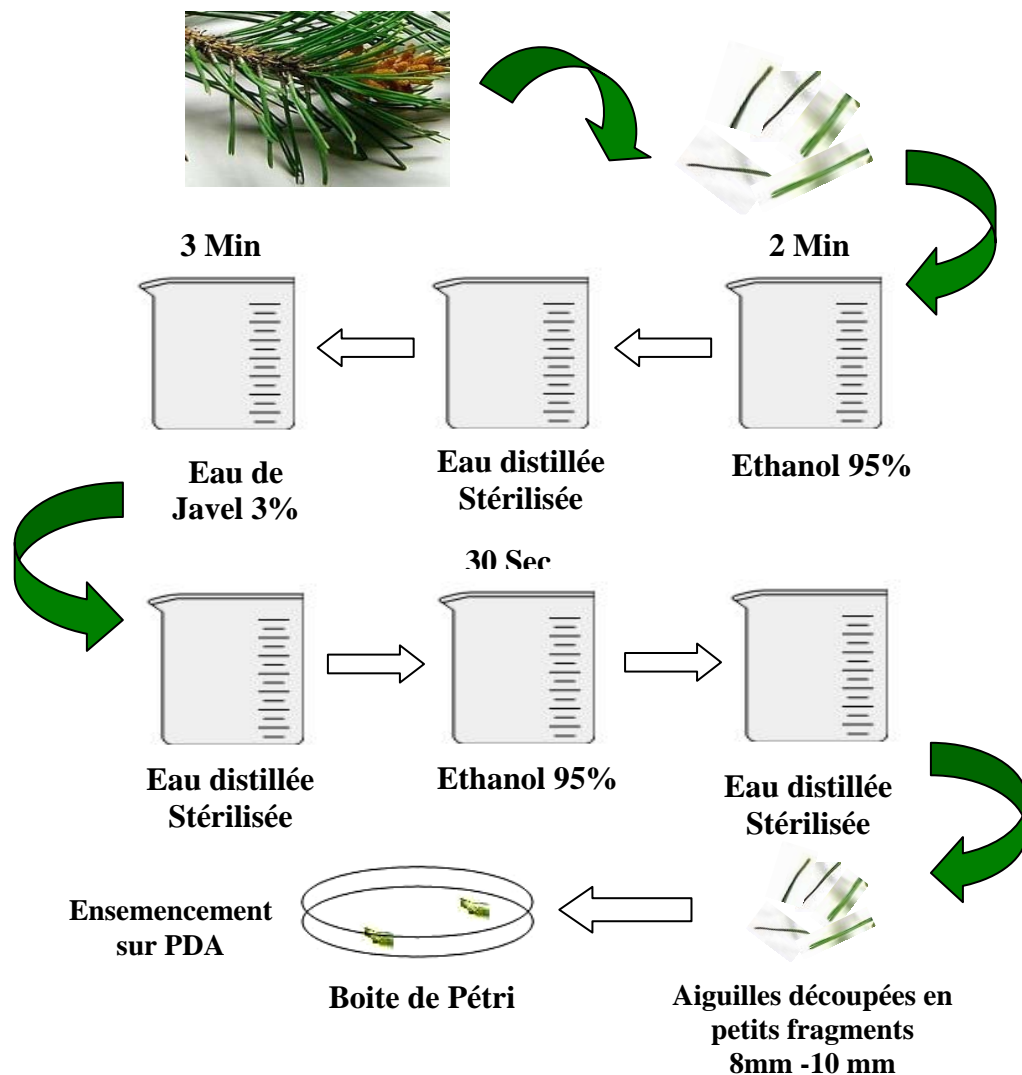
### II.2.1 LA STERILISATION SUPERFICIELLE

Précédemment mentionné, le but de la stérilisation superficielle est d'éliminer les organismes épiphytes qui demeurent au niveau du phylloplan. Bien que les données bibliographiques nous fournissent pas mal de techniques et voies conçues pour la stérilisation superficielle des aiguilles de conifères (PETRINI, 1991; SIEBER *et al.*, 1991; STONE *et al.*, 2004) (Voir Annexe. II). Il n'existe aucune donnée elucidant le traitement de celles du pin d'Alep (ni pour le genre *Pinus* d'ailleurs). Nous avons ainsi adopté le

protocole de HELANDER *et al.*, (1994) modifié, mentionné dans la figure.7, et donné comme suite:

- 1\* Traitement à l'Ethanol (95%) pour une durée de 2 minutes;
- 2\* Rinçage à l'eau distillée stérilisée;
- 3\* Traitement à l'eau de Javel 3% (NaOCl) pour une durée de 3 minutes;
- 4\* 2ème rinçage à l'eau distillée stérilisée;
- 5\* 2ème traitement à l'Ethanol (95%) pour une durée de 30 secondes;
- 6\* 3ème rinçage à l'eau distillée stérilisée.

Une fois stérilisées, les aiguilles sont desséchées en utilisant du papier Buvard stérile. Les aiguilles sont ensuite coupées à l'aide de bistouri stérilisé. Les fragments obtenus varient en longueur entre 8-10 mm. Ce sont ces fragments qui seront ensemencés sur le milieu de culture PDA.



**Figure 7:** Les étapes conçues pour la stérilisation superficielle et l'ensemencement des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. Selon le protocole d'HELANDER *et al.*, 1994.

## II.2.2 MISE EN CULTURE

Les fragments obtenus sont ensemencés sur des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) contenant le PDA; Pour chaque arbre donneur, 20 fragments d'aiguilles, appartenant à la même classe d'âge, sont fixés sur chaque boîte avec 3 disques de chloramphénicol (la charge de disque est de 30 $\mu$ g) sur chaque boîte. Le nombre de disques de chloramphénicol est effectué après plusieurs essais pour éliminer complètement la croissance des bactéries endophytes. Nous avons ainsi quinze arbres nommées (A1, A2, A3, A4, A5,... jusqu'à A15) et donc 600 fragments au total.

**Tableau 6 :** Dispositif expérimental conçu pour l'étude

Individus	La station d'El-Haourane	
	Aiguilles jeunes	Aiguilles adultes
<b>Arbre 01</b>	A1 C1	A1 C2
<b>Arbre 02</b>	A2 C1	A2 C2
<b>Arbre 03</b>	A3 C1	A3 C2
<b>Arbre 04</b>	A4 C1	A4 C2
<b>Arbre 05</b>	A5 C1	A5 C2
<b>Arbre 06</b>	A6 C1	A6 C2
<b>Arbre 07</b>	A7 C1	A7 C2
<b>Arbre 08</b>	A8 C1	A8 C2
<b>Arbre 09</b>	A9 C1	A9 C2
<b>Arbre 10</b>	A10 C1	A10 C2
<b>Arbre 11</b>	A11 C1	A11 C2
<b>Arbre 12</b>	A12 C1	A12 C2
<b>Arbre 13</b>	A13 C1	A13 C2
<b>Arbre 14</b>	A14 C1	A14 C2
<b>Arbre 15</b>	A15 C1	A15 C2

Chaque boîte de Pétri ensemencée est considérée comme étant une **unité de culture**, nous avons ainsi 30 unités de cultures au total (15 unités pour chaque catégorie d'âge).

Après l'ensemencement, les cultures sont incubées à l'obscurité (24°C) dans une étuve. Un contrôle quotidien minutieux est effectué afin d'observer le développement des colonies résultantes des extrémités des fragments des aiguilles.

Pour l'analyse de données précédentes, nous étudions les paramètres suivants :

- **La fréquence moyenne de colonisation (FC)** ou d'infection, calculée en se basant sur la méthode de FISHER et PETRINI, (1987), donnée comme suit :

$$FC\% = (Nc/Nt) \times 100$$

**Où :** Le nombre de segments colonisés (Nc) par une espèce ou groupe fongique/nombre total des segments (Nt) x 100.

Ensuite, on a purifié les souches fongiques résultantes de chaque fragment infecté pour observer la croissance de chaque isolat fongique par piqure centrale dans des boîtes de Pétri coulées préalablement par le PDA et Sabouraud à l'aide d'un porte disque. Toutes ces manipulations microbiologiques sont réalisées dans des conditions d'asepsie sous hotte avec l'appoint d'un bec bunsen.

L'identification des champignons endophytes est facilitée par la sporulation; ainsi bien que certains isolats n'exhibent que rarement ou jamais de phénomènes sporulatifs, il est possible d'induire une sporulation en mettant les cultures sous des conditions extrêmes sur le plan photonique, thermique ou hydrique.

L'identification des isolats fongiques endophytes détectés chez les segments traités qui est effectuée suite à une observation moyennant un microscope optique, en se basant sur les caractères morphologiques des hyphes (cloisonnement, coloration) et des formes reproductrices (fructifications, formes et couleurs des spores). Le mycélium est fixé, en utilisant une solution contenant 13 ml de Formaldéhyde 40% et 5 ml d'Acide Acétique glaciale, ajouté à 200 ml d'Ethanol 50 %. La préparation est colorée avec de Lactophénol bleu coton (PACKER et THOMAS, 1990). En outre, l'utilisation d'un microscope à fluorescence a permis la prise en photo du mycélium.

En se référant également aux clés d'identification de LANIER (1976,1978). La détermination est optée à l'échelle du genre car il est difficile de caractériser l'espèce fongique en se basant sur les données morphologiques uniquement.

Réensemencement des isolats précités afin d'obtenir des cultures pures, pour une description macromorphologique (colonies) et micro morphologique plus fiable.

Si l'induction de la sporulation est échouée, les isolats seront donc codés en utilisant les caractéristiques des cultures telles que l'aspect général de la surface de la colonie, sa texture et la pigmentation des hyphes (SURYANARAYANAN *et al*, 2005).

### II.2.3 ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE *in vitro* DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES

L'activité antimicrobienne des champignons endophytes a été déterminée par la technique de contact direct selon deux sortes: Test d'antagonisme des champignons endophytes (antagonistes) contre deux champignons pathogènes par méthode de confrontation directe, et Test d'antibiogramme des champignons endophytes contre 3 bactéries pathogènes et une levure, par méthode de diffusion, afin d'extraire les métabolites secondaires fongiques bruts (MSFB) après la fermentation en milieu liquide.

#### II.2.3.1 TEST D'ANTAGONISME

On a utilisé la méthode de confrontation directe, cette méthode appelée encore «technique des cultures opposées», consiste à déposer dans des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) contenant le milieu PDA à 4 cm l'un de l'autre, deux explants de 8 mm de diamètre provenant des cultures des champignons (pathogènes et antagonistes).

Les témoins sont représentés par des boîtes de Pétri contenant uniquement le champignon pathogène. L'ensemble des boîtes est placé à une température de 24 °C et à la lumière continue comme facteur d'activation de certains enzymes.

L'évolution de la croissance mycélienne est effectuée toutes les 24 heures par la mesure des diamètres de la colonie mycélienne au millimètre près (RAPILLY, 1968; MADIGAN *et al.*, 1997). Le taux d'inhibition de la croissance mycélienne exercé par le champignon endophyte (antagoniste) a été calculé selon la formule décrite par WHIPPS (1997):

$$I(\%) = [1 - D_n / D_o] \times 100$$

Où :

- **I (%)**: Représente inhibition moyenne de la croissance mycélienne;
- **D<sub>n</sub>**: Est le diamètre moyen du champignon pathogène en présence de champignon endophyte (antagoniste);
- **D<sub>o</sub>** : Est le diamètre moyen du champignon pathogène en absence de champignon endophyte (antagoniste) ou le témoin;



### II.2.3.2 LA FERMENTATION FONGIQUE EN MILIEU LIQUIDE

#### A. LE MILIEU DE CULTURE

Selon MICHEL (2001); La production des métabolites secondaires fongiques bruts (MSFB) est effectuée par la fermentation fongique en milieu liquide, dont sa composition est mentionnée dans l'Annexe. I., afin de repiquer régulièrement les isolats fongiques endophytes et incuber à 24 °C pendant une semaine dans le milieu PDA.

2200 ml de milieu de culture est préparé et répartie dans 22 erlemeyers de 250 ml. Chacun contient 100 ml, bouché par bouchon d'ouate recouvert d'une feuille d'aluminium afin d'éviter l'humidité. Ils sont mis à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes (BOTTON *et al.*, 1990).

Nous découpons des morceaux d'environ 5 mm de diamètre de coté de mycélium cultivé précédemment dans le PDA pendant une semaine à 24 °C. Quatre morceaux sont mis dans chacun des erlemeyers. Le col des erlemeyers et les ustensiles entre chaque inoculation sont stérilisés à la flamme, pour éviter toutes contaminations. Ensuite l'incubation est faite à 24 °C pendant 3 à 4 semaines.

#### B. PROCEDURE D'EXTRACTION

Après la période optimale de 4 semaines, on a filtré le milieu à l'aide d'un papier filtre N°01 de 18.5 cm pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat; qui est par la suite centrifugé à 5000 rt/min pendant 15 minutes, le culot est jeté puisque il contient le reste de mycélium et les spores, et donc le surnageant est extrait par son même volume d'Acétate d'Ethyle (V:V). Ce dernier est choisi comme meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires fongiques selon BADJI *et al.*, (2005); GOGOI *et al.*,(2008); QIN *et al.*, (2009). Ensuite on le met en contact prolongé. Le mélange est agité à 120 tours/min pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique à température 40°C, puis laissé décanter dans une ampoule de décantation pour séparer la phase aqueuse à la phase organique, la phase aqueuse est extraite par même méthode. Enfin, on mélange les deux phases organiques qui ont pour obtenir les métabolites secondaires bruts.

Par la suite; on a évaporé la phase organique résultante sous vide à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapeur), on pèse les résidus, et on les dilués au (Diméthyle de Sulfoxide (DMSO: Eau) (1:9) pour obtenir l'extrait brut à une concentration de 20 mg/ml à conserver à 4°C jusqu'à leur utilisation. Enfin, on a conclut par la procédure d'extraction; l'extrait brut des métabolites secondaires fongiques MSF (Voir la figure.8).

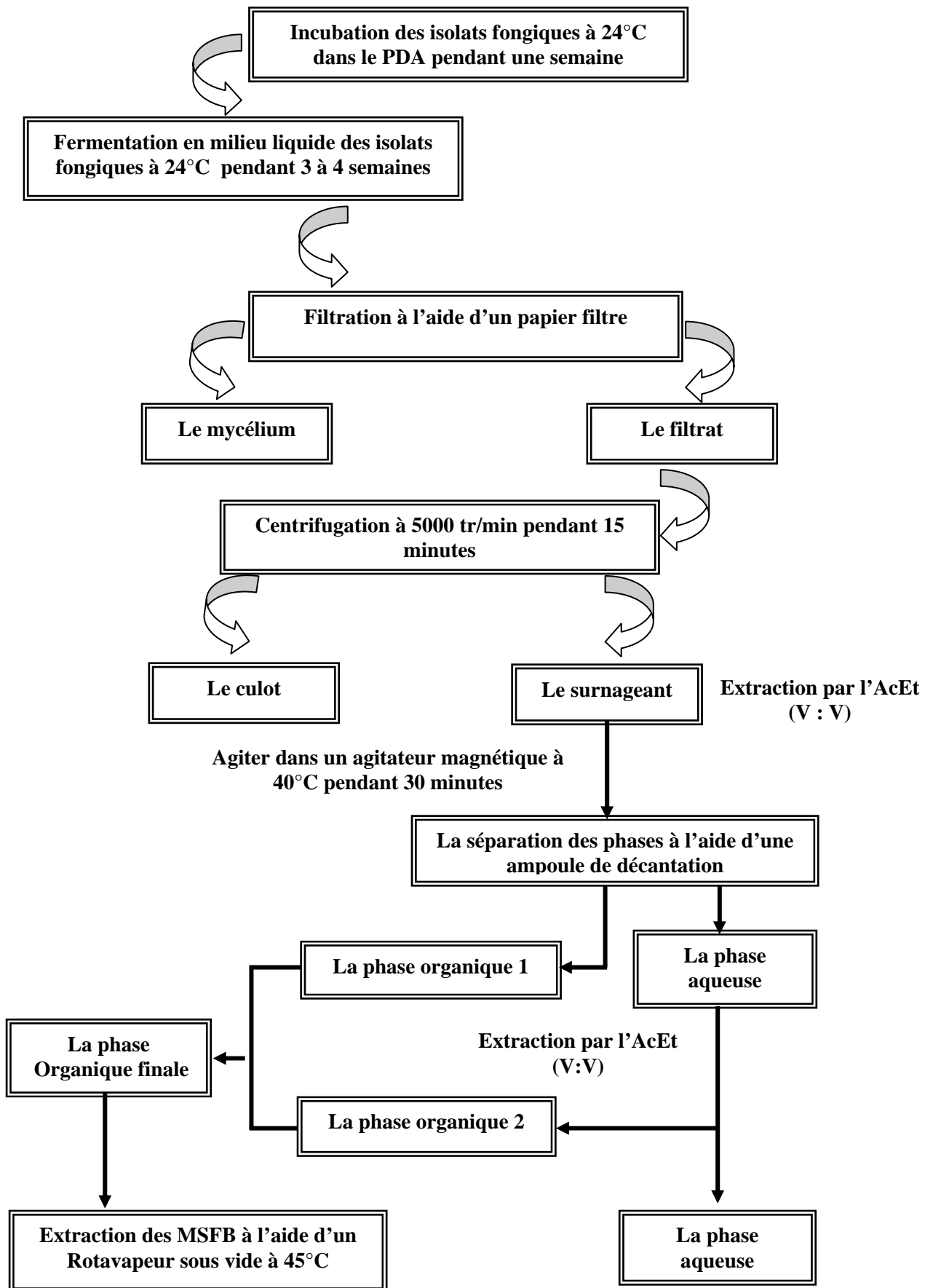


Figure 8: L'extraction des métabolites secondaires des isolats fongiques.

### II.2.3.3 TEST D'ANTIBIOGRAMME

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion sur gélose, qui est initialement conçue pour les antibiotiques (Antibiogramme), elle est appelée aussi la méthode des disques. C'est une vieille méthode, mais toujours d'actualité puisque elle est encore utilisée mondialement dans les laboratoires de bactério-mycologie pour la mesure du pouvoir antimicrobien des (Antibiotiques /ou Antifongiques) de synthèse.

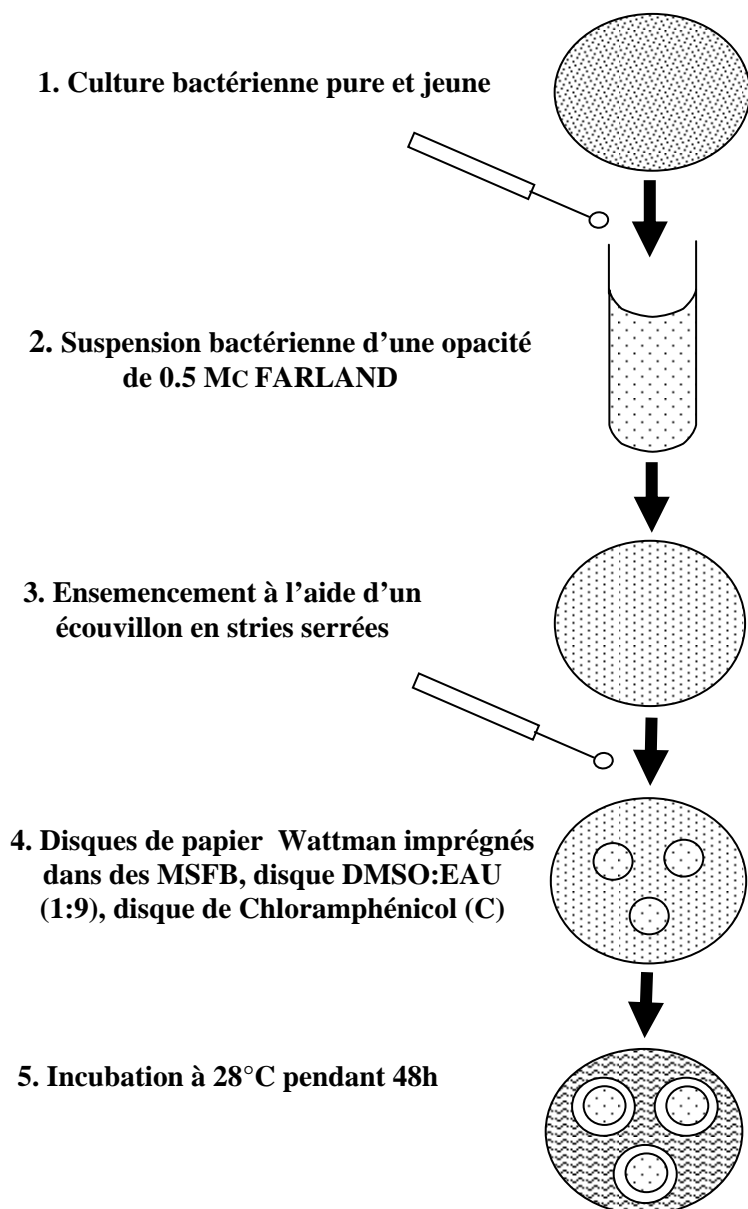
Ce qui concerne nos études on a étudié l'activité antimicrobienne des champignons endophytes par leurs métabolites secondaires bruts qui sont extraient précédemment par la fermentation, sur 3 bactéries et une levure extraient cliniquement, sont *E. coli*; *Pseudomonas aeruginosa* ; et *Staphylococcus aureus* ; et *Candida albicans*. Ce Test est l'équivalent de l'antibiogramme, où les disques des antibiotiques sont remplacés par des disques imprégnés dans des métabolites secondaires fongiques bruts (MSFB).

La figure.9 représente les étapes conçues pour le Test d'antibiogramme, où l'inoculation de géloses se fait par un inoculum préparé à partir d'une culture pure et jeune de 18 heures dans de l'eau physiologique stérile. L'opacité de la suspension bactérienne doit être équivalente à 0.5 MC FARLAND, la concentration bactérienne estimée à  $10^8$  UFC/ml. Il est signalé que l'inoculum ne doit pas être utilisé au delà de 15 minutes à partir de sa préparation. L'ensemencement des milieux se fait par écouvillonnage selon les recommandations de l'O.M.S. Il consiste à tremper un écouvillon stérile dans le tube contenant la suspension bactérienne préparée puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas de façon à former des stries serrées. A noter que l'on doit répéter l'opération sur la même boîte à trois reprises en le tournant chaque fois d'un angle de 60°.

Des disques de papier WATTMAN N°04 de 5 mm de diamètre sont imbibés de métabolites secondaires fongiques bruts MSFB dilués dans les DMSO:EAU (1:9), où la charge de disque est de 50 µl. D'autre disque utilisé comme témoin négatif a été déposé sur la même boîte est imprégné dans le DMSO:EAU (1:9); où la charge de disque est de 50µl. Le choix de chloramphénicol (30µg) comme un antibiotique à large spectre antimicrobien pour chaque souche microbienne est basé sur les directives du «National Comity for Clinical Laboratory Standars» (NCCLS). Donc chaque boîte de Pétri contient 3 disques, un disque de MSFB dilué dans le DMSO:EAU (1:9), un disque de DMSO:EAU (1:9) comme témoin négatif, et un disque d'antibiotique (C) comme témoin positif.

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h et 48h, pour les bactéries et la levure successivement. Après ce délai, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque.

La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm, et limite pour un diamètre compris entre 8–10 mm, et elle est moyenne pour un diamètre entre 10 et 14 mm. Et donc la bactérie est très sensible pour un diamètre à l'intervalle de 14 et 20 mm (DURAFFOURD *et al.*, 1990).



Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque.

Figure 9 : Technique du test d'antibiogramme



*CHAPITRE. III*

**RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### III.1 MISE EN EVIDENCE DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES DES AIGUILLES DE PIN D'ALEP (*Pinus halepensis* Mill.)

La présence des champignons endophytes a été confirmée pour la première fois au niveau des aiguilles de pin d'Alep pour la station étudiée (Voir Annexe. III).

Une étude plus détaillée de l'aspect quantitatif de la colonisation fongique de la phyllosphère de *Pinus halepensis* doit être conduite afin d'élucider les facteurs qui peuvent être associés à une variation de l'ampleur d'infection qui peut être masquée; si certains critères ne seront pas utilisés, tels que l'âge et la saisonnalité des infections. Le tableau.7 indique le nombre moyen de segments d'aiguilles de *P. halepensis* Mill. Dont il existe Vingt segments d'aiguilles pour chaque unité de culture infectés par les champignons endophytes.

#### III.1.1 LE TAUX D'INFECTION DES MYCOENDOPHYTE SELON L'AGE DES AIGUILLES

Les résultats obtenus dans le tableau.7 démontrent que la fréquence de colonisation des mycoendophytes des aiguilles de *Pinus halepensis* varie en fonction de l'âge de ces dernières. En effet, il semble que les aiguilles adultes sont plus densément infectées par rapport aux jeunes aiguilles. Cette différence –significative sur le plan statistique– est partagée pour la station étudiée.

La fréquence de colonisation (FC%) obtenue pour la station étudiée est de: 68.5%

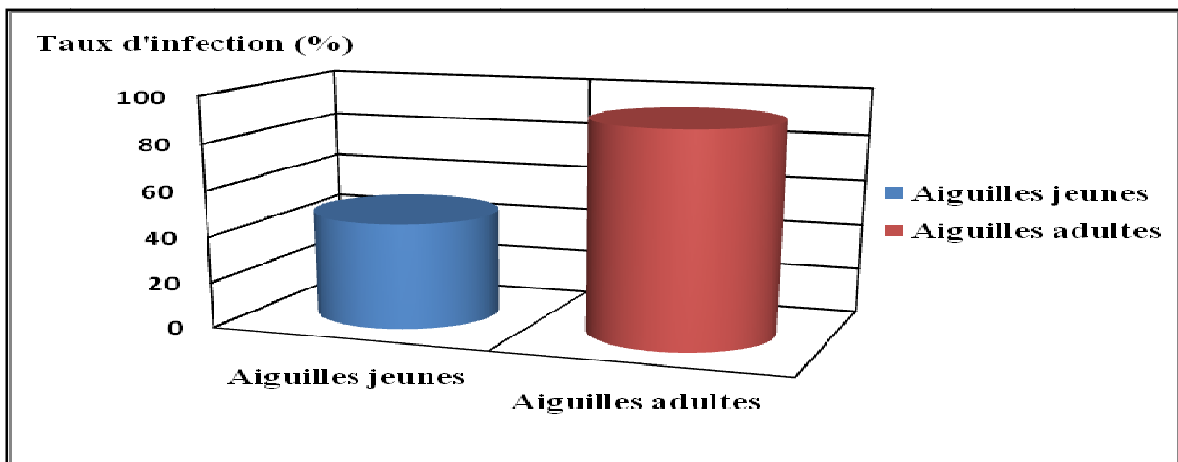
**Tableau 7:** Le nombre moyen des segments infectés par les champignons endophytes et la fréquence de colonisation en fonction de l'âge des fragments d'aiguilles de *Pinus halepensis*

Station El-Haourane	Aiguilles jeunes	Aiguilles adultes	Moyenne
Nombre moyen de fragments infectés*	9.27±2.52	18.33±1.17	13.80
Fréquence de colonisation (FC%)	46.33±0.84	91.67±0.39	<b>68.5</b>

\* Les données prises après 3 jours d'observation.

Les valeurs indiquées : moyenne ± écarts – type.

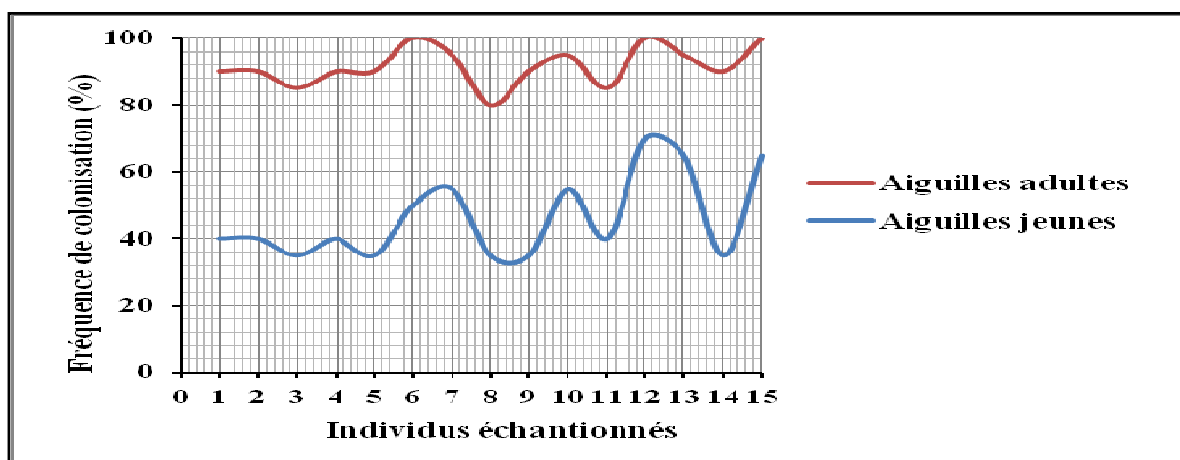
La figure.10 ci-dessous montre que la fréquence de colonisation des jeunes aiguilles de *Pinus halepensis* par les Mycoendophytes sont revues à la hausse lorsqu'elles deviennent plus âgées.



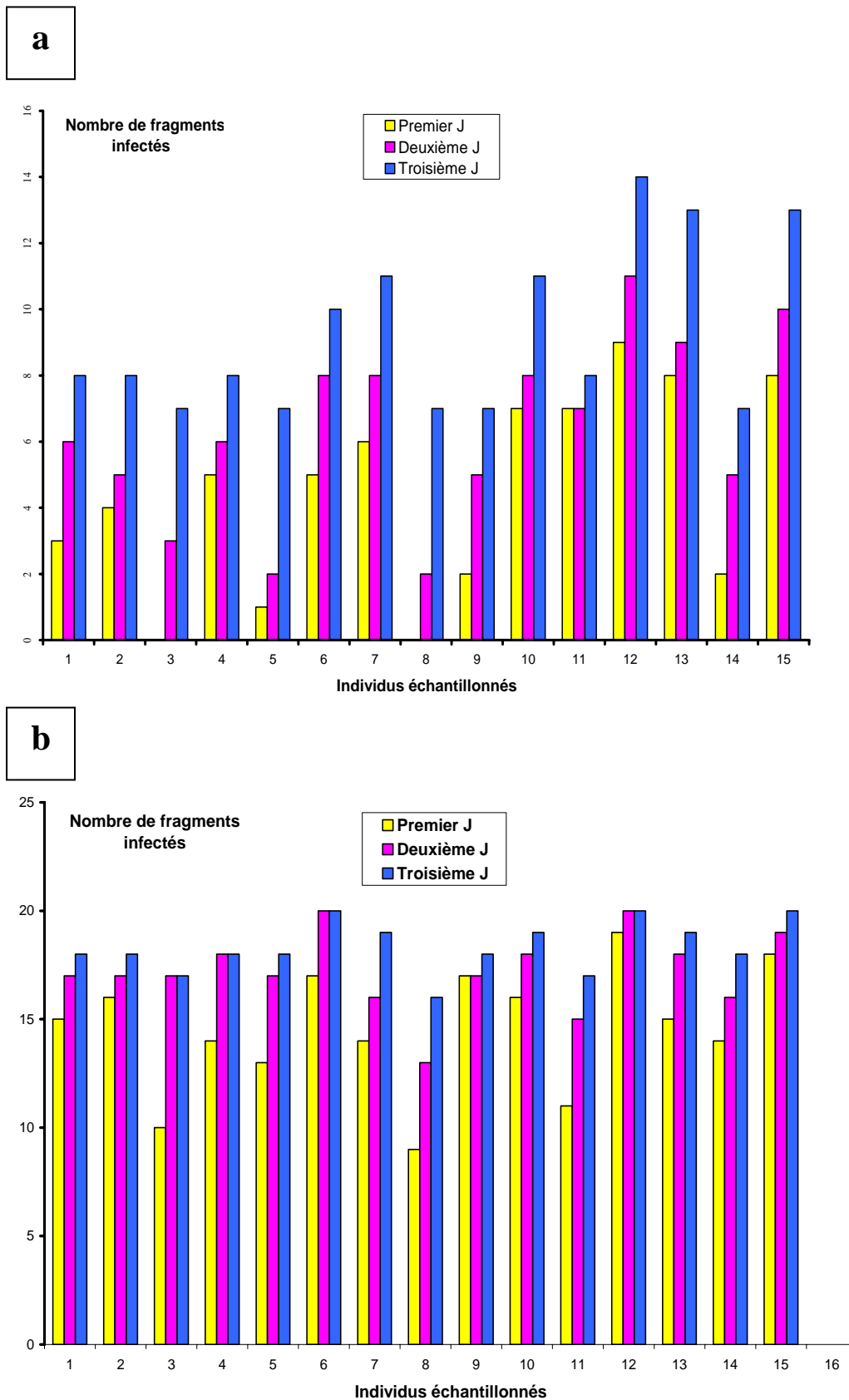
**Figure 10:** Représentation graphique de taux d'infection des fragments d'aiguilles de *P. halepensis* par les mycoendophytes en fonction de l'âge des aiguilles.

L'analyse de la variance et Test de NEWMAN-KEULS à seuil de 5% illustre une différence significative marquant le taux d'infection endophyte des aiguilles en fonction de l'âge de ces dernières. Il y a donc une tendance générale à une colonisation plus marquante des aiguilles adultes de pin d'Alep. Cette augmentation est étroitement liée au développement morphologique et physiologique de l'aiguille.

La figure.11 suivante indique que la colonisation des aiguilles suit toujours une même allure à travers les individus échantillonnés. Cette différence de colonisation, bien qu'illustrée sur une échelle globale, peut être également visualisée à travers sa précocité particulièrement observée pour les aiguilles adultes dont une forte proportion de fragments est infectée avant l'écoulement de 3 jours après ensemencement mentionnée dans la figure.12 par l'évolution du nombre des fragments infectés durant l'observation des unités de cultures. Et la couverture d'infection atteint parfois 100% des fragments par unité de culture.



**Figure 11:** Statut général des fréquences de colonisation après 3 jours d'observation, par les champignons endophytes des aiguilles de *Pinus halepensis* en fonction de l'âge de ces dernières.



**Figure 12:** Evolution du nombre de fragments d’aiguilles de pin d’Alep, infectés par les champignons endophytes durant les 3 premiers jours d’observation des unités de cultures.

**a:** Les aiguilles jeunes; **b:** Les aiguilles adultes



### III.1.2 DISCUSSION

Cette étude démontre pour la première fois, la présence des champignons endophytes liées à la trame foliaire de *Pinus halepensis* Mill., dans la région d'El-haourane de M'sila (Voir Annexe. III).

En effet, d'une manière générale, la fréquence de colonisation représente par une valeur de 68.5% pour la station, qui peut être attribuée à des facteurs qui sont majoritairement d'ordre stationnaire tel que l'allure du relief, l'altitude, le taux d'humidité, ainsi que les conditions édaphiques superficiellement déterminées par des différences de richesse de la litière, essentiellement composée d'aiguilles sénescents. D'autres caractéristiques stationnaires peuvent être impliquées dans le taux de colonisation des aiguilles par les mycoendophytes, tels que la densité du peuplement de *Pinus halepensis* à la zone d'échantillonnage, qui correspond à un peuplement dense des mycoendophytes; cette trame est importante car elle constitue une source déterminante de l'inoculum primaire d'endophytes (PETRINI, 1991; DECKERT, 2000).

Nous avons donnée une importance à l'analyse quantitative uniquement afin d'expliquer les variations –prises sur une échelle numérique– de colonisation des fragments d'aiguilles selon la classe d'âge.

On peut constater d'après les informations reçues, que l'âge de l'aiguille de *Pinus halepensis* est un facteur déterminant du taux d'infection endophyte. Et cela pour la station étudiée au niveau des aiguilles adultes, ce taux d'infection est typiquement supérieur. Les aiguilles des Pinacées appartenant à différentes classes d'âges, diffèrent ainsi en matière de durée d'exposition à la charge optimale de l'inoculum fongique qui va par la suite constituer la symbiose endophyte avec le partenaire végétal, alors qu'il est difficile de séparer cette caractéristique écologique distinctive des autres éléments qui sont étroitement liés et déterminés par l'âge des aiguilles, tels que la composition chimique et l'aspect physique de ces dernières (ARNOLD et HERRE, 2003).

Chez les Pinacées, l'âge des aiguilles est un facteur prédictif des niveaux d'infection par les champignons endophytes (HATA et FUTAI, 1993; DECKERT, 2000; GANLEY et NEWCOMBE, 2006). Ceci suggère dans un sens intuitif que la partie foliaire de *Pinus halepensis* a l'opportunité à accumuler la colonisation au cours du temps. Parallèlement au développement et à la croissance morphologique et physiologique de l'aiguille. Et donc nous pouvons expliquer l'intensité d'infection des aiguilles âgées de

*Pinus halepensis* au niveau anatomique et physiologique par la détérioration de l'intégrité des barrières physiques des feuilles telles que les couches cireuses et cuticulaires qui peuvent par conséquent induire une augmentation du lessivage biophysique, réduisant ainsi le temps nécessaire à la pénétration de l'inoculum fongique (MILLER et ROY, 1982; KIERSTIEN, 1996).

Toutefois, les facteurs physiques ne peuvent exclusivement expliquer d'autre part, la faible contamination des jeunes aiguilles de pin d'Alep, notamment après une exposition chronologiquement étendue à l'inoculum aérien. Les facteurs physiologiques et/ou biochimiques doivent être également pris en considération.

L'occurrence des champignons endophytes peuvent varier également pour la même aiguille à travers les différentes parties ou position sur l'arbre de cette dernière. Alors que plusieurs études engendrèrent des données très variables (WILSON, 1997; PIRTTILA, 2001; GANLEY et NEWCOMBE, 2006).

D'après les résultats obtenus, il est possible d'indiquer que la préférence de colonisation numériquement importante chez les aiguilles âgées par rapport aux aiguilles juvéniles de *Pinus halepensis* est une image universelle et semble être partagée entre les différents phytotaxons des Pinacées (DECKERT, 2000).

## III.2 COMPOSITION GENERALE DE LA MYCOFLORE ENDOPHYTE DETECTEE

### III.2.1 L'IDENTIFICATION DES ISOLATS FONGIQUES

L'identification des différents taxons endophytes dans cette étude est basée sur des critères morphologiques, notamment ceux qui sont déterminés par les structures reproductrices (LANIER *et al.*, 1976, 1978; OLDS, 1979 ; TAYLOR *et al.*, 2004; DEACON, 2006 ; GUILLAUME, 2006). Elle a été réalisée sur deux milieux de culture (PDA et Sabouraud) à 25°C; et elle se basée sur les observations du mycélium fongique :

- **Observation macroscopique:** qui permet de déterminer la couleur de la colonie pendant le développement et à mesurer son diamètre.
- **Observation microscopique:** qui détecte la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, la nature de la production et les caractéristiques des fructifications et des spores (SAMSON et HOEKSTRA, 1988; HAWKSWARTH *et al.*, 1995; GAMS *et al.*, 1998).

Au total, on a vingt-neuf isolats mycotaxons endophytes sur aiguilles de *Pinus halepensis* ont été identifiés au niveau de la station, parmi elles, vingt-deux mycotaxons endophytes différents ont été étudiés, la plupart de ces taxons viennent d'être détectés pour la première fois sur cette Pinacée: *Mortierella wolfii.*, *Rhizopus sp.*, *Epicoccum sp.*, *Alternaria alternata.*, *Aspergillus flavus.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma.*, *Curvularia sp.*

Les résultats obtenus dans le tableau.8 suivant démontrent que la composition mycofloristique endophyte à une diversité fongique plus importante enregistrée dans la station pour la première fois.

**Tableau 8:** Composition générale de la Mycoflore endophyte du pin d'Alep identifiée au niveau de station étudiée.

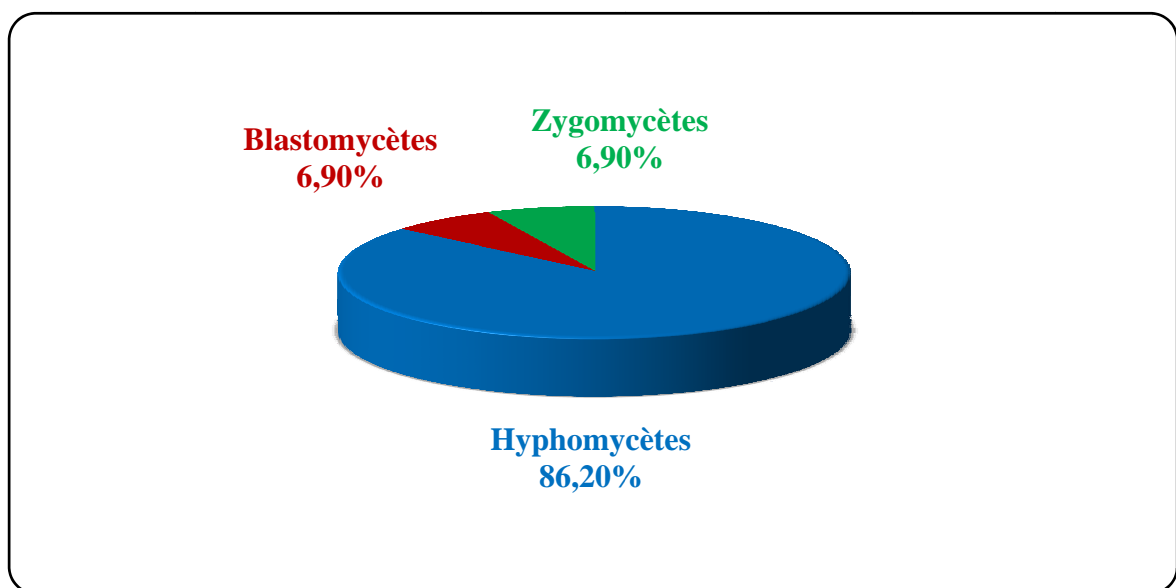
Les codes des isolats identifiés		Mycotaxons endophytes identifiés
Unités de culture	Codes d'unités de culture	
A1	A	<i>Aspergillus sp.1</i>
	B	<i>Aspergillus flavus</i>
A2	A	<i>Mortierella wolfii</i>
	B	<i>Aspergillus sp.2</i>
A3	A	<i>Alternaria alternata 1</i>
A4	A	<i>Aspergillus sp.3</i>
	B	<i>Trichosporon sp.1</i>
A5	A	<i>Bipolaris sp.</i>
A6	A	<i>Alternaria sp.1</i>
	B	<i>Alternaria sp.2</i>
A7	A	<i>Geotricum sp.1</i>
	B	<i>Rhizopus sp.</i>
A8	A	<i>Alternaria alternata 2</i>
A9	A	<i>Epicoccum sp.</i>
	B	<i>Penicillium sp. 1</i>
A10	A	<i>Cladosporium herbarum 1</i>
	B	<i>Alternaria sp.3</i>
A11	A	<i>Curvularia sp.1</i>
A12	A	<i>Penicillium sp.2</i>
	B	<i>Trichosporon sp.2</i>
	C	<i>Geotricum sp.2</i>
	D	<i>Alternaria sp.4</i>
A13	A	<i>Acremonium sp.</i>
	B	<i>Geotricum sp.3</i>
	C	<i>Curvularia sp.2</i>
A14	A	<i>Fusarium sp.</i>
A15	A	<i>Cladosporium sp.</i>
	B	<i>Trichoderma sp.</i>
	C	<i>Cladosporium herbarum 2</i>

La plus grande trame de genres fongiques endophytes que nous avons pu identifiés est rangée au sein du groupe des CHAMPIGNONS MITOSPORIQUES; formellement la division des Deutéromycètes ou (*les champignons imparfaits ou fungi imperfecti*). Cette division qu'on retrouvera le plus grand nombre des espèces d'intérêt médical. Cet ensemble, très hétérogène, englobe toutes les espèces qui se multiplient sur le mode asexué. Permettent d'établir des liens étroits avec de nombreux Ascomycètes ou Basidiomycètes. En pratique, le maintien de cette division s'avère utile car beaucoup d'espèces n'expriment pas en culture leur reproduction sexuée. Le tableau.9 résume la taxonomie des 29 mycotaxons endophytes résultants.

**Tableau 9 :** La classification taxonomique des mycotaxons endophytes isolés à partir de station.

Classification des mycotaxons endophytes		Mycotaxons endophytes	29 mycotaxons étudiés
LA DIVISION	LA CLASSE		
<b>Deuteromycotina</b>	<b><u>Hyphomycètes</u></b>	<i>Alternaria alternata</i>	02
		<i>Alternaria sp.</i>	04
		<i>Bipolaris sp.</i>	01
		<i>Cladosporium herbarum</i>	02
		<i>Cladosporium sp.</i>	01
		<i>Curvularia sp.</i>	02
		<i>Epicoccum sp.</i>	01
		<i>Acremonium sp.</i>	01
		<i>Aspergillus flavus</i>	01
		<i>Aspergillus sp.</i>	03
		<i>Fusarium sp.</i>	01
		<i>Penicillium sp.</i>	02
		<i>Trichoderma sp.</i>	01
		<i>Geotricum sp.</i>	03
	<b><u>Blastomycètes</u></b>	<i>Trichosporon sp.</i>	02
<b>Zygomycotina</b>	<b><u>Zygomycètes</u></b>	<i>Rhizopus sp.</i>	01
		<i>Mortierella wolfii</i>	01

La figure.13 suivante indique que la plupart des taxons dans cette étude, appartiennent à la classe des Hyphomycètes; Onze genres parmi les quatorze genres de cette étude sont: (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Geotricum*); qui regroupent l'ensemble des champignons filamenteux à thalle septé dont les cellules conidiogènes (productrices de spores ou conidies) sont libres, alors que la classe des Blastomycètes comporte un genre seulement: *Trichosporon* ; qui représente une forme unique des champignons levuriformes, D'autre part, deux genres sont attribués à la division de Zygomycotina, sont *Mortierella* et *Rhizopus* ; caractérisés par la production de spores sexués appelés zygospores.



**Figure 13:** Statut taxonomique générale (en %) de la mycoflore endophyte détectée de la partie Foliaire de *Pinus halepensis*. Mill

### III.2.2 DISCUSSION :

Il existe un nombre relativement moyen détecté des mycotaxons endophytes dans cette Pinacées (PETRINI, 1991; JOHNSON et WHITNEY, 1992; HATA et FUTAI, 1993; WILSON, 1997; PIRTILA, 2001; HOFF *et al.*, 2004; GANLEY et NEWCOMBE, 2006). Ceci est dû probablement à la dominance marquante de certaines espèces fongiques éliminant ou réduisant par conséquent l'apparition et le développement d'autres taxons endophytes au laboratoire; aux techniques d'échantillonnage et de culture; ainsi qu'aux caractéristiques de la station choisie (WILSON, 1997). BILLS et POLISHOOK (1994) démontrèrent également que l'utilisation de plusieurs types de milieux de culture permet l'apparition de mycotaxons qui varient sur le plan quantitatif et qualitatif.

La station d'El-Haourane avait enregistré une grande diversité mycoendophyte, ceci est peut être expliqué par l'état phytosanitaire relativement bon qui domine le pin d'Alep du site. Bien que, on constate que la plupart des mycotaxons endophytes détectés sont essentiellement attribués aux champignons mitosporiques (Deutéromycètes). Cette dominance spécifique est expliquée par le fait que la trame mycoendophyte des Pinacées se caractérise par des groupes taxonomiques ayant perdu le mode reproductif sexué ainsi que ces attributs écophysologiques eut égard à la coévolution champignons-plantes, sans oublier le mode de transmission qui nécessite généralement des mécanismes simples faisant intervenir le système reproductif conidien (STONE *et al.*, 2004).

La dominance de la trame des champignons mitosporiques sur les mycoendophytes des Pinacées avait été rapportée par plusieurs auteurs. WILSON, (1997); SIEBER *et al.*, (1991); DECKERT, (2000); GANLEY et NEWCOMBE, (2006) signalent la prédominance des Ascomycotina, et montrèrent une dominance des Ascomycètes dans la communauté endophyte, et ceux pour plusieurs Pinacées: *Pinus resinosa*, *P. mugo*, *P. sylvestris*, *Abies balsamea*, *Picea abies* *P. glauca*.

Les champignons mitosporiques constituent un assemblage artificiel des eumycètes. Ils ne se reproduisent que par voie asexuée (TAYLOR *et al.*, 2004; VIDHYASEKARAN, 2004; DEACON, 2006). Cette appellation indique que les spores formés ou conidies, sont engendrés suite à une division nucléaire mitotique (DEACON, 2006).

Selon HAWKSWORTH, (2004) beaucoup d'espèces de ce groupe ont des similarités structurales avec des membres anamorphes (asexués) du phylum des Ascomycota, ainsi, il existe une large gamme liée au sol, alors que d'autres espèces sont phytopathogènes, ils peuvent adoptées tout les modes trophiques. Un autre groupe est constitué de taxons endophytes ou de parasites secondaires (LANIER, 1978; STONE *et al.*, 2004).

Nous pouvons expliquer cette dominance particulière des champignons mitosporiques par le fait que l'endophytisme comme stratégie symbiotique adoptée par le champignon associé au feuillage de *Pinus halepensis* nécessite en général un recours à la reproduction asexuée, notamment si nous mettons en considération la présence permanente de la niche écologique de l'endophyte (aiguilles sempervirentes). Les formes reproductrices des champignons endophytes sont très rares dans le milieu naturel. Même si les mécanismes de transmission des endophytes sur cette essence sont mal connus, il est

nécessaire de s'appuyer sur d'autres facteurs écophysiologiques et climatiques qui peuvent expliquer la dynamique de ce groupe fongique dans le pin d'Alep de M'sila.

SCHULZ *et al.*, (1993, 1995, 1998) in SCHULZ et BOYLE, (2005) ont obtenu plus de 6500 isolats endophytes à partir de 500 espèces végétales des zones tempérées. La majorité de ces isolats appartiennent aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Neotyphodium*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geniculosporium*, *Phoma* et *Pleospora*. Ils sont considérés ubiquistes (SCHULZ et BOYLE, 2005). Les genres *Cladosporium*, *Mucor* et *Penicillium* ont été isolés à partir des aiguilles et des parties racinaires de *Picea abies* (HOLDENDRIEDER et SIEBER, 1992), et de *Pinus sylvestris* (FISHER *et al.*, 1991 in HOFF *et al.*, 2004).

La présence de *Fusarium sp.*, sous la forme endophyte au niveau des aiguilles de *Pinus halepensis*, n'est plus une exception, car ce champignon est caractérisé par sa plasticité à l'égard de ses milieux où il se développe. La forme endophyte de *Fusarium sp.*, a été isolée notamment à partir des racines et du feuillage de plantes herbacées appartenant aux familles des Fabacées et des Poacées (BOYLE *et al.*, 2001), mais également à partir des aiguilles de *Cedrus atlantica* et *Pinus strobus* par DECKERT et PETERSON, (2000), bien que la colonisation des tissus foliaires est nettement discrète et très localisée.


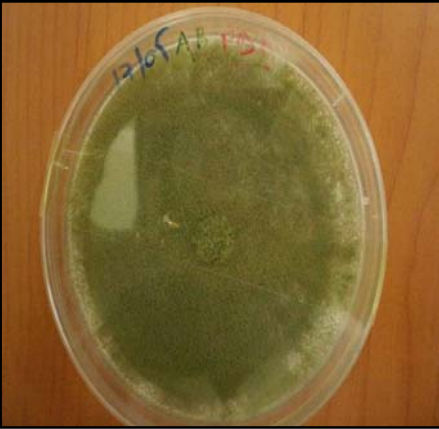
Le genre *Trichosporon sp.*, est adopté le mode endophyte, pour la première fois dans cette pinacées., une autre espèce, *Geotricum sp.*, est largement fréquente sur les Pinacées du genre *Abies*, *Pinus*, *Picea* sous forme endophyte. La détection de *Rhizopus sp.*, et *Mortierella sp.*, sur les aiguilles de *Pinus halepensis* témoigne l'association établie par les Pinacées et les Mucorales (PANDEY *et al.*, 2001 in STONE *et al.*, 2004). La présence de ces taxons s'est avérée minime dans notre étude. Les formes endophytes des Mucorales (Zygomycota) sont surtout fréquentes chez les plantes herbacées des zones tempérées et les arbustes des zones tropicales (MANOHARAHARY *et al.*, 2005)., *Mucor mucedo* et *Mortierella sp.*, sont deux taxons souvent isolés ensembles, mais les auteurs ne donnent guère de précision sur la partie hôte du végétal.

### III.3 LA SELECTION DES ISOLATS FONGIQUES PRODUCTEURS DES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES




Le Test d'activité des isolats identifiés consiste à rechercher son effet antimicrobien sur le développement des bactéries et les moisissures et une levure: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Candida albicans*, suivant le Test d'antagonisme et d'antibiogramme.


Dans ce travail, On a choisis vingt-deux espèces fongiques différentes sur le plan macro-microscopique, représentent les quatorze genres pour être mieux étudier l'activité antimicrobienne évaluée sur les souches testées. Le tableau.10 (ci-dessous) représente l'étude morphologique sert à l'identification des mycotaxons endophytes de cette étude.




**Tableau 10:** Les mycotaxons identifiés et sélectionnés pour la station étudiée

Les mycotaxons étudiés	Identification des mycotaxons étudiés	
<p style="text-align: center;"><b>A1A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> <i>Aspergillus</i></p> <p><b>Espèce:</b> <i>Aspergillus sp.1</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface; poudreuse à granuleuse et de Relief; planes, et de Couleur; d'abord blanches, puis gris verte;</li> <li>• <b>Verso:</b> Incolore;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Peu lente de 5 à 7 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> Très long et non cloisonné;</li> <li>• <b>Phialides:</b> Portées par des métules insérées sur la vésicule;</li> <li>• <b>Conidies:</b> Globulaires;</li> <li>• <b>Tête aspergillaire:</b> Bisériée, radiée.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A1B</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> <i>Aspergillus</i></p> <p><b>Espèce:</b> <i>Aspergillus flavus</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface ; duveteuses à poudreuse, et de Relief ; planes, et de Couleur ; D'abord blanches, puis jaunes, puis vert-jaune;</li> <li>• <b>Verso:</b> Peu jaune;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Rapide et extensive de 2 à 3 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés;</li> <li>• <b>Conidiophore :</b> long, et non cloisonné, hyalines;</li> <li>• <b>Phialides :</b> Directement insérées sur la vésicule;</li> <li>• <b>Conidies :</b> Globulaires, vert pâle, échinulées;</li> <li>• <b>Tête aspergillaire:</b> unisériée, radiée.</li> </ul>

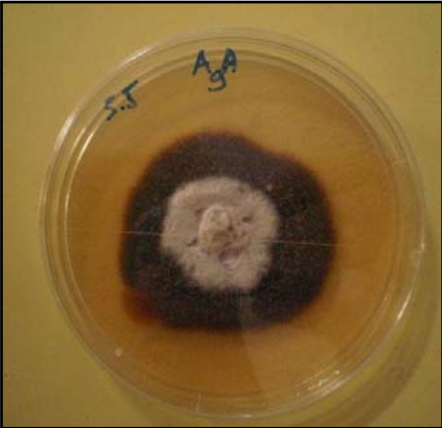



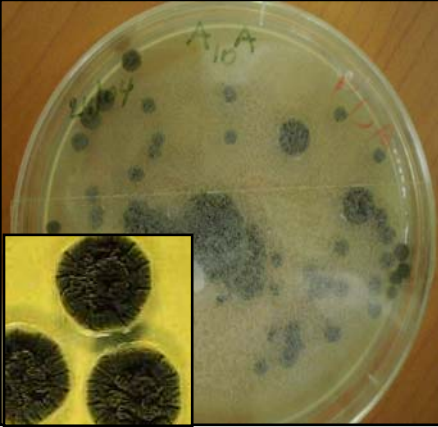
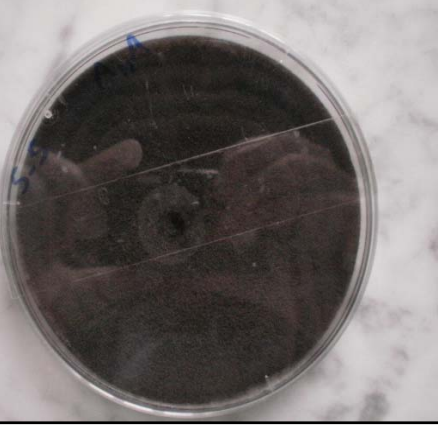

Les mycotaxons étudiés	Identification des mycotaxons étudiés	
<p style="text-align: center;"><b>A2A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Zygomycotina  <b>Classe:</b> Zygomycètes  <b>Famille:</b> Mortierellaceae  <b>Ordre:</b> Mortierellales  <b>Genre:</b> Mortierella</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Mortierella wolfii</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface ; duveteuses, à un aspect globalement zonée ou lobées de forme de rosette, et de Relief ; peu planes, et de Couleur ; blanches à blanc grisâtre;</li> <li>• <b>Verso:</b> Incolore ;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Très rapide (1 à 2 jours), et extensive sur gélose de PDA.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Thalle:</b> Filaments siphonnés ou coenocytiques;</li> <li>• <b>Sporocystophores:</b> Simple sans ramification, dressées, délicates, large à la base, absence d'une columelle;</li> <li>• <b>Sporocystes:</b> D'aspect piriforme;</li> <li>• <b>Spores:</b> Lisses, granuleuse.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A2B</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Monilialeae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Aspergillus</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Aspergillus sp.2</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface ; duveteuses à poudreuse, et de Relief ; planes, et de Couleur; beige à brun noisette presque de teinte cannelle;</li> <li>• <b>Verso:</b> jaune à brun orange;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Rapide de 3 à 5 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> lisse, long, et non cloisonné;</li> <li>• <b>Phialides:</b> Portées par des métules insérées sur la vésicule;</li> <li>• <b>Conidies:</b> De petite taille, globulaires;</li> <li>• <b>Tête aspergillaire:</b> bisériée, évasée ou (aspect d'éventail).</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A3A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Dematiaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Alternaria</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Alternaria alternata</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface ; duveteuses à laineuse, d'Aspect cotonneux, et de Relief; planes, et de Couleur; blanc-gris au départ, devient rapidement foncée (vert foncé à noire), les zones blanches constituées exclusivement d'hyphes aériennes et les zones sombres rasantes renfermant les spores asexuées mélanisées;</li> <li>• <b>Verso:</b> La même couleur au recto;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Très rapide de 2 à 3 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés, ramifiés, pigmentés en brun, d'aspect de Zigzags;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> Cloisonnés, bruns, septés, ramifiés;</li> <li>• <b>Conidies ou porospores:</b> Brunnes, ovoïdes, présentent des cloisonnements transversaux et longitudinaux et sont caractéristiques du genre Alternaria;</li> </ul>


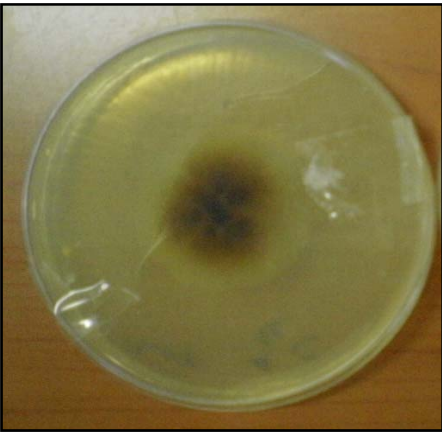
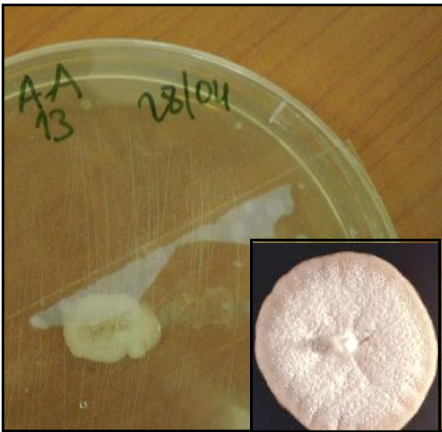
Les mycotaxons étudiés	Identification des mycotaxons étudiés	
<p style="text-align: center;"><b>A4A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Aspergillus</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Aspergillus sp.3</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface ; duveteuses à poudreuse, et de Relief; planes, et de Couleur; vert foncé à vert cresson;</li> <li>• <b>Verso:</b> Brun à rougeâtre;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Rapide de 3 à 5 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> Lisse, brun, très petit;</li> <li>• <b>Phialides:</b> Portées par des métules sur la supérieure de la vésicule;</li> <li>• <b>Conidies:</b> Rondes, vertes, échinulées, disposées en chaînes;</li> <li>• <b>Tête aspergillaire:</b> Bisériée, courte.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A4B</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Blastomycètes  <b>Ordre:</b> Cryptococcales  <b>Genre:</b> Trichosporon</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Trichosporon sp.1</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonies de Surface ; lisse, plissée de Type cérébriforme; et de Relief; planes, Couleur ; crème à blanc;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Rapide de 3 à 5 jours</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La présence; des blastospores et des pseudomycéliums ; et des vrais filaments se désarticulent en arthrospores bourgeonnantes;</li> </ul> <p>* Le test de la recherche d'une uréase en milieu urée-indole à 37°C est positif.</p>
<p style="text-align: center;"><b>A5A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Dematiaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Bipolaris</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Bipolaris sp.</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface; duveteuses, et de Relief ; peu planes, et de Couleur; brun foncé à noire, d'extrémité brun orangée;</li> <li>• <b>Verso:</b> Foncé;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Rapide de 2 à 3 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés, devient rapidement brun foncé ;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> Simples, bruns, géniculés, à croissance sympodiale ;</li> <li>• <b>Conidies ou porosporos:</b> Elles sont oblongues en fuseau, pluricellulaires, cloisonnées, seulement transversalement, elles comprennent de 3 à 6 cellules;</li> </ul>

Les mycotaxons étudiés	Identification des mycotaxons étudiés	
<p style="text-align: center;"><b>A6A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Dematiaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Alternaria</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Alternaria sp.</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface ; duveteuses à laineuse, d'Aspect cotonneux, et de Relief; planes, et de Couleur ; gris-vert au départ, devient rapidement foncée (vert cresson) ;</li> <li>• <b>Verso:</b> La même couleur au recto;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Très rapide de 2 à 3 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés, peu ramifiés, pigmentés en brun;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> Cloisonnés, bruns, septés, simples, plus ou moins droits (généculés);</li> <li>• <b>Conidies:</b> Brunnes, ovoïdes, pluricellulaires, da partie basale arrondie, présentent des cloisonnements obliques transversales.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A7A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Geotricum</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Geotricum sp.1</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonies de Surface; cireuse peu duveteuse; et de Relief; planes, Couleur; blanc-beige; de Revers; incolore;</li> <li>• <b>Croissance:</b> très lente de 5 à 7 jours, non extensive sur gélose PDA; sur Sabouraud est peut atteindre à 15 jours avec un diamètre de croissance ne dépasse pas 1cm ;</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La présence ; des eudomycéliums se désarticulent en arthrospores à parois épaisses;</li> <li>• L'identification est peu semblable avec le <i>Trichosporon sp.</i>, et la différence est sur: le test de la recherche d'une uréase en milieu urée-indole à 37°C est positif (GUILLAUME ; 2006).</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A7B</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Zygomycotina  <b>Famille:</b> Mucoraceae  <b>Ordre :</b> Mucorales  <b>Genre:</b> Rhizopus</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Rhizopus sp.</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface ; duveteuses, à une texture cotonneuse, et de Relief ; surélevée, et de Couleur ; blanche au départ, puis deviennent mouchetées de points noirs foncées en vieillissant correspondant aux organes fructifères asexués;</li> <li>• <b>Verso:</b> noire;</li> <li>• <b>Croissance :</b> Très rapide (1 à 2 jours), et extensive sur gélose de PDA, et Sabouraud, de manière quasi-totale la boîte de culture en 2 à 3 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Thalle:</b> Filaments très larges non ou peu septés;</li> <li>• <b>Sporocystophores:</b> Bruns sont isolés ou disposés en bouquets de 2 à 6 éléments;</li> <li>• <b>Sporocystes:</b> Globuleux avec une columelle globuleux cylindrique et une apophyse courte;</li> <li>• <b>Spores:</b> Ovoïdes;</li> <li>• <b>Stolons,Rhizoïdes:</b> Bien différenciées.</li> </ul>


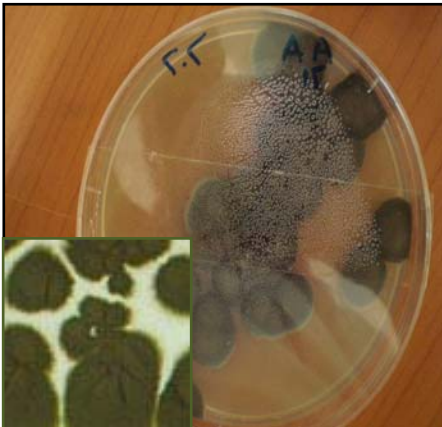



Les mycotaxons étudiés	Identification des mycotaxons étudiés	
<p style="text-align: center;"><b>A9A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Dematiaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Epicoccum</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Epicoccum sp.</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Texture ; suédée à duveteuse; et de Relief ; surélevées, et de Couleur ; jaune au départ, puis orange-brun, devient brun verdâtre avec l'âge de plus de 15 jours de croissance, un pigment diffusible est produit change la couleur du milieu de culture de jaune moyen à orange;</li> <li>• <b>Verso:</b> même couleur au recto, souvent de couleur plus intense;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Rapide de 3 à 5 jours.</li> </ul> <p>On peut observer macroscopiquement, de nombreux sporodochia noirs (agrégats de conidiophores) apparaissent comme des points noirs sur la surface de la colonie; ce sont des touffes d'hyphe avec des conidiophores;</p> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés, de couleur bruns;</li> <li>• <b>Conidiophore :</b> Courtes, ramifiés, légèrement pigmentés en bruns pâle;</li> <li>• <b>Conidies:</b> Multicellulaires, globuleux, bruns foncé à doré jusqu'à la maturité, devient noires.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A9B</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Penicillium</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Penicillium sp.1</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface ; duveteuses, poudreuse, et de Relief ; peu surélevés, et de Couleur ; variable de blanc à gris au départ, et souvent vert -jaune ;</li> <li>• <b>Verso:</b> Incolore ;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Rapide de 3 à 5 jours ;</li> <li>• Un pigment jaune claire diffuse dans la gélose.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés, hyalines, portent des conidiophores;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> Simples peu ramifiés, cylindrique, cloisonnées;</li> <li>• <b>Phialides:</b> Disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores ;</li> <li>• <b>Conidies:</b> Rondes à ovoïdes, lisses;</li> <li>• L'identification précise demeure difficile mais seulement basée sur les critères macro-micromorphologiques bien qu'elle soit possible.</li> </ul>

Les mycotaxons étudiés	Identification des mycotaxons étudiés	
<p style="text-align: center;"><b>A10A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Dematiaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Cladosporium</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Cladosporium herbarum</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Texture; floconneuse, et de Relief; surélevées, et de Couleur; vert olive au brun olive très foncé;</li> <li>• <b>Verso:</b> Brun noir;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Très lente de 7 à 10 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Foncé, septés, sont pigmentés;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> Peu long;</li> <li>• <b>Phialides:</b> Portées par des métules insérées sur la vésicule;</li> <li>• <b>Conidies:</b> Elliptique à cylindrique, lisse, formées à l'extrémité des conidiophores les premières sont de grande taille, et les suivantes sont plus petites, l'ensemble forme de longues chaînes, ramifiée.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A11A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Dematiaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Curvularia</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Curvularia sp.</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Surface; laineuse, et de Relief; planes, et de Couleur; brun olive au départ devient vert foncé à noir;</li> <li>• <b>Verso:</b> Foncé;</li> <li>• <b>Croissance :</b> Rapide de 3 à 5 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés; rapidement foncés;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> Sont bruns, simples, peu ramifiés, géniculés à leur extrémité;</li> <li>• <b>Phialides:</b> Portées par des métules insérées sur la vésicule;</li> <li>• <b>Conidies:</b> Ou porospores sont brunes, pluricellulaires et légèrement incurvées, cloisonnées seulement transversalement.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A12A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Penicillium</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Penicillium sp.2</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto :</b> Colonies de Surface; poudreuse, et de Relief; planes, et de Couleur; blanc puis bleu vert;</li> <li>• <b>Verso:</b> Incolore;</li> <li>• <b>Croissance :</b> Rapide de 3 à 5 jours;</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe :</b> Septés, hyalines, portent des conidiophores;</li> <li>• <b>Conidiophore :</b> Ramifiés, cylindrique, cloisonnées;</li> <li>• <b>Phialides :</b> Disposées en pinces ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores;</li> <li>• <b>Conidies :</b> Rondes, lisses.</li> <li>• L'identification précise demeure difficile mais seulement basée sur les critères macro- micromorphologiques bien qu'elle soit possible.</li> </ul>

Les mycotaxons étudiés	Identification des mycotaxons étudiés	
<p style="text-align: center;"><b>A12B</b></p> <p><u>Règne:</u> Champignons  <u>Division:</u> Deuteromycotina  <u>Classe:</u> Blastomycètes  <u>Ordre:</u> Cryptococcales  <u>Genre:</u> Trichosporon</p> <p><u>Espèce:</u> <i>Trichosporon sp.2</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonies de Surface ; lisse, plissée de Type levuforme ; et de Relief ; planes, Couleur ; crème ;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Rapide de 2 à 3 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mélange de courts filaments septés irréguliers dont certains sont fragmentés en petits éléments ou arthrospores, et de blastospores</li> </ul> <p>* Le test de la recherche d'une uréase en milieu urée-indole à 37°C est positif.</p>
<p style="text-align: center;"><b>A12C</b></p> <p><u>Règne:</u> Champignons  <u>Division:</u> Deuteromycotina  <u>Classe:</u> Hyphomycètes  <u>Famille:</u> Moniliaceae  <u>Ordre:</u> Moniliales  <u>Genre:</u> Geotricum</p> <p><u>Espèce:</u> <i>Geotricum sp. 2</i></p>		<p><b>Caractères cultureux:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonies de Surface ; cireuse; et de Relief ; planes, Couleur ; beige ; de Revers ; beige à orange claire avec le temps de 10 jours de croissance;</li> <li>• <b>Croissance:</b> très lente de 5 à 7 jours, non extensive sur gélose PDA; sur Sabouraud la croissance est très lente.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La présence; des eudomycéliums se désarticulent en arthrospores à parois épaisses;</li> <li>• Le test de la recherche d'une uréase en milieu urée-indole à 37°C est positif;</li> <li>• L'identification est peu semblable avec le <i>Trichosporon sp.</i>, et la différence est sur: le test de la recherche d'une uréase en milieu urée-indole à 37°C est positif (GUILLAUME ; 2006).</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>A13A</b></p> <p><u>Règne:</u> Champignons  <u>Division:</u> Deuteromycotina  <u>Classe:</u> Hyphomycètes  <u>Famille:</u> Moniliaceae  <u>Ordre:</u> Moniliales  <u>Genre:</u> Acremonium</p> <p><u>Espèce:</u> <i>Acremonium sp.</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies finement de Surface ; poudreuse plus souvent humides, de Relief; peu planes, et de Couleur ; varie du blanc au rose claire ;</li> <li>• <b>Verso:</b> Incolore ;</li> <li>• <b>Croissance:</b> restreintes de 3 à 5 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Thalle :</b> Septés, disposés, parallèlement les uns aux autres ;</li> <li>• <b>Phialides:</b> Naissent directement des filaments végétatifs, fines et cylindriques;</li> <li>• <b>Conidies:</b> Cylindrique, hyalines, regroupées en amas, à l'extrémité des phialides.</li> </ul>



Les mycotaxons étudiés	Identification des mycotaxons étudiés	
<p><b>A14A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Fusarium</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Fusarium sp.</i></p>	 <p>l'identification des espèces de ce genre est difficile, nécessite d'autre analyse d'identification.</p>	<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto :</b> Colonies de Surface ; duveteuses, laineuse à cotonneuse et de Relief ; planes, et de Couleur ; blanches à crème peu orangée;</li> <li>• <b>Verso:</b> brun orangé;</li> <li>• <b>Croissance:</b> Rapide mais non extensive sur gélose PDA ou Sabouraud de 3-5 jours</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Septés;</li> <li>• <b>Conidiophore:</b> Simples, portent de longues monophialides d'aspect cylindrique ;</li> <li>• On observe trois types de spore sont produites, les macroconidies cloisonnées en forme de banane, et les microconidies, uni ou/ bicellulaires ovales disposées en fausses têtes, et les chlamydoconidies isolées en courtes chaînes ;</li> </ul>
<p><b>A15A</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Dematiaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Cladosporium</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Cladosporium sp.</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto:</b> Colonies de Texture ; veloutée et poudreuse, et de Relief ; peu surélevé, et de Couleur ; vert olive au brun très foncé ;</li> <li>• <b>Verso:</b> brun-vert foncé;</li> <li>• <b>Croissance :</b> lente de 5 à 7 jours.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe:</b> Foncé, septés, sont pigmentés;</li> <li>• <b>Conidiophore :</b> Longueur variable;</li> <li>• <b>Conidies :</b> Elliptique à cylindrique, lisse, formées à l'extrémité des conidiophores les premières sont de grande taille, et les suivantes sont plus petites, l'ensemble forme de longues chaînes, ramifiées.</li> <li>• La différence entre les deux espèces de Cladosporium étudiées est confirmée beaucoup plus à l'échelle de caractères cultureux, selon les clés d'identification (LANIER <i>et al.</i>, 1976, 1978; TAYLOR <i>et al.</i>, 2004; DEACON, 2006).</li> </ul>
<p><b>A15B</b></p> <p><b>Règne:</b> Champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Trichoderma</p> <p><b>Espèce:</b> <i>Trichoderma sp.</i></p>		<p><b>Caractères cultureux :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Recto :</b> Colonies de Surface ; laineuses, et de Relief ; planes, et de Couleur ; blanche au départ, puis apparaissent en vieillissant des touffes verdâtre isolées en anneaux concentrique sur le milieu par le temps;</li> <li>• <b>Verso :</b> Reste en incolore;</li> <li>• <b>Croissance :</b> Très rapide de 2 à 3 jours et extensive sur gélose.</li> </ul> <p><b>Morphologie microscopique:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hyphe :</b> Septés, hyalines;</li> <li>• <b>Conidiophore :</b> Petits, bien différenciés simples ou peu ramifiés ;</li> <li>• <b>Phialides :</b> Petite taille, fixées à angle droit sur les conidiophores;</li> <li>• <b>Conidies :</b> Lisses, globuleuses, rassemblent en amas au sommet des phialides.</li> </ul>

## III.3.1 TEST D'ANTAGONISME

Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (Pathogène/Antagoniste). Après 144 heures d'incubation. Nous avons constaté l'apparition d'une zone d'inhibition plus ou moins différente selon les antagonistes étudiés suivie par un arrêt de croissance des souches du pathogène. Le calcul du taux d'inhibition confirme ces résultats, les souches du pathogène sont inhibées à plus de 50 % avec un nombre très important des antagonistes étudiés comme il est représenté dans les tableaux (11 et 12).

Tableau 11: Test d'antagonisme d'*Aspergillus niger* S1/Antagonistes \*

Pathogène/Antagoniste			Période d'incubation (heures)						Taux d'inhibition I(%)	
			24h	48h	72h	96h	120h	144h		168h
Do (Ø de S1 ; en absence d'antagoniste)			3.0	5.2	12.1	16.3	21.6	26.8		33.1
Dn (Ø de S1 en présence de :	A1	A	2,7	3,8	8,2	10,7	13,9	16,7	16,7	<b>49,55</b>
		B	2,7	3,9	8,4	10,9	14,1	16,9	16,9	<b>48,94</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A2	A	2,8	4,2	9,4	12,3	15,9	19,2	19,2	<b>41,99</b>
		B	2,7	3,9	8,3	10,8	14,0	17,3	17,3	<b>47,73</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A3	A	2,8	4,2	9,4	12,2	15,8	17,0	17,0	<b>48,64</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A4	A	2,5	3,5	6,8	8,5	11,0	13,5	13,5	<b>59,21</b>
		B	2,6	3,7	6,9	9,0	11,5	11,9	11,9	<b>64,05</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A5	A	2,8	4,3	9,6	12,6	16,2	19,9	19,9	<b>39,88</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A6	A	2,7	4,0	8,6	11,4	14,9	18,0	18,0	<b>45,62</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A7	A	2,9	4,8	10,5	13,7	18,0	21,5	21,5	<b>35,05</b>
		B	2,2	3,3	6,5	7,4	8,7	9,5	9,5	<b>71,30</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A9	A	2,7	3,9	7,2	9,5	12,5	15,2	15,2	<b>54,08</b>
		B	2,7	4,1	9,0	11,8	15,5	12,3	12,3	<b>62,84</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A10	A	2,6	3,6	6,8	8,6	11,2	13,6	13,6	<b>58,91</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A11	A	2,9	4,5	9,9	12,8	16,7	20,5	20,5	<b>38,07</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A12	A	2,9	4,4	8,2	9,5	11,5	12,0	12,0	<b>63,75</b>
		B	2,2	3,4	6,6	7,7	9,3	11,1	11,1	<b>66,47</b>
		C	2,8	4,1	8,9	11,6	15,3	22,0	22,0	<b>33,53</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A13	A	2,6	4,0	9,1	11,4	13,9	15,7	15,7	<b>52,57</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A14	A	2,9	4,7	10,1	13,0	13,8	16,0	16,0	<b>51,66</b>
Dn (Ø de S1 en présence de :	A15	A	2,8	4,3	9,5	11,8	14,3	15,9	15,9	<b>51,96</b>
		B	2,3	4,2	9,0	10,1	11,3	12,5	12,5	<b>62,24</b>

\* Voir le tableau 10, pour l'abréviation des codes des mycotaxons endophytes.



Tableau 12 : Test d'antagonisme d'*Aspergillus flavus* S2/Antagonistes\*

Pathogène/Antagoniste			Période d'incubation (heures)							Taux d'inhibition I(%)
			24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	
			Le diamètre moyen du champignon pathogène S2 (mm)							
Do (Ø de S2 ; en absence d'antagoniste)			2.4	4.7	11.4	15.5	20.7	25.6	31.9	
Dn (Ø de S2 en présence de :	A1	A	2,1	3,5	7,8	9,5	11,0	16,0	16,0	<b>49,84</b>
		B	2,1	3,6	8,5	10,7	13,5	15,9	15,9	<b>50,16</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A2	A	2,2	4,4	9,4	12,1	15,5	18,8	18,8	<b>41,07</b>
		B	2,2	3,6	8,1	10,7	14,1	17,3	17,3	<b>45,77</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A3	A	2,3	3,9	8,7	11,0	14,5	17,6	17,6	<b>44,83</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A4	A	2,2	3,2	7,5	9,8	12,8	14,7	14,7	<b>53,92</b>
		B	2,2	3,4	8,0	10,6	13,6	16,4	16,4	<b>48,59</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A5	A	2,3	4,4	9,7	12,2	15,5	19,1	19,1	<b>40,13</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A6	A	2,3	4,2	9,3	11,8	15,2	18,6	18,6	<b>41,69</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A7	A	2,2	4,1	9,9	12,9	16,9	20,8	20,8	<b>34,80</b>
		B	2,2	3,2	7,1	9,0	11,5	13,4	13,4	<b>57,99</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A9	A	2,1	3,0	6,9	9,0	11,3	12,9	12,9	<b>59,56</b>
		B	2,2	3,7	8,2	10,3	13,6	16,2	16,2	<b>49,22</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A10	A	2,2	3,8	8,9	10,6	13,7	16,6	16,6	<b>47,96</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A11	A	2,3	4,3	10,3	13,4	17,7	21,7	21,7	<b>31,97</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A12	A	2,0	3,7	8,0	9,7	10,5	11,8	11,8	<b>63,01</b>
		B	2,2	3,4	7,5	9,9	12,5	13,9	13,9	<b>56,43</b>
		C	2,3	4,2	10,1	13,3	17,5	21,4	21,4	<b>32,92</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A13	A	2,2	3,9	9,1	10,9	13,8	16,9	16,9	<b>47,02</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A14	A	2,0	3,2	7,4	9,5	11,0	12,4	12,4	<b>61,13</b>
Dn (Ø de S2 en présence de :	A15	A	2,2	4,1	9,1	11,4	14,7	17,9	17,9	<b>43,89</b>
		B	2,1	3,3	7,4	9,1	10,5	12,5	12,5	<b>60,82</b>

\* Voir Tableau 11, pour l'abréviation des isolats fongiques.

### III.3.2 TEST D'ANTIBIOGRAMME

Les résultats obtenus dans le tableau.13 a révélé que les isolats fongiques peuvent être divisés en quatre groupes en fonction de pourcentage (%) moyen d'inhibition (en mm):

- **Des isolats à fort effet antimicrobien:** Le diamètre de la zone d'inhibition sur les bactéries et la levure Test est: à l'intervalle de 14 à 20 mm. Et donc la souche Test est sensible aux souches fongiques. Il s'agit d'*Aspergillus flavus* A1B, *Penicillium sp.1* A9B, et *Penicillium sp.2* A12A, *Acremonium sp.* A13A.

- **Des isolats à effet moyen:** Le diamètre de la zone d'inhibition sur les souches Test est: à l'intervalle de 10 à 14 mm: *Alternaria Alternata* A3A, et *Alternaria sp.*, A6A, *Aspergillus sp.3* A4A, *Fusarium sp* A14A, et *Rhizopus sp* A7B, *Trichoderma sp.* A15B.
- **Des isolats à effet faible ou limite:** Le diamètre de la zone d'inhibition sur les souches Test est: à l'intervalle de 08 à 10 mm: *Aspergillus sp.1* A1A, *Aspergillus sp.2* A2B, *Cladosporium herbarum* A10A, *Cladosporium sp.*, A15A.
- **Des isolats à effet nulle:** Le diamètre de la zone d'inhibition sur les souches Test est égale ou inférieur à 8 mm: *Mortierella wolfii*, A2A, *Trichosporon sp.1*, A4B, *Trichosporon sp.2*, A12B, *Bipolaris sp.*, A5A, *Geotricum sp.1*, A7A, *Geotricum sp.2*, A12C, *Epicoccum sp.*, A9A, *Curvularia, sp.*, A11A.

**Tableau 13:** Activité antibactérienne développée par l'ensemble des isolats fongiques sur les bactéries Test

Codes des isolats fongiques	Les extraits des isolats fongiques	La zone d'inhibition (mm)		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A1A	<i>Aspergillus sp.1</i>	09	09	08
A1B	<i>Aspergillus flavus</i>	17	14	13
A2A	<i>Mortierella wolfii</i>	-	-	-
A2B	<i>Aspergillus sp.2</i>	09	08	-
A3A	<i>Alternaria alternata</i>	14	-	-
A4A	<i>Aspergillus sp.3</i>	13	-	-
A4B	<i>Trichosporon sp.1</i>	-	-	-
A5A	<i>Bipolaris sp.</i>	-	-	-
A6A	<i>Alternaria sp.1</i>	14	-	-
A7A	<i>Geotricum sp.1</i>	-	-	-
A7B	<i>Rhizopus sp.</i>	12	-	-
A9A	<i>Epicoccum sp.</i>	-	-	-
A9B	<i>Penicillium sp. 1</i>	20	17	16
A10A	<i>Cladosporium herbarum</i>	08	09	08
A11A	<i>Curvularia sp.1</i>	-	-	-
A12A	<i>Penicillium sp.2</i>	21	18	15
A12B	<i>Trichosporon sp.2</i>	-	-	-
A12C	<i>Geotricum sp.2</i>	-	-	-
A13A	<i>Acremonium sp.</i>	18	10	14
A14A	<i>Fusarium sp.</i>	13	-	-
A15A	<i>Cladosporium sp.</i>	08	09	09
A15B	<i>Trichoderma sp.</i>	11	14	11
<b>Chloramphénicol 30µg (control)</b>		<b>25.3±0.5</b>	<b>20.0±1.4</b>	<b>16±0.8</b>
<b>DMSO:Eau (1 :9)</b>		-	-	-

Par ailleurs, le tableau.14 représente la fréquence d'effet antibactérien fort et moyen des isolats sur l'ensemble des bactéries:

**Tableau 14:** Activité antibactérienne développée par l'ensemble des isolats fongiques sur *Candida albicans*

Codes des isolats fongiques	Les extraits des isolats fongiques	La zone d'inhibition (mm)
		<i>Candida albicans</i>
A1A	<i>Aspergillus sp.1</i>	08
A1B	<i>Aspergillus flavus</i>	13
A2A	<i>Mortierella wolfii</i>	-
A2B	<i>Aspergillus sp.2</i>	08
A3A	<i>Alternaria alternata</i>	10
A4A	<i>Aspergillus sp.3</i>	-
A4B	<i>Trichosporon sp.1</i>	-
A5A	<i>Bipolaris sp.</i>	-
A6A	<i>Alternaria sp.1</i>	09
A7A	<i>Geotricum sp.1</i>	-
A7B	<i>Rhizopus sp.</i>	13
A9A	<i>Epicoccum sp.</i>	-
A9B	<i>Penicillium sp. 1</i>	08
A10A	<i>Cladosporium herbarum</i>	09
A11A	<i>Curvularia sp.1</i>	-
A12A	<i>Penicillium sp.2</i>	09
A12B	<i>Trichosporon sp.2</i>	-
A12C	<i>Geotricum sp.2</i>	-
A13A	<i>Acremonium sp.</i>	11
A14A	<i>Fusarium sp.</i>	14
A15A	<i>Cladosporium sp.</i>	08
A15B	<i>Trichoderma sp.</i>	14
<b>Kétoconazole (KET)</b>		<b>33±0.5</b>
<b>DMSO : Eau (1:9)</b>		-

➤ *Escherichia coli* :

- **Effet antibactérien fort :** *Aspergillus flavus* A1B, *Penicillium sp.1* A9B, et *Penicillium sp.2* A12A, *Acremonium sp.*, A13A.
- **Effet antibactérien moyenne:** *Alternaria Alternata* A3A, et *Alternaria sp.* A6A, *Aspergillus sp.3* A4A, *Fusarium sp.*, A14A, et *Rhizopus sp.*, A7B, *Trichoderma sp.* A15B.

➤ *Staphylococcus aureus* :

- **Effet antibactérien fort :** *Penicillium sp.1* A9B, et *Penicillium sp.2* A12A.
- **Effet antibactérien moyenne:** *Aspergillus flavus* A1B, *Trichoderma sp.*, A15B.

➤ *Pseudomonas aeruginosa*:

- **Effet antibactérien fort** : *Penicillium sp.1* A9B, *Penicillium sp.2* A12A.
- **Effet antibactérien moyenne**: *Acremonium sp*, A13A.

La fréquence d'effet antimicrobien moyenne sur la *Candida albicans*: *Fusarium sp.*, A14A, et *Rhizopus sp* A7B, *Trichoderma sp.* A15B, *Aspergillus flavus* A2B, *Acremonium sp.*, A13A.

### III.3.3 DISCUSSION

Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires peuvent montrer des productions impressionnantes mais leurs produits peuvent aussi avoir une grande importance commerciale. **Les antibiotiques**, métabolites secondaires comme les Pénicillines, les Céphalosporines et la Cyclosporine B (immunosuppressive), largement prescrites comme des médicaments et sont classées dans les 5 % de vente des produits pharmaceutiques, et **les mycotoxines**, métabolites secondaires, sont des dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'Acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques. Les mycotoxines sont des moyens de défense pour les champignons contre les parasites ou contre d'autres organismes en concurrence dans le même environnement (ADAMS et MOSS, 2002).

Quelques métabolites fongiques sont retenus dans le mycélium fongique, alors que les autres sont excrétés dans le milieu de culture. Les métabolites secondaires peuvent être obtenus à partir de la matière biologique suite à une extraction avec des solvants tels que l'acétate d'éthyle, sa production peut être réalisée sous trois conditions. Premièrement, il est nécessaire d'avoir des usines cellulaires pour synthétiser la molécule, c'est-à-dire de la biomasse; deuxièmement, les précurseurs, doit être présents; et troisièmement, les enzymes capables de transformer ces précurseurs, doivent être aussi présents et actifs (VOELKER et ALTABA, 2001).

Les sources de carbone telles que l'amidon, la dextrine, le glucose et le saccharose révèlent une grande croissance fongique et une bonne sporulation, sont communément utilisées comme des substrats de croissance pour produire des enzymes, influencent fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotique ou de mycotoxine par fermentation (MARTIN et LIRAS, 1989). Par contre, les Peptones et les sucres plus complexes comme le Galactose, la Xylose, le Mannitol et le Lactose ne permettent pas bien la production des métabolites secondaires (LIU et CHU, 1998).

L'utilisation des acides aminés, par exemple: L-Asparagine, comme sources d'Azote dans le milieu de croissance, régule le métabolisme secondaire, et les niveaux élevés de l'azote répriment la production d'antibiotiques pendant l'Idophase pour améliorer la biosynthèse de certains métabolites secondaires comme la Stérigmatocystine et l'Aflatoxine chez *Aspergillus nidulans* et l'aflatoxine chez *A. parasiticus*, et la Pénicilline chez *P. chrysogenum* (FENG et LEONARD, 1998).

A l'égard de nombreuses mycoendophytes isolés et identifiés dans cette étude, les résultats du test d'antibiogramme et d'antagonisme, sont très importants, car elles considèrent comme un travail initial portant sur la sélection des aiguilles du *Pinus halepensis*, Ainsi, qu'elles représentent pour la première fois sur la mycoflore endophyte du pin d'Alep.

L'activité antimicrobienne des isolats fongiques identifiés, consiste à rechercher l'effet antibiotique et antifongique de ses MSB sur le développement des souches Test: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, et *A. niger*.

Une différence dans la sensibilité des espèces microbiennes a été enregistrée pour les isolats fongiques étudiés. Cette différence suggère la sensibilité des différents microorganismes aux divers composants des MSB des mycoendophytes étudiés. Pour cela, cette sensibilité des microbes aux MSFB varie selon l'espèce microbienne. L'*E.coli* a montrée une grande sensibilité aux MSFB, alors que, *Candida albicans* et les Staphylocoques ont montrés moins de sensibilité que l'*E.coli.*, et une sensibilité presque limité pour le *Pseudomonas aeruginosa*.

Le Test d'activité antibactérienne des isolats fongiques a révélé que la majorité des isolats présentent une activité antibactérienne sur, au moins, une des bactéries Test; où les isolats fongiques, qui ont une activité antibactérienne à fort effet sur les trois bactéries Test sont: *Aspergillus flavus*; les deux espèces de *Penicillium sp.*, et l'*Acremonium sp.*, alors que, *Trichoderma sp.* montre une activité à moyen effet sur les 3 bactéries Test, par rapport à *Alternaria alternata*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.3*; *Fusarium sp.*; *Rhizopus sp.*; qui ont une activité antibactérienne à moyen effet sauf sur *E. coli* d'une part, et une activité antibactérienne nulle sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* d'autre part. Ces résultats sont interprétés par des tests d'antibiogramme sur une gamme des

antibiotiques sélectifs, et conclus que les Staphylocoques et *Pseudomonas aeruginosa* sont des souches résistantes et multi-résistantes respectivement.

On outre, cette activité est limitée sur les 3 bactéries Test par l'*Aspergillus sp.1*, *Cladosporium herbarum*, et *Cladosporium sp.*, et quasiment absente sur les trois bactéries Test par les deux espèces de *Trichosporon sp.*, et les deux espèces de *Geotricum sp.*, et de *Bipolaris sp.*, *Epicoccum sp.*, *Mortierella wolfii.*, et *Curvularia sp.*

Cependant, les deux espèces de *Penicillium sp.*, développent une activité antibactérienne plus importante sur toutes les bactéries Test d'une part, et le seul isolat à avoir un effet nettement important sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant d'autre part. L'effet antimicrobien de cet isolat, est donc, largement justifié d'autant plus, en parallèle avec les recherches bibliographiques, ainsi que, les genres d'*Aspergillus*, et les espèces de l'ordre des Monilliales qui constituent les réservoirs les plus importants des antibiotiques (BOTTON *et al.*, 1990). (Voir le tableau.2).

L'effet antimicrobien des isolats étudiés assez moyen sur *Candida albicans*, où *Fusarium sp.*, *Trichoderma sp.*, sont les plus marquants que *Rhizopus sp.*, *Acremonium sp.*, *Aspergillus flavus.*, et *Alternaria alternata*, alors que, les autres isolats ont une activité limitée, et presque nulle chez: *Mortierella wolfii.*, *Aspergillus sp.3.*, *Bipolaris.*, *Epicoccum sp.*, *Curvularia sp.*, et les deux espèces de *Trichosporon sp.*, et de *Géotricum sp.*

Le *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.2*, *Epicoccum sp.*, *Trichosporon sp.2.*, *Aspergillus sp.3*, *Fusarium sp.*, *Trichoderma*, marquent un effet antagoniste très important sur les deux espèces d'*Aspergillus* Test.

*Trichosporon sp.1*, *Penicillium sp.1*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium*, et *Acremonium sp.*, ont un effet antagoniste sur *A. niger* d'une part, et au contraire avec *A. flavus* d'autre part avec un taux d'inhibition moins de 50% (Voir le tableau.12).

Trois cas particuliers présentent une interrogation dans cette étude, nécessitent un intérêt particulier et plus profond dans nos perspectives. *Cladosporium sp.*, a une activité antifongique avec un taux d'inhibition de 51.96 % sur *A.niger*, et n'ont pas une activité antifongique sur *A. flavus* où le taux d'inhibition est de 43.89 %. Ainsi, l'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus sp.1*, ont un taux d'inhibition presque 50 % sur les deux espèces d'*Aspergillus* Test (Voir le tableau 11 et 12).

TUNALI et MARSHALL, (2000) fait des travaux qui consiste l'effet antagoniste de champignons endophytes contre plusieurs pathogènes de pourriture des racines du blé, et il

résulte quatre espèces différentes d'endophytes ont été isolées dans des ray-grass, *Triticum spp.* et *Festuca arundinacea*. Toutes les espèces de *Neotyphodium* et *Acremonium* ont affecté de manière significative, le taux de croissance de cinq champignons pathogènes de pourriture des racines de blé dans des PDA. Les filtrats de culture des endophytes ont eu un certain effet contre ces champignons de l'essai. Cependant, les traitements sans filtre sont plus efficaces que les cultures avec filtres. Les conidies d'*A. typhinum* et de *D. sorokiniana* ont été mélangées pour l'essai de germination. Ces champignons pathogènes ont montré une élongation anormale des hyphes, une lyse des conidies et des tubes anormaux de germe.

La production des substances antimicrobiennes par les mycotaxons endophytes et son excrétion dans le milieu a commencé durant la fin de la phase exponentielle de croissance et atteint son maximum pendant la phase stationnaire. Ces constatations sont en concordance avec plusieurs travaux indiquant que des métabolites secondaires chez les mycètes sont excrétés durant la phase stationnaire soit après la production de différents métabolites primaires (CALVO *et al.*, 2002; TORTORA *et al.*, 2003 ).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de MEREDITH et POHLAND, (1970) qui ont montré que les mycètes sont, en premier, des producteurs des substances antibactériennes d'une part et que le système solvant utilisé dans l'extraction et l'élution s'avéraient efficace d'autre part. En outre, l'utilisation de chromatographie sur couche mince (CCM) pour séparer et purifier les substances actives a permis l'obtention de spots purs. Cette pureté est démontrée par son application sur des bactéries Test et l'obtention d'un effet considérable. En effet, plusieurs travaux consultés ont mentionné que la CCM est appliquée dans la plupart des cas de purification de métabolites secondaires de mycètes (BETINA, 1989; NEILSON, 2000).

Selon les travaux dirigés pour cette étude, il y a moins des travaux déjà réalisés sur l'activité antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes des végétaux supérieurs. Pour cela, les résultats de cette étude nécessitent un intérêt particulier et une investigation approfondie dans nos perspectives.

## CONCLUSION GENERALE

Dans cette étude, réalisée dans le laboratoire de bactériologie et de parasitomycologie de EPH de M'sila, suite à un isolement, identification, et activité antimicrobienne de la mycoflore endophyte du pin d'Alep du canton d'El-Haourane de la région de M'sila, nous avons démontré que la partie foliaire de *Pinus halepensis*, comme pour les autres conifères étudiés jusque là, abrite diverses taxons fongiques endophytes possèdent un effet antimicrobien contre plusieurs microorganismes pathogènes pour l'homme et pour les plantes.

L'ampleur de la colonisation endophyte de la trame mycoflore du pin d'Alep, montré généralement sur la recherche des mycoendophytes fongiques a été réalisée sur les aiguilles de pin d'Alep. Vingt-neuf mycoendophytes ont été isolés représentant quatorze genres: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Mortierella*, *Trichosporon*, *Geotricum*, *Acremonium*, *Bipolaris*, *Epicoccum*, et *Curvularia*. A cet égard, il est important d'effectuer des études plus approfondies tenant en considération l'allure chronologique et histologique de l'infection endophyte des tissus foliaires (saisonnalité et changements physiologiques périodiques accompagnants de la phyllosphère, l'âge de l'aiguille...), et la composition spécifique de la mycoflore endophyte est liée à l'état phytosanitaire de l'hôte.

L'âge de l'aiguille est un élément déterminant du taux d'infection par les champignons endophytes, nous avons démontré que le taux d'infection (exprimé en FC% égale à 68.5%) est d'autant plus important en allant des classes d'âge juvéniles vers les classes d'âge avancées de la partie foliaire pour la station étudiée. Cette constatation s'ajoute ainsi aux études précédentes (BERNESTEIN et CARROLL, 1977; HATA et FUTAI, 1993; DECKERT, 2000; STONE *et al.*, 2004).

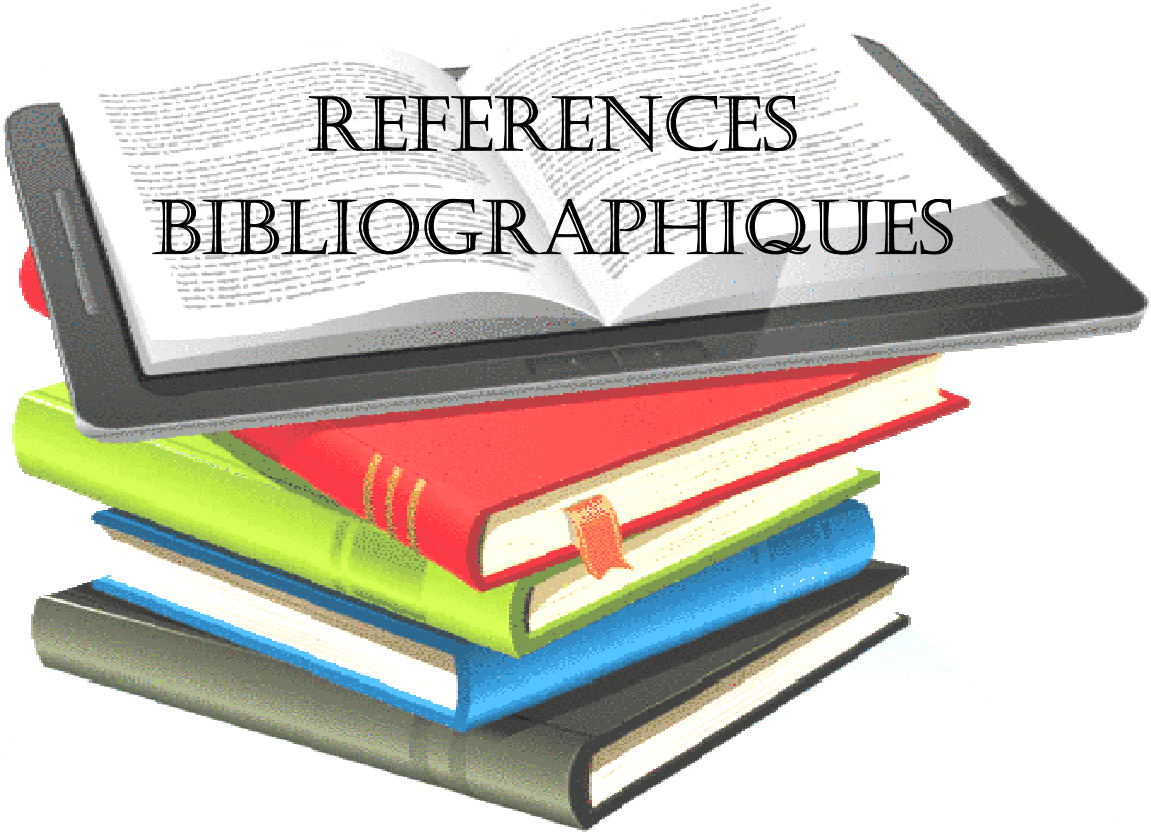
La mycoflore endophyte des aiguilles de *Pinus halepensis* est relativement diverse; la majorité des mycotaxons est rangée au sein du groupe mitosporique, ce qui démontre la dominance particulière de cette trame fongique dans cette association. Une telle présence active et marquante de ce groupe indique probablement que la perte de la reproduction sexuée chez les champignons mitosporiques endophytes et le recours exclusif au mode asexué implique une couverture « écophysiological » de la part de l'hôte comme étant une niche écologique permanente (espèce sempervirente) pour le partenaire fongique.



Le test d'activité antimicrobienne des isolats identifiés, qui consiste à rechercher l'activité antibactérienne et antifongique sur le développement des souches Test : *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, et *A. niger*, montrent que les genres: *Penicillium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichosporon*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, ont manifesté un effet antagoniste et antibiotique important, en considération avec les données bibliographiques.

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

- Etudier l'aspect anatomique et physiologique de l'infection endophyte pour expliquer le mécanisme naturel de l'infection – peu connu actuellement – connaître les facteurs génétiques qui gèrent l'élaboration, le succès et le maintien de la symbiose *Pinus halepensis* / champignon endophyte, mais également pour expliquer le *Switch* entre les différents régimes trophiques des mycoendophytes (mutualisme, infection latente, pathogénique, saprophytisme ...);
- Il est possible de donner une importance à la bioprospection des mycoendophytes pour leurs vertus agrochimiques (mycopesticides, biofertilisants) et Pharmaceutiques (anticancéreux, immunosuppresseurs...);
- L'identification génétique des mycotaxons endophytes résultantes de cette étude par des techniques de la biologie moléculaire;
- L'identification des substances antimicrobiennes extraites par des méthodes plus performantes comme HPLC, CPG, etc... ,afin d'obtenir de nouvelles substances;
- La production de la substance antimicrobienne à l'échelle industrielle (Scall-up).



REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS M.R., MOSS M.O. 2002.** Toxigenic fungi In "Food microbiology". RSC, UK.282-301.
- ALSPAUGHT J.A., PERFECT J.R., HATMAN J. 1997.** *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G- protein Alpha subunit GPAI and Camp. *Genes.Dev.*11: 3206-3217.
- ARBEZ M. 1987.** Les ressources génétiques forestières en France: les conifères, INRA, 49-54.
- ARNOLD A.E., MAYNARD Z., GILBERT G.S. 2001.** Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological research* 108 (12): 1502-1507.
- ARNOLD A.E., HERRE E.A. 2003.** Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95 (3): 388-398.
- AZEVEDO J.L., MACCHERNI JR.W., PEREIRA J.O., DE ARAUJO W.L. 2000.** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(1): 40-65.
- BADJ B., RIBA A., MATHIEU F., LEBRIHI A., SABAOU N. 2005.** Activité antifongique d'une souche d'*Actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de mycologie médicale* 15(2005):211-219.
- BELLEFONTAINE R. 1979.** Onze années d'amélioration génétique forestière. Annales de la recherche forestière au Maroc, Tome XIX. 15-48.
- BENNETT J.W., KLICH M. 2003.** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 16:497-516.
- BERNESTEIN M. E. et CARROLL G. C. 1977.** Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. *Canadian Journal of Botany* 55: 644-653.
- BETINA V. 1989.** Bioactive molecules, Vol. 9: Mycotoxins chemical, biological and environmental. Aspects Elsevier Science Publishers, Amsterdam.Netherlands.
- BILLS G.F., POLISHOOK J.D. 1994.** Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica, 86,178-198.
- BISHOP D.L., CHATTERTON N.J., HARRISON P.A., HATFIELD DR.D. 2002.** Changes in carbohydrate coordinated partitioning and cell wall remodelling with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiological and Molecular Pathology* 61:53-63.
- BOIRON P. 1996.** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris.
- BOTTON B., BRETTON A., FEVER M., GAUTIER S., GUY PH., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGLIER J.J., VAYSSIER Y., VEAU P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
- BOULAACHEB N. 2000.** Contribution à l'étude phytosociologique du Djebel Megriss. Thèse de Magister. Université de Sétif, Algérie. 92p.
- BOYLE C., GOTZ M., DAMMANN-TUGEND U., SCHULZ B. 2001.** Endophyte: host interactions III. Local vs. systemic colonization. *Symbiosis* 31:259-281.
- C.P.C.S. 1969.** Classification des Sols- La commission pédologique de la classification du sol. France.96p.
- CABRAL D., STONE J.K., CARROLL G.C. 1993.** The internal mycoflora of *Juncus* ssp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. *Mycological Research* 97:367-376.
- CAHAGNIER B., DRAGACC S., FRAYSSINET C., FREMY J.M., HENNEBERT G.L., LESAGE-MEESSEN L., MULTON J.L., RICHARD-MOLARD D., ROQUEBERT M.F. 1998.** Moisissures des aliments peu hydrates. *Lavoisier Tec and Doc*, France 104p.
- CALVO A.M., GARDNER H., WAND KELLER N.P. 2001.** Genitic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J.biol.Chem.* 276:20766- 20774.
- CALVO A.M., WILSON R.A., BOCK J.W., KELLER N.P. 2002.** Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.* 66:447-459.
- CARROLL G.C. 1986.** The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. Microbiology of the phyllosphere. Cambridge University Press. pp 205-222.
- CARROLL G.C. 1988.** Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2-9.
- CASSELLS A.C. 1991.** Problems in tissue culture: culture contamination. Micropropagation technology and application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland. pp. 31-44.

- CASTEGNARO M. 1999. Risques cancérogènes -Les aflatoxine. Dans "Les mycotoxines dans l'alimentation: evaluation et gestion du risque" de conseil supérieur d'hygiène publique de France. *Technique et Documentation*, Paris.
- CASTEGNARO M., CANASAS D., VRABCHEVA T., PETKOVA-BOCHAROVA T., CHERNOZEMSKY I.N., PFOHL-LESZKOWICZ A. 2006. Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxin A through biomarkers. *Molecular Nutrition Food Research* 50: 519-529.
- CHAMP S.P., RAW P., CHANG A. 1987. An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans* .. *J. Gen. Microbiol.* 133:1383- 1388.
- CHAMPE S.P., EL-ZAYAT A.A.E. 1989. Isolation of sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacterial* . 171:3982-3988.
- CLEMENT S. L., ELBERSON L. R., YOUSSEF N. N., DAVITT C. M. ET DOSS R. P. 2001. Incidence and diversity of *Neotyphodium* fungal endophytes in tall fescue from Morocco, Tunisia, and Sardinia. *Crop Science* 41: 570-576.
- CZECZOIT H. 1954. *The pasta ndpresent distribution of Pinus halepensis Mill, and Pinus brutia TenC.* .R. Cong. Bot. Paris, Vol. sections, 2-6, pp. 196-197.
- D'AMICO M., FRISULLO S., CIRULLI M. 2008. Endophytic fungi occurring in fennel, lettuce, chicory, and celery- commercial crops in southern italy. *Mycological research* 112: 100-107.
- DAVIS E.C., FRANKLIN J. B., SHAW A. J., VILGALYS R. 2003. Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American Journal of Botany* 90 (11): 1661-1997
- DEACON J. 2006. Fungal biology. 4ème edition. Blackwell Publishing. London. pp. 371.
- DEBAZAC E.F., TOMASSONE R. 1965. Contribution à une étude comparée des Pins Méditerranéens de la Section Halepensis. *Extr. Annales Sciences Forestières*, Nancy21, 2, pp. 213-256, 1965.
- DECKERT R. J. 2000. Structural and ecological aspects of the relationship of phyllosphere fungi with their host, *Pinus strobus* L. Thèse PhD. University of Guelph (Canada). pp.172.
- DECKERT R. J. et PETERSON R. L. 2000. Distribution of foliar fungal endophytes of *Pinus strobus* between and within host trees. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1436-1442.
- DEMAIN A AND FANG A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 69 : 1-39.
- DJEBAILI S. 1984. Steppe algérienne: phytosociologie et écologie. Ed. OPU. pp.26- 36.
- DURAFFOURD C., D'HERVICOURT L., LAPRAZ J.C. 1990. Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique Eléments Thérapeutiques Synergiques. 2ème Edition Masson (Paris).87 pp.
- ETZEL R.A. 2002. Mycotoxins . *JAMA* . 297(4): 425–427.
- FAETH S. H. 2002. Are entophytic fungi defensive plant mutualists, *OIKOS* 98: 25-36.
- FAETH S.H., BUSH L.P., SULLIVAN T.J. 2002. Peramine alkaloid variation in *Neotyphodium*infected Arizona fescue: effects of endophyte and host genotype and environment. *Journal of Chemical Ecology* 28(8): 1511-1526.
- FENG G.H., LEONARD T.J. 1998. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl Environ Microbiol* 64, 2275-2277.
- FINLAY R., WALLANDER H., SMITS M., HOLMSTROM S., VAN HEES P., LIAN B., ROSLING A. 2009. The role of fungi in biogenic weathering in boreal forest soils. *Fungal Biology Reviews* 23: 101-106.
- FISHER P.J., PETRINI O. 1987. Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: apreliminary study. *Mycological Research* 89: 246-249.
- FISHER P.J., PETRINI O. 1990. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England (UK) and Switzerland. *Mycol Res* 94: 313-319.
- GAMS W., HAEKSTRA E.S., APTROOT A. 1998. CBS. Course of mycology.Centralbureau voor. Schimmelcultures Baarns. The Netherlabnd.
- GANLEY R.J., NEWCOMBE G. 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* 110: 318-327.
- GAUSSEN H. 1926. *Végétation de la moitid orientale des Pyrdndes*.L echevalier ed. Paris, 526.
- GAUSSEN H. 1960. Les Gymnospermes actuelles et fossiles. Fasc. VI, chap. XI, pp. 1-272.

- GHANMI S., M. L. BOUAZIZI ET N. BOUHADDI. 2005.** Optimisation multiobjectifs en mécanique des structures : Approche basée sur les surfaces de réponse adaptative, *7ème colloque national en calcul des structures*, Giens, France.
- GOGOI D.K., MAZUMDER S., SAIKIA R., BORA T. C. 2008.** Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea spp.* NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. In North-Est India. *Journal de mycologie medicale*, **18**(2008):1-9
- GUILLAUME V. 2006.** Mycologie, Auto-évaluation manipulations.(edn). De boeck. Belgique.
- HALEWYN M. A., LERCTERC J. M., KING N., BELONGER M., LEGRIS M. AND FRENETT Y. 2001.** Les risques à la santé associés à la présence de moisissure en milieu intérieure. (edn) Quebec. Canada.
- HAPWOOD D. A. 1988.** Toward's and under standing of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. Land B.* **235**: 121-138.
- HATA K ET FUTAI K. 1993.** Effect of needle aging on the total colonization rates of endophytic fungi on *Pinus thumbergii* and *Pinus densifolia* needles. *Journal of Japanese Forestry Society* **75**: 338-341.
- HAWKSWORTH D. L., KIRK P. M., SUTTON B., PEGLER D.N. 1995.** Dictionnaire of the fungi, 8th ed. CAB. *International Walling Ford*. United Kingdom.
- HAWKSWORTH D.L. 2004.** Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in mycology* **50**: 9–18.
- HELANDER M. L., SIEBER T. N., PETRINI O ET NEUVONEN S. 1994.** Endophytic fungi in Scot's pine needles: spatial variation and consequences of simulated acid rain. *Canadian Journal of Botany* **72**: 1108-1113.
- HENDEY K. H., COLE C. E. 1993.** Areviws of mycotoxins in indoor air . *J.Toxicol. Environ. Health.* **38** (2) : 183- 198.
- HOFF J. A., KLOPFENSTEIN N. B., MCDONALD G. I., TONN J. R., KIM M. S., ZAMBINO P. J., HESSBURG P. F., ROGERS J. D., PEEVER T. L. ET CARRIS L. M. 2004.** Fungal endophytes in woody roots of douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology* **34**: 255-271.
- HOLDENDRIEDER O. et SIEBER T. N. 1992.** Fungal associations of serially washed healthy nonmycorrhizal roots of *Picea abies*. *Mycological Research* **96**: 151-156.
- HOLLAND M.A (1997)** Occams razor applied to hormonology. Are cytokinins produced by plants? *Plant Physiol* **115**: 865-868.
- HUSSEIN S. H., BRASEL J. M. 2001.** Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, **167**: 101-134.
- IARC -INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER-. 1993.** Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals t Human: Some Naturally Occurring Substances. Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC, Lyon, pp. 397-444.
- IONESCO T ET SAUVAE. 1962.** Les types de végétation du Maroc : Essai de nomenclature et de définition. *Rev. Géog. Maroc*, 1-2, pp.75-86.
- INSPQ -INSTITUT NATIONAL DE SANTE PUBLIQUE QUEBEC-. 2002.** Les risques à la santé associée à la présence de moisissures en milieu intérieur, Québec.
- JAE-HYUK Y AND KELLER N. P. 2005.** Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi . *Ann. Rev. Phytopathol.* **43**: 437- 458.
- JOHNSON J. A ET WHITNEY N. J. 1992.** Isolation of fungal endophytes from black spruce (*Picea mariana*) dormant buds and needles from New Brunswick, Canada. *Canadian Journal of Botany* **70**: 1754-17557.
- JUMPPONEN A. 2001.** Dark septate endophytes – are they mycorrhizal, *Mycorrhiza* **11**: 207-211.
- JURC D., JURC M., SIEBER T. N ET BOJOVIC S. 2000.** Endophytic *Cenangium ferruginosum* (Ascomycota) as a reservoir for an epidemic of *Cenangium Dieback* in Austrian pine. *Phyton (Austria)* **40** (4): 103-108.
- KANIZAWA M. 1984.** Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. *Developments in Food Science*, **7**: 245-254.
- KAWAMURA C., TSUJIMOTO T AND TSUG T. 1999.** Targeted dissuption of melanin biosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the japenesespear pathotype of *Alternaria alternate*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **12**: 59- 63.

- KELLER N. P AND WOOBOK J. 2005. Aglobal regulatory of secondary metabolite biosynthesis in fungi , (edn) Warfe.
- KIERSTIENS G. 1996. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure function relationship. *Trends in Plant Science* 1: 125-129.
- KOHN L. M. 2005. Mechanisms of fungal speciation. *Annual Review of Phytology* 43: 1211- 1230.
- LANE G. A., CHRISTENSEN M. J ET MILES C. O. 2000. Coevolution of fungal endophytes with grasses : the significance of secondary metabolites. In PETRINI O. et OUELLETTE G. B. (eds.) *Host wall alterations by parasitic fungi*. APS Press, St. Paul, MN. pp: 115-128.
- LANIER L., JOLY P., BONDOUX P., BELLEMERE A. 1976. Mycologie et Pathologie Forestière Volume II : Pathologie forestière. Edition Masson. 478 pp.
- LANIER L., JOLY P., BONDOUX P., BELLEMERE A. 1978. Mycologie et Pathologie Forestière, Volume I : Mycologie forestière. Edition Masson. 487 pp.
- LARPANT J. P., LARPANT-GOURGUAND M. 1996. Mémento Technique de microbiologie, 2ème édition. Technique et Documentation. Lavoisier.
- LI C.J., GAO J.H., HAN Z.B. 2007. Interactions of *Neotyphodium gansuense*, Achnatherum inebrians, and plant-pathogenic fungi. *Mycological Research* 111:1220-1227.
- LIU B.H., et CHU F.S. 1998. Regulation of *aflR* and its product, *AflR*, associated with aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 64, 3718-3723.
- LUCERO M.E., BARROW J. R., OSUNA P., REYES I. 2006. Plant-fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: large-scale impacts from microscale process. *Journal of Arid Environments* 65:276-284.
- MAAROUF A. 2000. Dictionnaire de botanique (Les phanérogames).
- MADIGAN M.T., MATINKO J.M., PARKER J. 1997. Brok biology of microorganisms, 8<sup>th</sup> edn. USA
- MAHEUX L .1998. Session on microbial contamination occupational and environmental health services agency , (edn) Health Canada. Canada.
- MALINOWSKI D.P., BELESKRY D.P. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40 (4): 923-940.
- MANDERVILLE R.A., PFOHL-LESZKOWICZ A. 2006. Genotoxicity of chlorophenols and ochratoxin A. *Advance in molecular toxicology*, 1:73-118.
- MANOHARAHARY C., SRIDHAR K., SINGH R., ADHOLEYA A., SURYANARAYANAN T.S., RAWAT S., JOHRI B.N. 2005. Fungal biodiversity: Distribution, conservation and prospecting of fungi from India. *Current Science* 89 (1): 58-71.
- MARTIN J.F., LIRAS P. 1989. Organisation and expression of genes involvbed in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolite. *Annu. Rev. Microbiopl.* 43:173-206.
- MASSEY T.E., STEWART R.K., DANIELS J.M., LING L. 1995. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208: 213-217.
- MAPLESTON R.A., STONE H.G., WILLIAMS P.H. 1992. The evolutionary rol of secondary metabolite. *A REVIEW.Gen.* 115:151-157.
- MAZURE P., NAKANISHI K., EL-ZAYAT A.A.E., CHAMP S.P. 1991. Structure and synthesis of sporogenic psifactors from *A. nidulans* .*J. Chem.Soc. Chem.Commun.*20:1486- 1487.
- MEREDITH J. C., F.G., POHLAND. 1970. Some observations of purple sulfur bacteria associated with waste stabilization ponds. *Purdue Eng. Ext. Series* 137(2): 699–707.
- MICHEL A. 2001. Métabolites secondaires d'*ophiostoma novo-ulmi* et de *coratocystis fimbriata* sp. *Platani*, pathogènes de l'orme et du platane. Thèse de doctorat en sciences. Institut de chimie. Université de Neuchâtel.16pp.
- MILLER W.A., ROY K.W. 1982. Mycoflora of soybean leaves, pods, and seeds in Mississippi. *Canadian Journal of Botany* 60: 2716-2723.
- MIROV N.T. 1955. Relationships between *Pinus halepensis* and other insignes pines of the Mediterranean region. *Bull. Res. Counc. Israel* SD.: 65–72.
- MOON C.D., MILES C.O., SCHARDL C.L. 2002. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern hemisphere. *Mycologia* 94 (4): 694-711
- MULLER C.B., KRAUSS J. 2005. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 450-456.

- NAHAL I. 1962. Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill). Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. Annales E.N.E.F., Nancy, 19: 475–686.
- NEILSON K.F. 2000. Mould growth on building materials secondary metabolites .Mycotoxins and biomarkers . www. Biocentrum. Dtu .dt, Mycology, Staff, Scientific staff, Neilson Kristian.
- OLDS R.J. 1979. Atlas en couleurs de Microbiologie. (edn). Maloine s.a. paris. pp 109-126.
- OZENDA P., 1974. Sur la définition d'un âge de vdgdtation supramdditerranéenne en GrèceV. eröff. Geobot. Inst. Zürich,Wübel.
- PACKER H.L., THOMAS C.R. 1990. Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. Biotechnology and Bioengineering 35, 870–881.
- PANETSOS C.K.P. Monograph of *Pinus halepensis* Mill. And *Pinus brutia* Ten . , Annales Forestales, vol. 9, no 2, pp. 39-77, Zagreb, 1980.
- PETERINI O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews J. et Hirano S. (eds.) Microbial Ecology of Leaves. Springer Verlag. pp 179-197.
- PFOHL-LESZKOWICZ A. 1999. Métabolisation des mycotoxines- Effets biologiques et pathologies- Ecotoxicogénèse. Dans « Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. *Technique et Documentation*, NParis, pp. 18- 35.
- PFOHL-LESZKOWICZ A., MANDERVILLE R.A. 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (1):61-99.
- PIRTTILA A.M. 2001. Endophytes in the buds of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Thèse Doctorat en Sciences. Department of Biology and Biochemistry, University of Oulu (Finlande) 52 pp.
- PRESCOTT ., HARLY., KLEIN. 1995. *Microbiologie*. 2th ed. Debroeck-wesmael. Bruxelles.
- POUGET M., 1980. Les relations sol- végétation dans les steppes sud algéroises.555 p.
- 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* endophytic fungus isolates from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 19 (2009):1572-1574
- QUEZEL P. 1980. *Biogdographie et dcologie des conifitires sur le pourtour mdditerrandIne Pn,E SSON* : Actualit& d'Ecologie Forestikre, Bordas Edit. Paris, 205-256.
- QUEZEL P. 2000. Réflexions sur l'évolution de la flore et de la végétation au Maghreb méditerranéen. Ibis Presse, Paris, 117p.
- RADJI M., SUMIATI A., RACHMAYANI R., et ELYA B., 2011. Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangostana* and their antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology* 10(1): 103-107.
- RAMADE F. 1994. Eléments d'Ecologie-.Ecologie fondamentale.Ed;Ediscience. Paris.549p.
- RAPILLY F., 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. Ann. Epiphyt., 101 p.
- RILY R.T., NORRED W.P. 1996. Mechanisms of mycotoxicity. In: The Mycota, Vol. VI (edited by Howard,D.H. and Miller, J.D.), Springer Verlag, Berlin Germany.
- RODRIGUEZ R.J., REDMAN R.S., HENSON J.M. 2004. The role of fungal symbiosis in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 9: 261-272.
- RUDGERS J.A., MATTINGLEY W.B., KOSLOW J.M. 2005. Mutualistic fungus promotes plant invasion into diverse communities. *Oecologia* 144: 463-471.
- SABATIER S., BARADAT P., BARTHELEMY D. 2003. Intra- and interspecific variations of polycyclism in young trees of *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex. Carrière and *Cedrus libani* A. Rich (Pinaceae). *Annals of Forest Sciences* 60: 19-29.
- SAIKKONEN K., WALI P., HELANDER M., FAETH S.H. 2004. Evolution of endophyte-plant symbiosis. *Trends in Plant Science* 19 (6): 275-280.
- SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S. 1988. Introduction to food –born fungi , 3 rd edn .Centra Albureau Voor .Schimelcultures. Baane. The Netherlands.
- SCHARDL C.L. 2001. *Epichloë festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal genetics and Biology* 33: 69-82.
- SCHMID E., 1966. Die Vegetation-Gürtel die Iberische Barbariesche Gebirge, Ver. Geobot. Inst. Rübel, Zurich, 31, 124-163.
- SCHULZ B., BOYLE C. 2005. *The endophytic continuum*. Technical University of Braunschweig, Spilmannstr, Germany. 64 pp.

- SCHULZ B., BOYLE C. 2006. What are Endophytes? Technical University of Braunschweig, Spilmannstr, Germany. 01 pp.
- SELTZER P., 1946 -Le climat de l'Algérie. Ed. Inst. de météorologie et de physique du globe de l'Algérie. 218 p
- SIEBER T.N. 2002. Fungal root endophytes. In WASEL Y., ESHEL A. et KAFKAFI U. (eds.) *Plant Roots: the hidden half*. Marcel Dekkert Inc. pp 887-917.
- SIEBER T.N., SIEBER-CANAVESI F., PETRINI O., EKRAMODDOULLAH A.K.M., DORWORTH C.E. 1991. Characterization of Canadian and European *Melanconium* from Anus species by morphological, cultural, and biochemical studies. *Canadian Jrnl of Botany* 69:2170-2176.
- SIEBER T.N., RYS J., HOLDENRIEDER O. 1999. Mycobiota in symptomless needles of *Pinus mugosp. uncinata*. *Mycological Research* 103 (3): 306-310.
- STROBL G.A., MILLER R.V., MARTINEZ-MILLER C., CONDRON M.M., TEPLow D.B., HESS W.M. 1999. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* fc. *quercina*. *Microbiology* 145: 1919-1956.
- STONE J.K. 1988. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir. *Canadian Journal of Botany* 66: 45-54.
- STONE J.K., POLISHOOK J.D., WHITE J.F. 2004. Endophytic fungi. In MUELLER G. M., BILLS G. F. et FOSTER M. S. (eds.) *Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press. pp 241-269.
- STONE M.J., WILLIAMS D.H. 1992. On the evolution of functional secondary metabolites (Natural products). *Mol. Microbiol.* 6: 29-34
- SURYANARAYANAN T.S., MURALI T.S., VENKATESAN G. 2002. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany* 80: 818- 826.
- SURYANARAYANAN T.S., THENNARASAN S. 2004. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal diversity* 195-202.
- SURYANARAYANAN T.S., WITTINGER S. K., FAETH S.H. 2005. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research* 109 (5): 635-639.
- TAN R.X., ZOU W.W. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448-459.
- TAYLOR J.W., JACOBSON D. J., KROKEN S., KASUGA T., GEISER D.M., HIBBETT D.S., FISHER M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fngl Gntics & Blgy* 31: 21-32.
- TRAIL F., MAHINTIN., LINZ J. 1995. Molecular biology of aflatoxine biosynthesis. *Microbiology*. 141: 755-765.
- TORTORA J., FUNK B.F., CASE CH.L. 2003 . *Introduction à la microbiologie* , (edn) ISBN.Canada.
- TUNALI B., MARSHALL D. 2000. Antagonistic effect of endophytes against several root-rot pathogens of wheat. *CIHEAM-Option méditerranéennes. Série A:* (40):381-386.
- VENNETIER M., GIRARD F., DIDIER C., OUARMIM S., RIPERT C., MISSON L., ESTEVE R., MARTIN W., N'DIAYA A. 2011. Adaptation phénologique du pin d'Alep au changement climatique. *Forêt méditerranéenne*. Accepté pour publication
- VIDHYASEKARAN P. 2004. Concise encyclopedia of plant pathology. Food Products Press & Th Haworth Press. New York. 619 pp.
- VOELKER F., ALTABA S. 2001. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristina mycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology* 147, 2447-2459.
- WILSON R. 1997. Endophytic fungi from four tree species in New Brunswick and a comparison of two methods of identification of *Leptostroma* isolates of *Pinus resinosa* : Morphology and molecular probing. Thèse Philosophia Doctor (PhD.). University of New Brunswick (Canada). 131 pp.
- YATES I.E., BACON C.W., HINTON D.M. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on growth and cellular morphology. *Plant Disease* 81 (7): 723-728.





## ANNEXE I

### LES MILIEUX DE CULTURE

#### MH AGAR :

-Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300g
-Hydrolysate de caséine.....	17.5 g
-Amidon de maïs.....	1.5 g
-Agar Agar.....	13 g
-Eau distillée qsp.....	1000 ml

#### SABOURAUD SIMPLE

-Peptone Chapoteau.....	10 g
-Gélose .....	20 g
-Glucose.....	20 g
-Eau distillée.....	1000 ml

#### SABOURAUD + CLORAMPHENICOL

-Milieu de Sabouraud	
-Chloramphénicol.....	0.5%

#### PDA

-Pomme de terre .....	200g
-Saccharose.....	20 g
-Agar Agar.....	13 g
-Eau distillée qsp.....	1000 ml

#### MILIEU DE CULTURE LIQUIDE DE FERMENTATION

-Saccharose .....	10 g
-L-asparagine .....	02 g
-Extrait de levure .....	02 g
-MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O.....	0.36 mg
-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	01 g
-MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
-ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0.44 mg
-FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O.....	0.48 mg
-Eau distillée qsp .....	1000 ml

## ANNEXE II

### Exemples sur les composés approuvés pour la stérilisation superficielle des parties du végétal lors des études des champignons endophytes (STONE *et al.*, 2004)

Désinfectant, concentration et durée de traitement	Hôte / tissu	Référence
Formaldéhyde 37-40 %, 1-5 min; NaOCl 10% , Cl, 5 min	Feuilles : <i>Festuca</i> , <i>Anemone</i> , <i>Crataegus</i> , <i>Glechoma</i> , <i>Potentilla</i> , <i>Salix</i> , <i>Sorbus</i> , <i>Teucrium</i> , <i>Vaccinium</i>	SCHULZ <i>et al.</i> , 1993
Ethanol 96%, 1 min; NaOCl, 10% Cl, 5 min; éthanol 96%, 30s	Feuilles de <i>Crataegus</i> , <i>Glechoma</i> , <i>Potentilla</i> et de <i>Salix</i>	SCHULZ <i>et al.</i> , 1993
Éthanol 96%, 1 min; NaOCl, 2% Cl, (1:2), 7 min; éthanol 96%, 30s	Brindilles des conifères	PETRINI et MÜLLER, 1979
Éthanol 99%, 1 min; NaOCl, 8.7% Cl, 5-120 min; éthanol 99%, 30s	Jeunes pousses de <i>Castanea</i>	BISSEGGER et SIEBER, 1994
Éthanol 96%, 1 min; NaOCl 3% Cl, 10 min; éthanol 70%, 30 s	Feuilles de <i>Sequoia</i>	ESPINOSA-GARCIA et LANGENHEIM, 1990
Ethanol 96%, 30 s; NaOCl 2.5% Cl, 1-3 min; ethanol 96%, 30s	Feuilles de lichenes, mousses, fougères, <i>Arctostaphylos</i> .	PETRINI, 1986; WIDLER et MÜLLER, 1984; PETRINI, 1986
Ethanol 96%, 30 s; eau distillée stérilisée, 30 s; NaOCl 5% Cl, 5 min; éthanol, 3 s; eau distillée stérilisée, 30s.	Feuilles de <i>Crataegus</i> , <i>Glechoma</i> , <i>Salix</i> e <i>Sorbus</i>	SCHULZ <i>et al.</i> , 1993
Ethanol 75-96 %, 1 min; NaOCl 2-4% Cl, 3-5 min	Aiguilles des conifères, feuilles et brindilles des <i>Quercus</i>	CARROLL et CARROLL, 1978 HALMSHLAGER <i>et al.</i> , 1993
Ethanol 75-96 %, 30 s, rinçage à l'eau distillée stérilisée	Brindilles de <i>Ulex</i> Brindilles de <i>Pinus</i> et <i>Fagus</i> Brindilles de <i>Salix</i> et <i>Quercus</i> Feuilles de <i>Quercus</i> Rameaux de <i>Abies</i> et <i>Picea</i> Racines de <i>Acer</i> , <i>Betula</i> et <i>Picea</i>  Feuilles et brindilles de <i>Fagus</i>  Aiguilles de <i>Pinus</i> Branches de base de <i>Abies</i> , <i>Larix</i> , <i>Picea</i> , <i>Pinus</i> , <i>Acer</i> , <i>Alnus</i> , <i>Betula</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Fagus</i> , <i>Fraxinus</i> et <i>Quercus</i>	FISHER <i>et al.</i> , 1986 PETRINI et FISHER, 1988 PETRINI et FISHER, 1990 FISHER <i>et al.</i> , 1994 SIEBER, 1989 SRIDHAR et BÄRLOCHER, 1992 SIEBER et HUGNETOBLER, 1987 HELANDER <i>et al.</i> , 1994 KOWALSKI et KEHR, 1992; PFOHL- et BUTIN, 1994
Ethanol 99%, 1 min; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15%, 15 min; éthanol 70%, 1 min; eau distillée stérilisée, 2 rinçages	Racines de <i>Abies</i> , <i>Fagus</i> , <i>Picea</i> et <i>Pinus</i> , aiguilles de <i>Pinus</i>	AHLICH et SIEBER, 1996 HATA et FUTAI, 1995

### ANNEXE III

#### Exemples illustrant quelques études portées sur les champignons endophytes dans le monde (STONE *et al.*, 2004)

Référence	Localité	Nbr d'espèces	Tissu ou organe	Plantes-hôtes
KOWALSKI et KEHR, 1992	Allemagne, Pologne	44	Rameaux	<i>Abies alba</i>
SIEBER-CANAVESI et SIEBER, 1993	Suisse	120	Aiguilles	<i>A. alba</i>
SIEBER et DORWORTH, 1994	Colombie britannique (Canada)	9	Feuilles, brindilles	<i>Acer macrophyllum</i>
SRIDHAR et BÄRLOCHER, 1992	Nova Scotia	7	Racines	<i>A. spicatum</i>
KOWALSKI et KEHR, 1992	Allemagne, Pologne	24	Rameaux	<i>Alnus glutinosa</i>
FISHER <i>et al.</i> , 1991	Grande Bretagne	46	Racines aquatiques	<i>A. glutinosa</i>
WIDLER et MÜLLER, 1984	Suisse	176	Feuilles	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>
KOWALSKI et KEHR, 1992	Allemagne, Pologne	23	Rameaux	<i>Betula pendula</i>
BILLS et POLISHOOK, 1991	New Jersey (Etats-Unis)	155	Ecorce	<i>Carpinus caroliniana</i>
PETRINI et CARROLL, 1981	Oregon (Etats-Unis)	15	Feuillage	<i>Calocedrus decurrens</i>
PETRINI et CARROLL, 1981	Oregon (Etats-Unis)	18	Feuillage	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>
SURYANARAYANAN <i>et al.</i> , 2000	Inde	45	Tiges	<i>Cuscuta reflexa</i>
FISHER <i>et al.</i> , 1995	Spitsberg	4	Feuilles	<i>Dryas octopelata</i>
CHAPELA et BODDY, 1988	Grande Bretagne	18	Rameaux	<i>Fagus sylvatica</i>
RIESEN et CLOSE, 1987	Nouvelle-Zélande	14	Feuilles	<i>Hordeum vulgare</i>
PETRINI et MÜLLER, 1979	Suisse	114	Feuilles	<i>Juniperus communis</i>
BROWN <i>et al.</i> , 1998	Hongkong, Australie	24	Feuilles	<i>Musa acuminata</i>
FISHER <i>et al.</i> , 1994	Australie	23	Tiges	<i>Opuntia stricta</i>
BARKLUND et KOWALSKI, 1996	Suède	85	Pousses	<i>Picea abies</i>
SUMMERBELL, 1989	Ontario (Canada)	97	Racines	<i>P. mariana</i>
HATA et FUTAI, 1995	Japon	9	Aiguilles	<i>Pinus densifolia</i>
PETRINI <i>et al.</i> , 1992	Grande Bretagne	61	Racines, tiges, feuilles	<i>Pteridium quilinum</i>
COLLADO <i>et al.</i> , 2000	Espagne	149	Pousses, feuilles	<i>Quercus ilex</i>
PETRINI et FISHER, 1986	Grande Bretagne	31	Tiges	<i>Salicornia perennis</i>
ESPINOSA-GARCIA et LANGENHEIM, 1990	Californie (Etats-Unis)	26	Feuilles	<i>Sequoia sempervirens</i>
PEHL et BUTIN, 1994	Allemagne	17	Feuilles	<i>Tilia cordata</i>
MOUSTERT <i>et al.</i> , 2000	Afrique du Sud	46	Feuilles, tiges	<i>Vitis vinifera</i>
FISHER <i>et al.</i> , 1992	Grande Bretagne	23	Feuilles, tiges	<i>Zea mays</i>

## Résumé:

Les champignons endophytes, représentent une trame fongique importante qui vient juste d'être étudiée comme modèle symbiotique des végétaux supérieurs. Ces microorganismes *discrets* vivent en interaction complexes avec les plantes, colonisant toutes les parties de ces dernières, et jouent un rôle essentiel dans l'amélioration de leurs performances écologiques et physiologiques (résistance aux maladies, aux ravageurs, et aux stress physiques). A la lumière de la connaissance des traits de plus en plus intéressants des symbioses plante/champignon endophyte, nous avons jugé utile de débiter un travail portant sur l'isolement, et l'identification, et l'activité antimicrobienne des champignons endophytes à partir de la trame foliaire de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) au niveau de site du canton d'El-Haourane de M'sila. A titre d'information, ces champignons viennent d'être isolés pour la première fois à partir de ce site.

L'étude été conduite en utilisant des aiguilles aléatoirement échantillonnées à partir de sujets asymptomatiques, portant sur deux catégories foliaires. Nous constatons que les aiguilles adultes sont plus densément colonisées par les mycoendophytes que les jeunes aiguilles par une fréquence de colonisation exprimée en (FC% égale à 68.5%). Vingt-neuf mycotaxons endophytes ont été identifiés, dont la grande part taxinomique est prédominée par le groupe des champignons mitosporiques, ce qui démontre la couverture écophysologique de l'interaction plant/champignons endophytes. L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la technique de contact direct par le test d'antagonisme contre *A. niger* et *A. flavus* et par le test d'antibiogramme contre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, et *C. albicans*. Les résultats démontrèrent une différence dans la sensibilité des espèces microbiennes aux composants des métabolites secondaires des mycoendophytes étudiés. Pour cela l'*E. coli* a montré une grande sensibilité, alors que *S. aureus* et *C. albicans* ont montré moins de sensibilité, et sensibilité presque limité pour le *P. aeruginosa* multi-résistant. D'autre coté, la plupart des mycoendophytes présentent des activités antifongiques plus importantes sur les deux *Aspergillus*. Et donc les mycoendophytes de genre de *Penicillium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichosporon*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*. Ont manifesté un effet antagoniste et antibiotique assez plus important contre les microorganismes pathogènes pour l'homme et pour les plantes.

**Mots-clés:** Champignons endophyte, Pin d'Alep, El-Haourane, Métabolites secondaires, Activité antimicrobienne.

:

)

/

.(

(*Pinus halepensis* Mill.)

.( )

%68.5

29

و *A. niger* و *A. flavus* (Test d'antagonisme) :

.*C. albicans*· *P. aeruginosa* · *S. aureus*· *E. coli* (Test d'antibiogramme)

*E. coli*

*P. aeruginosa*

*C. albicans*· *S. aureus*

.*Aspergillus* :

*Penicillium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* *Trichosporon*, *Cladosporium*, :

*Fusarium*, *Trichoderma*

: