

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

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

N° :.....



DOMAINE : SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : ECOLOGIE ET
ENVIRONNEMENT

OPTION : ECOLOGIE DES ZONE
ARIDE ET SEMI ARIDE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique En
Ecologie des Zones Aride et Semi-aride

Par:

ABDELLAOUI RANYA

DEBIH REBIHA

Intitulé :

**Etude de la mycoflore endophyte du Pin
d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.)**

Soutenu le : 03/07/2019

Soutenu devant le jury composé de:

BENDIF Hamdi	MCA	Université de M'Sila	Président.
LADJAL Somia	MAA	Université de M'Sila	Rapporteur.
ARAB Radhia	MCB	Université de M'Sila	Examina tris.

Année universitaire: 2018 /2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur **M^{me}. Ladjal Somía.** qui a guidé, surveillé le déroulement et l'exécution du travail de ce mémoire en me prodiguant tout aide possible, et en me consacrant beaucoup de son temps précieux.*

*Nous vifs remerciements s'adressent à tous les membres du jury: nous vous remercions vivement : **Mr. BENDIF Hamdi** De nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous remercions notre examinateur : **M^{me}. ARAB Radiah** Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.*

Nous remercions à tous techniciens de laboratoires.

Nous remercions nos parents pour le soutien inconditionnel dont ils ont fait, merci pour le soutien financier, moral, psychologique et matériel. Si je suis ici aujourd'hui, c'est grâce à vous !

Nous remercions également toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à L'élaboration de ce mémoire.

Enfin, Nous remercions nos amis et camarades de promotion pour ces années passées ensemble, dans les meilleurs moments comme dans les pires.

Merci

Rebiha & Ranya

Dédicace

Je dédie ce travail:

*A la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, qui se fond toujours pour éclairer ma route, à mon cher père **Messaoud** je dédie ce travail et je souhaite une longue belle vie ;*

*A la fleur qui rehausse et aromatise mes jours, qui garde les nuits pour que je me rendorme, à ma très chère mère **Akri** je dédie ce travail et je lui souhaite une longue belle vie.*

*A mes chers soeurs **Amína, Samah, Bisma, Ahlem, Wahiba** et **Souad** ; qui ont répand la bonne humeur et la Joie tout autour d'elles.*

*A mon cher frère **Zouheir** et sa femme **Hanna**.*

*A tout la famille **Debih**.*

*A mon encadreur : **Dr Ladjal Somia**. Les mots ne suffisent guère pour exprimes mes remerciements pour votre patience, je vous souhaite une vie pleine de bonheur.*

*A ma camarade de ce travail **Ranya**.*

A mes collègues de la promotion de master "Ecologie de zone aride et semi-aride" 2018\ 2019

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université.



REBIHA

Dédicaces

C'est une immense joie et un grand honneur que Je dédie ce modeste travail à:

*Mon très cher père : **Moussa** LA LUMIERE DE MA VIE*

*Ma très chère mère : **Fatiha** REBHAOUI*

qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études qui n'auraient pas été couronnés de succès sans elle .Je prie Allah, tout puissant de lui donner longue vie, santé et bonheur

*A mon cher frère : **MOURAD, AHMED***

*A mes adorables sœurs : **Yara ,Aya ,Chaima, Basma***

*A toute ma grande famille : **ABD ELAOUI, REBHAOUI***

*A ma très chères tentes : **Sadia , Rahima, Rbiha***

A tous mes amis sans exception pour leur aide et encouragements

*A ma camarade de ce travail **Rebiha***

A mes collègues de la promotion de master "Ecologie de zone aride et semi aride" 2018\ 2019

*... **RANYA***

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 01 :	Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes.....	4
Figure 02 :	Les feuilles ; les graines et les cônes du pin d'Alep.....	14
Figure 03 :	Caractères botaniques du pin d'Alep.....	15
Figure 04 :	Aire de répartition du pin d'Alep dans la région méditerranéenne	16
Figure 05 :	Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie	17
Figure 06 :	Les étapes conçues pour la stérilisation superficielle et l'ensemencement des aiguilles de <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	21
Figure 07 :	Les étapes de la mise en culture des fragments de pin d'Alep infectées par les mycoendophytes.....	22
Figure 08 :	Les étapes conçues pour la purification des isolats fongiques.....	23
Figure 09 :	Culture monospore de souche fongique dans le PDA et Sabouraud.....	24
Figure 10 :	Les étapes conçues pour l'identification microscopique des isolats fongiques.....	25
Figure 11 :	Classification générale des champignons	32
Figure 12 :	Statut taxonomique des champignons endophytes isolées à partir des aiguilles du pin d'Alep.....	33
Tableau 01 :	Quelques mycotaxons identifiés d'après les aiguilles du pin d'Alep... ..	26
Tableau 02 :	Composition spécifique de la mycoflore endophyte associée aux aiguilles de pin d'Alep	34

SOMMAIRE

SOMMAIRE

DEDICACE.....	I
REMERCIEMENTS	III
LISTES DES FIGURES	IV
LISTES DES TABLEAUX	IV
INTRODUCTION GENERALE	1

I. PARTIE THEORIQUE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les champignons endophytes

Définitions et caractéristiques generals	3
La biologie et la diversité écologique	4
Interaction endophyte-plante	5
I.1.4 Colonisation	6
Diversité et classification	7
I.1.5.1 Groupe des Balansieae	7
Les endophytes non-Clavicipitacées	7
Les endophytes non-systémiques des Poacées	8
Les endophytes des plantes ligneuses perennes	8
Rôles écologiques et physiologiques des champignons endophytes	9
Rôles physiologiques des champignons endophytes	9
Rôles des endophytes dans la tolérance aux stress abiotiques	10

Le pin d'Alep

I.2.1 Définition	12
I.2.2 Systématique de l'espèce	12
I.2.3 Caractère botanique du pin d'Alep	13
I.2.4 Phénologie de l'espèce	15
Répartition géographique de l'espèce	16
Répartition du pin d'Alep dans le monde	16

Répartition du pin d'Alep en Algérie.....	17
Statut écologique du pin d'Alep.....	18
Zonation altitudinale	18
Exigences bioclimatiques.....	18
I.2.6.3 Exigences édaphiques	19

II. PARTIE EXPERIMENTALE

II.I Materiel et Methods

Matériel

II.1.1.1 Matériel vegetal	20
II.1.1.2 Milieux de culture et produits chimiques	20

Methodes experimentales

Lastérisation superficielle des aiguilles de Pinus halepensis	20
II.1.2.2 Mise en culture	21
La purification des isolats fongiques	22
A. Le Repiquage successif	22
B. La culture monospore	23
L'identification macro-microscopique des isolats fongiques	24

II.2 Résultats et Discussion

II.2.1 Identification morphologique des isolats fongiques	26
II.2.2 Composition general de la mycoflore endophyte détectée	32
II.2.3 Discussion des résultats	35
CONCLUSION GENERALE	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	41
ANNEXES	I

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes et les microorganismes présentent un complexe dont l'habitat écologique est très divers. Dans la nature nous ne trouvons pas un organisme qui vit en isolation, mais en association avec d'autres entités vivantes. Les scientifiques ont décrit cette relation par le mot symbiose, qui veut dire en termes simples " la co-existence entre différents organismes". 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 sont les champignons qui colonisent les tissus vivants des plantes, sans causer aucun symptôme apparent, ils sont estimés au nombre de 1.5 millions d'espèces et seulement environ 75.000 d'entre elles sont décrites (**Manoharachary et al., 2005**). Ils reçoivent la nutrition et la protection de la plante hôte et, en retour, ils améliorent la compétitivité ainsi que la résistance de celle-ci aux différents agents pathogènes tels les bactéries, champignons, parasites, insectes... ainsi qu'aux différents types de stress abiotiques. Grâce à cette protection, les champignons endophytes ont reçu une attention considérable et sont maintenant considérés comme étant une source riche de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs.

A la lumière de la connaissance des traits devenant de plus en plus intéressants des symbioses plantes/champignons endophytes, nous avons jugé utile un travail initial portant sur l'étude des mycoendophytes chez les aiguilles de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Ces données laissent croire que, des souches fongiques à utilités biologiques peuvent être isolées et identifiées à partir d'un phytotaxon considéré comme essence forestière d'une extrême importance en Algérie.

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

En effet , le travail s'articule sur :

- Caractériser la mycoflore endophyte chez les aiguilles de *Pinus halepensis* Mill.
- L'isolement des champignons endophytes à partir des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill.
- La purification et l'identification morphologique des isolats fongiques obtenus.

PARTIE THEORIQUE

RÉVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.1 Les champignons endophytes

Définitions et caractéristiques générales

Littéralement, le mot endophyte signifie "dans la plante" (endon = dans; phyton = plante). L'usage de ce terme est aussi large que sa définition et le spectre des hôtes ainsi que les organismes qui les habitent (ex: Bactéries, champignons...etc.). Le terme endophyte a été utilisé pour la première fois par **De bary** en 1866 pour décrire les champignons qui colonisent l'intérieur des tissus végétaux des tiges et des feuilles (**Schulz et Boyle, 2006**).

Anton De Bary, inventa le terme endophyte qui est composé de deux mots grecs, endon: signifiant au sein et phyton: désignant plante et qui désignait tout organisme survenant dans les tissus de plantes (**Hyde et Soytong, 2008**); définit aussi le terme endophyte comme toute infection asymptomatique d'une plante par un microorganisme.

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

Cette définition a été modifiée plusieurs fois. Les plus acceptées et utilisées des définitions sont les suivantes:

- " Les endophytes sont l'ensemble de microorganismes qui colonisent l'intérieur des tissus sains de leurs plantes hôtes, sans l'exhibition de symptômes, bien qu'ils puissent après une période de latence ou d'incubation causer de maladies" . (**Petrini, 1991 in Bayman, 2007**).
- " Les endophytes sont les champignons et les bactéries qui, pour une partie ou la totalité de leurs cycles de vie, causent des infections inaperçus et asymptomatiques des tissus végétaux" (**Wilson, 1995**).

Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolé en tant qu'endophytes, ce sont des champignons qui peuvent croître de façon intra et/ou intercellulaires dans les tissus internes des plantes, sous la couche des cellules épidermiques, sans causer aucun symptôme apparent chez l'hôte . Ils sont présents et ont été isolés de toutes les plantes déjà étudiées (**Hyde et Soytong, 2008**), et leurs façons de croître asymptomatiquement dans les tissus de plantes a induit que leurs relations avec l'hôte était de l'ordre du mutualisme et de la symbiose mais leur biodiversité suggère qu'ils peuvent être

également des saprophytes ou des pathogènes opportunistes. Une même espèce de champignon endophyte est capable de coloniser plusieurs hôtes différents (Andéol et Benjamin, 2016).

Les caractéristiques générales des champignons endophytes sont majoritairement issus du phylum Ascomycota (Arnol, 2007) et présentent une grande diversité. Ils sont hétérotrophes et prélèvent des nutriments à l'hôte sans que celui-ci ne présente de quelconques signes de maladie. Ils peuvent croître dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Figure 01).

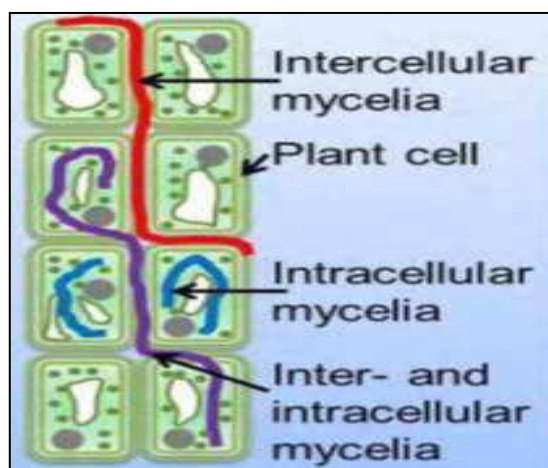


Figure 01: Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes

I.1.2. La biologie et la diversité écologique

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 (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 subis 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; 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. (**Ladjal, 2012**). Ce rythme de croissance épisodique est une caractéristique déterminante des endophytes en général.

Interaction endophyte-plante

La réaction plante hôte-endophyte est complexe. En effet, les deux organismes synthétisent des composés qui ne sont pas directement impliqués dans le processus de croissance: les métabolites secondaires (**Saliba, 2015**). Les endophytes possèdent différents modes de vie, donnant différentes interactions qui sont variables d'un endophyte à un autre et d'un hôte à un autre (**Zabalgozcoa, 2008**), elles dépendent des facteurs abiotiques, des interactions avec d'autres espèces, de la géographie et de la phylogénie, et varient de l'antagonisme au mutualisme, c'est pour cette raison que la gamme d'interactions endophyte-hôte est considérée comme un continuum (**Zabalgozcoa, 2008**).

La relation symbiotique entre plante et microorganisme attire actuellement l'attention des scientifiques et devient sujet d'intérêt: c'est l'endophytisme qui exprime une relation plante-endophyte.

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, mais également une activation des métabolites inducteurs de défense tels que l'acide jasmonique (**Kohn, 2005**).

Colonisation

Les modèles de colonisation des endophytes dans leurs hôtes traversent un continuum et incluent les champignons qui sont spécialisés à occuper chaque niche dans la plante hôte, ceux qui se développent d'une manière inter et intracellulaire, ceux ayant une spécificité d'organe et ceux qui colonisent la partie végétative et également le système racinaire. Certains se développent seulement de façon endophytique et d'autres d'une manière endophytique et épiphytique. On trouve aussi ceux qui sont adaptés à certains hôtes et d'autres qui sont omniprésents à l'égard de leurs hôtes (**Schulz et Boyle, 2005**).

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

Les mycoendophytes colonisateurs de xylème 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**).

La colonisation des racines peut également être inter- et intracellulaire, les hyphes forment souvent des enroulements intracellulaires, nous rapportent que: *Cryptosporiopsis*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Microdochium* et également les endophytes bruns séptés (DSE:Dark Septate Endophytes) tel que *Phialocephala* spp. et *Phialophora* spp. sont les espèces qui dominent fréquemment les communautés inféodées aux racines. (**Stone et al., 2000; Sieber, 2002**). Cette même source évoque la spécialisation probable, pour les niches similaire dans les plantes herbacées et particulièrement les graminées, des espèces *Fusarium* spp., *Phialophora* spp., (excepté *P. finlandia*, qui infecte spécialement les pins), de trois races de *Gaeumanomyces graminis* et *Microdochium bolleyi*.

En conclusion: La colonisation et la différenciation du champignon endophyte au sein de la plante sont probablement gouvernées par une multitude de facteurs comme les changements biochimiques au niveau des concentrations des phytohormones ou des métabolites et/ou les changements physiques tels que la division et l'élongation cellulaire chez la plante (**Schardl et al., 2004**).

Diversité et classification

La diversité des champignons endophytes fut traitée est revue par **Stone et al., (2000, 2004)**. Nous constatons également que la caractérisation des groupes endophytes est basée surtout sur le groupe végétal infecté, la modalité de l'infection et de la répartition (colonisation) des tissus de l'hôte ainsi que le mode de transmission au sein de la communauté végétale (**Bensaci, 2016**).

Il est admis que les champignons endophytes sont rangés dans deux principaux groupes: les Balansieae et les non-Balansieae, de plus, elle est basée sur certains critères relatifs à la gamme d'hôtes, les tissus colonisés, la nature de la colonisation et la biodiversité au sein des phytotaxons, les modes de transmission ou encore les bénéfices résultant de l'association (**Rodriguez et al., 2009**).

Dans cette revue bibliographique nous nous limiterons à traiter seulement les groupes fongiques (endophytes) spécifiques aux graminées.

5.1 Groupe des Balansieae

Les champignons endophytes des graminées appartenant à la famille: Clavicipitaceae, tribu des Balansieae (phylum Ascomycota) et sont traditionnellement groupés dans quatre genres *Atkinsonella*, *Balansia*, *Epichloë*, et *Myriogenospora* (**Cheplick et Faeth, 2009**). Le genre *Balansia*, ayant une phase de vie asexuée ou anamorphe, est rangé par ces formes imparfaites au sein du genre *Ephelis* (**Stone et al., 2004**). Quant au genre *Epichloë*, **Malinowski et Belesky (2000)** créèrent la section *Albo-lanosa* pour y ranger le genre *Acremonium* décrivant les anamorphes de ce premier. Ultérieurement, en se basant sur leurs biologies et leurs affinités phylogénétiques avec le genre *Epichloë*, ces anamorphes ont été reclassifiées au sein du genre *Neotyphodium* (**Stone et al., 2004**). Les plus connus sont *Neotyphodium coenophialum*, *N. uncinatum* et *N. lolii* inféodés (**Malinowski et Belesky 2006**).

5.2 Les endophytes non-Clavicipitacées

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* 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). (**Stone et al., 2004**).

5.3 Les endophytes non-systémiques des Poacées

Les études portées sur les graminées quant aux endophytes non-systémiques ont révélé la présence des formes épiphytes ou pathogènes (**Stone et al., 2004**). Parmi les formes les plus signalées des mycoendophytes épiphytes, on trouve chez le riz (*Oryza sativa*) et le maïs (*Zea mays*): *Alternaria alternata*, *Arthrinium* spp., *Cladosporium tenuissimum*, et *Epicoccum purpurascens* (**Fisher et Petrini, 1992**). Pour les formes pathogènes on cite à titre d'exemple: *Phaeosphaeria (Stagonospora) nodurum* (**Crous et al., 1995**) et quelque espèces de *Fusarium* comme le *Fusarium graminearum*. (**Stone et al., 2004**).

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 plan taxonomique aux ordres des Rhytismatales, et des Leotiales (notamment les familles des Phacidiaceae et Hemiphacidiaceae). Des exemples typiques concernent: *Fabrella tsugae*, et *Lophodermium* spp., 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**). 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 (**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**).

Rôles écologiques et physiologiques des champignons endophytes

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.

Les champignons endophytes reçoivent la nutrition, la protection, et la possibilité de se propager grâce à leurs hôtes (**Clay et Schardl, 2002**); et en retour la plante hôte bénéficie aussi de certains avantages procurés par l'endophyte.

Rôles physiologiques des champignons endophytes

Les plantes sont constamment menacées par une variété d'agents comme les microorganismes tels les champignons, bactéries et virus, les herbivores et les insectes. Cependant, les plantes possèdent des mécanismes de défense contre ses agents, dont les obstacles structurels qui se renforcent rapidement lors du processus d'infection (cire, lignine, cellulose, composés phénoliques et des protéines de la paroi cellulaire) sont le type le plus performant de défense. Parmi les rôles joués par les champignons endophytes, sont mentionnés:

❖ **Protection contre les microorganismes pathogènes** : Plusieurs mécanismes peuvent être utilisés par les endophytes pour inhiber les microorganismes phytopathogènes: la production d'antibiotiques, la stimulation des mécanismes de défense de l'hôte, la concurrence pour la nourriture ou les sites de colonisation, et le mycoparasitisme (**Cao et al., 2009**). De nombreuses espèces de champignons endophytes produisent plusieurs métabolites secondaires dont des substances antibiotiques (**Wang et al., 2007**). Plusieurs extraits liquides des cultures des endophytes ont démontré une inhibition de la croissance de plusieurs espèces de champignons phytopathogènes (**Kim et al., 2007**).

Selon **Arnold et Herre (2003)**, inoculer des feuilles de jeunes plants de *Theobroma cacao*, par le mélange de six endophytes isolés à partir de la même plante hôte, puis les infecter avec *Phytophthora sp.*, agent pathogène responsable de la maladie de la pourriture brune, une réduction significative de l'incidence de la maladie et ses effets néfastes sur les feuilles inoculées a été conclue. Vu la différence de sévérité de la maladie observée entre les feuilles inoculées et non inoculées, l'induction d'un mécanisme de résistance de la plante ne peut être impliqué. La protection dans ce cas pourrait être le résultat d'une concurrence directe entre les

endophytes et les agents pathogènes, par exemple en formant une zone d'inhibition qui restreindrait l'entrée des autres champignons ou bien l'occupation des sites disponibles pour l'infection.

❖ **Protection contre les insectes** : Certains endophytes peuvent aussi protéger leurs hôtes contre les insectes en produisant des métabolites secondaires (**Spiering et al., 2005, Clay et Schardl, 2002; Riedell et al., 1999**).

Webber (1981), a probablement été le premier à démontrer la protection des végétaux contre les insectes due à des champignons endophytes par l'exemple de l'endophyte *Phomopsis oblonga*, qui protège les ormes contre le *Physocnemum brevilineu*, vecteur d'un champignon pathogène qui provoque la maladie hollandaise de l'orme. Cet endophyte produit des composés toxiques qui auraient un effet répulsif contre ce vecteur de l'agent pathogène. Cela a été confirmé quatre ans plus tard par **Claydon et al., (1985)**, qui ont démontré que les champignons endophytes appartenant à la famille des Xylariaceae synthétisaient des métabolites secondaires chez les hôtes du genre *Fagus*, ces derniers affectaient les larves des coléoptères.

❖ **Protection contre les herbivores**: **Bacon et al., (1977)**, ont démontré pour la première fois la corrélation existant entre les champignons endophytes et la toxicité de leurs plantes hôtes sur les mammifères herbivores domestiques.

Roberts et al., (2005) ont démontré que cette toxicose est due à un certains nombre de composés tels l'acide lysergique, les amides et l'ergopeptine, dont de forte concentration de ce derniers on été trouvé infectant les semences et les feuilles des herbes.

Rôles des endophytes dans la tolérance aux stress abiotiques

Les plantes sont exposées à des conditions environnementales changeantes, obligeant à s'adapter à des températures extrêmes, des insuffisances d'eau et des produits chimiques. Plusieurs études ont démontré que les plantes associées à des champignons endophytes ont été plus tolérantes à la sécheresse, la chaleur, la toxicité des métaux et à une salinité élevée (**Waller et al., 2005**).

Les champignons endophytes des graminées fourragères (Fétuque élevée) augmentent de manière significative la tolérance à la sécheresse de cette espèce. La teneur en eau des graminées associées à des endophytes était plus élevée que celle des graminées dépourvues

d'endophytes (Clay et Schardl, 2002). Ce phénomène peut s'expliquer par l'accumulation accrue de solutés dans les tissus des plantes infectées par les endophytes, ou par la réduction de la conductance foliaire et un ralentissement du flux de transpiration (Malinowsky et Belesky, 2000), ou encore par la limitation de la germination des graines et donc la réduction du risque de la mort des plantules (Gundel et al., 2006). De même, *Festuca* spp. infectée par les endophytes a montré une plus grande tolérance à l'aluminium du sol et une plus grande croissance par rapport à la plante non infectée (Zaurov et al., 2001).

Redman et al., (2002) ont démontré que les champignons endophytes pourraient aussi augmenter la tolérance à la chaleur chez leurs hôtes, cette tolérance a été détectée chez *Dichanthelium lanuginosum* infecté par l'endophyte *Covularia* sp., qui résiste à des températures de 65° C, alors que les plantes non infectées ne résistaient même pas à une température de 40° C. Il a été suggéré que l'endophyte agirait comme un déclencheur biologique pour activer la réponse au stress plus rapidement et plus fortement que dans les plantes non symbiotiques. Cette résistance à la température peut être très avantageuse pour ces plantes qui pourraient croître dans des chaleurs où tous les agents pathogènes, les ravageurs et les mauvaises herbes ne résisteraient pas.

Waller et al., (2005) ont démontré que l'endophyte *Piriformo spora indica* protège l'orge du stress salin. L'exposition des plantes infectées pendant deux semaines au sel modéré (100 mM de NaCl) a permis d'obtenir une plus grande biomasse que celle des plantes contrôles sous les mêmes conditions. L'orge non infectée a même montré une augmentation de chlorose des feuilles et une croissance réduite des semis.

Les champignons endophytes peuvent aussi améliorer la photosynthèse de leur hôte, par exemple quand *Agavevictoria reginae* grandit en présence du champignon endophyte *Fusarium oxysporium*, la chlorophylle totale et la teneur en sucre augmente, entraînant une augmentation du rendement de la photosynthèse des plantes par rapport à celles dépourvues d'endophyte (Obledo et al., 2003). Ils peuvent aussi améliorer la croissance de nombreuses espèces végétales, cette amélioration est due en partie à la production de phytohormones par l'endophyte, tels que l'acide indole-3-acetic (AIA), acide indole-3-pyruvic (AIP), cytokines et d'autres substances de promotion de la croissance comme les vitamines, et en partie du fait que les endophytes peuvent améliorer l'absorption des éléments nutritifs par l'hôte comme la fixation de l'azote et l'assimilation du phosphore, et ils régulent les qualités nutritionnelles (Waller et al., 2005).

Le pin d'Alep

Définition

- *Pinus*, n. sc. (vern.: pins). Genre de Conifères, très répandus dans l'ensemble du monde depuis la taïga jusqu'à certaines forêts tropicales. Il renferme de nombreuses espèces pionnières, favorisées par le passage récurrent de l'incendie. Ce sont souvent des espèces pionnières qui apparaissent au début des stades forestiers d'une succession progressive, précédant de plusieurs décennies l'implantation des feuillus ou des espèces de Conifères climaciques. Ils sont de ce fait utilisés dans les opérations de reboisement, car ils sont capables de s'installer sur des sols très pauvres voire squelettiques. Ainsi, le pin noir d'Autriche a été employé à vaste échelle au XIXe siècle pour le reboisement des montagnes du Sud de la France dévastées par l'érosion.
- *halepensis*: nom scientifique que du pin d'Alep, espèce très commune sur sols calcaires dans l'ouest de la province Biogéographique méditerranéenne tant dans sa partie européenne qu'au Maghreb, le *Pinus brutia* en est l'espèce vicariante dans la partie orientale du bassin (**Ramade, 2008**).

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 circum méditerranéen 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**).

Systematique de l'espèce

Selon **Nahal (1962)** ; in **Athmani et Masmoudi, (2008)** ; le Pin d'Alep "*Pinus halepensis* Mill." est l'essence caractéristique de l'étage bioclimatique méditerranéen semi- aride, il appartient à :

- **Embranchement** : Phanérogames.
- **Sous embranchement** : Gymnospermes.

- **Classe** : Conifères.
- **Ordre** : Coniféroles pinoidines.
- **Sous ordre** : Abiétales.
- **Famille** : Pinacées.
- **Genre** : Pinus .
- **Sous genre** : Eupinus.
- **Espèce** : *Pinus halepensis*.
- **Nom scientifique** : *Pinus halepensis*.
- **Nom commun**: pin d'Alep
- **Nom arabe**: Sanaoubar al-halabi.

Caractères botaniques du pin d'Alep :

- ✓ C'est un arbre forestier résineux de deuxième grandeur qui peut parfois atteindre les 30 mètres de hauteur est souvent penché et peu droit avec une cime écrasée, irrégulière et clairemais ses branches sont assez étalées (**Boutchiche et Boutrigue, 2016**).(Figure 02, 03)
- ✓ C'est un arbre toujours vert, vivace, au tronc généralement tortueux, à écorce d'abord lisse et grise, puis épaisse et crevassée tournant au rouge-brun avec l'âge.
- ✓ Les arbres jeunes sont de forme assez régulière, les plus âgés, dégarnis à la base, ont un houppier plus dispersé, une cime irrégulière peu dense.
- ✓ Les aiguilles fines et souples et réunies par deux, mesurent 5 à 10 cm de long, de couleur vert jaunâtre.
- ✓ Le pin d'Alep est une plante à fleurs mâles et femelles séparées (monoïque) situées sur le même individu; elles sont groupées en épis.
- ✓ Les fruits sont des cônes verticillés apparaissant à l'automne sur les arbres adultes. Les écailles s'écartent à maturité, libérant des graines environ 7 mm.
- ✓ Cône largement pédonculé et réfléchi vers la base du rameau.

L'identification de l'espèce se base sur les critères suivants (**Bouguenna, 2011**) :

- **L'écorce** ; riche en tannin, est d'abord lisse de couleur argentée puis devient crevassée avec des écailles de couleur gris-brunâtre (**Boutchiche et Boutrigue, 2016**).(Figure 03)

- **Les Feuilles** ; très fines, inférieures à 1 mm, molles, très finement serrutées sur les bords, 5 à 10 cm de long ; réunies par deux, rarement par trois dans une gaine ; groupées en pinceaux à l'extrémité des rameaux ; leur couleur est vert jaunâtre. (Nahal, 1962 ; in Boutchiche et Boutrigue, 2016). (Figure 02)
- **Les Rameaux** ; sont verts clair, puis gris clair, assez fins (Figure 02). Il est polycyclique car cet arbre fait souvent une seconde pousse la même année. Les bourgeons sont non résineux, ovoïdes, aigus, bruns avec des écailles libres frangées de blanc (Kadik, 1987 ; in Boutchiche et Boutrigue, 2016).
- **Les Cônes** ; Sont gros avec une taille de 6 à 12 cm avec un pédoncule épais de 1 à 2 cm, Souvent isolés et réfléchis. Ils sont pourpres puis brun lustré avec des écussons aplatis, persistant plusieurs années sur l'arbre. (Figure 02)
- **Les graines** ; sont de petite taille de 5 à 7 mm à aile longue, brun gris sur une face et gris moucheté de noir sur l'autre (Kadik, 1987; in Boutchiche et Boutrigue, 2016). L'arbre de pin d'Alep produit également une graine comestible, appelée « Zgougou », Destinée à la confection d'une crème largement utilisée en Tunisie (Boutchiche et Boutrigue, 2016). (Figure 02)
- **La résine**; L'arbre de pin d'Alep peu produire également de la résine grâce à une opération appelée Gemmage. Cette opération consiste à « blesser » le tronc de l'arbre de pin d'Alep pour que ce dernier envoie de la résine afin de cicatriser cette blessure (Venet, 1986).



Figure 02 :1, 2, 3 : Les feuilles ; les graines et les cônes du pin d'Alep.



Figure 03: Caractères botaniques du pin d'Alep.

Phénologie de l'espèce

Les observations phénologiques constituent la méthode la plus importante de l'étude de la relation entre le rythme de développement d'une espèce et les variations écologiques du milieu ambiant. L'étude phénologique du Pin d'Alep entreprise par plusieurs auteurs permet de déceler les observations phénologiques suivantes :

La croissance en hauteur de la pousse terminale du pin d'Alep se fait en deux temps: en automne , il développe un bourgeon terminal qui donnera naissance ensuite au printemps suivant à une pousse terminale (**Nicault et al., 2001**).

La reprise de la végétation chez le pin d'Alep est relativement tardive et se situe entre février et mars (**Nicault et al, 2001**).

Les mois de mai et juin correspondent à la période de croissance (radiale et apicale) maximale (**Nicault et al, 2001**).

La période de croissance est stoppée par la sécheresse vers le mois de juillet (**Nicault et al, 2001**).

En automne, les rameaux ne semblent s'allonger que très peu, la croissance radiale par contre reprend de façon significative (**Nicault et al, 2001**).

La germination peut avoir lieu, soit à la fin de l'automne, soit au début du printemps (**Calamassi et al, 1984**).

Les cônes mûrissent au cours de la deuxième année et laisse le plus souvent échapper leurs graines au cours de la troisième année (**Nahal, 1962**).

La dissémination naturelle des graines à lieu entre la fin du mois d'août et la fin du mois d'octobre. Le cône doit avoir subi de fortes chaleurs, qui détruisent les joints de résine entre les écailles, pour pouvoir s'ouvrir.

Le Pin d'Alep est un arbre polycyclique, susceptible d'effectuer plusieurs pousses par an et de produire des faux cernes. Le Pin d'Alep fructifie dès l'âge de 10 à 12 ans, mais les graines qu'il produit ne sont aptes à germer que lorsqu'il a atteint l'âge de 18 à 20 ans (Nahal, 1962).

D'après Nahal (1962), 100 kg de cônes produisent à peu près 50 kg de graines ailées, 1 kg de graines comptant environ 50 000 graines. De plus, les graines conservent leur pouvoir germinatif pendant au moins deux ans.

Répartition géographique de l'espèce.

Répartition du pin d'Alep dans le monde.

Pinus halepensis se trouve à l'état spontané autour du Bassin méditerranéen, sauf en Egypte. Il est très répandu en Afrique du Nord surtout en Algérie et Tunisie où il constitue les massifs les plus importants. Ses forêts occupent plus de 2.5 millions d'hectares (Quezel, 2000) réparties dans certains pays situés sur le pourtour de la Méditerranée. (Figure 04).

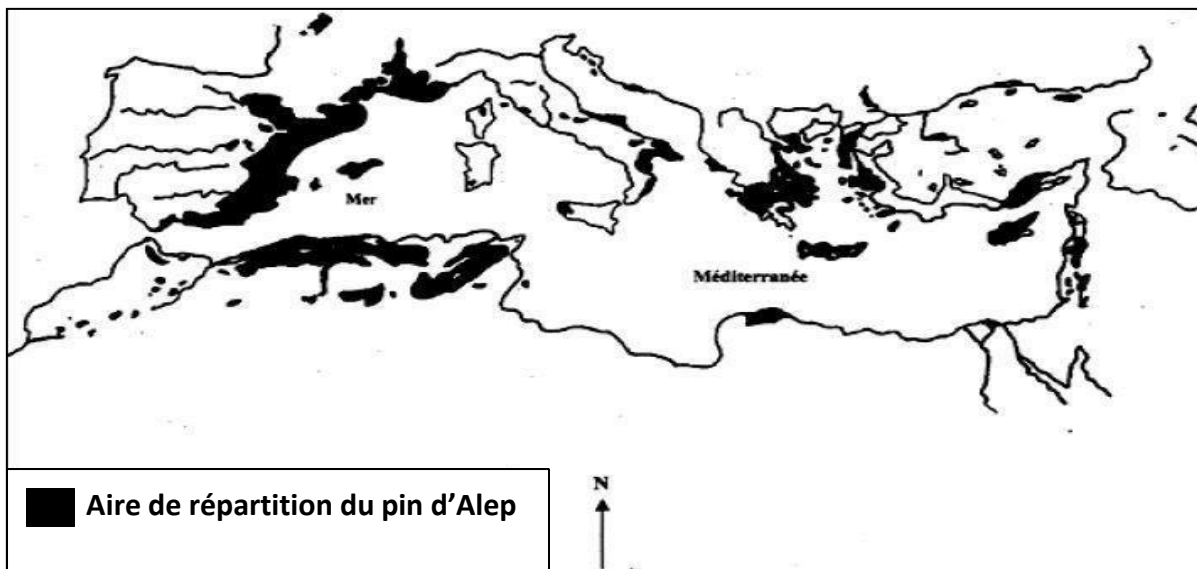


Figure 04: Aire de répartition du pin d'Alep dans la région méditerranéenne (Quezel, 1986).

En Espagne, il constitue 15 % de la superficie boisée (surtout sur les chaînes littorales de Catalogne, de la région de Valence et Murcie). Aux îles Baléares, il monte jusqu'à 1.200 m d'altitude (Kadik, 1987).

En France, les peuplements occupent 36.000 à 232.000 ha en un siècle (**Brochiero et al., 1999**) surtout en Provence et peu à l'Ouest du Rhône). En Corse, sa spontanéité est douteuse (région de Saint Florent) (**Kadik, 1987**).

En Italie, le pin d'Alep couvre environ 20.000 ha et reste à proximité des côtes (Haffane, 1982) (massifs dans la province de Tarente et quelques localités en Sardaigne et en Sicile).

Il est représenté peu en Yougoslave, en Grèce, en Turquie, par des peuplements relativement importants en Palestine et en Jordanie (**Quezel et Barbero, 1992**) et quelques boisements en Syrie et au Liban (**Kadik, 1987**).

En Lybie, il existe dans quelques localités en Cyrénaïque littoral; en Tunisie, il occupe 370.000 ha (**Ammari et al. 2001**) surtout sur les Monts de la dorsale tunisienne et au Maroc 65.000 ha dans le Rif, le moyen et le haut Atlas (**Ammari et al., 2001**).

Répartition du pin d'Alep en Algérie.

D'après **Zenzen (2016)**, le pin d'Alep est fréquent surtout sur les massifs du tell littoral et l'Atlas saharien, Il s'étend à lui seul sur près de 850.000 ha, il occupe 37% de la surface effectivement boisée de l'Algérie (**Figure 05**).

Selon **Boudy (1955)**, Le pin d'Alep présente de vastes peuplements en oranais (Sidi-Bel-Abbès, Saïda, Tlemcen, Tiaret) dans l'Algérie (média, Boghar, Monts des Bibans) sur l'Atlas saharien(mont de Ouled Nail) et dans le sud Constantinois (Aurès, région de Tébessa).

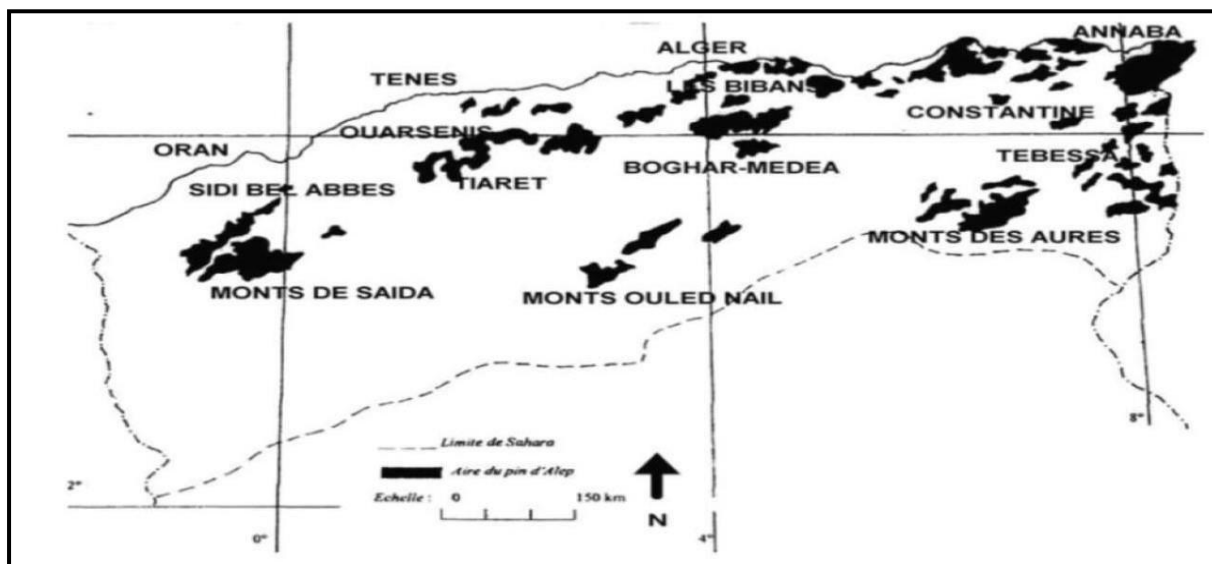


Figure 05: Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie (Bentouati, 2006; in Mezeraï, 2014)

Statut écologique du pin d'Alep

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

Zonation 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 **Schmid (1966)**, et par de nombreux autres auteurs (**Quézel, 1974**). Sans entrer dans le détail rappelons qu' il est possible d'envisager sur le pourtour méditerranéen, 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.

Ces étages qui correspondent surtout à des critères thermiques, dont les rapports avec les variantes thermiques définies par Emberger à propos de ses étages bioclimatiques sont évidents mais actuellement encore difficiles à codifier, varient bien entendu avec la latitude et ne sont pas présents partout sur le pourtour méditerranéen.

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 circum-méditerranéen, 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.

Exigences édaphiques

Le pin d'Alep se développe les substrats marneux, calcaires et calcaro-marneux (**Quezel et Barbero, 1992**) mais également sur les schistes et les micaschistes (sur littoral algérois) mais jamais sur les granites ou les gneiss. Il tolère très mal les sols sablonneux et pas du tout les nappes aquifères permanentes qui asphyxient son système racinaire (**Quezel, 1986**).

Ses meilleurs peuplements sont situés sur des sols à réaction basique $7,5 < \text{pH} < 8,5$ mais on peut rencontrer des formations sur sols acides (Provence et Sardaigne), surtout en position sub-littorale (**Quezel et Medail, 2003**).

Au nord méditerranéen, on le rencontre à 0–600 m d'altitude et au sud à 0–1400 m et même à 2.600 m dans le Haut Atlas du Maroc (**Bouguenna, 2011**).

PARTIE

EXPERIMENTALE

MÉTHODES
ET
MATÉRIELS

II.1 Matériel et Méthodes

Matériel

Matériel végétal

La plante prospecté pour l'étude de la mycoflore endophyte est le pin d'Alep : *Pinus halepensis* Mill.,

L'échantillonnage des aiguilles est porté sur des sujets de *Pinus halepensis* qui ont été choisis aléatoirement. Le choix des arbres échantionnés sont doit être porté sur des sujets qui sont en bon état physiologique, et dont les aiguilles sont toujours vertes; (des sujets asymptomatiques).

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).

Les milieux de cultures

Nous avons opté pour un ensemencement sur le milieu **PDA (Potato Dextrose Agar)** préparé (**Annexe. I**), car il s'avère plus universellement utilisé pour l'isolement des mycoendophytes liés aux conifères (**Wilson, 1997; Ganley et Newcombe, 2006**). Ce milieu est amendé à la **Gentamycine** 100 mg /L; un antibiotique général d'action pour éliminer la croissance des bactéries endophytes.

On utilise aussi la gélose de **Sabouraud**: un milieu d'isolement des Fungi (moisissures et levures); naturellement acide, elle inhibe la croissance de nombreuses bactéries. (**Annexe. I**)

Méthodes expérimentales

La stérilisation superficielle

La stérilisation superficielle c'est une procédure pour 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; Stone *et al.*, 2004) (Voir Annexe. II). Nous avons ainsi adopté le protocole de (Helander *et al.*, 1994) modifié, mentionné dans la figure 06, et donné comme suite:

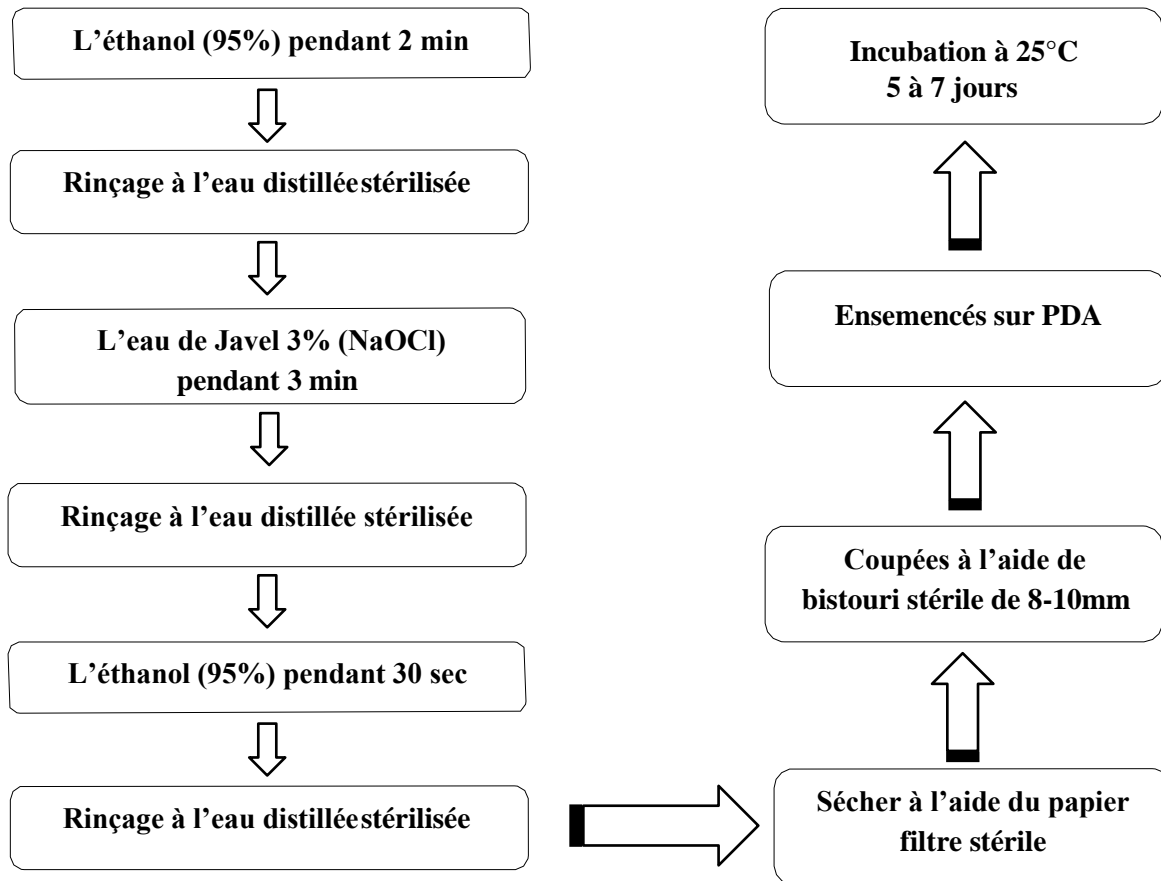


Figure 06: Les étapes conçues pour la stérilisation superficielle et l'ensemencement des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. Selon le protocole d'Helander *et al.*, 1994.

Une fois stérilisées, les aiguilles sont desséchées en utilisant du papier filtre 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.

Mise en culture

Les fragments obtenus ont été déposés dans des boîtes de Pétri contenant le PDA amendé par la Gentamycine, les cultures ensuite sont incubées dans une étuve à une température de 25°C. Un contrôle quotidien minutieux est effectué afin d'observer le développement des colonies résultantes des extrémités des fragments des aiguilles. (Figure 07)

Le repiquage des hyphes permettre une bonne croissance radiale des colonies désormais séparées par pique centrale dans des boîtes de Pétri coulées préalablement par le PDA.

Toutes ces manipulations microbiologiques sont réalisées dans des conditions d'asepsie avec l'appoint d'un bec bunsen.

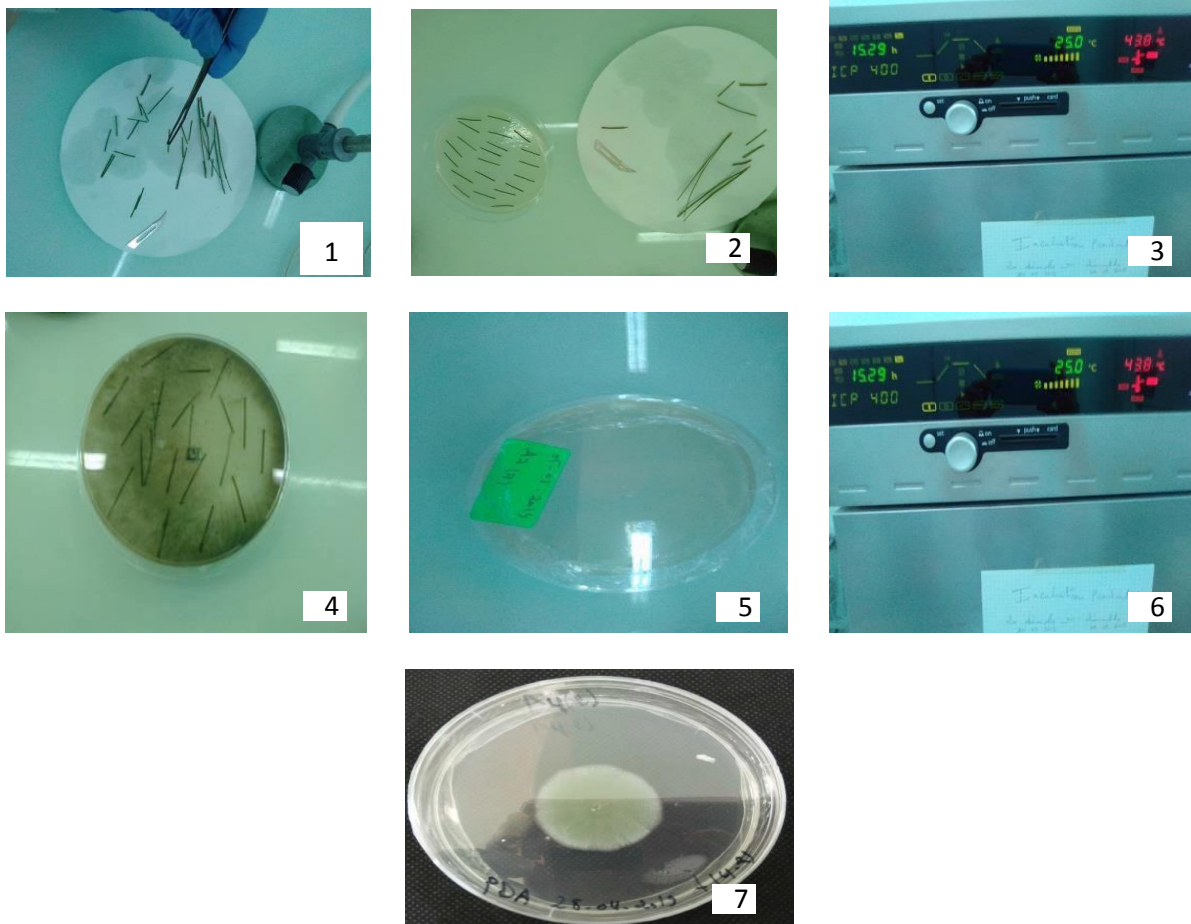


Figure 07: Les étapes de la mise en culture des fragments de pin d'Alep infectées par les mycoendophytes(Photos originale)

La purification des isolats fongiques

A. Le repiquage successif:

L'expression « culture pure » implique le développement d'une seule espèce dans un milieu donné. En principe, l'opération de purification consiste à avoir une culture pure par repiquages successifs sur un nouveau milieu de culture à partir d'une seule colonie bien isolée sont réalisés (Aouati et Chebil , 2018)

Nous effectuons des repiquages successifs dans de nouvelles boîte de Pétri contenant du milieu PDA + Gentamycine pour obtenir des cultures plus ou moins pures. (Figure 08)

Néanmoins, les cultures obtenues risquent d'être contaminées par des bactéries et par des champignons qui sont parfois invisibles et afin d'éviter ce risque, le procédé le plus simple et le plus sûr reste celui de la culture monospore.

B. La culture monospore:

La technique de la culture monospore (**Figure 09**) permet d'obtenir une culture pure à partir des spores fongiques par étalement.

Prélever un explant à partir de la périphérie de la boîte de l'isolat fongique et l'introduire dans un tube contenant d'eau distillée stérile, après agitation, on obtient une suspension sporale, on effectue des dilutions à partir de la suspension sporale puis on agite. On répète l'opération autant de fois jusqu'à la dilution voulue. (Si Mohammed, 2010). A partir de la dernière dilution, on prélève 10 μ l -50 μ l que l'on étale à l'aide de billes stériles sur milieu PDA.

Après 24h d'incubation à 28°C, à l'aide d'une loupe binoculaire, on procède au repérage et à la délimitation des spores en germination. On prélève les conidies que l'on dépose dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA et Sabouraud pour chaque isolat fongique.**Figure. 09**

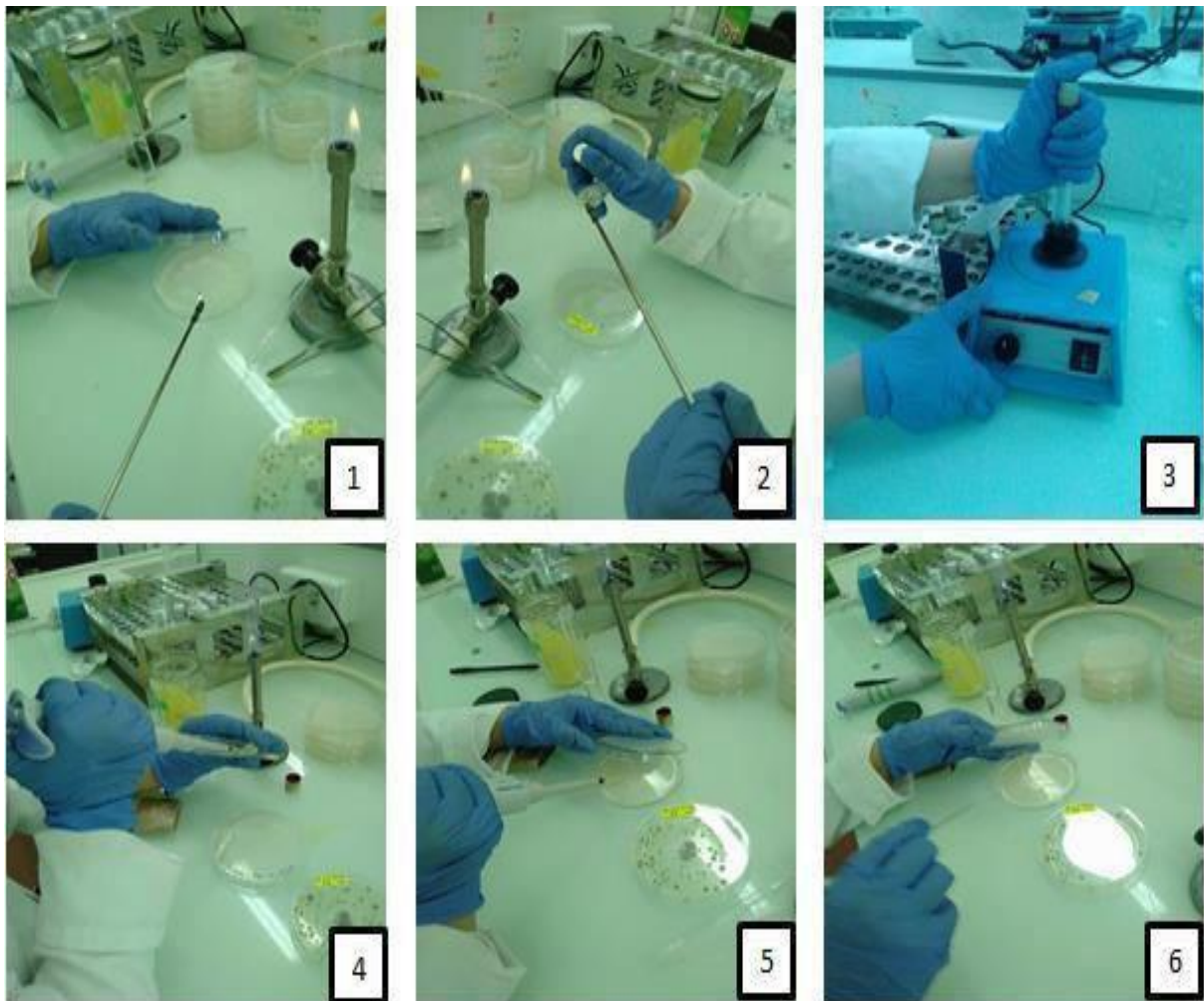


Figure 08 : Les étapes conçues pour la purification des isolats fongiques
(Photos originale)

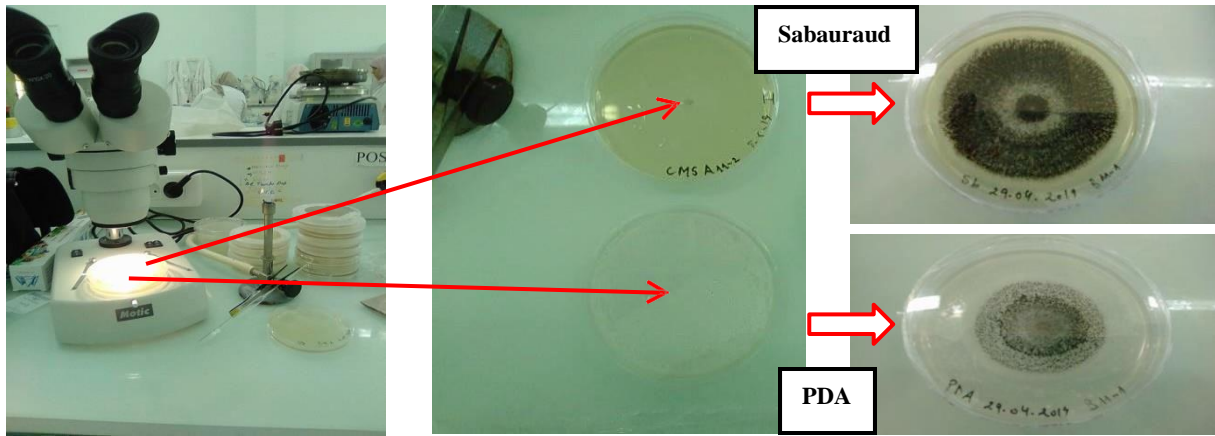


Figure 09: Culture monospore de souche fongique dans le PDA et Sabouraud (Photos originale)

II.2.4 L'identification macro-microscopique des isolats fongique

L'identification des champignons repose sur des critères macroscopiques, microscopiques après isolation et culture sur milieux de culture. Les critères macroscopiques reposent sur l'observation des colonies et de leur couleur recto et verso, leur taille, leur relief, leur aspect (filamenteux, collant), leur transparence (opaque, translucide), l'allure des contours et la pigmentation. Les critères microscopiques sont fondés sur l'aspect morphologique des différentes structures des champignons: le type de thalle (septé ou non), la couleur des hyphes (foncées ou claires), la forme des spores, l'origine des spores (endogène ou exogène), la forme des têtes (en forme de pinceau, aspergillaire). (Aouati et Chebil , 2018)

❖ **Caractérisation macroscopique :** La caractérisation macroscopique des champignons est basée sur la morphologie de ces derniers c'est à dire la forme et la couleur de mycélium. L'identification se fait à l'œil nue, observé directement sur la gélose après purification, elle se base essentiellement sur les caractères suivant:

- ✓ **La vitesse de croissance :** en mesurant le diamètre de la colonie.
- ✓ **La texture de colonie :** velouté, laineux, poudreuse.
- ✓ **La couleur:** du recto et du verso de la boîte de Pétri.
- ✓ **La pigmentation:** présence ou l'absence d'un pigment diffusible dans le milieu.
- ✓ **La forme de colonie:** régulier, irrégulier, dentelé, filamenteux.
- ✓ **L'exsudat:** présence ou absence des gouttelettes.

❖ **Caractérisation microscopique :**

✓ **Technique des lamelles:** L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après la réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton au lactophénol. Un fragment de colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et

déposé sur une lame porte-objet, une goutte de colorant est ensuite dissocié, puis recouvert d'une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation (**Chabasse et al., 2002**). Un examen à l'objectif 100 suffit pour mettre en évidence la plupart des éléments importants des isolats fongiques. (**Figure 10**)

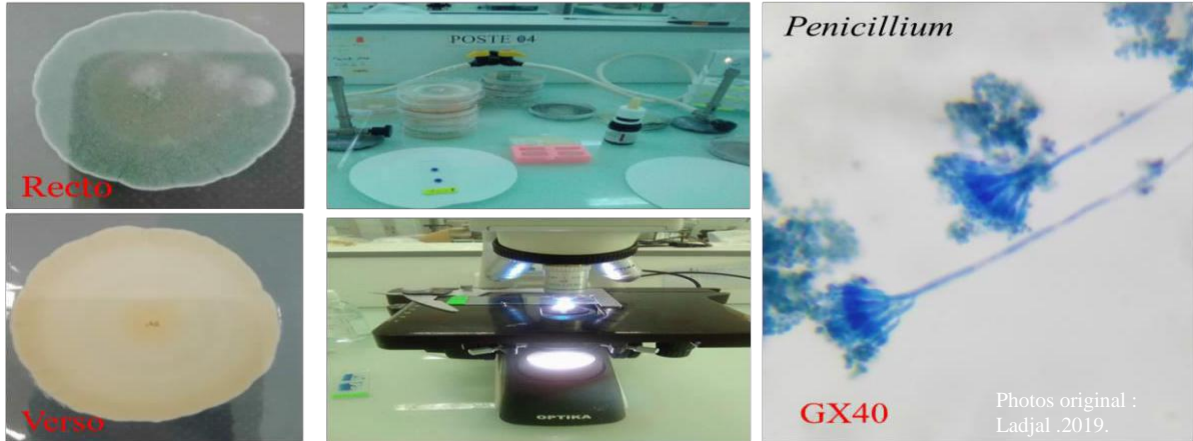


Figure 10 : Les étapes conçues pour l'identification microscopique des isolats fongiques.

**photos microscopiques originaux : Capturés à l'aide de Microscope Digital Camera SPCMOS02000KPA APTINA CMOS*

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 la préparation est colorée avec de Lactophénol bleu coton (**Annexe .I**). En outre, permis la prise en photo du mycélium (**Packer et Thomas, 1990**).

En se référant également aux clés d'identification de (**Lanier, 1976-1978; Taylor et al, 2004; Deacon, 2006; Dufresne, 2014-2018 ; Chabasse et al., 2002**). 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.

❖ **Conservation des souches** : Les souches pures sont repiquées sur gélose Sabouraud inclinée, les tubes sont ensuite incubés à 25°C dans une étuve jusqu'à ce qu'elles poussent, puis sont conservés à 4°C.

RÉSULTATS
ET
DISCUSSION


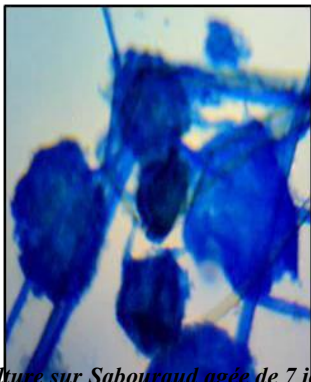
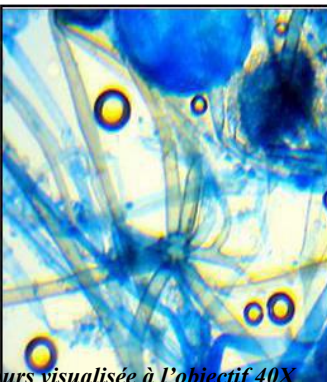
Résultats et discussion: la mise en évidence de la mycoflore endophyte des aiguilles de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.)

Identification morphologique des isolates fongique



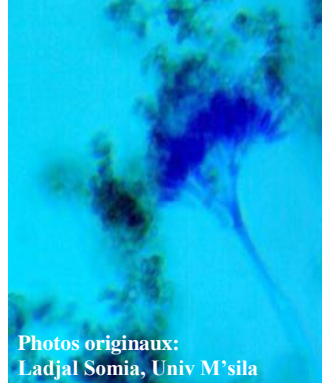






Nous avons pu caractériser 46 isolats fongiques endophytes dont 37 furent identifiés au moins à l'échelle du genre ou d'espèce (07 genres différents); et d'autres 05 genres différents appartenant au classe des Hyphomycètes et 03 genres différents appartenant au classe des Blastomycètes et 01 genre appartenant au Zygomycètes (**Tableau 02**). Les résultats obtenus montrent que la composition mycofloristique endophyte à une diversité fongique plus importante enregistrée pour les aiguilles de pin d'Alep.

L'identification des mycotaxons endophytes dans cette étude est basée sur des critères morphologiques, les données obtenues montrent également que certains mycotaxons sont particulièrement abondants que d'autres.

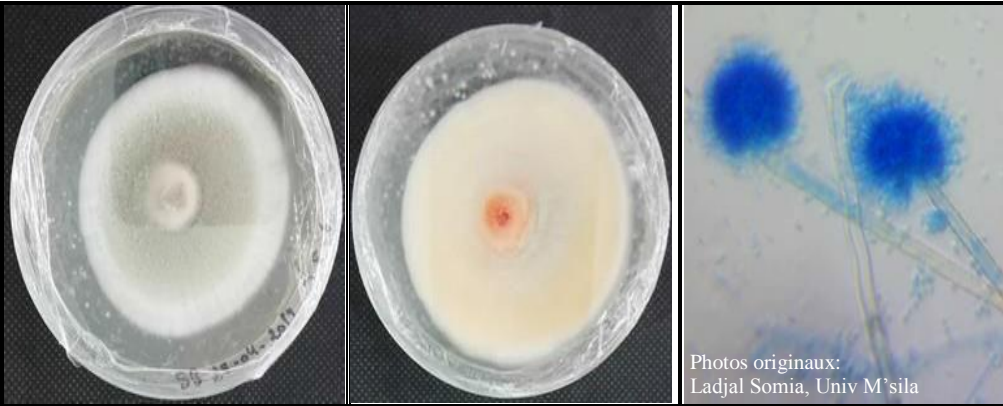
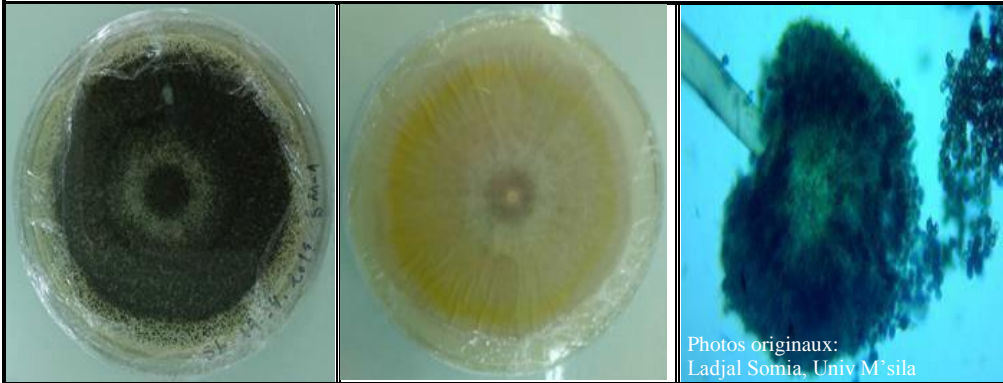

Tableau 01: Quelques mycotaxons identifiés d'après les aiguilles du pin d'Alep

Code de mycotaxons	Photo macroscopique - Recto -	Photo macroscopique - Verso -	Photos microscopique
N°39 <i>Rhizopus</i> <i>sp.1</i>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ de M'sila</p>  <p>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 40X</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>		
	<p>Recto: Colonies de surface duveteuses, texture cotonneuse, Couleur blanche au départ, puis deviennent mouchetées de points noirs foncées en vieillissant ; Verso: noire; Croissance : Très rapide et extensive sur gélose en 2 à 3 jours;</p> <p>Thalle: Filaments très larges non ou peu septés; Sporocystophores: sont isolés ou disposés en bouquets; Sporocystes: Globuleux avec une columelle globuleux cylindrique et une apophyse courte; Stolons,Rhizoïdes: Bien différenciées.</p>		

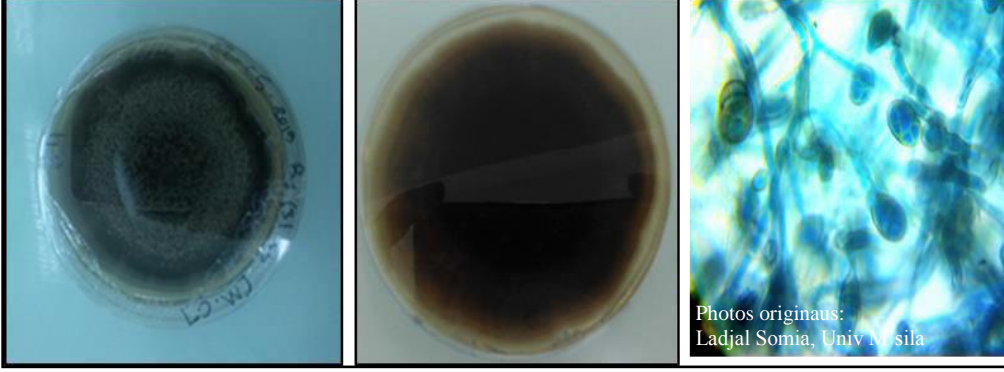

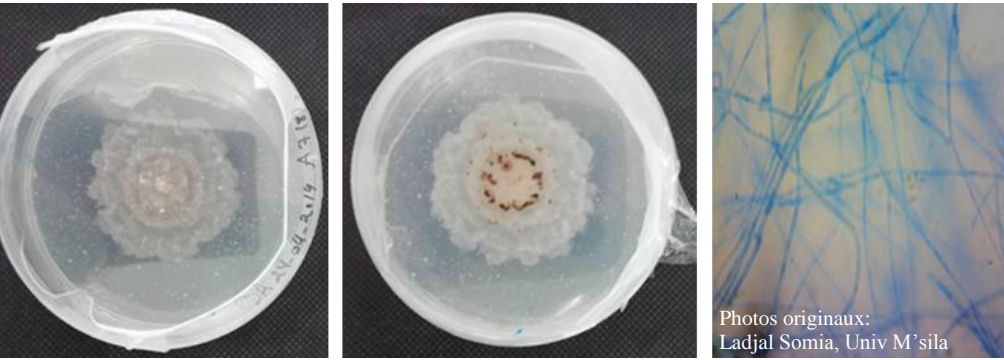
Suite: Tableau 01

<p>N°01 <i>Penicillium</i> <i>sp.1</i></p>			 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p>
<p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 40X</i></p>			
<p>N°07 <i>Penicillium</i> <i>sp.2</i></p>			 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p>
<p><i>Photo macro-microscopique de culture sur PDA agée de 7 jours visualisée à l'objectif 40X</i></p>			
<p>N°10 <i>Penicillium</i> <i>sp.3</i></p>			 <p>Photos originaux : Ladjal Somia, Univ M'sila</p>
<p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 100X</i></p>			
<p><i>Penicillium sp.1 (N°01); Penicillium sp. 2 (N°07); Penicillium sp. 3 (N°10)</i></p> <p>Recto: Colonies de Surface : duveteuses poudreuse ; Relief : planes ou peu surélevés, Couleur: Blanc à gris au départ puis bleu vert (N°01) ou vert foncé (N°07) ou blanc à orange claire (N°10); Verso: Incolore ou jaune; Croissance: Rapide de 3 à 5 jours;</p> <p>Présence de têtes pénicillaires (pinceaux) ou pénicilles ; Hyphe: Septés, hyalines, portent des conidiophores; Conidiophore: Ramifiés, cylindrique, cloisonnés; Phialides: Disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores ; Conidies : Rondes, lisses</p>			

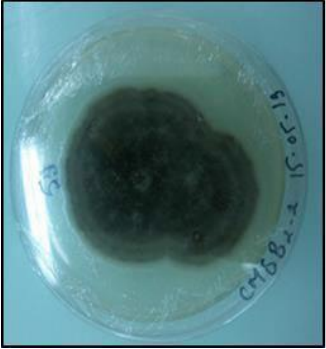
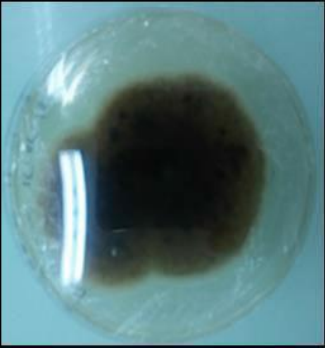
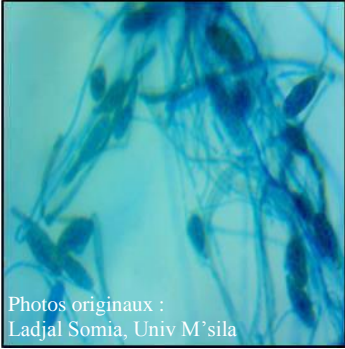
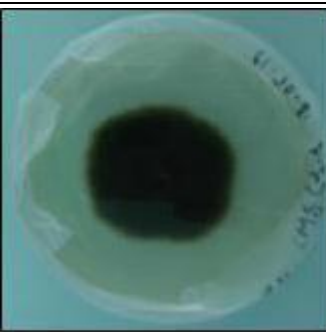
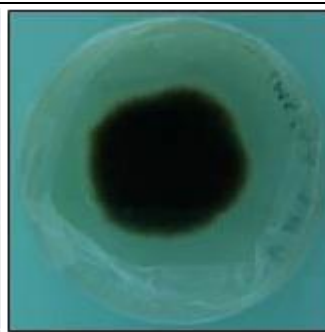
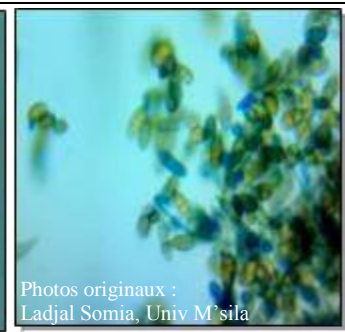

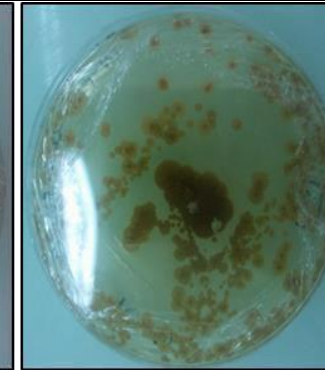
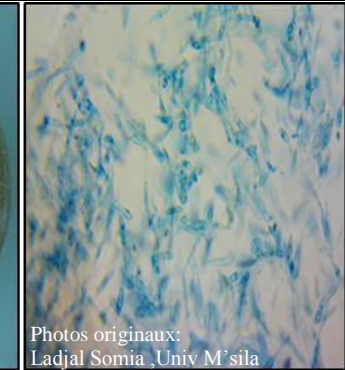
Suite: **Tableau 01**

<p>N°15 <i>Aspergillus sp.1</i></p>	 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p> <p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 40X</i></p>
<p>N°55 <i>Aspergillus niger</i></p>	 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p> <p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 40X</i></p>
<p>N°03 <i>Aspergillus flavus</i></p>	 <p>Photos originaux : Ladjal Somia, Univ M'sila</p> <p><i>Photo macro-microscopique de culture sur PDA agée de 7 jours visualisée à l'objectif 40X</i></p>
<p><i>Aspergillus flavus</i></p>	<p><i>Aspergillus sp.1</i> (N°15); <i>Aspergillus niger</i> (N°55); <i>Aspergillus flavus</i> (N°03)</p> <p>Recto: Colonies de surface; duveteuse à poudreuse, Relief : planes, Couleur: d'abord blanche, puis jaunes, ou vert claire à foncé, ou deviennent mouchetées par poudres noirs foncées ; Verso : incolore ou jaune ou beige crème; Croissance : Rapide de 3 à 5 jours et très rapide et extensive (<i>A. niger</i>) ;</p> <p>Présence de têtes aspergillaires caractérisées par leur aspect radiée et leur vésicule sphérique de couleur noires à maturité (<i>A. niger</i>), les spores sont globuleuses de couleur vert pâle (<i>A. flavus</i>)</p>


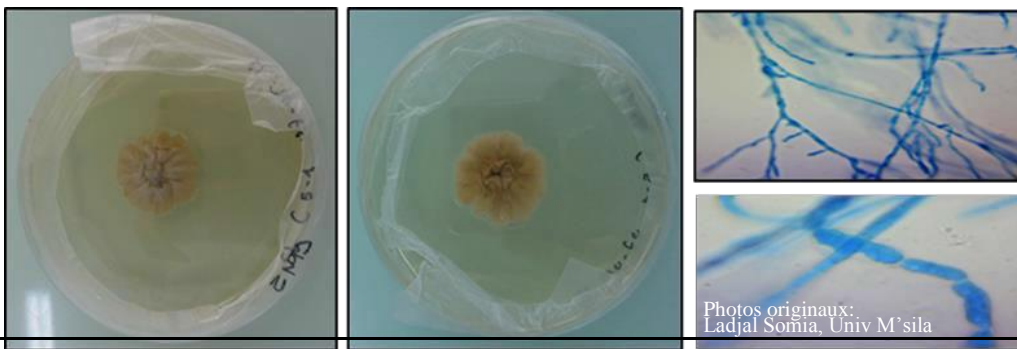
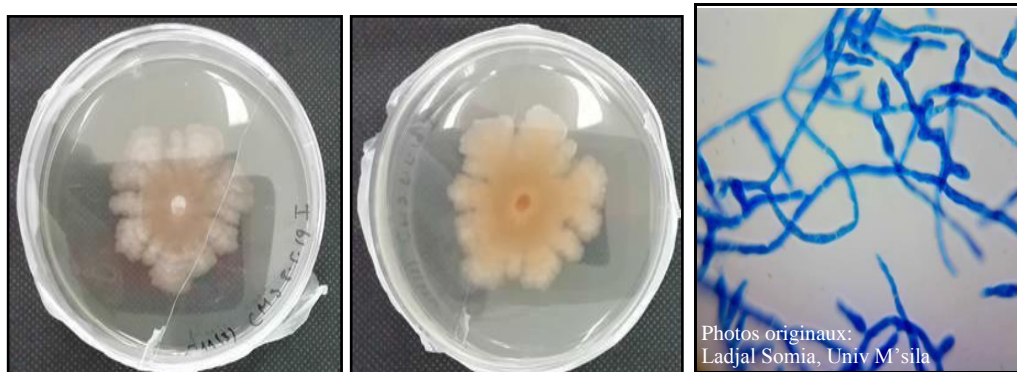
Suite: **Tableau 01**

<p>N°64 <i>Curvularia</i> sp.</p>	 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p> <p><i>Photo macro-microscopique de culture sur PDA agée de 7 jours visualisée à l'objectif 40X</i></p> <p>Recto: Colonies de Surface : laineuse, Relief : planes, Couleur : brun olive au départ devient vert foncé à noir; Verso: Foncé; Croissance: Rapide de 3 à 5 jours. Hyphe: Septés; Conidiophore: Sont bruns, peu ramifiés; Conidies: Ou porospores sont brunes, pluricellulaires et légèrement incurvées, cloisonnées seulement transversalement</p>
<p>N°12 <i>Cladosporium</i> sp.1</p>	 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p> <p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 100X</i></p> <p>Recto: Colonies de Texture; floconneuse, Relief : surélevées, Couleur : vert olive au brun olive très foncé; Verso: Brun noir; Croissance: Très lente de 7 à 10 jours. Hyphe: Foncé, septés, sont pigmentés; Conidiophore: Peu long; Conidies: Elliptique à cylindrique formées à l'extrémité des conidiophores.</p>
<p>N°11 <i>Mortierella</i> sp.</p>	 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p> <p><i>Photo macro-microscopique de culture sur PDA agée de 7 jours visualisée à l'objectif 100X</i></p> <p>Recto : Colonie de surface : duveteuse à un aspect zoné ou lobé de forme de rosette ; Relief : peu planes ; Couleur : blanches à blanc grisâtre ; Verso : incolore Croissance : rapide (2-3 jours) ; Thalle : siphonné ; sporocystophores : simple sans ramification ; absence de collumelle</p>

Suite: **Tableau 01**

<p>N°59</p> <p><i>Alternaria</i> <i>sp.1</i></p>			 <p>Photos originaux : Ladjal Somia, Univ M'sila</p>
<p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 100X</i></p>			
<p>N°38</p> <p><i>Alternaria</i> <i>sp.2</i></p>			 <p>Photos originaux : Ladjal Somia, Univ M'sila</p>
<p><i>Photo macro-microscopique de culture sur PDA agée de 7 jours visualisée à l'objectif 100X</i></p>			
<p><i>Alternaria sp.1</i> (N°59); <i>Alternaria sp.2</i> (N°38)</p> <p>Recto: Colonies de Surface : duveteuses à laineuse, d'Aspect cotonneux, Relief : peu planes; Couleur ; gris-vert au départ devient rapidement foncée (vert cresson) Verso: Incolore; Croissance: Très rapide (2 à 3 jours); Hyphe: Septés, peu ramifiés, pigmentés en brun; Conidiophore: Cloisonnés, bruns, septés, simples ; Conidies: Brunnes, ovoïdes, pluricellulaires, da partie basale arrondie, présentent des cloisonnements obliques transversales.</p>			
<p>N°56</p>			 <p>Photos originaux : Ladjal Somia, Univ M'sila</p>
<p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 100X</i></p>			
<p>Exemple de Blastomycètes.1</p> <p>Chamignons levuriformes ; Formé par un thalle qui se réduit à l'état unicellulaire : levure ou pseudomycelium ou même des filaments mycéliens vrais ; Forme de blastospore : forme sphérique, ovoïde, (parfois cylindrique, triangulaire ...) Caractère macroscopiques : Colonies de 2 mm de diamètre souvent blanches, crémeuses, lisses et brillantes, parfois d'aspect filamenteux.</p>			

Suite: **Tableau 01**

<p>N°49</p>	 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p> <p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 40X</i></p> <p>Exemple de Zygomycètes</p> <p>Champignons à spores, leurs hyphes étant cœnocytiques ou siphonnés, avec de nombreux noyaux dans un même siphon. Ces champignons sont également caractérisés par une abondante reproduction asexuée et une croissance rapide qui leur permettent de coloniser rapidement leur milieu. L'identification basée sur l'existence ou pas des <u>rhizoïdes</u>, d'<u>apophyse</u>, et de <u>columelle</u></p>
<p>N°41</p>	 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p> <p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 40X,100 X</i></p> <p>Exemple de l'Hyphomycètes.1</p>
<p>N°19</p>	 <p>Photos originaux: Ladjal Somia, Univ M'sila</p> <p><i>Photo macro-microscopique de culture sur Sabouraud agée de 7 jours visualisée à l'objectif 100X</i></p> <p>Exemple de Hyphomycètes.2</p> <p>Classe de champignons qui se reproduisent de manière asexuée par les conidies sur des hyphes ou des agrégations d'hyphes. Il existe 02 groupes : <u>Les hyhomycètes hyalins</u> ceux qui ont des conidies incolore, et <u>les hyphomycètes dématiées</u> ceux avec des conidies à pigmentation sombre.</p> <p>*Les conidies portées par un conidiophore simple (isolé) ou complexe</p>

Composition générale de mycoflore endophyte détectée

Les résultats obtenus démontrèrent que les aiguilles de *Pinus halepensis* abritent une mycoflore endophyte plus diversifiée, avec environ 20 mycotaxons différents à l'échelle d'espèce parmi les isolats fongiques identifiées. D'une façon globale, le statut morphologique des isolats fongiques identifiés au niveau des aiguilles de pin d'Alep indique une prédominance des anamorphes (formes asexuées) comparativement au téléomorphes (formes sexuées), alors que sur le plan taxonomique, nous avons constaté que les mycotaxons sont affiliés aux Dicyariomycotina, autrement dit la division des Ascomycotina, tandis que la plupart des taxons fongiques furent classés comme des représentant du groupe « Mitosporique » (formelement Deuteromycotina ou champignons imparfaits) à savoir de la classe des Hyphomycètes (les appareils reproducteurs sont dispersés), et la classe des Blastomycètes (levures). D'autre part nous avons trouvé des mycotaxons sont affiliés au division de Zygomycotina (**Figure 11**)

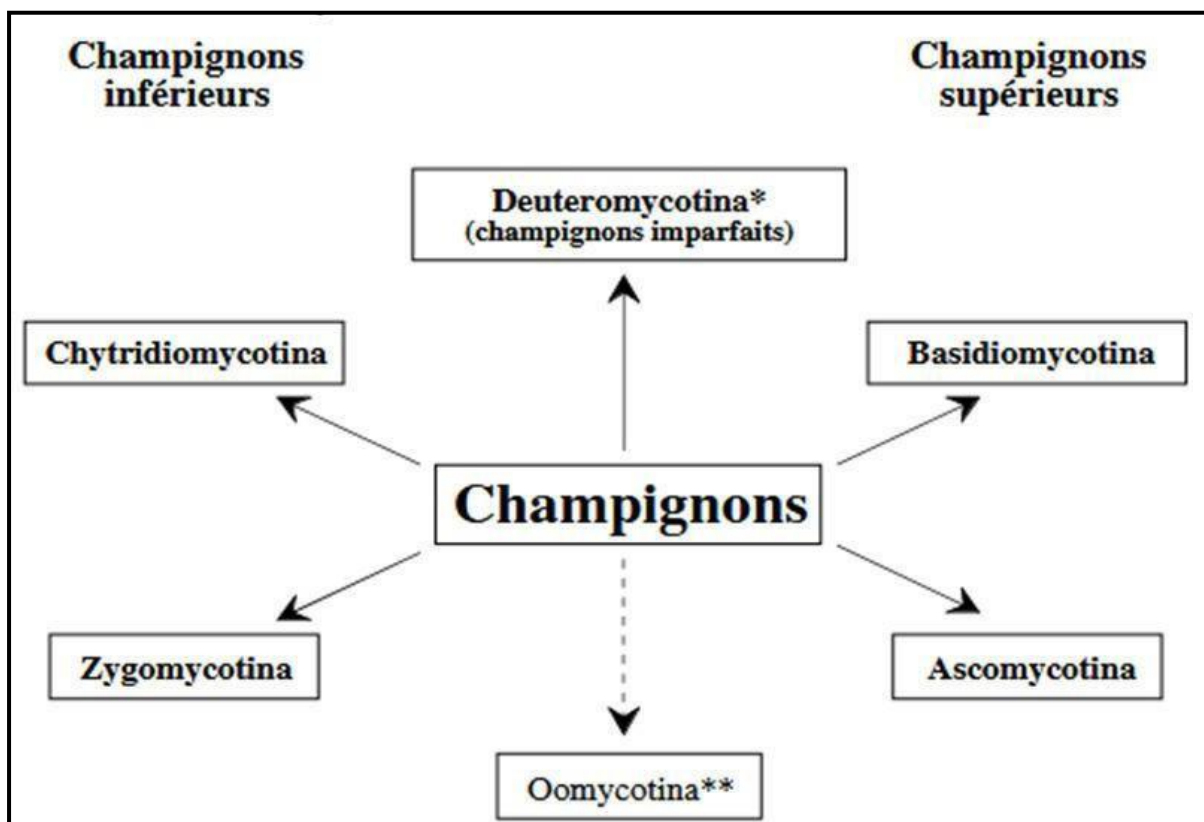


Figure 11: Classification générale des champignons (De Hoog et Guarro, 1995)

* Champignons connus seulement par leur stade asexué, en attente de classification

** Actuellement les espèces issues de cette division ne sont plus classées parmi les champignons vrais.

Nous avons trouvé que mycotaxons du la division des Ascomycotina (formelement les Deuteromycotina) prédominent la mycoflore endophyte détectée chez les aiguille de *Pinus halepensis*, particulièrement les **Hyphomycètes** en deux classes des Eurotiomycètes (ordre des: Eurotiales), et Dothidéomycètes (ordre des: Pleosporales, et Capnodiales) ; (**Tableau 03**) représentés respectivement par **54%** et **17%** des mycotaxons endophytes identifiés, et **12%** des mycotaxons représentés comme des Hyphomycètes non déterminés, **Figure (12, B)**. Viennent ensuite les mycotaxons de groupe de **Blastomycètes** non déterminés enregistrèrent un taux de **6%** par rapport au total des isolats fongiques isolés pour cette étude **Figure 12 (A, B)**.

D'autre part, la division de Zygomycotina est représenté dans cet inventaire par la classe des Zygomycètes (ordres des Mucorales, et des Mortierellales) ; (**Tableau 03**) par **11%** par rapport au total des isolats fongiques isolés pour cette étude **Figure 12 (A, B)**.

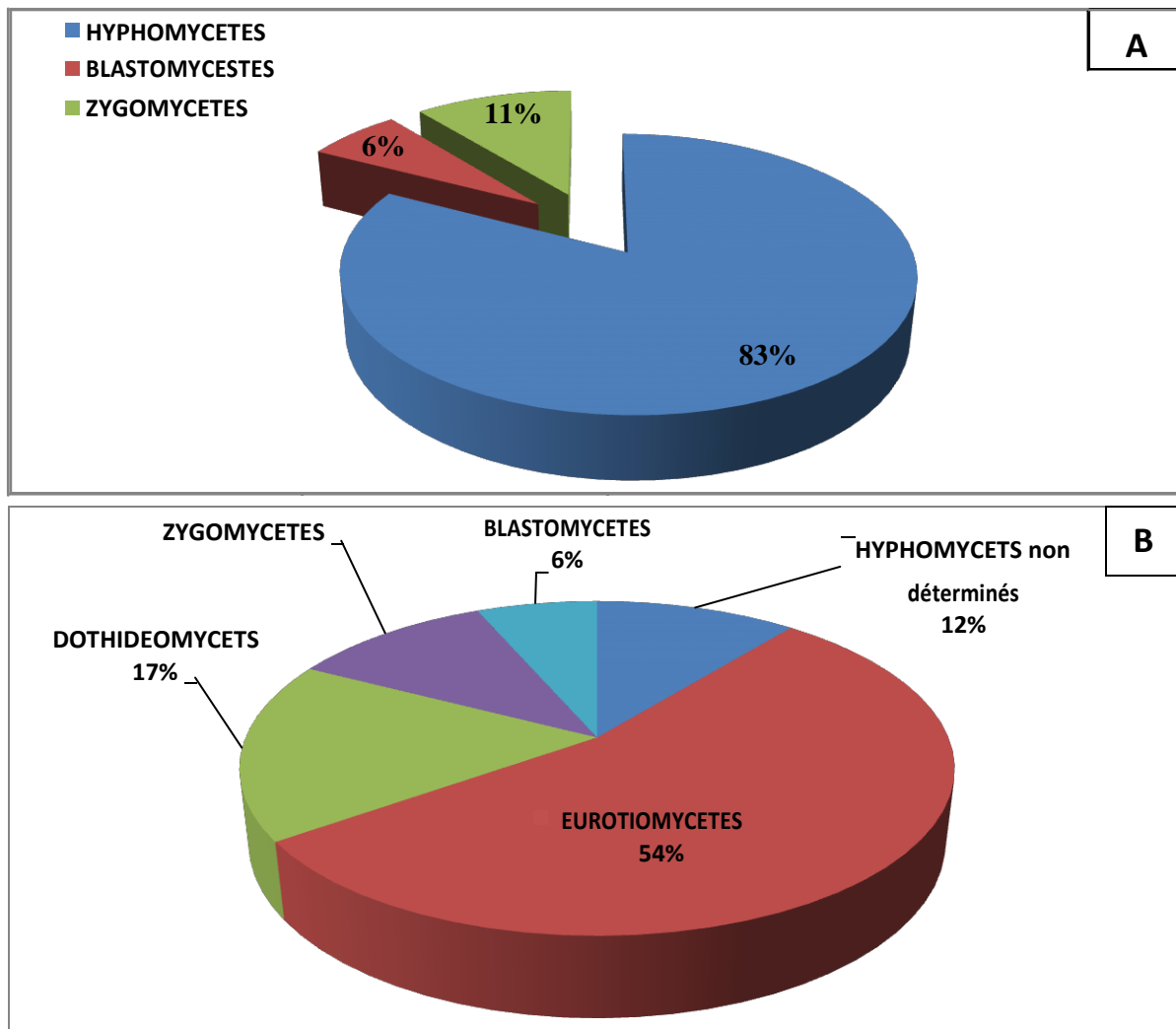


Figure 12: (A, B), Statut taxonomique des champignons endophytes isolées à partir des aiguilles du pin d'Alep

Comme il fut mentionnée précédemment, dans cette étude 46 mycotaxons endophytes furent isolés à partir d'aiguilles de *Pinus halepensis*. Parmi les 46 mycotaxons isolés, 37 furent l'objet d'une identification classique morphologique au moins à l'échelle du genre. Le statut taxonomique de la mycoflore endophyte indique une prédominance des Hyphomycètes par 38 mycotaxons (principalement le genre: *Penicillium* et *Aspergillus* et 04 genres différents déterminé comme des Hyphomycètes), suivie par 05 mycotaxons des Zygomycètes (le genre: *Rhizopus* et *Mortierella* et un genre déterminé comme des zygomycètes), alors que 03 mycotaxons sont déterminés comme des Blastomycètes (**Tableau 03**).

Tableau 02 : Composition spécifique da la mycoflore endophyte associée aux aiguilles de pin d'Alep (Nombre total des mycotaxons isolés: 46)

Mycotaxons isolés	Nombre des mycotaxons	Pourcentage (%)	Ordre	Classe
<i>Penicillium sp.</i>	17	36,96 %	EUROTIALES	HYPHOMYCETES
<i>Aspergillus sp.</i>	08	17,39 %		
<i>Cladosporium sp.</i>	05	10,87 %	CAPNODIALES	
<i>Alternaria sp.</i>	02	4,35 %	PLEOSPORALES	
<i>Curvularia sp.</i>	01	2,17 %		
Hyphomycètes	05	10,87 %	----	
Blastomycètes	03	6,52 %	----	BLASTOMYCETES
<i>Rhizopus sp.</i>	03	6,52 %	MUCORALES	ZYGOMYCETES
<i>Mortierella sp.</i>	01	2,17 %	MORTIERELLALES	
Zygomycètes	01	2,17 %	----	

Discussion des résultats

Dans cette étude initiale; les espèces étudiées vont appartenir principalement aux Hyphomycètes, et moins fréquent ; les espèces de Zygomycètes et plus rarement ; les espèces de Blastomycètes.

Les Hyphomycètes qui regroupent tous les champignons filamenteux à thalle septé dont les cellules conidiogènes (productrices de spores ou conidies) sont libres. Et **Les Blastomycètes** qui regroupent l'ensemble des champignons levuriformes. Ces deux classes appartenant au **Deuteromycotina**: Dans cette division qu'on retrouvera le plus grand nombre des espèces d'intérêt médical. Cet ensemble, très hétérogène, englobe toutes les espèces se multipliant sur le mode asexué.

Les données obtenues dans cette étude montrent la prédominance des Hyphomycètes, montrent également que certains mycotaxons sont particulièrement abondants que d'autres. Parmi les mycotaxons de cette étude qui présentent des taux d'occurrence assez élevés nous trouvons le groupe de *Penicillium sp.*, (36,96 %) et *Aspergillus sp.*, (17,39 %) ; suivie par les autres mycotaxons avec un taux moins abondant : *Cladosporium sp.*, (10,87 %), *Rhizopus sp.*, (6,52 %), *Alternaria sp.*, (4,35 %), *Curvularia sp.*, (2,17 %), *Mortierella sp.*, (2,17%) ; (le pourcentage par rapport au nombre total des mycotaxons identifiés) Voir **Tableau 03**

Penicillium; contient actuellement 354 espèces, parmi les quels 45 espèces sont associées au téléomorphe genre Eupenicillium et 24 chez Talaromyces. Récemment, 17 espèces supplémentaires ont été rapportés (Wang et al., 2004). Des quatre sous-genres de Penicillium, se compose maintenant de 58 espèces avec une forte la diversité de la morphologie et la production de secondaire métabolites. La plupart de ces espèces se trouvent sur les aliments, les aliments pour animaux, les bulbes ou les légumes racines. Au sein de l'industrie agroalimentaire, certaines moisissures sont utilisées pour la production de fromage comme le roquefort (*Penicillium roqueforti*) ou le camembert (*Penicillium camemberti*) (**Ropars et al., 2012**)

Aspergillus; un genre très diversifié comptant 180 espèces, dont certaines ayant une valeur commerciale, médicale, ainsi que des espèces pathogènes (**Lubertozzia et Keasling, 2009**). *Aspergillus* est un genre capable de croître sur presque tout type d'habitat, a été déjà isolé préalablement en tant qu'endophyte à partir de plusieurs plantes médicinales dont *Clitoria*

ternatia, une plante médicinale de la famille des Fabaceae, il a été isolé aussi à partir de différentes plantes médicinales (Abdel-Motaal et al., 2010). Le genre *Aspergillus*, possède une activité antimicrobienne. (Ladjal, 2012). Cette activité conduisant à la réduction de la croissance de bactéries ou de champignons par différents mode d'action des mycotoxines produites par *A. terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*. Elles peuvent également servir à la synthèse d'acides organiques comme l'acide citrique ou l'acide gluconique (*Aspergillus niger*). Ces deux types d'acides sont utilisés comme additifs alimentaires (Karaffa, 2001).

Cladosporium ; un genre mondialement répandu, il groupe environ 35 espèces parasites de végétaux ou saprophytes très communs; il a été isolé comme endophyte a partir de *Cephalotaxus manniipar* (Saithong et al., 2010), et de *Acacia catechu* Willd par (Nagaraja et Devkar, 2010).

L'utilisation des filtrats fongiques de *Cladosporium sp.*, en matière de lutte contre les insectes a été proposée par de nombreux autres auteurs Une étude menée par (Rezende et al., 2009) contre *Alphitobius Diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) par l'utilisation d'un filtrat de *Cladosporium sp.*, a donné comme résultat 95% de mortalité pour les larves et 100% pour les Adultes de cet insecte.

Rhizopus; un genre de moisissures communes qui se développent sous forme de filaments dans les sols, sur les fruits et les végétaux en décomposition, Il produit à la fois des spores sexuées et des spores asexuées.

Une étude phylogénétique moléculaire du genre *Rhizopus* réalisée par (Abe et al., 2010) ont reconnu huit espèces; *R. caespitosus*, *R. delemar*, *R. homothallicus*, *R. microsporus*, *R. arrhizus* (*R. oryzae*), *R. reflexus*, *R. schipperae* et *R. stolonifer*.

Rhizopus oryzae, est utilisée pour la synthèse d'enzymes telles la maltase et la dextrinase servant à transformer le maltose et l'amidon en alcool. Ce processus de fermentation alcoolique est rencontre dans la fabrication de l'alcool de riz en Asie (Lv et al., 2012).

Alternaria ; est un genre de champignons deutéromycètes de la famille des Pleosporaceae. Ce genre renferme un grand nombre d'espèces (plus de soixante) parasites ou saprophytes.

Le mode de vie saprophyte nécrotrophes qui causent de véritables maladies pour les plantes hôtes. Plusieurs espèces d'*Alternaria* sont responsables de maladies des plantes

cultivées ou non. Ces maladies sont parfois regroupées sous le terme d'alternariose. Par exemple *Alternaria dauci* infecte les feuilles de carottes cultivées, plus ou moins selon les caractéristiques génétiques de la souche en cause, et selon l'espèce de carotte infectée. Les symptômes de l'alternariose se manifestent généralement par des taches brunes à noirâtres au niveau des feuilles, des tiges et des fruits (**Rodrigous et al., 2010**).

Plusieurs études ont examinés les activités antimicrobiennes et antimycotoxigènes de l'extrait à l'acétate d'éthyle (EA) et d'un composé bioactif obtenu à partir d'un champignon endophyte *Alternaria alternata* isolé de feuilles de *Catharanthus roseus*. L'EA et le composé bioactif, l'acide p-coumarique (PC), ont montré une activité antimicrobienne à large spectre dépendant de la concentration contre les bactéries, levures et champignons (**Sudharshana et al., 2018**).

Curvularia ; contient environ 80 espèces, qui sont principalement des agents pathogènes du sol ou des plantes. Des études récentes ont montré que l'identification morphologique ne correspond pas à l'identification moléculaire. Une analyse phylogénétique des genres *Bipolaris* et *Curvularia* a permis de réaligner plusieurs espèces. En particulier, des isolats cliniques précédemment identifiés comme étant des espèces de *Bipolaris*, notamment *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* et *B. spicifera* ont maintenant été transférés à *Curvularia* (**Manamgoda et al., 2012**).

Curvularia sp., espèces comme parasites facultatifs sont parmi micro-organismes utilisés pour lutter contre les mauvaises herbes. Dans les pays d'Amérique du Sud, *Curvularia lunata* et *Phyllachora sp.* a été identifié comme facteur causant la tache foliaire chez *Hymenachne amplexicaulis* (Rudge) (**Monterio et al., 2003**).

Aussi, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* et Espèces *Exserohilum*, en tant que champignons causant des lésions sur les feuilles de *Lolium multiflorum* (L.) et de *Cynodon dactylon* (L.) ont été évalués (**Pratt, 2006**). Par conséquent, isolements de différentes espèces de *Curvularia* dans *Cyperaceae* ont été collectés et évalués comme probables agents de lutte biologique contre les mauvaises herbes dans les rizières *Curvularia tuberculata* était assez efficace pour lutter contre *Cyperus difformis* (L.), *C. iria* (L.) et *Fimbristylis miliacea* (L.). Le premier isolement de *Curvularia lunata* de *Lolium perenne* (L.) a été signalé en 2007 (**Goldring, 2007**). En outre, six espèces de champignons pathogènes ont été identifiées. isolé d'*Echinochloa spp.* (L.) et ont été évalués comme agents de contrôle de cette mauvaise herbe

dans le riz que parmi ces champignons, *Curvularia lunata* var. *aeria* et *Exserohilum oryzae* étaient pathogènes chez le riz et Espèces *Echinochloa* (Zhang et al., 1996), tandis que *Curvularia geniculata* n'était pathogène que chez *Echinochloa spp.*, Mais pas dans le riz (Zhang et al., 1996). Afin de modifier les souches fongiques, ce qui pourrait montrer une meilleure efficacité dans le contrôle biologique, la fusion de protoplastes a été réalisée entre *Helminthosporium gramineum* et *Curvularia lunata* et les conséquences souches contrôlaient efficacement les principales espèces de riz (Zhang et al., 2007). *Curvularia lunata* et *Curvularia aerea* ont été signalés comme agents de contrôle biologique dans *Echinochloa spp.* (Tsukamoto et al., 1998). *Curvularia lunata* isolé sur du foin barnyardgrass a été évalué lutte contre les mauvaises herbes dans les champs de haricots (Bisen, 1983). C'était a constaté que ce champignon n'était pas efficace chez les cultivars de riz, mais a provoqué des maladies chez les variétés de haricots (Bisen, 1983). Également, *Curvularia lunata* réduit la croissance d'*Echornia crassipes* (L.) de 15-20% (Praveena et Naseema, 2004).

Mortierella; Le genre répandu contient environ 85 espèces. Des membres de l'ancienne *Mortierella isabellina*- groupe sont maintenant classés comme *Umbelopsis* (*Umbelopsis isabellina*, *Umbelopsis ramanniana*, et sont classifiés avec le genre *Mortierella* dans la famille *Mortierellaceae* (Hoffmann et al., 2013).

Depuis plusieurs décennies, les genres *Mortierella* et *Umbelopsis* sont des producteurs efficaces des acides gras polyinsaturés (AGPI). Industriellement l'acide gras le plus important est l'acide arachidonique (ARA), qui est utilisé en médecine, en pharmacologie, en cosmétique, l'industrie alimentaire (Dyal et Narine 2005) et l'agriculture (Eroshin et Dedyukhina 2002).

L'espèce la plus étudiée du genre *Mortierella* est *Mortierella alpina* mais tous les isolats de cette espèce ne produisent pas ARA. Par exemple, dans l'étude de Eroshin et al., (1996) il a été constaté que l'isolat VKM-F-1630 ne produisait pas cet acide gras mais deux isolats l'ont produit à un niveau supérieur à 55,2% du total des lipides, ce qui était le plus élevé de tous les espèces testées de *Mortierella*. *Mortierella gamsii*, *Mortierella minutissima*, *Mortierella elongata* et *Mortierella humilis* ont été observés comme produisant des ARA jusqu'à 25, 23,2, 6,2 et 15% de la teneur totale en lipides, respectivement (Eroshin et al., 1996).

CONCLUSION

GÉNÉRALE

Conclusion et perspectives

La présente étude a été effectuée dans le but de la recherche des champignons endophytes à partir des aiguilles du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.), par isolement, purification et identification morphologique, dont l'objectif est de caractériser la relation symbiotique mycoendophytes/Plantes; où les mycoendophytes sont d'excellentes sources de nouveaux produits naturels bioactifs avec un potentiel d'exploitation dans une grande variété de domaines médicaux, industriels, et agricoles.

La colonisation endophyte de la trame mycoflore des aiguilles du pin d'Alep, montrée l'isolement et la purification des 46 mycoendophytes; 37 mycotaxons sont identifiés représentant 07 genres: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Rhizopus*, *Mortierella*. 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 et l'état phytosanitaire de l'hôte (saisonnalité et changements physiologiques périodiques accompagnants de l'âge de l'aiguille).

La mycoflore endophyte des aiguilles de *Pinus halepensis* est relativement diverse, la majorité des mycotaxons est rangée au sein du groupe « Mitosporique ». 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 pour le partenaire fongique.

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

- L'identification moléculaire des mycotaxons endophytes difficile à identifier morphologiquement;
- Etudier la nature de relation symbiotique champignons endophytes/Plante et 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 *Switch* entre les différents régimes trophiques des mycoendophytes (mutualisme, infection latente, pathogénique, saprophytisme);

- Extraction des métabolites secondaires des mycoendophytes pour donner une importance à des activités biologiques contre les microorganismes pathogènes pour l'homme et pour les plantes;
- Identification des substances antimicrobiennes séparées par des méthodes plus performantes, dans l'espoir d'obtenir de nouvelles substances ;
- La production des substances antimicrobiennes à l'échelle industrielle ;
- Il est possible de donner une importance à la bioprospection des mycoendophytes pour leurs vertus agrochimiques (mycopesticides, biofertilisants) et pharmaceutique (anti cancéreux, immunosuppresseurs,....etc).

En générale, il est recommandé dans le futur de réaliser des recherches sur la totalité de la plante hôte, et de déterminer davantage les mycoendophytes abrités dans les plantes et d'employer les moyens possibles qui permettent d'étudier la spécificité de cette trame fongique à l'égard de la plante, et voir les relations écologiques qui règnent entre les assemblages endophytes au sein de la plante.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdel-Motaal F.F., Nassar M.S.M., El-Zayat S.A., El-Sayed M.A. and Ito S.I. 2010.** Antifungal activity of endophytic fungi isolated from Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus L.*). *Pakistan Journal of Botany*. (42): pp 2883-2894.
- Abe A., Asano K., Sone T. 2010.** A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* (74): 1325–1331.
- Ammari Y., Sghaier T., Khaldi A., Garchi S. 2001.** Productivité du pin d'Alep en Tunisie: Table de Production. *Annales de L'INGREF N° Spécial*, pp. 239-246.
- Andéol S.C., Benjamin C. 2016.** Les champignons endophytes: impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. *Science pharmaceutique*. Dumas-01266084.
- Aouati C., Chebil B. 2018.** Criblage des activités antagoniste des quelques souches endophytes contre des champignons phytopathogènes. Thème de master. Université Oum El Bouaghi. Algérie.
- 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.
- Atmani N et Masmoudi M. 2008.** Etude de l'impact de *Bacillus thuringiensis Kurstaki* dans la lutte de la chenille processionnaire du Pin d'Alep "*Thaumetopoea pityocampa Schiff*" au niveau de la forêt domaniale de Beni Oudjana (khenchela), mémoire d'ingénieur d'état en écologie végétale et environnement, uni-batna, 47p.
- Bacon C. W., Porter J. K., Robbins J. D. and Luttrell E. S. 1977.** *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* (34): 576-581.
- Bayman, P. 2007.** Fungal Endophytes in the Environment in (Eds.) C.P. Kubicek and I. S. Druzhinina. *Environmental and Microbial Relationships*, 2nd Edition The Mycota IV. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 213-224.
- Bensaci.O.A. 2016.** Diversité et bioprospection des mycobiantes endophytes associées aux phytotaxons caractéristiques des massifs de Belezma et des Aures. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques, université Batna 1, Algérie.
- Bentouati A. 2006.** Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) du massif de Ouled Yagoub (Khenchla-Aurès). Thèse Doctorat, Univ. Batna, 115p.
- Bisen P.S. 1983.** Production of toxin metabolites by *Curvularia lunata* and its role in leaf spot disease of bean. *Acta Bot., Indica*. (11) :235-238.
- Boudy P. 1955.** Economie forestière nord-africaine. Tome 4 : Description forestière de l'Algérie et de la Tunisie. Larose, Paris, 483 p.

- Bouguenna S. 2011.** Diagnostic écologique, mise en valeur et conservation des pineraies de (*Pinus halepensis* Miller) de la région de Djerma (Nord-est du parc national de Belezma, Batna). Thèse magister. P 31.
- Boutchiche F et Boutrigu S .2016.** Caractérisation morpho métrique de la chenille processionnaire (*Thaumetopoea pityocampa*) et de son hôte au niveau de la wilaya de Tlemcen. Mém, master en génétique, univ. Tlemcen, 79 p.
- Brochiero F., Chandioix O., Ripert C., Vennetier M. 1999.** Autécologie et croissance du pin d'Alep en Provence calcaire. Forêt méditerranéenne, 20(2):215-224.
- Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. 2002**
. Cahier de formation BIOFORMA n° 25. les moisissures d'intérêt médical. Paris.
- Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Dai Y. and Wang X. 2009.** Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. Current Microbiology (59): 584-592.
- Calamassi R., Falusi M., Tocci A. 1984.** Effet de la température et de la stratification sur la germination des semences de *Pinus halepensis* Mill. Silvae genetica, 33 (4-5): 133-139.
- Cheplick, G. P. Faeth, S H., 2009.** Ecology and evolution of the grass-endophyte symbiosis. ed by Oxford University Press, Inc. New York, 252pp
- Clay K. and Schardl C. 2002.** Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. American Naturalist (160): S99-S127.
- Claydon N., Grove J. F. and Pople M. 1985.** Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. Phytochemistry (24): 937-943.
- Crous, P. W., O. Petrini, G. F. Marais, Z. A. Pretorius, and F. Rehder. 1995.** Occurrence of fungal endophytes in cultivars of *Triticum aestivum* in South Africa. *Mycoscience* (36):105-111.
- Deacon J. 2006.** Fungal biology. 4ème édition. Blackwell Publishing. London. pp. 371.
- 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.
- De Bary A. 1866.** Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten.
- De Hoog G.S., Guarro J. 1995.** Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Pays-Bas
- Dufresne P. 2014.** Identification des champignons d'importance médicale. Institut national de santé publique. Québec. Guy St-Germain.
- Dufresne P. 2018.** Identification des champignons d'importance médicale. Institut national de santé publique. Québec. Guy St-Germain.
- Dyal S.D., Narine S.S. 2005.** Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. Food Res. Int. (38): 445-467.
- Eroshin V.K., Dedyukhina E.G. 2002.** Effect of lipids from *Mortierella hygrophila* on plant resistance to phytopathogens. World J. Microbiol. Biotechnol. (18): 16-167.

- Eroshin V.K., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Zhelifonova V.P., Kurtzman C.P., Bothast R.J. 1996.** Arachidonic-acid production by species of *Mortierella*. *World J. Microb. Biotechnol.* (12): 91-96.
- 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. 1990.** A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England (UK) and Switzerland. *Mycol Res* (94): 313-319.
- Fisher, P.J. and Petrini, O. 1992.** Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: a preliminary study. *Mycological Research*, 89:246-249.
- Ganley R. J. and Newcombe G. 2006.** Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* (110): 318-327.
- Goldring L. 2007.** *Curvularia* blight on *Lolium perenne* on turfgrasses in Argentina. *Plant Dis* (91): 323(abstract).
- Gundel P. E., Maseda P. H., Vila-Aiub M. M., Ghersa C. M. and Bencech-Arnold R. 2006.** Effects of *Neotyphodium* fungi on *Lolium multiflorum* seed germination in relation to water availability. *Annals of Botany* (97): 571-577.
- Haffane M. 1982.** Contribution à l'étude du comportement de *Pinus halepensis* dans les reboisements de Zoumi Mokrisat. Mémoire 3 cycle, I.A.V. Hassan II, Rabat.
- 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.
- Hoffmann K., Pawłowska J., Walther G., Wrzosek M., de Hoog G.S., Benny G.L., Kirk P.M., Voigt K. 2013.** The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia* (30): 57–76.
- Hyde K. D. and Soyong K. 2008.** The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* (33): 163-173.
- Kadik B. 1987.** Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) En Algérie: Ecologie, dendrométrie, morphologie. Ed. OPU. Alger., 581p.
- Karaffa L, Sandor E, Fekete E, Szentirmai A. 2001.** The biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 48(3-4):429-40.
- Kim H. Y., Choi G. J., Lee H. B., Lee S. W., Kim H. K., Jang K. S., Son S. W., Lee S. O., Cho K.Y., Sung N.D. and Kim J.C. 2007.** Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology* (44): 337.
- Kohn L. M. 2005.** Mechanisms of fungal speciation. *Annual Review of Phytology* (43): 1211- 1230.
- Ladjal S. 2012.** Activité antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de la région de Msila. Thème de magister. Université Ferhat Abbas – Sétif. Algérie.

- Lanier L., Joly P., Bondoux P. et Bellemère A. 1976.** Mycologie et Pathologie Forestière, Volume II: Pathologie forestière. Edition Masson. 478 pp.
- Lanier L., Joly P., Bondoux P. et Bellemère A. 1978.** Mycologie et Pathologie Forestière, Volume I : Mycologie forestière. Edition Masson. 487 pp.
- Lubertozzia D. and Keasling J.D. 2009.** Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances* (27): 53-75.
- Lv XC, Huang ZQ, Zhang W, Rao PF, Ni L. 2012.** Identification and characterization of filamentous fungi isolated from fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing. *J Gen Appl Microbiol.* 58(1):33-42
- Malinowski D.P., and Belesky D.P. 2000.** Adaptation of endophyte-infected coolseason grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Corp Science* (40): 923-940.
- Manamgoda D.S., Cai L., McKenzie E.H.C., Crous P.W et al. 2012.** A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56, 131–144.
- Manoharachary C., Sridhar K., Singh R., Adholeya A., Suryanarayana T. S., Rawat S. and Johri N. 2005.** Fungal biodiversity: Distribution, conservation and prospecting of fungi from India. *Current Science* (89): 58-71.
- Mezerai D.J. 2014.** Ecologie du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) dans la région du Tlemcen, mémoire, master en biologie, univ. Tlemcen, 85 p.
- Monterio F.T., Vieira B.S., Barreto R.B. 2003.** *Curvularia Lunata* and *Phyllachora sp.*: two fungal pathogens of the grassy weed *Hymenachne amplexicaulis* from Brazil. *Australasian Plant Pathol*, (32): 449-453.
- Nagraja T.G. and Devkar P.G. 2010.** Seasonal occurrence of endophytic mycoflora of inner bark of medicinal plant *Acacia catechu* willd. *The Bioscan* (5): pp 243-245.
- Nahal I. 1962.** Le pin d'Alep. Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. *Annales de l'école Nationale des Eaux et Forêts* 19 (4) : 533-627.
- Nicault I A. Rathgeber C. Tessier L et Thomas A. 2001.** Croissance radiale et densité du bois du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en relation avec les facteurs climatiques. Analyse in situ de la mise en place du cerne. *Annals of Forest Sciences* (58): 769-784p.
- Obledo E.N., Barragan-Barragan L.B., Gutierrez-Gonzalez P., Ramirez-Hernandez B.C., Ramirez J.J. and Rodriguez-Garay B. 2003.** Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (74): 237-241.
- Packer A 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. 1980.** Monograph of *Pinus halepensis* Mill. And *Pinus brutia* Ten., *Annales Forestales*, vol. 9, no 2, pp. 39-77, Zagreb.

- Pratt R.G. 2006.** Frequency and pathogenicity of dematiaceous hyphomycetes on annual ryegrass overseeded on bermudagrass in Mississippi. *Plant Dis*, (90):1085-1090.
- Praveena R., Naseema A. 2004.** Fungi occurring on water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Kerala. *J. Tropical Agric*, (92): 24-33.
- Petrini O. 1991.** Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews J. et Hirano S. (eds.) *Microbial Ecology of Leaves*. Springer Verlag. pp 179-197.
- Quezel P., 1974.** Les forêts du pourtour méditerranéen. Notes tech. M.A.B.2, U.N.E.S.C.O.Paris:9-34.
- Quezel P. 1986.** Les pins du groupe « *halepensis* ». *Ecologie, végétation, Ecophysiologie*. CIHEAM-Option méditerranéenne, 86 (1): 11-23.
- Quezel P. 2000.** Taxonomy and biogeography of Mediterranean pines (*Pinus halepensis* and *Pinus brutia*). In: *Ecology, Biogeography and Management of Pinus halepensis and P. Brutia Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin*. Eds., Néeman G., Trabauds L., Backhuys Publishers, Leiden, pp. 1-12.
- Quezel P., Barbero M. 1992.** Le pin d'Alep et les essences voisines: répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France méditerranéenne. *Forêt méditerranéenne*, 8(3):158-170.
- Quezel P., Médail F., 2003.** *Écologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Eds. scientifiques et médicales, Elsevier SAS. Paris, pp.28-125.
- Ramade F. 2008.** *Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité*. © Dunod, Paris, ISBN 978-2-10-053670-2. 465pp.
- Redman R.S., Sheehan K.B., Stout R.G., Rodriguez R.J. and Henson J.M. 2002.** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* (298): 1581.
- Rezende, S.R.F. ; Curvello, F.A.; Fraga, M.E. ; Reis, R.C.S. ; Castilho, A.M.C.; Agostinho T.S.P. 2009.** Control of the *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) with entomopathogenic fungi. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 11 :121-127
- Riedell W.E., Kijieckhefer R.W., Haley S.D., Langham M.A.C. and Evenson P.D. 1999.** Winter wheat responses to bird cherry oat aphids and barley yellow dwarf virus infection. *Crop Science* (39): 158-163.
- Rodríguez-Salazar J., Suárez R., Caballero-Mellado J., Iturriaga G. 2009.** Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *FEMS Microbiol Lett* 296(1):52-9
- Roberts C.A., Benedict H.R., Hill N.S., Kjallenbach R.L. and Rottinghaus G.E. 2005.** Determination of ergot alkaloid content in tall fescue by near-infrared spectroscopy. *Crop Science* (45): 778-783.
- Rodrigous, T.T.M.S., Berbee M.L., Simmons E.G., Cardoso V.R., Reis A., Maffia L.A., Mizubuti ESG. 2010.** First report of *Aternaria tomatophila* and *A. grandis* causing early blight on tomato and potato in Brazil. *New Disease Report*. P: 22-28

- Ropars J, Cruaud C, Lacoste S, Dupont J. 2012.** A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int J Food Microbiol.* Apr 16;155(3):199-210.
- Saliba S. 2015.** Nouvelle approches biotechnologiques pour l'obtention d'alcaloïdes: culture in vitro de *Leucojum aestivum* L et isolement d'endopytes bactériens d'Amaryllidaceae. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.
- Saithong P., Panthavee W., Stonsaovapak S. and Congfa L. 2010.** Isolation and primary identification of endophytic fungi from *Cephalotaxus mannii* trees. *Maejo International Journal of Science and Technology* (4): 446-453.
- Schardl C. L., Leuchtmann A. and Spiering M. J. 2004.** Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* (55): 315-340.
- Schmid E. 1966.** Die Vegetation-Gürtel die Iberische Barbarische Gebirge, Ver. Geobot. Inst. Rübel, Zurich(31): 124-163.
- Schulz B. and Boyle C. 2005.** The endophytic continuum. *Mycological Research* (109): 661-686.
- Schulz, B. and Boyle C. 2006.** What are Endophytes? in *Soil Biology*, V9 Microbial Root Endophytes. B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 1-13
- Si Mohammed A. 2010.** Etude de la compatibilité végétative chez des populations de *Fusarium oxysporum* isolées dans l'ouest Algérien, thèse de Magister, Université d'Oran, Algérie, pp.32
- Sieber T.N. 2002.** Fungal root endophytes. In Waisel Y., Eshel A. et Kafkafi U. (Eds.) *Plant Roots: the hidden half*. Marcel Dekkert Inc. pp 887-917.
- Spiering M. J., Moon C. D., Wilkinson H. H. and Schardl C. L. 2005.** Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics* (169): 1403-1414.
- Stone JK, Bacon CW, White Jr JF, 2000.** An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: **Bacon C.W. White J.F.** (Eds), *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 3-29.
- Stone J. K, White J. F., Jr. and Polishook J. D. 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.
- Sudharshana T. N., Venkatesh H. N., Borah Nayana, K. Manjunath et Mohana D. C. 2018.** Anti-microbial and anti-mycotoxigenic activities of endophytic *Alternaria alternata* isolated from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: molecular characterisation and bioactive compound isolation *Mycology. An International Journal on Fungal Biology*. ISSN: 2150-1203 (Print): 2150-1211
- Taylor J.W., Spatafora J., O'Donnell K., Lutzoni F., James T., Hibbett D.S., Geiser D., Bruns T.D. et Blackwell M. 2004.** The fungi. In CRACRAFT J. et DONOGHUE M. J. (Eds.) *Assembling the Tree of Life*. Oxford University Press. pp 171-194.

Tsukamoto H., Tsuda M., Gohbara M., et al. 1998. Effect of water management on mycoherbicidal activity of *Exserohilum monoceras* against *Echinochloa oryzicola*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn (64): 526-531.

Venet J. 1986. Identification des outils et méthodes utilisées à Dynafor concernant la Dendrochronologie.

Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., von W. D., Franken P. and Kogel K. H. 2005.The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (102):13386-13391.

Wang L., Zhou H.B., Frisvad J.C. and Samson R.A. 2004. *Penicillium persicinum*, a new griseofulvin, chrysogine and roquefortine C producing species from Qinghai province, China. *Antonie van leeuwenhoek.* (86): 173-179.

Wang F.W., Jiao R. H., Cheng A. B., Tan S. H. and Song Y. C. 2007.Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (23): 79-83.

Webber J. 1981. A natural control of Dutch elm disease. *Nature, London* (292): 449-451.

Wilson D. 1995. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* (73): 274-276.

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 andmolecular probing. Thèse Philosophia Doctor (PhD.). University of New Brunswick (Canada).131 pp.

Zabalgoeazcoa I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* (6): 138-146.

Zhang W.M., Moody K., Watson A.K. 1996. Responses of *Echinochloa* species and rice (*Oryza sativa*) to indigenous pathogenic fungi. *Plant Dis* (80): 1053-1058.

Zhang Z.B., Burgos N.R., Zhang JP. et al. 2007. Biological control agent for rice weeds from protoplast fusion between *Curvularia lunata* and *Helminthosporium gramineum*.*Weed Sci*(55):599605.

Zaurov D. E., Bonos S., Murphy J. A., Richardson M. D. and Belanger F. C. 2001. Endophyte infection can contribute to aluminium tolerance in fine fescues. *Corp Science* (41): 1981-1984.

Zenzen W. 2016. Utilisation du S.I.G pour l'analyse de la structure de la forêt de Ouennougha dans la Wilaya de Bordj Bou Arréridj, mémoire, master en foresterie ,univ. Tlemcen, 60p.

Les liens :

1. <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/>
2. <https://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/mycologie/les+fiches+pratiques>

ANNEXES

ANNEXE. I**SABOURAUD SIMPLE**

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

POTATO DEXTROSE AGAR (PDA) + GENTAMYCINE

Pomme de terre épluchées et coupées.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH : 5.6	
Gentamycine.....	100 mg /L

EXAMEN MICROSCOPIQUE**LIQUIDES DE MONTAGE : BLEU DE COTON**

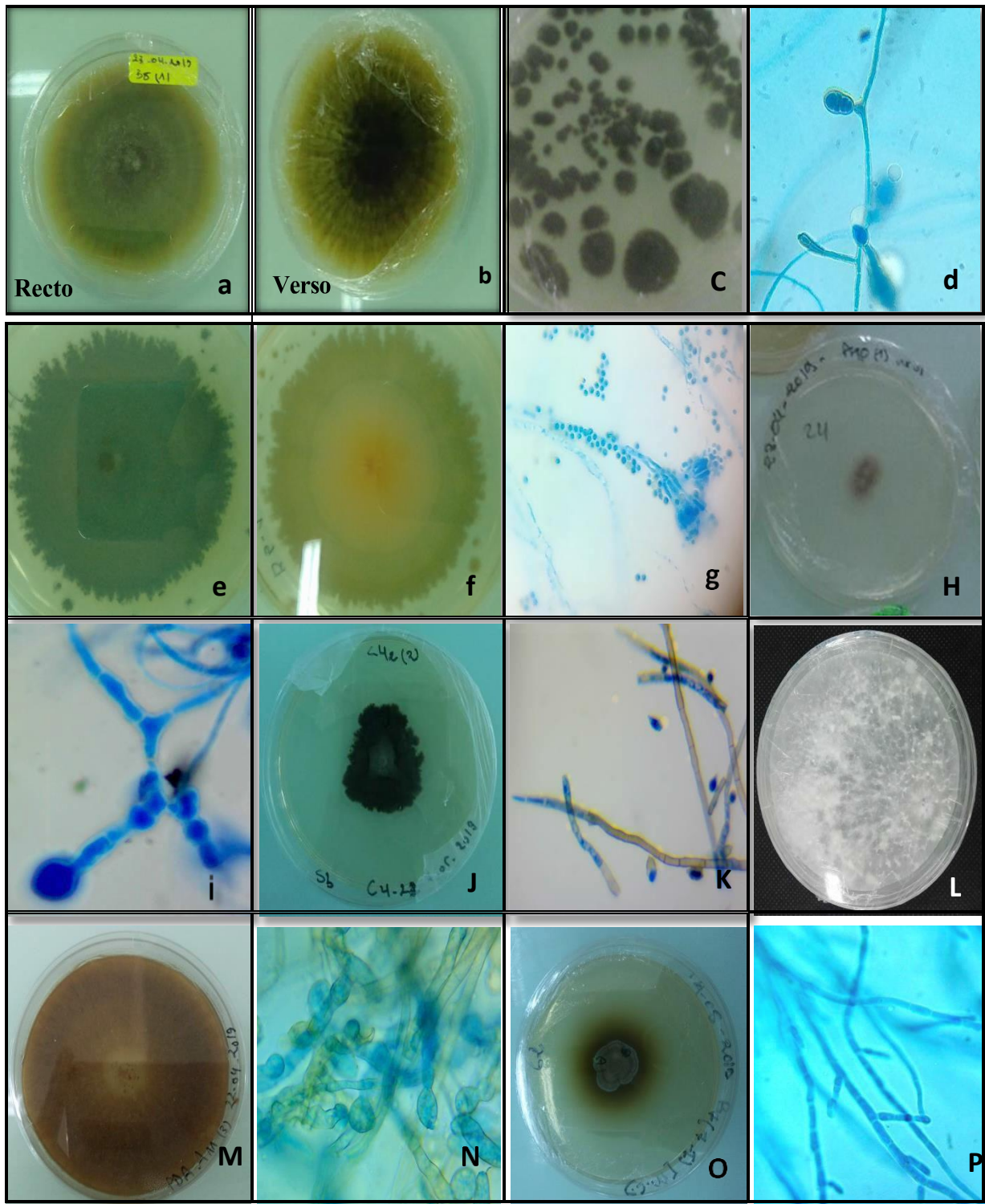
Eau distillée.....	20 ml
Acide lactique.....	20 ml
phénol (cristaux).....	20 g
bleu d'aniline (bleu de coton).....	0,05 g
glycérol.....	40 ml

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 : Festuca, Anemone, Crataegus, Glechoma, Potentilla, Salix, Sorbus, Teucrium, Vaccinium	Schulz <i>et al.</i> , 1993
Ethanol 96%, 1 min; NaOCl, 10% Cl, 5 min; éthanol 96%, 30s	Feuilles de Crataegus, Glechoma, Potentilla et de Salix	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 Muller, 1979
Éthanol 99%, 1 min; NaOCl, 8.7% Cl, 5-120 min; éthanol 99%, 30s	Jeunes pousses de Castanea	Bissegger et Sieber, 1994
Éthanol 96%, 1 min; NaOCl 3% Cl, 10 min; éthanol 70%, 30 s	Feuilles de Sequoia	Espinosa-Garcia et Langenheim, 1990
Ethanol 96%, 30 s; NaOCl 2.5% Cl, 1-3 min; ethanol 96%, 30s	Feuilles de lichenes, mousses, fougères, Arctostaphylos.	Petrini,1986; Widler et Muller,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 Crataegus, Glechoma, Salix e Sorbus	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 Quercus	Carroll,1978 ; Halmshlager <i>et al.</i> ,1993
Ethanol 75-96 %, 30 s, rinçage à l'eau distillée stérilisée	Brindilles de Ulex Brindilles de Pinus et Fagus Brindilles de Salix et Quercus Feuilles de Quercus Rameaux de Abies et Picea Racines de Acer, Betula et Picea Feuilles et brindilles de Fagus Aiguilles de Pinus Branches de base de Abies, Larix, Picea, Pinus, Acer, Alnus, Betula, Carpinus, Fagus, Fraxinus et Quercus	Fisher <i>et al.</i> , 1986; Petrini et Fisher,1990; Sieber,1989; Helander <i>et al.</i> , 1994; Kowalski et Kehr,1992; Pfohl et Butin,1994
Ethanol 99%, 1 min; H ₂ O ₂ 15%, 15 min; éthanol 70%, 1 min; eau distillée stérilisée, 2 rinçages	Racines de Abies, Fagus, Picea et Pinus, aiguilles de Pinus	Ahlich et Sieber,1996; Hata et Futai,1995

ANNEXE. III



Des mycotaxons endophytes isolés à partir des aiguilles de pin d'Alep:
 (a, b): Souche N°51; (c, d) : Souche N°67; (e, f, g): Souche N°74 : *Penicillium sp* ; (H, i) :
 Souche N°24 ; (J, K): Souche N°40 ; (L): Souche N°:14 ; (M, N): Souche N°21; (O, P) :
 Souche N°62

ملخص:

الفطريات الداخلية هي كائنات دقيقة قادرة على استعمار جميع الأجزاء السليمة من النبات. أجريت هذه الدراسة الحالية لغرض البحث عن الفطريات الداخلية من خلال إبر الصنوبر الحلبي (*Pinus halepensis* Mill.) ، بهدف تمييز العلاقة التعايشية بين الفطريات الداخلية و النباتات ؛ حيث تعد الفطريات الداخلية مصادر ممتازة للمنتجات الطبيعية النشطة بيولوجيًا مع إمكانية استغلالها في مجموعة واسعة من المجالات الطبية والصناعية والزراعية.

الاستعمار الداخلي للنمط الفطري للصنوبر الحلبي ، سمح بعزل وتنقية 46 فطر داخلي، تم التعرف على 37 شكلياً والتي ينتمي 07 أجناس: *Penicillium* ، *Aspergillus* ، *Cladosporium* ، *Alternaria* ، *Curvularia* ، *Rhizopus* ، *Mortierella* ، والتي تنتمي معظمها إلى *Deutéromycètes* حيث تتميز الأغلبية بالوضع اللاجنسي والذي يؤدي الى تكوين غطاء "ايكوفيزيولوجية" من جانب المضيف باعتباره مكاناً بيئيًا دائمًا للشريك الفطري.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية ، *Pinus halepensis* ، التعايش ، *Deutéromycètes*.

Résumé:

Les champignons endophytes sont des micro-organismes capables de coloniser toutes les parties saines de la plante. La présente étude a été effectuée dans le but de la recherche des mycoendophytes à partir des aiguilles du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.), dont l'objectif est de caractériser la relation symbiotique mycoendophytes/Plantes; où les mycoendophytes sont d'excellentes sources de nouveaux produits naturels bioactifs avec un potentiel d'exploitation dans une grande variété de domaines médicaux, industriels, et agricoles.

La colonisation endophyte de la trame mycoflore du pin d'Alep, montrée l'isolement et la purification des 46 mycoendophytes; 37 mycotaxons sont identifiés morphologiquement représentant 07 genres: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Rhizopus*, *Mortierella*. Dont la plupart des mycotaxons appartiennent aux *Deutéromycètes* où la prédominance d'un mode asexué implique une couverture « écophysiological » de la part de l'hôte comme étant une niche écologique permanente pour le partenaire fongique.

Les mots clés: Mycoendophytes, *Pinus halepensis*, Relation symbiotique, *Deutéromycètes*.

Abstract:

Endophytic fungi are micro-organisms capable of colonizing all healthy parts of the plant. The present study was conducted for the purpose of mycoendophyte research from the needles of the Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.), The purpose of which is to characterize the symbiotic mycoendophytes / Plants relationship; where mycoendophytes are excellent sources of new bioactive natural products with potential for exploitation in a wide variety of medical, industrial, and agricultural fields.

Endophytic colonization of the mycofloral pattern of Aleppo pine, showed isolation and purification of 46 mycoendophytes; 37 mycotaxons are identified representing 07 genera : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Rhizopus*, *Mortierella*. Most of the mycotaxons belong to *Deuteromycetes* where the predominance of the asexual mode implies an "ecophysiological" coverage on the part of the host as being a permanent ecological niche for the fungal partner.

Key words: Mycoendophytes, *Pinus halepensis*, the symbiotic relationship ,*Deuteromycetes*.