

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE VIE

DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

Thème

Etude des champignons endophytes halotolérants et producteurs de métabolites secondaires

Mastère

Spécialité : Protection des végétaux

Option : Phytopathologie

Réalisée par :

DERKAOUI Imane

Devant le jury composé de :

BERRADHIR M.S	M.C.A	U.S.D.B	Présidente
BERRAF A.	M.C.D	U.S.D.B	Examinatrice
AIT SAADI N.	M.A.A	U.S.D.B	Examinatrice
MOHAMED MAHMOUD F.	M.A.A	U.S.D.B	Promotrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2014/2015

*Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à
Professeur KRIMI Zoulikha d'avoir m'accepter dans son laboratoire
de phytopathologie et surtout pour les conseils qui mon aidées
pendant tous mon chemin.*

*Madame MOHAMED MAHMOUD Fadhéla enseignante à
l'université SAAD DAHLEB de Blida qui est à l'origine de ce sujet. Ses
idées et ses conseils ont été essentiels et enrichissants pour
l'aboutissement de ce modeste mémoire.*

*Aux examinatrices qui ont assisté à ma soutenance pour valoriser se
travail.*

*Aux mes meilleures copines HADOUCHE Rabéaa
et ABD ALLAH Imane d'avoir m'aider et étaient toujours avec moi le
long du chemin.*

*J'adresse mes remerciements aux enseignants, administrateurs,
responsables et au personnel du département de Biotechnologie de la
faculté des sciences naturelles et vie (SNV), à tous ceux qui ont
contribués à ma formation de prés ou de loin pendant ces dernières
années, et à tous mes collègues qui m'ont accompagné et soutenu de
l'option de Phytopathologie.*

Afin d'être reconnaissant envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

À mes chers parents Fatiha et Abd El Kader qu'ils étaient toujours avec moi ; l'exemple du courage et de patience, merci d'illuminer ma vie avec votre présence.

À ma très chère sœur Fahima et à mon très cher frère Lotfi qui n'ont cessé de me combler par leur amour et leur tendresse.

À mon très cher Abd El Hakim pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts, surtout ton aimable présence devant moi

A ma très chère cousine Zahra ma deuxième sœur ; le bon dieu te garde pour moi mon ange. Je te souhaite la bonne réussite dans ta vie avec Aymen

À tous les membres de ma famille sans aucune exception.

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	4
I.1. Présentation du palmier dattier.....	5
I.2. Microorganismes promoteurs de la croissance des plantes (PGPM).....	9
I.2.1. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).....	10
I.2.2. Les PGPF ou champignons bénéfiques.....	11
I.2.3. Les endophytes.....	12
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES.....	18
II.1. Matériel biologique.....	29
II.2. Méthodes.....	30
CHAPITRE III: RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....	24
III.1. Production des métabolites secondaires <i>in vitro</i> par les isolats fongiques endophytes.	40
III.2. Analyse statistique.....	48
III.2.2. Différence entre les isolats fongiques producteurs et non producteurs des métabolites secondaires.....	52
III.3. Tolérance à la salinité.....	55
CHAPITRE IV: DISCUSSION.....	58
CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....	63
ANNEXE 1	
ANNEXE 2	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Les palmiers dattiers « <i>Phoenix dactylifera</i> ».....	06
Figures 2 : Inflorescences femelles de palmier-dattier.....	07
Figures 3 : Inflorescences mâles du palmier-dattier.....	08
Figure 4 : Interaction entre la plante et les champignons endophytes.....	15
Figure 5 : Schéma comparatif entre la relation plante-endophyte et plante-pathogène.....	16
Figure 6 : Fonctions et odeurs des composés volatiles produites par des champignons.....	24
Figure 7 : La tolérance des microorganismes aux concentrations de sels (NaCl).....	28
Figure 8 : Mycètes endophytes utilisés.....	31, 32,33
Figure 9 : Les étapes de la cyanogénèse.....	35
Figure 10: Les étapes de la phosphatase.....	36
Figure 11: Les étapes de la pectinase.....	37
Figure 12 : Les étapes de la salinité.....	39
Figure 13 : Production d'AIA par les isolats fongiques.....	41
Figure 14 : Production d'HCN par les isolats fongiques.....	42
Figure 15 : La solubilisation du phosphore bi-calcique par les isolats fongiques.....	44
Figure 16 : Les isolats fongiques ne produisent pas la pectine.....	45
Figure 17: Production de protéase par les isolats fongiques.....	46
Figure 18 : Classification ascendante hiérarchique des différents isolats fongiques.....	49
Figure 19: Classification ascendante hiérarchique des différents isolats fongiques répartis en quatre groupes.....	50
Figure 20 : Analyse en Composante Principale (ACP) des isolats fongiques testés.....	51
Figure 21 : Taux de production de l'acide indole acétique.....	52
Figure 22 : Taux de production de l'acide cyanhydrique.....	53
Figure 23 : Taux de production de la phosphatase.....	53

Figure 24 : Taux de production de pectinase.....	54
Figure 25 : Taux de production de protéase.....	54
Figure 26 : Croissance des mycètes dans la concentration [15] et [75] de NaC.....	56

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1: Classification du palmier dattier.....	05
Tableau2: Quelques métabolites secondaires bioactifs isolés à partir des champignons endophytes.....	19
Tableau 3 : Champignons endophytes utilisés	30
Tableau 4 : Production des métabolites secondaires.....	47
Tableau 5 : Croissance des isolats fongiques dans le milieu PDA additionne de 15g et de 75g de chlorure de sodium	57

Liste des abréviations

AIA : Acide Indole-3-Acétique

COVs: Composés Organique Volatile

HCN : Acide Cyanhydrique

LBT: Milieu solide de Luria-Bertani enrichi avec du tryptophane

M9 : Milieu minimum

MEA: Malt Extract Agar.

MPSs : Micro-organismes solubilisant les phosphates.

PDA: Potato Dextrose Agar

PGPF: Plant Growth Promoting Fungi

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PGPY: Growth-Promoting Yeasts

PVK: Milieu de Pikovskaya

Table des matières

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Remerciements	
Dédicace	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Sommaire	
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	4
I.1. Présentation du palmier dattier.....	5
I. 1. 1. Les différentes espèces du genre Phoenix L.....	5
I. 1. 2. Systématique du palmier dattier.....	5
I. 2. 3. Présentation biologique.....	6
I. 2. 3. 1. Structure générale d'un palmier dattier.....	6
I. 2. 3. 2. Organes floraux.....	6
I. 2. 3. 2. 1. L'inflorescence femelle.....	7
I. 2. 3. 2. 2. L'inflorescence mâle.....	7
I. 2. 3. 3. Le fruit.....	8
I. 2. 3. 4. Les feuilles ou palmes de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	8
I. 2. 3. 5. Le tronc ou stipe de <i>Phoenix dactylifera</i>	9
I. 2. 3. 6. Le système racinaire.....	9
I.2. Microorganismes promoteurs de la croissance des plantes (PGPM).....	9
I.2.1. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR).....	10
I.2.2. Les PGPF ou champignons bénéfiques.....	11

I.2.3. Les endophytes.....	12
I.2.3.1. Diversité des champignons endophytes.....	4
I.2.3.2. Mode de transmission et de reproduction.....	5
I.2.3.3. Interactions plantes-endophytes.....	5
I.2.3.4. Les champignons endophytes et les métabolites secondaires.....	8
I.2.3.5. Effet bénéfique des champignons endophytes.....	10
I.2.3.5.1. Stimulation directe de la croissance des plantes.....	10
✚ Changement de la physiologie de la plante.....	10
✚ Bio-fertilisation.....	10
➤ Fixateurs d'Azote (N).....	11
➤ Solubilisation du phosphore(P).....	12
I.2.3.5.2. Stimulation indirecte de la croissance des plantes.....	13
✚ Production des phytohormones.....	13
✚ Production des composés organiques volatiles.....	13
✚ Production des enzymes.....	15
I.2.3.5.3. Adaptation des plantes aux stress abiotiques.....	15
✚ Stress hydrique et thermique.....	15
✚ Stress salin.....	16
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES.....	18
II.1. Matériel biologique.....	29
II.1.1. Isolats fongiques endophytes utilisés.....	29
II.2. Méthodes.....	30
II.2.1. Purification des isolats.....	30
II.2.2. Production des métabolites secondaires.....	34
II.2.2.1. Estimation de la production de l'acide indole acétique (AIA).....	34

II.2.2.2. Production de substances volatiles (HCN).....	34
II.2.2.3. Production d'enzymes.....	36
II.2.2.3.1. Phosphatase.....	36
II.2.2.3.2. Pectinase.....	37
II.2.2.3.3. Protéase.....	38
II.2.2.4. Tolérance à la salinité.....	38
II.2.2.5. Analyses statistiques des résultats.....	39
CHAPITRE III: RESULTATS ET INTERPRETATIONS.....	40
III.1. Production des métabolites secondaires <i>in vitro</i> par les isolats fongiques endophytes.	40
III.1.1. Production de l'acide indole acétique (AIA).....	40
III.1.2. Production de l'acide cyanhydrique (HCN).....	40
III.1.3. Production des enzymes.....	42
III.1.3.1. Production des phosphatases.....	43
III.1.3.2. Production des pectinases.....	43
III.1.3.3. Production des protéases.....	45
III.2. Analyse statistique.....	48
III.2.1. Effet des métabolites secondaires sur les isolats fongiques.....	48
III.2.1.1. Classification Ascendante Hiérarchique des quinze isolats fongiques (CAH).....	48
III.2.2. Différence entre les isolats fongiques producteurs et non producteurs des métabolites secondaires.....	52
III.3. Tolérance à la salinité.....	55
CHAPITRE IV: DISCUSSION.....	58
CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....	63

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE 1

ANNEXE 2

Résumé

Le palmier-dattier (*Phoenix dactylifera L.*, la famille des ARECACEAE) est une plante introduite en Algérie pendant la période coloniale. C'est une monocotylédone subtropicale largement cultivée dans les zones arides pour ses multiples usages. L'étude a été réalisée pour mieux comprendre l'importance de cette filière agricole et l'utilisation dans la région d'Adrar (Sud-ouest) et pour développer les méthodes de lutte biologique contre les agents phytopathogènes du palmier dattier.

L'étude *in vitro* de la production de quelques métabolites secondaires ainsi que la tolérance au sel de quinze isolats fongiques endophytes isolés à partir des racines de palmier dattier de la région d'Adrar en 2010 ; a révélé qu'ils produisent la protéase et ne produisent pas la pectinase. Seulement sept isolats ont produit l'acide-indole acétique (AIA) représentés par un taux de production de 46,67%, dix ont produit l'acide cyanhydrique (HCN) représentés par un taux de production de 66,67%, et sept ont solubilisé le phosphore (P) par un taux de 46,67%. Tout les isolats ont montré une tolérance aux différentes concentrations de sel ; 15 g/L et 75 g/L de NaCl ; ce qui nous a permis de les classer comme des champignons halophiles. Cette étude a abouti à la sélection de trois isolats du genre *Aspergillus* qui sont halophiles et produisent les métabolites testés (l'AIA, l'HCN, la phosphatase et la protéase).

Mot clés : *Phoenix dactylifera L.*, Champignons endophytes, métabolites secondaires, halophile, *In vitro*.

ملخص

النخيل (*Phoenix dactylifera L.*)، من عائلة (ARECACEAE) هو نبات أدخل إلى الجزائر خلال الفترة الاستعمارية. وهو أحادي الفلقة من المناطق شبه الاستوائية المزروعة على نطاق واسع في المناطق الجافة لأجل استخدامات متعددة. وقد أجريت الدراسة من أجل فهم أفضل لأهمية هذا القطاع الفلاحي واستخداماته في منطقة أدرار (جنوب غرب الجزائر) وتطوير أساليب مكافحة البيولوجية ضد المسببات لأمراض للنخيل.

كشفت دراسة أجريت في المختبر لإنتاج بعض المركبات الثانوية و التسامح للملح لخمس عشرة عزلات فطرية داخلية للنبات، المعزولة من جذور النخيل من منطقة أدرار في عام 2010، وكشفت أنها تنتج الأنزيم البروتيني ولا تنتج أنزيم البكتيناز. سبع عزلات فقط أنتجت حمض الخليك الإندول (AIA) الممثلة بنسبة 46.67% من الانتاج، أنتجت عشرة عزلات سيانيد الهيدروجين (HCN) ممثل بمعدل إنتاج 66.67%، وسبعة عزلات تذبّوب الفوسفور (P) بنسبة 46.67%. وأظهرت جميع العزلات التسامح لتركيزات مختلفة من الملح. 15 غرام / لتر، و 75 غرام / لتر من كلوريد الصوديوم. الأمر الذي سمح لنا بتصنيفهم كفطريات محبة للملوحة. أدت هذه الدراسة إلى اختيار ثلاث عزلات من **نوع** الرشاشيات التي تتحمل الملوحة والمنتجة لنواتج الأيض المختبرة (AIA ، HCN ، الأنزيم الفوسفاتي والأنزيم البروتيني).

الكلمات المفتاحية: *Phoenix dactylifera L.* ، فطريات داخلية نباتية، المركبات الثانوية، المحبة للملوحة ، دراسة مخبرية.

Abstract

The date palm (*Phoenix dactylifera* L., family of ARECACEAE) is a plant introduced in Algeria during the colonial period. It is a subtropical monocot widely cultivated in arid areas for its multiple uses. The study was conducted to better understand the importance of the agricultural sector and use it in Adrar region (south-west) to develop biological control methods against date palm pathogens.

The *in vitro* study of the production of some secondary metabolites and salt tolerance of fifteen endophytic fungal isolates isolated from the roots of date palm of the Adrar region in 2010; revealed that they produce protease and don't produce the pectinase. Only seven isolates produced indole-acetic acid (IAA) represented by a production rate of 46.67%, produced ten hydrogen cyanide (HCN) represented by a production rate of 66.67%, and seven solubilized phosphorus (P) by a rate of 46.67%. All isolates showed tolerance to different concentrations of salt; 15 g / L and 75 g / L NaCl; which allowed us to classify them as halophilic fungi. This study led to the selection of three isolates of *Aspergillus* genus that are salt-tolerant and produce metabolites tested (IAA HCN, phosphatase and protease).

Keyword: *Phoenix dactylifera* L., Endophytic fungi, secondary metabolites, halophilic, *In vitro*.

INTRODUCTION

Les micro-organismes ont un rôle essentiel dans l'agriculture pour favoriser l'échange des nutriments des plantes et pour réduire l'application des engrais chimiques autant que possible. Les bio-fertilisants microbiens sont essentiellement des champignons, bactéries et levures qui interagissent directement ou indirectement avec la plante. Avis *et al.*, (2008) ont proposé les termes PGPM (Plant Growth Promoting Microorganism) pour les microorganismes qui agissent sur la plante, et BCA (Bio Control Agent) pour ce qui agissent sur les agents pathogènes. En raison de leurs effets bénéfiques sur leurs plantes hôtes, ils suscitent un très grand intérêt en agriculture (Morgan *et al.*, 2005). En raison de leur nature, leur origine et leurs actions, plusieurs termes ont été avancés des dernières années afin de classer les PGPM plus précisément. Ainsi, les termes PGPF (Plant Growth Promoting Fungi), PGPY (Plant Growth Promoting Yeast) et PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) permettent de les différencier en fonction de leur nature (El Tarabily *et Sivasithamparam*, 2006).

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) peuvent exercer un effet positif menant à la croissance des plantes ainsi les champignons promoteurs de la croissance des plantes (PGPF) ; chez ces plantes, les PGPF peuvent être épiphytiques et/ou endophytiques (Selosse *et al.*, 2004). Les interactions bénéfiques plante-microorganisme dans la rhizosphère peuvent influencer la vigueur de la plante et la fertilité du sol. Ces effets bénéfiques des PGPF ont un effet direct ou indirect sur les plantes. La promotion de la croissance directe comprenant la production des métabolites secondaires qui augmente la croissance des plantes telle que les auxines, les cytokinines et les gibbérellines ; la production des enzymes qui solubilisent les minerais comme le phosphate. La promotion de la croissance indirecte se fait par l'élimination des agents pathogènes à travers la production des métabolites secondaires tels que le cyanure d'hydrogène et les sidérophores (Idris *et al.*, 2010).

Ces micro-organismes du sol sont isolés à partir des plantes ; le plus souvent sans provoquer de symptômes apparents de diverses espèces. Leur association avec les plantes sont connues pour améliorer l'absorption des éléments nutritifs, la croissance des plantes et leur vigueur en produisant des hormones végétales (Ting *et al.*, 2008). La colonisation de la

rhizosphère par quelques micro-organismes non pathogènes peut protéger le plant d'une variété de maladies bactériennes, virales et cryptogamiques. Ce phénomène est connu sous le nom de résistance systémique et conférer potentiellement une résistance contre les maladies des plantes et contre l'infection par des microorganismes pathogène (Ting *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont révélé l'omniprésence de ces champignons, avec une estimation d'au moins 1 million d'espèces de champignons endophytes résidant dans les plantes et même les lichens. Les champignons endophytes représentent un élément important de la biodiversité quantifiable fongique, et sont connus pour affecter la diversité de la communauté végétale et sa structure (Krings *et al.*, 2007). Seulement environ 80.000-100.000 espèces de champignons ont été décrites, sur une estimation prudente de 1, 5 millions d'euros. Des études sur les champignons endophytes des forêts tempérées et tropicales prouve des estimations élevées de la diversité des espèces. Ces estimations ne tiennent pas en compte plusieurs sources complémentaires de la diversité fongique (Ganley et Newcomb, 2006).

Une variété de relations existe entre les champignons endophytes et leurs plantes hôtes, allant de mutualisme ou de symbiose vers l'antagonisme ou la latence. En raison de ce qui semble être leur contribution à la plante hôte, les endophytes peuvent produire une pléthore de substances bioactives d'utilisation potentiel dans la médecine moderne, l'agriculture et l'industrie, comme ; les nouveaux antibiotiques, les anti-mycoses, les immunosuppresseurs, et les composés anticancéreux (Mitchell *et al.*, 2008). Il ya un grand potentiel pour trouver de nouveaux médicaments à partir des endophytes pour le traitement de nouvelles maladies chez les humains et les animaux (Kumar *et al.*, 2005).

Les sols salins et les irrigations salines constituent un problème sérieux de production pour des récoltes pendant que des conditions salines sont connues pour supprimer la croissance des plantes. On le pense que l'effet répressif de la salinité sur la germination et la croissance des plantes pourrait être lié à un abaissement dans les niveaux endogènes des hormones de croissance des plantes ou des phytohormones. On suggère également que les bactéries colonisant les racines qui produisent des phytohormones qui favorisent leur développement et peuvent agir en tant qu'un mécanisme pour la stimulation de la croissance des plantes et ces organisations peuvent empêcher les effets délétères des efforts de l'environnement (Frankenberger et Arshad 1995).

La présente étude a pour objectif la sélection des souches endophytes fongiques isolées à partir du palmier dattier de la région d'Adrar, à travers une étude réalisée *in vitro* par la production de quelques métabolites secondaires ; l'acide indole acétique (AIA) et l'acide cyanhydrique (HCN), par la production de quelques enzymes (la phosphatase, la protéase et la pectinase) et leurs tolérance au stress salin.

Chapitre I : Données bibliographiques

Afin de pallier à l'utilisation abusive des traitements chimiques, de nouvelles approches pour la protection des cultures ont été envisagées par la prise en compte des interactions existantes entre les microorganismes naturellement présents dans le sol et la plante hôte. Ainsi, de nombreux produits à base de champignons microscopiques ont vu le jour. Cependant il faut noter que même si certains de ces produits sont bien enregistrés comme bio-pesticides dans les pays comme la Nouvelle Zélande, Israël, l'Inde ou les USA, la réglementation européenne et notamment française est difficilement abordable étant donné le coût et les délais d'une telle démarche ; cette dernière étant plus drastique que celle concernant l'homologation des molécules chimiques (Anonyme, 2007).

L'agriculture biologique est un système de production respectueux de l'environnement, ce qui évite largement l'utilisation des composés synthétiques (les engrais) et de maintenir la santé des écosystèmes et des êtres humains (Lind et *al.*, 2003). L'utilisation des bio-fertilisants y compris les micro-organismes bénéfiques comme une alternative de composés synthétiques sont connus pour augmenter la croissance des plantes via les nutriments aux végétaux et même à maintenir la santé et la productivité des sols (O'Connell, 1992). Les rôles naturelles des microorganismes de la rhizosphère dans le maintien de la fertilité des sols, améliorer la croissance et la santé des végétaux susciter l'intérêt de recherche considérable. Un nombre considérable des espèces fongiques et bactériennes sont associées à la rhizosphère de la plante et à l'intérieur de cette dernière, qui ont été testées et se sont avérées avoir des effets bénéfiques sur la croissance des plantes, le rendement ainsi la qualité des produits (Khalid et *al.*, 2004 ; Egamberdiyeva 2007) sur plusieurs filières agricoles ; parmi eux la phoeniculture.

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) appartient à la famille des Arecaceae, il est cultivé pour la production de fruits (dattes) et aussi pour sa valeur ornementale. C'est une plante d'intérêt écologique, économique et social pour de nombreux pays des zones arides. Son adaptation aux conditions climatiques sévères et son aspect morphologique permettent le

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

développement des cultures sous-jacentes (céréalières, maraîchères, fruitières, fourragères) et le maintien des paysages oasiens.

Actuellement les zones oasiennes sont particulièrement menacées par une surexploitation anthropique des ressources en eau et en sols. De plus ces écosystèmes fragiles sont aussi touchés par les changements climatiques, la diminution des précipitations, en particulier, entraîne la salinisation des sols (Memadji-le-allah, 2011).

I.1. Présentation du palmier dattier :

I. 1. 1. Les différentes espèces du genre *Phoenix* L.

Le genre *Phoenix* comporterait 12 espèces d'après Auguste Chevalier (1952): *Phoenix dactylifera* L., *P. atlantica* A. Chev., *P. canariensis* Chabaud, *P. reclinata* Jacq., *P. sylvestris* Roxb., *P. humilis* Royle, *P. hanceana* Naudin, *P. roebelinii* O'Brien, *P. farintfera* Roxb., *P. rupicola* T. Anders, *P. acaulis* Roxb., *P. paludosa* Roxb.

I. 1. 2. Systématique du palmier dattier :

Son nom commun est « Palmier dattier » en français, « *Date palm* » en anglais et à Toliara «*Asenjy*». Sa classification botanique d'après Linné (1753) (Tableau 1). Ils existent de nombreuses variétés. Le nombre de variété est basé sur les caractères morphologiques (de fruit, feuille, graine et même du stipe) et les noms vernaculaires.

Tableau 1 : Classification du palmier dattier (Anonyme, 2012) :

Classification	
Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordre	Arecales
Famille	Arecaceae
Genre	Phoenix
Espèce	Dactylifera L., 1753

I. 2. 3. Présentation biologique :

I. 2. 3. 1. Structure générale d'un palmier dattier :

Phoenix dactylifera (Arecaceae) est une plante monocotylédone. C'est un grand palmier de 10 à 30 mètres (Ozenda, 1958) au tronc cylindrique (figure 1). Le stipe porte une couronne de feuilles (palmes). Les feuilles sont pennées finement divisées et longues de 4 à 7 mètres. Les inflorescences mâle et femelle appelées spadices sont enveloppées d'une très grande bractée membraneuse, la spathe (Sallon et *al.*, 2008). C'est le palmier le plus cultivé dans le monde avec le cocotier *Cocos nucifera*. Un palmier a une espérance de vie de 250 à 300 ans.

I. 2. 3. 2. Organes floraux :

Le palmier dattier étant dioïque, les fleurs mâles et femelles sont portées par des individus différents, il est nécessaire d'attendre 6 à 8 ans l'induction des premières floraisons pour connaître le sexe des plantes (Aberlenc-bertossi, 2012). La différenciation morphologique entre ces organes est extrêmement précoce puisque celle-ci est déjà marquée lorsque l'inflorescence ne mesure que 10 mm de longueur, avant même que n'intervienne la différenciation sexuelle des fleurs (Daher, 2010). La différence entre pieds mâles et femelles pourrait être remarquée morphologiquement.



Figure 1: Les palmiers dattiers « *Phoenix dactylifera* » (Bezato, 2013).

I. 2. 3. 2. 1. L'inflorescence femelle :

Les inflorescences femelles présentent une élongation marquée du pédoncule ainsi qu'une bilatéralisation. Les inflorescences et les épillets sont plus longs. Ceci est lié à leur position relative sur le rachis (Figures 2).



2a. Inflorescence femelle initiale



2b. Inflorescence femelle plus mûres

Figures 2 : Inflorescences femelles de palmier-dattier (Bezato, 2013).

I. 2. 3. 2. 2. L'inflorescence mâle :

L'inflorescence mâle a une forme conique (figures 3) et le nombre de méristèmes floraux est plus élevé sur les épillets. La longueur de ces derniers semble indépendante chez les mâles de la position relative sur le rachis (Zango, 2011).



3a. Inflorescence mâle (spadice) avec son spathe la protégeant



3b. Inflorescence mâle avec des fleurs plus ouvertes

Figures 3 : Inflorescences mâles du palmier-dattier (Bezato, 2013)

I. 2. 3. 3. Le fruit :

Le fruit ou datte est une baie contenant une seule graine improprement appelée noyau à cause de sa dureté. La datte comporte un mésocarpe charnu (pulpe) protégé par un fin péricarpe et un tégument interne blanc et fibreux, l'endocarpe directement appliqués sur la graine (Bouna, 2002). Ce fruit se présente en grappe ou régime (nombre de 4 à 10) de quatre au minimum sur un pied et dix au maximum.

I. 2. 3. 4. Les feuilles ou palmes de *Phoenix dactylifera L.* :

Les feuilles des jeunes plants issus des graines présentent un pétiole peu développé et un limbe entier. Ce type de feuille se forme durant les deux ou trois premières années qui suivent la germination des graines (feuilles primordiales). La première feuille formée est réduite à une gaine. C'est la gaine post-cotylédonaire. Les feuilles suivantes sont formées par un limbe vert entier de plus en plus grand et présentant des plis dont le nombre va de 3 à 8 selon l'âge et peut-être selon les cultivars. Le bourgeon terminal initie ensuite les feuilles définitives. Les jeunes palmes sont d'abord de grandes feuilles entières à nervation pennée, pliées sur elles mêmes; puis en se développant, le limbe se déchire aux plissements et chaque élément se

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

sépare pour former une feuille pseudo-composée ou palme. Les palmes sont disposées sur le tronc en hélice. Elles demeurent en activité pendant 4 à 7 ans; puis elles jaunissent, se dessèchent et meurent. Un palmier adulte peut produire de 20 à 30 palmes par an et porter 50 à 150 palmes actives (Munier, 1973 ; Djerbi, 1992).

I. 2. 3. 5. Le tronc ou stipe de *Phoenix dactylifera* L.

Le palmier dattier, en tant que Monocotylédones, ne s'accroît pas par genèse de tissus secondaires. Le tronc, perpétuellement en structure primaire quels que soient son âge et sa taille, est appelé stipe mais pas tronc comme la tige des Dicotylédones. Le stipe est généralement cylindrique sans ramification. Certains cultivars peuvent cependant avoir une forme tronconique. L'élongation du dattier se fait dans sa partie coronale par le bourgeon terminal ou phyllophore. La hauteur de l'arbre peut atteindre 10 à 30 m (Ozenda, 1958). Le tronc des jeunes palmiers est recouvert par les bases des pétioles des anciennes palmes mortes depuis 10-20 ans (Bouna, 2002).

I. 2. 3. 6. Le système racinaire :

Le système racinaire du dattier est de type fasciculé comme chez presque la totalité des monocotylédones. Les racines de premier ordre ne ramifient pas et n'ont relativement que peu de radicelle. Il y aurait quatre zones d'enracinement chez les palmiers dattiers (Munier, 1973). L'extension de ces quatre zones d'enracinement est fonction de la nature du sol, du mode de culture, de la profondeur de la nappe phréatique, de la variété cultivée et de l'origine de la plante (Bezato, 2013).

I.2. Microorganismes promoteurs de la croissance des plantes (PGPM) :

Les micro-organismes promoteurs de la croissance des plantes (PGPM) sont hétérogènes dans la nature comportant les bactéries, les mycètes et les actinomycètes et se retrouvent dans et autour de la rhizosphère. Les PGPMs augmentent la croissance des plantes soit directement ou indirectement (Hariprasad et *al.*, 2009). La promotion de la croissance des plantes directe est impliquée dans la solubilisation ou la mobilisation des éléments importants (phosphore, potassium, zinc, soufre, et fer) ou la fixation de l'azote atmosphérique dans le sol pris par les plantes. Ils sont également connus pour produire les hormones de croissance de diverses plantes comme : l'acide indole acétique, l'acide gibbérellique, les cytokinines et

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

l'éthylène (Arshad et Jr Frankenberger, 1993). Un micro-organisme promoteur de la croissance des plantes (PGPM) réduit également indirectement l'effet délétère des phytopathogènes.

Le mode d'action des PGPMs cependant n'est pas complètement exploré, les raisons possibles ont pu être :

- Production des régulateurs de la croissance des plantes,
- Fixation symbiotique et a-symbiotique de N₂,
- Activité antagonistique aux phytopathogènes par la production des sidérophores, antibiotiques (Shanahan, 1992) et HCN (Flaishman, 1996),
- Solubilisation des minéraux phosphatés et d'autres nutriments (Gaur, 1990),
- Compétition aux substrats,
- Production des chitinases,
- Production des cellulases, pectinases, protéases et l'hydrolyse de l'amidon,
- Sclérotés et mycoparasitisme.

En plus de ces traits, un PGPM effectif devrait être un compétent rhizospérique, faire face aux stressés biotiques et abiotiques et pour coloniser la rhizosphère (Cattelan, 1999). Il s'avère que les espèces de *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp, *Azospirillum* spp, *Rhizobium* spp, *Azotobacter* spp, *Klebsiella* spp et *Serratia* spp augmentent la croissance des plantes (Kloepper, 1989).

La rhizosphère est le centre de la dynamique microbienne et la richesse en éléments nutritifs, elle décrit la zone du sol entourant les racines des plantes qui libèrent des substances organiques. Les bactéries existantes dans la rhizosphère améliorent la croissance des plantes par différents mécanismes ; sont désignés rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) (Arnou et al., 1953).

I.2.1. Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) :

Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) colonisent rapidement la rhizosphère et suppriment les pathogènes telluriques à la surface des racines

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

(Rangajaran et *al.*, 2003). Ces organismes peuvent être également bénéfiques pour la plante en stimulant sa croissance (Bloemberg et Lugtenberg, 2001; Moeinzadeh et *al.*, 2010). Parmi ces organismes, les *Pseudomonas* spp. fluorescents sont considérées comme le groupe le plus prometteur des rhizobactéries impliqué dans la lutte biologique contre les maladies des plantes (Gardner et al, 1984; Moeinzadeh et *al.*, 2010). Parmi ces espèces bactériennes *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter* et *Bacillus* ont une efficacité élevée pour la colonisation des racines de l'hôte et dans l'augmentation de production des métabolites secondaires dans de nombreuses plantes ; sont connues pour coloniser la rhizosphère de la pomme de terre, du blé, de maïs, d'herbes, de petits pois et de concombre (Brown et Rovira 1976 ; Howie et Echandi, 1983 ; Khalid et *al.*, 2004).

Ils produisent des métabolites secondaires tels que les antibiotiques, les phytohormones (Keel et al., 1992), les composés volatils comme le cyanure d'hydrogène (HCN) et les sidérophores. Ces bactéries ont une grande capacité de stimuler la croissance des plante c'est principalement, en raison de la production de l'acide indole acétique (AIA) (Patten et Glick, 2002), sidérophores et des antibiotiques. Les PGPR les plus étudiés sont les genres d'*Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholdria*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Glumus* (Sturz and Nowak 2000 ; Sudhakar et *al.*, 2000; Glick et *al.*, 2007). Comme les PGPR, les PGPF (Plant Growth Promoting Fungi), représentés par les genres *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*,etc, ont été signalé comme étant bénéfique pour plusieurs plantes, non seulement par la promotion de leurs croissance, mais aussi en les protégeant contre les maladies (Hyakumachi, 1994 ; Koike et *al.*, 2001 et par Mouslim et *al.*, 2003 ; Shivanna et *al.*, 1996).

I.2.2. Les PGPF ou les champignons bénéfiques :

Des champignons bénéfiques ont été récemment appelés PGPF “ Plant Growth-Promoting Fungi” (Bent, 2006). Ils peuvent être des champignons filamenteux voire même des levures également appelées PGPY pour “Plant Growth-Promoting Yeasts”. Les PGPF peuvent être naturellement présents chez diverses plantes, aussi bien chez des plantes herbacées que des plantes ligneuses. Chez ces plantes, les PGPF peuvent être épiphytiques et /

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

ou endophytiques. Ces champignons peuvent stimuler les défenses de la plante et présentent une activité antagoniste envers différents phytopathogènes, ceci tout en stimulant directement la croissance de la plante et sont même quelque fois à l'origine de symbioses remarquables comme c'est le cas avec les mycorhizes (Selosse *et al.*, 2004).

Depuis la première description de la symbiose comme «les organismes différents qui vivent ensemble» (De Bary, 1879), les modes de vie ont été définies en fonction des bénéfiques ou des impacts des deux partenaires ; les hôtes macroscopiques et les symbiontes microscopiques. Collectivement, plus de 100 ans de recherche suggère que plus, les plantes dans les écosystèmes naturels sont si pas tous symbiotique avec les champignons mycorhiziens et / ou des champignons endophytes (Petrini, 1986).

I.2.3. Les endophytes :

La définition la plus couramment utilisée pour décrire les endophytes est celle de Petrini (1991) qui définit les endophytes comme étant tous les microorganismes vivant dans les organes végétaux interne à un certain moment de leurs vie et peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommage apparents chez l'hôte. L'endophyte ; est un micro-organisme capable d'entrer à l'intérieur d'une plante et d'y survivre au moins une partie de sa vie sans provoquer de symptômes apparents à son hôte végétal. Cette définition correspond à la définition de Hallmann (2001). Pour les bactéries endophytiques et inclut également les micro-organismes de nature fongique. Ceci exclut en revanche les autres définitions de De Bary (1866) et Kado (1992), ainsi que celle de Quispel (1992) trop restrictives ou pouvant également inclure des agents pathogènes. Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolés 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. Ils sont présents et ont été isolés de toutes les plantes déjà étudiées (Hyde et Soyong, 2008).

Les endophytes sont des eucaryotes colonisant les tissus vivants sains des plantes. Ils ont souvent été rapportés associés avec des racines, où ils semblent protéger les plantes exposées à divers stress abiotique et stress biotiques et de promouvoir la croissance des plantes. Plus précisément, les champignons profondes colonisant les racines et leurs façons de croître a-symptomatiquement dans les tissus de plantes a induit que leurs relations avec l'hôte

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

était de l'ordre du mutualisme et de symbiose avec la majorité des espèces de plantes terrestres fournissant une mycovitalité et une myco-hétérotrophie avec le renforcement d'efficacité à contrôler de nombreuses maladies racinaires (Waller *et al.*, 2005 ; St- Arnaud et Vujanovic, 2007). Mais leur biodiversité suggère qu'ils peuvent être également des saprophytes ou des pathogènes opportunistes (Strobel *et al.*, 2004).

I.2.3.1. Diversité des champignons endophytes :

La plupart des champignons endophytes appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota* ; cependant certains appartiennent à d'autres taxons tels que les *Deuteromycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* et les *Oomycota*, ils représentent un groupe très diversifié avec une estimation de 1.5 millions d'espèces et une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante, dont les multiples couches des tissus sont utilisés comme habitat, Ils ont été isolés à partir de toutes les plantes étudiées à ce jour, des plantes allant des grands arbres (Oses *et al.*, 2008), palmier, les graminées marines et même à partir des lichens. Et aussi, à partir de plante poussant dans les forêts aussi bien tropicales, tempérées que boréales (Stone *et al.*, 2004).

En 2007, les estimations ont démontré que plus de 90% d'espèces de champignons endophytes ne sont pas décrites, et seulement 80.000 à 100.000 espèces ont été décrites. Seulement, l'utilisation de l'identification moléculaire pour faire la distinction entre les cultures stériles isolées au laboratoire ainsi que l'exploration de nouveaux environnements telles les forêts tropicales qui pourraient révéler une grande diversité d'endophytes (Saar *et al.*, 2001) ont et vont permettre l'identification de nouvelles espèces (Zabalgozcoa, 2008).

I.2.3.2. Mode de transmission et de reproduction:

Les endophytes possèdent deux modes de transmission :

Le premier se fait par la croissance végétative des hyphes qui est complètement interne ; ainsi les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les graines. Ceci est communément appelé transmission verticale. Et c'est le principal mode de transmission des champignons endophytes (Saikkonen *et al.*, 2010).

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Le second se fait via les spores ; ce groupe de champignons se transmet horizontalement, c'est-à-dire le champignon peut être transmis soit par spores sexuées ou asexuées pour infecter d'autres plantes. Pour les endophytes non systémiques des plantes ligneuses, la transmission se fait horizontalement provoquant généralement des infections locales très limitées, mais ils peuvent être trouvés aussi dans les graines et les glands mais la transmission verticale est rare (Saikkonen *et al.*, 1998).

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction (la reproduction sexuée et la reproduction asexuée). Etant donné que certains champignons peuvent produire soit des spores sexuées soit asexuées et que la reproduction sexuée nécessite des spores sexuées, elle est donc toujours horizontale, contrairement à la reproduction asexuée qui peut se faire verticalement via les graines ou horizontalement par les spores ou éventuellement les hyphes (Saikkonen *et al.*, 2004a).

I.2.3. 3. Interactions plantes-endophytes :

En 1879, De Bary a défini le terme de symbiose par une association entre deux partenaires d'espèces différentes. Ceci inclut une association de type commensalisme, neutralisme, mutualisme ou de type parasitisme (figure 4). Etant donné que l'interaction plante/agents pathogène peut être, ainsi, représentée dans ce terme de symbiose de type mutualisme, c'est à dire une association à caractère constant et durable où des bénéfices sont partagés entre deux espèces différentes. Ceci exclut, par conséquent, les micro-organismes ne présentant un impact positif sur leur hôte que pendant un laps de temps limité. Cependant, ces derniers peuvent quand même être considérés comme symbiontes puisqu'ils restent au contact de la plante pour certains, mais deviennent neutres pour leur hôte végétal. Les endophytes sont susceptibles d'adopter la même stratégie que les champignons phytopathogènes afin d'entrer dans une plante hôte. Même une telle généralisation doit être faite avec une certaine prudence: dans le cas d'agents pathogènes fongiques biotrophiques directs pénétrant, la surface de l'épiderme de l'hôte est la première ligne de défense expliquer à un certain degré de spécificité entre eux (Heath, 2002 ; Valkama *et al.*, 2005).

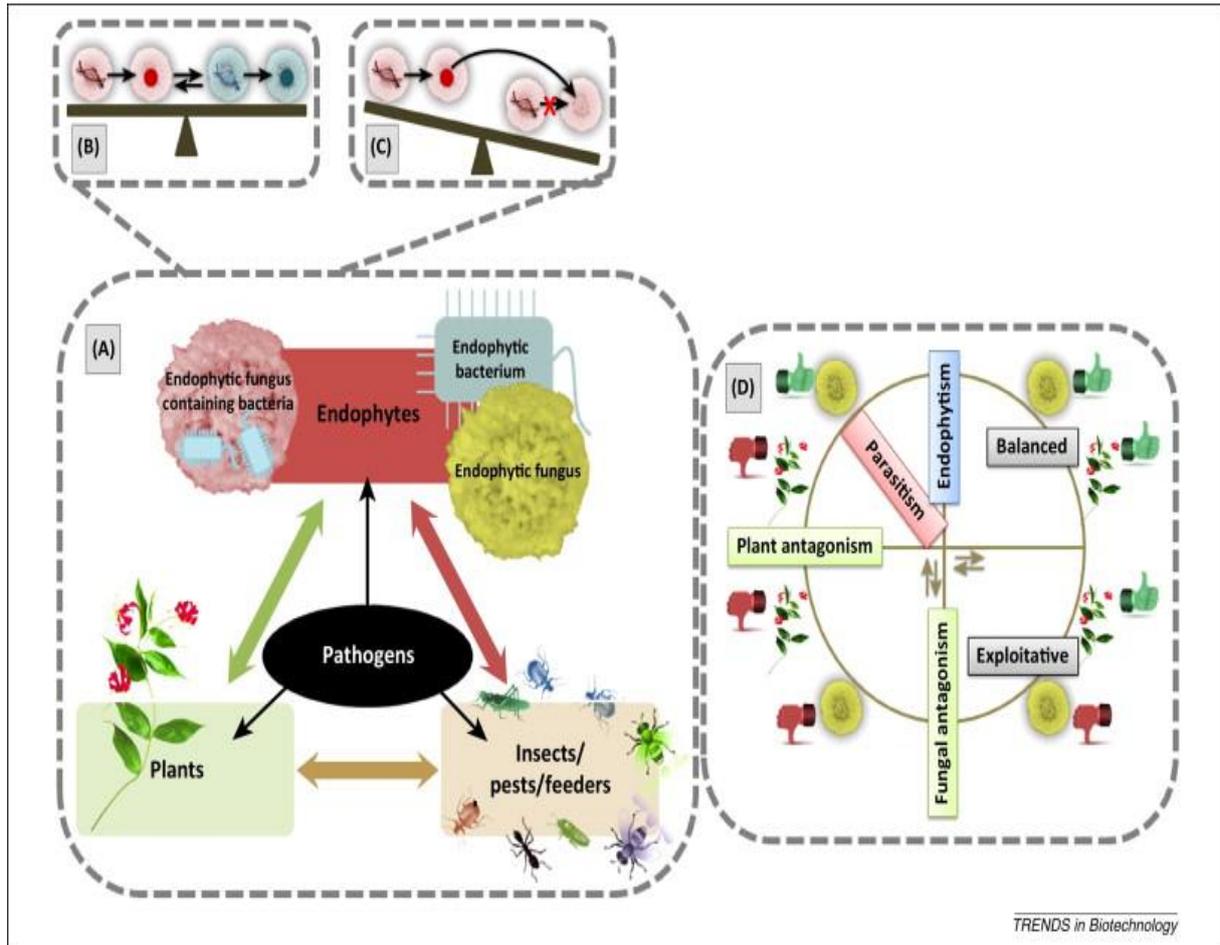


Figure 4 : Interaction entre la plante et les champignons endophytes (Kusari et *al.*, 2014).

Les analyses récentes des interactions compatibles plante-endophyte et plante-parasite augmentent notre compréhension aux principes de reprogrammation moléculaires communs ayant pour résultat un statut compatible (Liu et *al.*, 2003, Kistner et *al.*, 2005). Puisque les endophytes possèdent des similitudes structurales avec les pathogènes, elles sont l'objet de l'identification de la non-auto reconnaissance de la plante hôte (Figure 5). En outre, dans la pénétration de la paroi cellulaire par un intrus fongique est normalement accompagnée par la libération des molécules éliciteurs actifs d'origine végétale. Ainsi, les endophytes doivent éviter ou vaincre la réponse de l'hôte par la résistance non spécifique pour atteindre une pénétration réussite par la reprogrammation qui envahi la cellule de la plante hôte pour recevoir les structures d'infection et pour maintenir l'intégrité de la cellule hôte pour une interaction de longue durée.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Le logement ou la localisation ; exige la reconnaissance sophistiqué de l'endophyte comme un intrus sympathique; pour les mycorhizes, cette reconnaissance est réalisée par récepteur-kinase de l'hôte médiée par une signalisation transmembranaire. Le médiateur récepteur-kinase de la reconnaissance est également impliquée dans la reconnaissance non-spécifique des pathogènes (Zipfel et Felix, 2005).

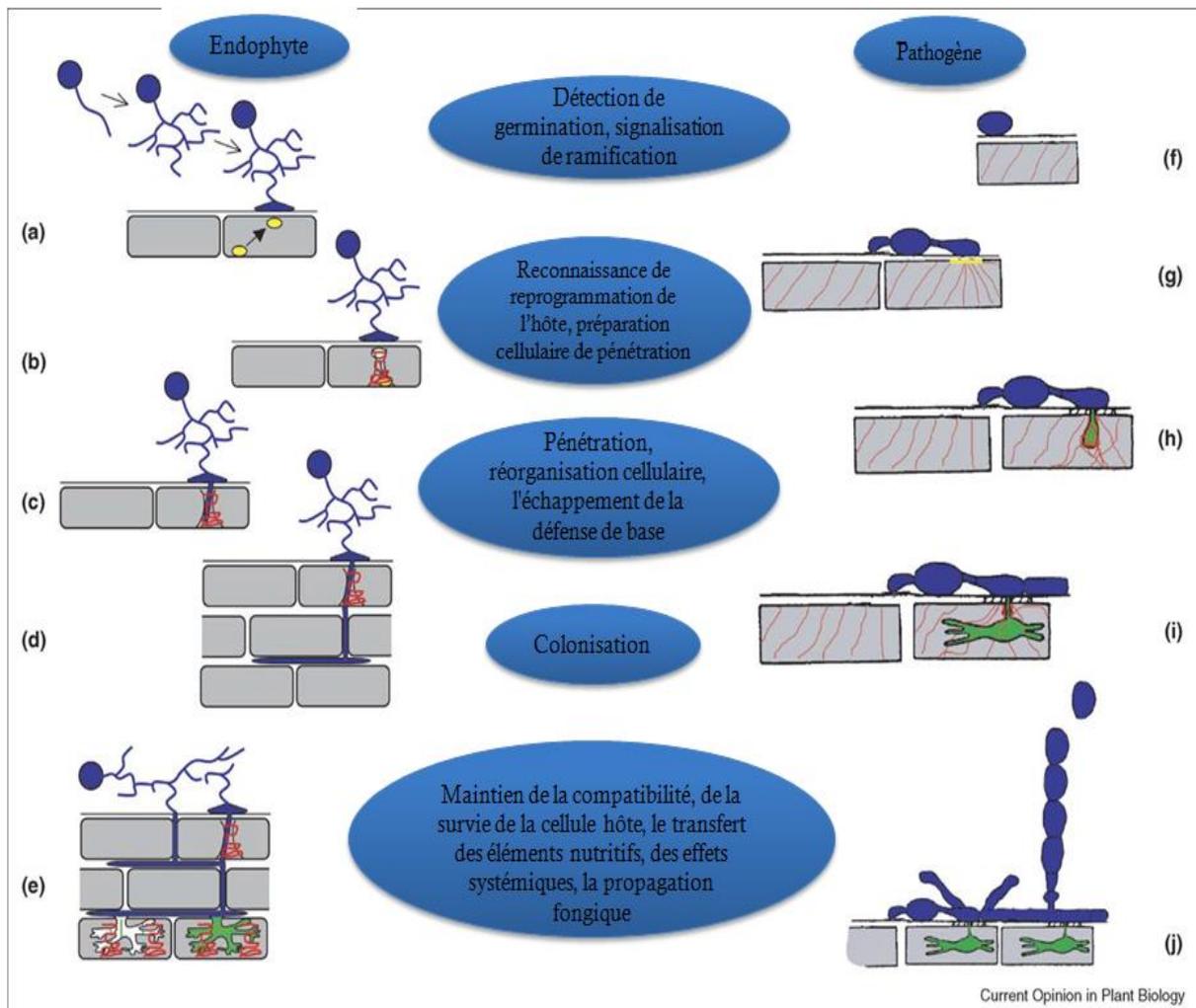


Figure 5: Schéma comparatif entre la relation plante-endophyte et plante-pathogène (Bhat *et al.*, 2005).

Développement symbiotique des endophytes et des pathogènes biotrophes.

(a) Une fois les spores germent et le tube germinatif rapproche des racines, la dominance apicale est abandonnée et l'embranchement des hyphes est déclenché par le 5deoxy-strigol

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

(Akiyama, Matsuzaki et Hayashi, 2005) Après le contact physique, le mycète forme un appressorium, qui semble induire le mouvement du noyau de la plante vers le site de contact.

(b) Les éléments cyto-squelettiques et le réticulum endoplasmique forment la structure de pré-pénétration le long de l'axe du mouvement nucléaire (Genre et *al.*, 2005).

(c) La structure est formé par un hyphe d'infection,

(d) L'initiation de la colonisation du cortex racinaire. L'infestation initiale est accompagnée d'une induction équilibrée des gènes de la défense de la plante.

(e) lorsque le mycète atteint finalement le cortex intérieur, il pénètre dans la paroi cellulaire et reconstruit la structure d'un hyphe qui ressemble à un arbre, l'arbuscule.

Les cellules qui contient les arbuscules possèdent des structures spécifiques cyto-squelettiques et accumulent le ROS (les espèces réactives d'oxygènes). Tandis que les arbuscules se développent et décèdent, le mycète propage plus loin dans la racine et colonise également les alentours du sol. Où il prend les éléments minéraux, qui sont transportés dans la racine et échangés des hydrates de carbone.

(f) Une fois les spores fongiques de l'oïdium germent, Elles forment un appressorium pour la pénétration de la paroi de cellule hôte.

(G) Appressoria semblent libérer des signaux pour la formation membranaire (le jaune) dans lequel les facteurs de susceptibilité et les facteurs de la défense de la plante hôte sont recrutés (Bhat et *al.*, 2005). Dans une interaction compatible, le noyau de l'hôte migre transitoirement à l'emplacement de la pénétration (non montrée) et quelques filaments d'actine (rouges) polarisent vers cet emplacement.

(h) Pendant la pénétration, la membrane de la cellule hôte est formée autour de la structure d'alimentation fongique (vert), qui est étroitement enveloppée par des filaments d'actine et menée par un anneau d'actine autour de la pointe de croissance (Opalski et *al.*, 2005).

(i) Lorsque l'haustorium arrive à maturité, un maillage d'actine corticale est maintenu autour du cou haustorial, tandis que des résolutions de polarisation d'actine aura lieu.

(j) Par la suite, le parasite établit les haustoria secondaires et accomplit son cycle de vie en produisant une nouvelle génération des conidies.

Les champignons pathogènes peuvent résider comme des endophytes asymptomatiques dans les tissus de la plante. Un endophyte bénigne résidant dans le tissu de l'hôte dans un état ou une asymptomatiques qui peuvent être bénéfique à son hôte peut se transformer en un agent pathogène en réponse à un certain signal environnemental. Il est logique à supposer qu'un tel changement dans la nature de l'endophyte entraînerait également un changement de

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

son profil de métabolite. Il peut être dans un environnement métabolique agressif rencontrant sans cesse des produits chimiques de défense de l'hôte. Un tel environnement défavorable peut représenter l'évolution de la capacité de synthèse potentiellement accru des endophytes. Ceci explique peut-être l'anomalie apparente observée quand une espèce d'endophyte isolé à partir d'un hôte végétal produit un composé bioactif, mais ne parvient pas à le faire lorsqu'il est isolé d'une autre espèce végétale (Li *et al.*, 1996).

I.2.3.4. Les champignons endophytes et les métabolites secondaires:

Les métabolites secondaires englobent tout produit à activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressive et toxiques (mycotoxine et phytotoxine). Les microorganismes ne produisent pas leurs métabolites secondaires avant d'avoir terminé leur phase de croissance et d'avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase. En effet, le métabolite secondaire (Tableau 2) peut être un produit d'un métabolite primaire du même microbe qui se forme (le métabolite primaire) au moment où les cellules se divisent durant la phase de croissance logarithmique appelée trophophase (Tortora *et al.*, 2003).

Beaucoup de mycètes et de bactéries peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires qui sont caractérisés par le fait que, leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même et ils sont de structure et d'activité biologique très diverses. Habituellement, ils sont sécrétés sous forme de mélange qui ne représente qu'une structure chimique unique. Chez les mycètes, la production des métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation. De ce fait, les métabolites secondaires peuvent avoir certaines activités :

- 1- Métabolites qui activent la sporulation (acide linoléique et ses dérivés produit par *Aspergillus nidulans*) (Mazur *et al.*, 1991 ; Calvo *et al.*, 2001) ;
- 2- Pigments nécessaires (mélanine) pour la formation des spores sexuelles et asexuelle (Kawamura *et al.*, 1999) ;
- 3- Métabolites toxiques sécrétés par des colonies à la période approximative de la sporulation (la biosynthèse des mycotoxines) (Alspaugh *et al.*, 1997).

Les études récentes n'ont pas assez développé sur les endophytes ; comme une source de produits naturels à intérêt pharmaceutique et agronomiques. Les bactéries endophytes, même

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

les champignons endophytes sont connus par la production de plusieurs nouveaux composés chimiques fonctionnels et structurels qui sont utilisés directement dans les modifications synthétiques (Gunatilaka,2006 ; Mitchell et *al.*, 2008).

Tableau 2 – Quelques métabolites secondaires bioactifs isolés à partir des champignons endophytes (Suryanarayanan et *al.*, 2009) :

Champignon endophyte	Composé bioactive
<i>Phomopsis sp.</i>	Phomopsolide A Phomopsolide B
<i>Chaetomium sp.</i>	Chaetoglobosin A Chaetoglobosin C Chaetoglobosin D Chaetoglobosin G
<i>Alternaria alternata</i>	Prosalanapyrone I Prosalanapyrone II Prosalanapyrone III Solanopyrone A, B, C, D, E, F, G
<i>Nigrospora oryzae</i>	Aphidicolin Aphidicolene Aphidicolaneodiol Aphidicolanatriol Aphidicolanepentol
<i>Curvularia sp</i>	Cytochalasin B Cytochalasin F
<i>Fusarium sp.</i>	Apicidin Enniatin A1 Enniatin B Enniatin E

I.2.3.5. Effet bénéfique des champignons endophytes:

I.2.3.5.1. Stimulation directe de la croissance des plantes :

Au cours des dernières années, de nombreuses recherches sur les rôles des champignons endophytes dans les plantes hôtes ont été réalisées. La stabilité ou la variabilité de l'interaction asymptotique entre les champignons endophytes et leurs plantes hôtes dépend de nombreux facteurs tels que le stress de l'environnement, la sénescence des hôtes, la virulence des endophytes et la réponse de défense de l'hôte. En général, les champignons endophytes pourraient jouer un rôle important dans la physiologie de la plante en conférant la résistance aux insectes et aux herbivores, la tolérance à la sécheresse, la protection contre les agents phytopathogènes et l'amélioration du développement et de la croissance végétative (Arnold et al, 2007; Brosi et al, 2011).

✚ Changement de la physiologie de la plante :

Concernant les rôles physiologiques des champignons endophytes ; ils peuvent améliorer la tolérance au stress général et la résistance aux champignons pathogènes d'hôtes est un domaine de recherche actif. Tanaka et *al.*, 2006 ont démontré que les endophytes produisent le ROS (les espèces réactives de l'oxygène) qui joue un rôle très important dans le maintien de l'association symbiotique entre un endophyte et son hôte. Il y a de plus en plus de données qui suggèrent que des champignons endophytes modifient la physiologie des plantes hôtes et affectent la façon dont ils réagissent aux contraintes environnementales. La modification des tissus des plantes est physiquement associée aux stomates fongiques ; est une stratégie pour augmenter la surface d'échange nutritionnelle et de l'eau, entre la plante et les champignons. Les modifications des tissus et des cellules de la plante sont particulièrement évidentes dans les tissus des végétaux incorporés avec les stomates (Kuldau et Bacon 2008; White et Torres 2010).

Bio-fertilisation :

Une fertilisation adéquate est un préalable pour l'agriculture moderne afin de pouvoir satisfaire à de forts rendements et à une qualité optimale des récoltes. La grande majorité des éléments minéraux essentiels au développement de la plante, n'est nécessaire qu'en quantités infimes, qui peuvent être fournies par la plupart des sols sans suppléments. Cependant quelques éléments clefs, que sont le phosphore (P), le potassium (K), le soufre (S) et l'azote (N), sont fréquemment en quantités insuffisantes dans le sol pour permettre la croissance optimale des cultures.

➤ **Fixateurs d'Azote (N):**

Dans le sol, les nitrates et l'ammonium sont les deux principales formes d'azote inorganique disponibles pour la plante. Dans les sols bien aérés, la nitrification est rapide: il en résulte une faible concentration en ammonium, et le nitrate est la principale source d'azote disponible pour les plantes. Dans les sols détrempés ou acides, l'ammonium s'accumule (Crawford et Forde, 2002). Les plantes non fixatrices de l'azote atmosphérique absorbent et assimilent ces deux formes d'azote anionique (NO_3^-) et cationique (NH_4^+). *Azotobacter*, exemple de bactéries fixatrices d'azote est considéré comme économique, le faible coût de bio-engrais dans les productions agricoles. Des expériences avec des souches d'*Azotobacter chroococcum* a donné le potentiel aux bactéries pour promouvoir la croissance des plante et d'améliorer le rendement de cultures dans des sols différents et dans différentes conditions climatologiques (Pandey et Kumar, 1998). La production des hormones de croissance des plantes, l'amélioration de l'absorption des nutriments et l'effet antagoniste contre les pathogènes des plantes (Parmar et Dadarwal, 1997), sont quelques effets bénéfiques d'*Azotobacter*.

L'azote atmosphérique et la fixation dans le sol est assimilé par *Azospirillum*, il contribue également à économiser de l'azote. *Azospirillum* sécrète des phytohormones dans la partie racinaires des plantes pour améliorer la croissance des racines. Littérature a cité clairement que *Azospirillum* peut être utilisé en tant que potentiel de bio-engrais en agriculture intensive et extensive. L'application des bio-fertilisants est une clé importante pour maximiser le rendement des cultures, *Azotobacter* et *Azospirillum* sont potentiel bio-engrais, qui sont capables de contribuer à un azote nombre de cultures non légumineuses. L'augmentation de la

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

hauteur, le pourcentage de protéines, le poids du grain, le rendement en grains, la surface foliaire signifie que les racines sont associées à l'extension de la contamination avec *Azetobacter* et *Azespirilium* (Kim, 2003, Krieg et al., 1984 et Okon et Kapulink, 1986).

➤ Solubilisation du phosphore(P):

Le phosphore est l'un des principaux éléments nutritifs, le deuxième élément après l'azote dans l'exigence pour les plantes. La grande partie du phosphore du sol, environ 95 à 99% est présente sous forme de phosphates insolubles et ne peut pas être utilisé par les plantes. Pour augmenter la disponibilité du phosphore pour les plantes, de grandes quantités d'engrais sont appliqués sur le sol. Mais la grande partie du phosphore de ces engrais après l'application est rapidement transformé à la forme insoluble. Par conséquent, très peu de pourcentage de la quantité appliquée du phosphore est disponible pour les plantes, ce qui continue l'application nécessaire (Abdalla, 1994).

Cependant, les carences en phosphore sont largement répandues sur le sol dans le monde et les engrais phosphatés représentent le coût le plus important pour la production agricole. De nombreux champignons et bactéries du sol, levures, et espèces d'actinomycètes sont connus pour solubiliser les phosphates inorganiques (Whitelaw, 2000). Les micro-organismes solubilisant les phosphates (MPSs) jouent un rôle très important dans la solubilisation du phosphore supplémentaire pour les plantes, permettant une utilisation durable des engrais phosphatés. Ces micro-organismes sont impliqués dans une gamme de processus qui influent sur la transformation de phosphore du sol (P), et sont donc partie intégrante du cycle de phosphore 'P' du sol.

L'application des MPSs dans le champ a été signalée pour augmenter le rendement des cultures. Plusieurs mécanismes comme l'abaissement du pH par la production des acides, chélation des ions et les réactions d'échange, dans le milieu de croissance ont été rapportés pour jouer un rôle dans la solubilisation du phosphate par les MPSs. Parmi les MPSs, les champignons réussissent mieux dans les conditions d'un sol acide. Les espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et la levure ont été largement rapporté pour solubiliser diverses formes de phosphates inorganiques (Asea et al., 1988;. Whitelaw, 2000).

I.2.3.5.2. Stimulation indirecte de la croissance des plantes :

Production des phytohormones :

Les phytohormones, incluent principalement les auxines, les cytokinines, l'acide abscissique, gibbérellines, et de l'éthylène, induire des réponses physiologiques importantes à différents stades de développement de la plante à des concentrations basses (Lee ASY et *al.*, 2008).

L'acide gibbérellique est un régulateur de croissance des plantes d'importance économique et industrielle. Diverses gibbérellines sont disponibles et sont associées avec plusieurs processus de croissance et de développement végétales, telles que la germination des graines, montaison, floraison, et le développement des fruits(3,4). D'autre part, l'auxine a d'abord été isolé et caractérisé comme une hormone de plante, et l'acide indole-3-acétique (AIA) est un type d'auxine (Nakamura et *al.*, 2006).

L'acide gibberellique est synthétisée par *Gibberella fujikuroi*, *Sphaceloma manihoticola*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Sphaceloma* sp., *Rhizobium phaseoli*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas* sp., et *Phaeosphaeria* sp., alors que l'AIA est synthétisé par *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Aspergillus niger*, *Rhizopus*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Rhizobium* sp., *Azospirillum* sp., et *Erwinia* sp. (Cihangir et Aksöz, 1993 ; Ahmad et *al.*, 2008).

En particulier dans les pays développés où les activités agricoles jouent un rôle important, les régulateurs de croissance des plantes ainsi que des engrais devraient être utilisés pour maximiser l'efficacité de la production. Par conséquent, les régulateurs de croissance des plantes synthétiques devraient être produits économiquement à l'échelle industrielle.

Production des composés organiques volatiles :

Les champignons produisent divers mélanges de composés à base de carbone en phase gazeuse appelés les composés organiques volatiles (COVs) qui en raison de leur petite taille sont capables de diffuser à travers l'atmosphère et les sols. Malgré certaines contraintes méthodologiques et technologiques, les chercheurs ont détecté et caractérisé environ 250 COV fongiques, dont beaucoup qui ont des odeurs caractéristiques et sont produits au cours du métabolisme primaire et secondaire. Les composés organiques volatiles (COVs) fongiques peuvent contribuer dans le succès de certaines espèces de lutte biologique de *Trichoderma*.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Les COVs jouent également un rôle de signalisation importante pour les champignons dans leur milieu naturel. De nombreuses interactions écologiques sont médiés par les COVs, y compris entre les champignons et les plantes, les arthropodes, les bactéries, les champignons et autres (Morath et *al.*, 2012).

Les diverses fonctions des COV fongiques peuvent être développées pour une utilisation dans des applications biotechnologiques pour les biocarburants, la lutte biologique, et mycofumigation. Les composés volatiles représentent une nouvelle frontière dans la bioprospection qui sont dérivées à partir des voies du métabolisme à la fois primaire et secondaire (Korpi et *al.*, 2009), et parce que les COV peuvent diffuser à travers l'atmosphère et le sol, elles sont idéales "Info-chimiques" (Figure 6).

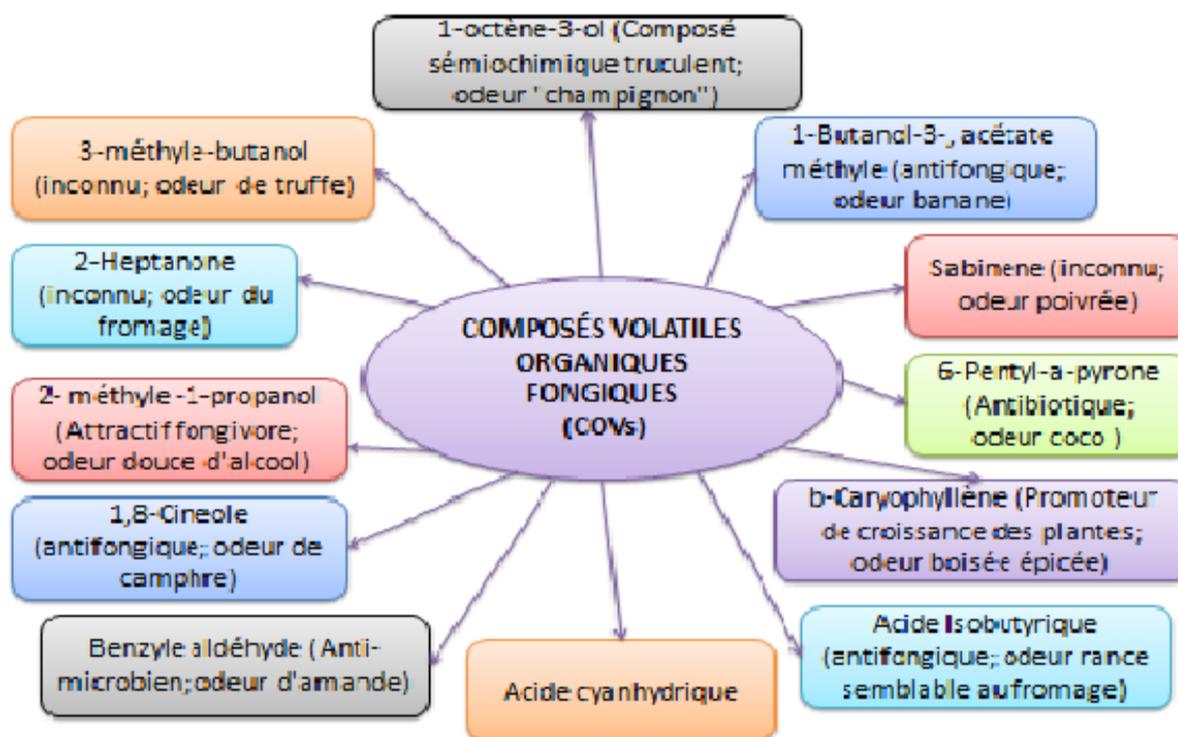


Figure 6: Fonctions et odeurs des composés volatiles produites par les champignons (Morath et *al.*, 2012).

Production d'enzymes :

Les enzymes des endophytes fongiques sont souvent isolés à partir des plantes médicinales (*Alpinia calcarata*, *Bixa orellana*, *Calophyllum inophyllum* et *Catharanthus roseus*), sont utilisés dans les produits alimentaires, les boissons, les confiseries, les textiles et les industries du cuir pour simplifier la transformation des matières premières. Ils sont souvent plus stables que les enzymes dérivées d'autres sources. Les enzymes des endophytes sont des agents de dégradation des polysaccharides disponibles dans les plantes hôtes. L'utilisation d'un simple milieu solide permet la sélection rapide de grandes populations de champignons pour la présence ou l'absence des enzymes spécifiques. Comme d'autres organismes envahisseurs des tissus végétaux, les champignons endophytes produisent des hydrolases extracellulaires ; comme un mécanisme de résistance contre l'invasion des pathogènes et pour obtenir la nutrition de l'hôte, de telles enzymes comprennent une pectinase, cellulase lipase laccase du champignon endophyte *Monotospora* sp., xylanase, les phosphatases et la protéinase. L'éventail des enzymes produites diffère entre les champignons et souvent dépend de l'hôte et les facteurs écologiques (Maccheroni et Azevedo, 1998) ;

Les enzymes pectiques sont induits en présence des substances pectiques par les mycètes pathogènes et endophytes. Les pectinases microbiennes sont importantes dans le processus phytopathologique, symbiose entre le microorganisme et la plante et dans la décomposition de la matière végétale morte (Santos et al., 2012) . La dégradation des tissus de la plante hôte par les agents phytopathogènes commence généralement par la production des enzymes pectinolytiques, qui sont les enzymes principales impliquées dans le processus de la dégradation. Si un endophyte peut dégrader les substances pectiques, ceci implique que le mycète est susceptible d'être un microbe pathogène latent (Choi et al., 2005).

I.2.3.5.3. Adaptation des plantes aux stress abiotiques :

Stress hydrique et thermique

Les plantes sont confrontées à des conditions environnementales changeantes, les obligeant à s'adapter ou à succomber à des températures extrêmes, des insuffisances d'eau et

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

des produits chimiques. Les mycètes sont généralement plus adaptés à la sécheresse que les bactéries. En effet, certains mycètes du sol peuvent survivre pendant les périodes de sécheresse par la formation des spores, en particulier en contact avec l'oxygène et des sels minéraux. Les spores sont des cellules de résistance et leur formation nécessite une concentration, plus au moins, importante de matière carbonée (Malinowski *et al.*, 2000).

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 élevées 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. 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 (Rodriguez *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005).

Stress salin

Dans le monde entier, la salinité est l'un des plus graves contraintes abiotique qui limitent la croissance et la productivité des cultures. Presque 20% des terres irriguées du monde sont affectées du sel, avec 2500 - 5000 km² de production perdus chaque année en raison de la salinité. Environ 60% des sols salins sont sodiques et de nature saline qui a augmenté de façon constante au fil des décennies dans les plaines du nord-ouest du bassin indo-gangétique et du fleuve Jaune bassin de la Chine (Gupta et Abrol, 2000). Cependant, les micro-organismes halophiles et halotolérants peuvent contaminer la nourriture qui est conservée avec du sel, ils peuvent aussi habiter les environnements hyper-salins naturels dans le monde, tels que les lacs salés et les marais salants solaires.

Dans la nature, la plupart des cas de salinité sont dus aux sels de sodium et surtout au NaCl. La haute salinité compromet des fonctions biologiques dans les écosystèmes et cause la dégradation des ressources de sol et de l'eau (Das Sarma et Arora, 2001). Bien que, les océans soient de loin, la plus grande eau superficielle saline des environnements hyper salins (3.5% sels totaux). Ce processus mène les diverses espèces microbiennes à s'adapter aux différentes gammes de salinités (figure 7), pendant que la saumure est concentrée de 1 mol/L à 3.5 mol/L

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

(DasSarma et Arora, 2001). Les microorganismes halophiles et halotolérants sont trouvés dans chacun des trois types de vie : Archea, Bacteria et Eucarya (Litchfield and Gillevet, 2002). Ils peuvent être classifiés selon leur concentration en sel de NaCl :

- Les halophiles, se développent de façons optimales à 0.2-0.85 mol/L (2-5%) de NaCl.
- Les halophiles modérés se développent de façons optimales à 0.85-3.4 mol/L (5-20%) de NaCl.
- Les halophiles extrêmes se développent de façons optimales à 3.4-5.1 mol/L (20-30%) de NaCl.

En revanche, les non halophiles se développent de façons optimales à moins de 0.2 mol/L. Les halotolérants peuvent se développer dans la salinité élevée et en l'absence d'une concentration élevée des sels. Les mycètes ont été découvertes dans les environnement dont la salinité s'étend entre 15-32% de NaCl, où jusqu'ici supposé que seules les bactéries pouvaient se développer (Gunde-Cimerman *et al.*, 2002).

En outre, un certain nombre des mycètes tolérants de sel ont été isolées à partir des poissons salés (*Polypeaucilum pisce* et *Basipetspora halophila*) l'eau de mer et des sols des désert. Une variété des mycètes filamenteux ont été récemment isolées à partir de la mer morte (340 g/L en montent de sels dissous). Buchalo *et al.*, (2000) ont isolé 26 espèces fongiques de la mer morte représentent 13 genres : Zygomycotina (*Absidia glauca*), Ascomycotina (*Chaetomium aureum*, *C. flaveginum*, *Emericella nidulans*, *Eurotium amstelodami*, *Gymnoascella marismortui*, *Thelvia terricola*), mycètes mitosporiques (*Acremonium persicinum*, *Stachybotrys chartarum*, *Ucladiumchlamydosporum*) (Kispapo *et al.*, 2003).

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

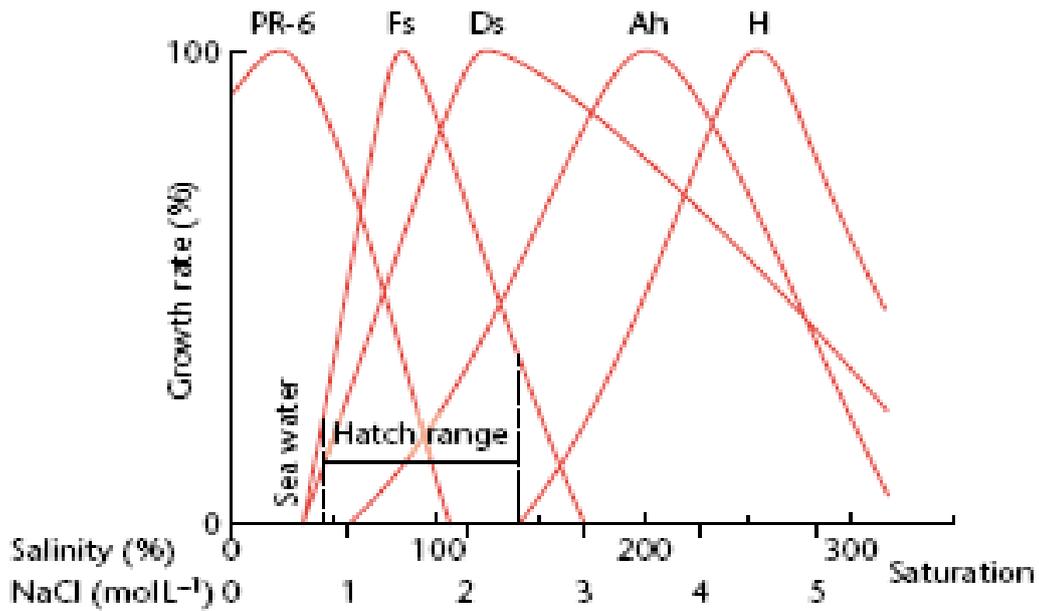


Figure 7 : La tolérance des microorganismes aux concentrations de sels (NaCl) :
PR-6 *Agmenellum quadruplicatum*, **Fs** *Fabrea saline*, **Ds** *Dunaliella salina*, **Ah** *Aphanothece halophytica*, **H** *Halobacterium* d'après DasSarma et Arora (2001).

L'osmose élevée (hypersalinité) peut être nocive à la cellule fongique car, l'eau perdue dans le milieu environnemental peut empêcher la perte de l'eau cellulaire. Dans ces conditions, les mycètes halophiles accumulent généralement des concentrations élevées des corps dissous dans le cytoplasme (Galinski, 1993). Ces corps dissous (osmolytes) qui s'accumulent dans la cellule des halophiles sont habituellement, des acides aminés et des polyols comme, Betaine de glycine, acetoïne, tréhalose et glycérol qui ne perturbent pas les processus métaboliques. Les osmolytes peuvent se produire par la biosynthèse du matériel de stockage ou par de nouveaux matériel se trouvant dans le milieu (DasSarma and Arora, 2001).

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

Le présent travail a pour objectif de mettre en évidence la production de quelques métabolites secondaires secrétés par une collection de mycètes. Il s'agit de quinze isolats fongiques endophytes isolés à partir des racines de palmier dattier de la région d'Adrar testées *in vitro* en déterminant une phytohormone, un antibiotique et quelques enzymes et de tester leur tolérance à différentes concentration de sel.

II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE:

II.1.1. Isolats fongiques endophytes utilisés :

Dans la présente étude, les quinze isolats fongiques endophytes utilisés appartiennent à la collection du laboratoire de phytopathologie de département de Biotechnologie de la faculté des sciences naturelles et vie (SNV). Les mycètes endophytes ont été isolés en 2010 à partir des racines de palmier dattier de la région d'Adrar (Tableau 2) (Figure 8).

MATERIEL ET METHODES

Tableau 2 : Champignons endophytes utilisés :

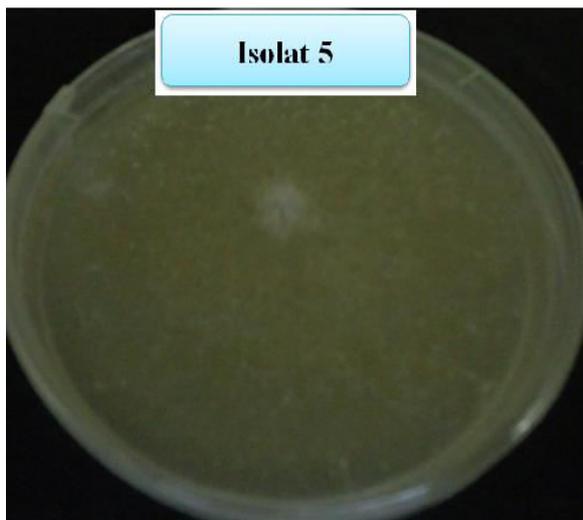
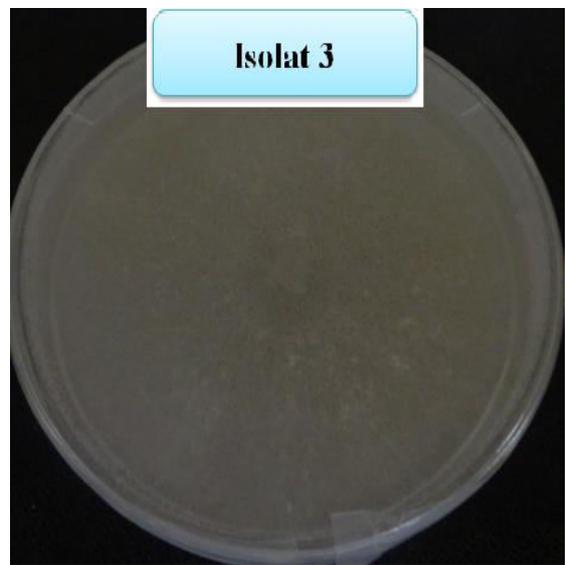
Isolats fongiques	Nom scientifique	Origine végétale	Région	Provenance
B ₁₂₈₃	<i>Aspergillus sp.</i>	Racine de palmier dattier	Adrar	Collection du laboratoire de phytopathologie. Université de Blida 1
B ₁₃₃₁	Isolat 1	Racine de palmier dattier		
B ₂₁₇₂	<i>Fusarium sp.</i>	Racine de palmier dattier		
B ₂₁₉₈	Isolat 2	Racine de palmier dattier		
B ₂₂₃₅	Isolat 3	Racine de palmier dattier		
B ₂₃₈₇	Isolat 4	Racine de palmier dattier		
B ₂₁₁₃₁	Isolat 5	Racine de palmier dattier		
B ₂₁₁₁₀₂	<i>Penicillium sp.2</i>	Racine de palmier dattier		
S ₂₃₇₁	<i>Fusarium sp.</i>	Racine de palmier dattier		
S ₂₃₈₁	Isolat 6	Racine de palmier dattier		
T ₁₁₂₃	Isolat 7	Racine de palmier dattier		
T ₁₁₇₂	<i>Aspergillus sp.</i>	Racine de palmier dattier		
T ₂₂₅₇	<i>Aspergillus sp.</i>	Racine de palmier dattier		
T ₁₂₁₂₂	Isolat 8	Racine de palmier dattier		
T ₂₂₁₀₉	<i>Acremonium sp.</i>	Racine de palmier dattier		

II.2. METHODES :

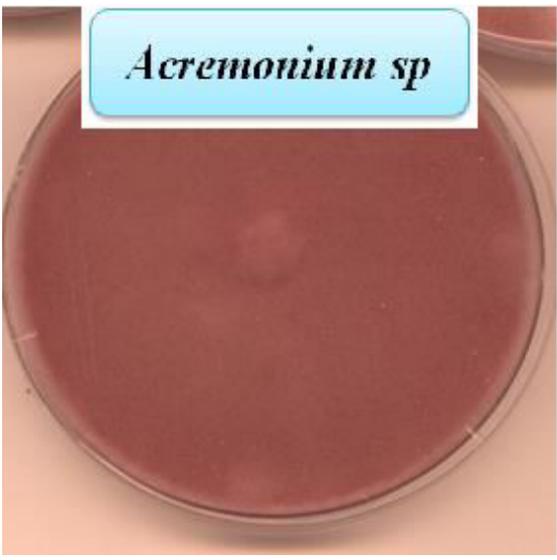
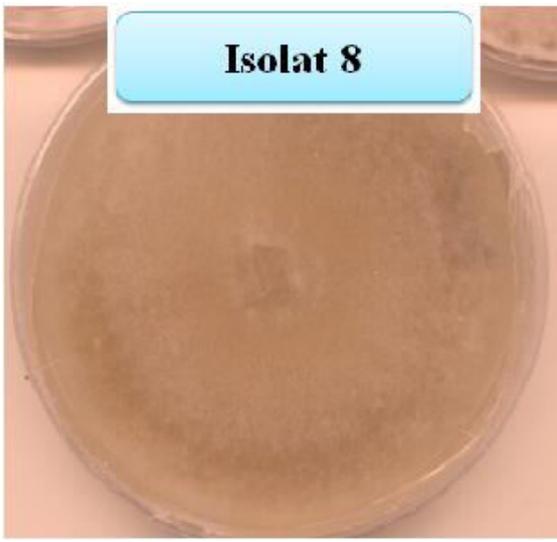
II.2.1. Purification des isolats :

Après plusieurs repiquage, la purification des isolats a été réalisée par des transplantations successives des disques mycéliens de chaque champignon dans des boites de Pétri contenant le milieu (MEA, Malt Extract Agar) (Dutton et Penn, 1989), et (PDA, Potato Dextrose Agar) (Johnston et Booth, 1982) (Annexe 1) (Figure 8).

MATERIEL ET METHODES



MATERIEL ET METHODES



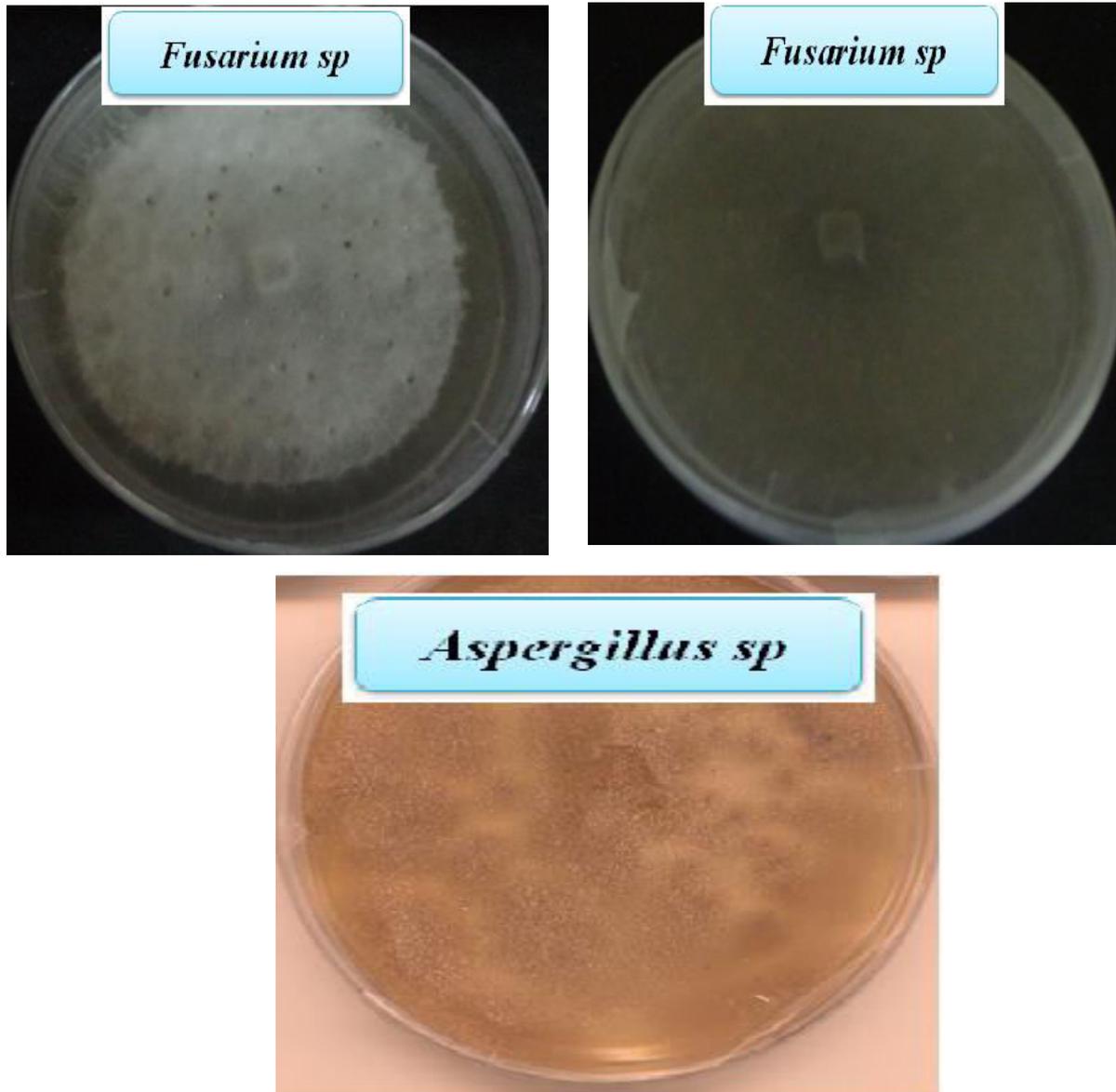


Figure 8 : Mycètes endophytes utilisés.

II.2.2. Production des métabolites secondaires :

II.2.2.1. Estimation de la production de l'acide indole acétique (AIA) :

Le milieu solide LBT de Luria Bertani additionné au tryptophane (Bric *et al.*, 1991) (Annexe 1) a été utilisé pour détecter la production d'AIA par les isolats fongiques endophytes. Un papier filtre stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min a été déposée sur milieu de culture LBT. Le disque mycélien est déposé sur le papier filtre ; puis les boites ont été incubées à 28°C pendant 2 jours avec deux (2) répétitions pour chaque isolat. Les disques de papier filtre contenant le champignon sont prélevés et sont saturés dans une boite de Pétri en verre stérile en les plongeant directement dans le réactif de Salkowski (Annexe 1). Le témoin est représenté par une boite de Pétri sans inoculum.

Selon (Naik et Sakthivel, 2006), la production d'AIA et/ou de ses analogues se manifeste après 10 à 30 min par la formation d'un halo rose autour des colonies, et pour les souches productrices d'autres types d'indoles la coloration est jaune à jaune brune.

II.2.2.2. Production de substances volatiles (HCN) :

La cyanogénèse a été évaluée sur milieu solide ; une méthode adaptée de celle de Lorck (1948). Sur le milieu PDA, additionné de 4.4g/l de glycine (Annexe 1); les disques mycéliens sont déposés sur le milieu, des disques de papier Wattman n°1 saturés en picrate alcalin (2.5g d'acide picrique + 12.5g de Na₂CO₃ dans 1L d'eau) sont déposés dans les couvercles des boites de Pétri, ces dernières sont scellées au parafilm et incubées inversées à 28°C pendant 4 jours (Figure 9).

MATERIEL ET METHODES

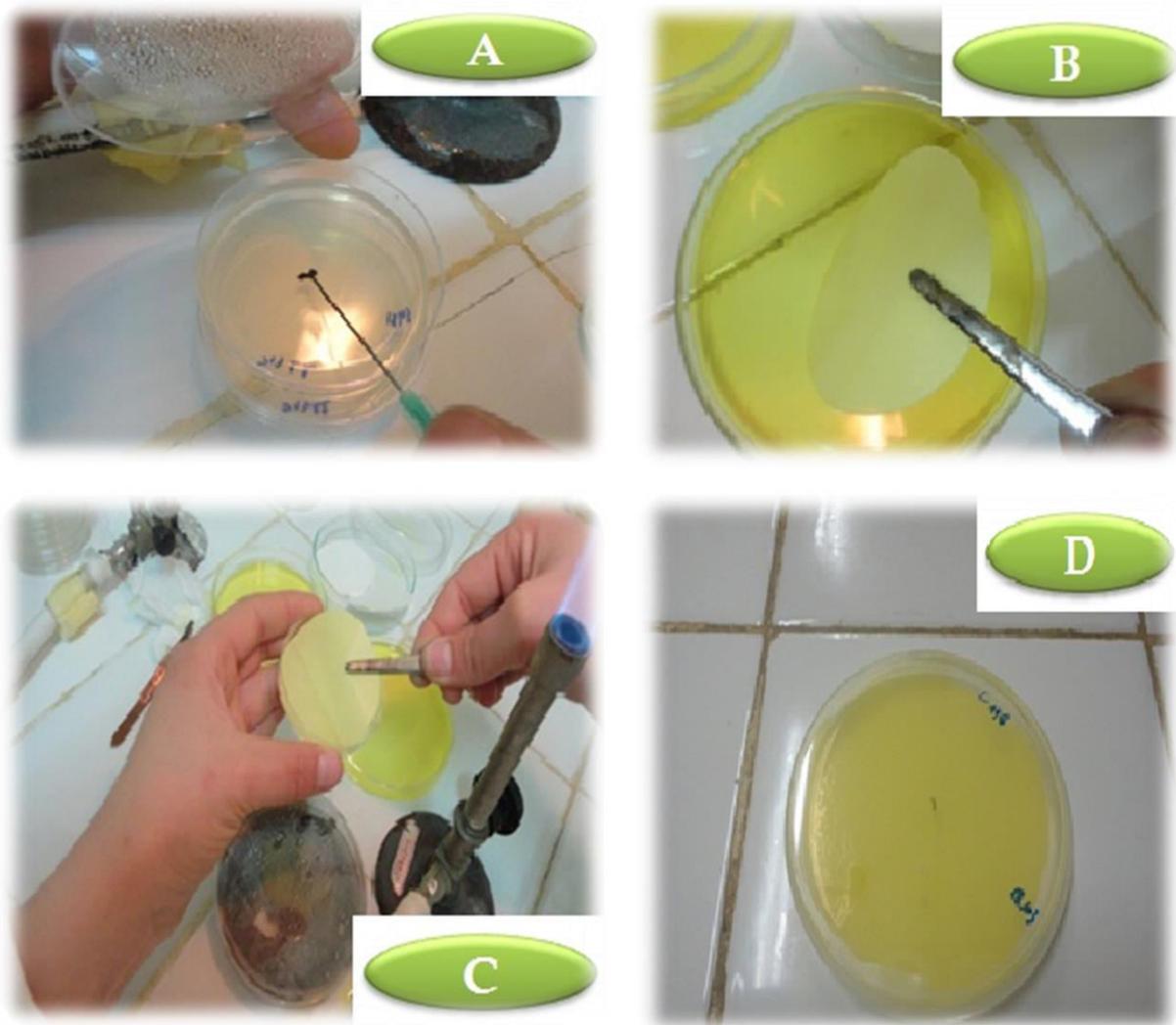


Figure 9 : Les étapes de la cyanogénèse :

- A :** Le disque mycélien est déposé sur le milieu HCN.
- B :** Le disque de papier Whatman n°1 est saturé en picrate alcalin.
- C :** Le disque de papier Whatman n°1 est déposé dans le couvercle de la boîte de Pétri.
- D :** La boîte de Pétri est scellée au parafilm.

Le virage de la couleur : du jaune vers le brun clair au rouge brun indique respectivement une production modérée ou élevée d'HCN par le champignon producteur. Deux répétitions ont été effectuées, le témoin est représenté par un milieu sans inoculum.

II.2.2.3. Production d'enzymes :

II.2.2.3.1. Phosphatase :

Le test de solubilisation du phosphate a été effectué sur milieu Pikovskaya (PVK) bicalcique solide ; additionné de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948) (Annexe 1). Selon la méthode décrite par Mehta et Nautiyal, (2001). Cette méthode est basée sur la décoloration du Bleu de Bromo-Phénol (BPB) suite à un abaissement du pH du milieu de culture par la production de phosphatase.

Les disques mycéliens sont déposés sur gélose de Pikovskaya, à raison de deux répétitions pour chaque isolat fongique (Figure 10). Une boîte de pétri contenant le milieu PVK sans inoculum sert comme témoin. Les boîtes sont incubées pendant 4 jours à 28°C.

La décoloration du milieu de Pikovskaya autour des spots est un indicateur d'une solubilisation des phosphates ; on mesure le diamètre de solubilisation (halo + colonie) et celui de la colonie fongique.



Figure 10: Les étapes de la phosphatase.

A : Le disque mycélien est déposé sur le milieu PVK

B : Une boîte sans inoculum sert comme témoin.

MATERIEL ET METHODES

II.2.2.3.2. Pectinase : Selon Cattelan et *al.*, (1999), on détermine la production de pectinase par les isolats endophytes fongiques. On utilise le milieu M9 agar (Miller, 1974) additionné de 10 g de pectine et majoré de 1,2 g d'extrait de levure (Annexe 1). On dépose trois disques mycéliens sur milieu gélosé ; en raison de trois (3) répétitions par boîte et une boîte sans champignon sert comme témoin incubé à 28° C pendant 2 jours.

Les boîtes ont été inondées avec 2M d'HCl après 2 jours d'incubation. La présence d'un halo clair autour de la colonie indique une réponse positive pour la production de pectinase (Figure 11).

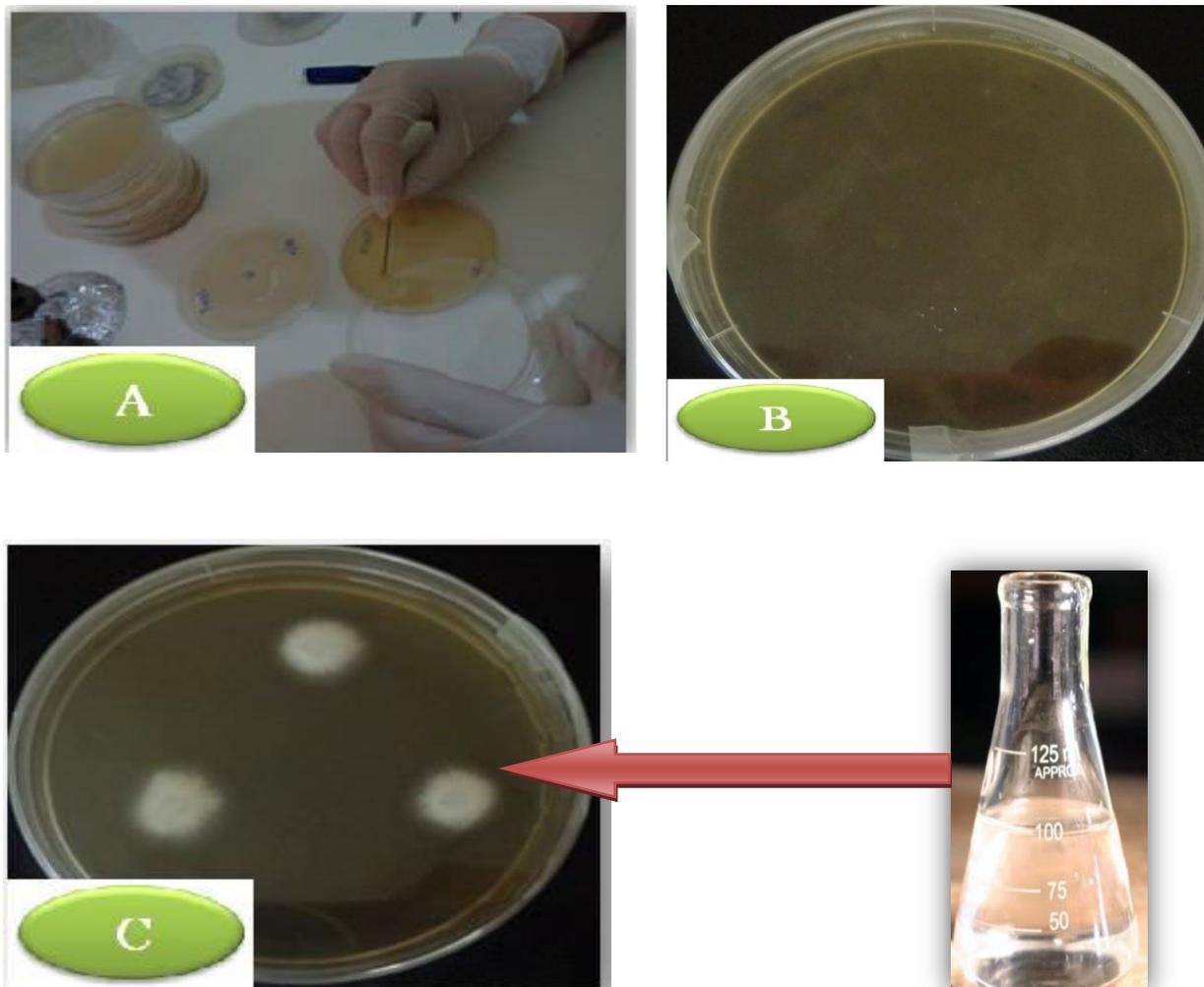


Figure 11: Les étapes de la pectinase.

A : Trois disques mycéliens sont déposés sur le milieu gélosé de pectinase

B : Une boîte sans inoculum sert comme témoin

C : L'inondation des boîtes avec 2M d'HCl après 2 jours d'incubation.

II.2.2.3.3. Protéase :

L'activité protéolytique a été déterminée en utilisant du lait écrémé agar (Sunish Kumar *et al.*, 2005) (Annexe 1). On dépose trois disques mycéliens sur ce milieu; en raison de trois (3) répétitions par boîte et une boîte sans champignon sert comme témoin. Après 2 jours d'incubation à 28°C, une zone claire autour de la colonie indique une activité protéolytique positive (Smibert et Krieg 1994).

II.2.2.4. Tolérance à la salinité :

Le choix des deux concentrations a été par rapport à la recherche bibliographique ; bien que, les océans soient de loin, la plus grande eau superficielle saline des environnements hyper salins (3.5% sels totaux). Ce processus mène les diverses espèces microbiennes à s'adapter aux différentes gammes de salinités, pendant que la saumure est concentrée de 1 mol/L à 3.5 mol/L (DasSarma et Arora, 2001).

La tolérance à la salinité des isolats fongiques est étudiée dans un milieu gélosé à base de pomme de terre (PDA, potato dextrose agar) ; additionné à des concentrations progressives de NaCl (g/L) : 15, 75 par rapport à un témoin (Kogej *et al.*, 2005).

Chaque boîte de Pétri contient un disque mycélien de 5 mm de diamètre de l'isolat fongique a subi une incubation de 10 jours à une température de 30°C. Deux répétitions ont été effectuées par isolats (Figure 12). Le meilleur développement est déterminé par la mesure du diamètre de la croissance mycélienne par rapport au témoin respectif.



Figure 12 : Les étapes de la salinité.

A : Un disque mycélien 5mm de Q est déposé de dans le milieu PDA à 15 et 75g de NaCl

B : Une boîte de PDA sans NaCl et sans inoculum sert comme témoin.

II.2.2.5. Analyses statistiques des résultats :

Les résultats obtenus lors de cette étude sont analysés statistiquement en utilisant le logiciel XLSTAT 2012 à une valeur de probabilité $p=0.00001$; afin d'analyser tous les paramètres pour déterminer le taux de production des différents métabolites secondaires.

CHAPITRE III: RESULTATS ET INTERPRETATIONS

III.1. Production des métabolites secondaires *in vitro* par les isolats fongiques endophytes :

III.1.1. Production de l'acide indole acétique (AIA) :

La production de l'acide indole acétique et/ou de ses analogues a été observée chez la plus part des isolats testés. Toutefois, sept de ces derniers (B₁₂₈₃, B₂₂₃₅, B₂₃₈₇, B₂₁₁₃₁, S₂₃₇₁, T₁₁₇₂, T₂₂₅₇) ont montré un degré de production appréciable et dont la concentration varie d'un isolat à un autre en présence de tryptophane, alors que huit isolats (B₁₃₃₁, B₂₁₇₂, B₂₁₉₈, B₂₁₁₁₀₂, S₂₃₈₁, T₁₁₂₃, T₁₂₁₂₂, T₂₂₁₀₉) n'ont pas produits l'AIA (Tableau 3). Les isolats producteurs de ce métabolite ont développé une coloration rose avec quelques isolats (B₂₂₃₅, B₂₃₈₇, B₂₁₁₃₁, S₂₃₇₁) et une coloration marron avec d'autres du genre *Aspergillus sp.* (B₁₂₈₃, T₁₁₇₂, T₂₂₅₇;) ; à la suite de l'addition du réactif révélateur de Salkowski après 20mn à 30mn. (Figure 5).

III.1.2. Production de l'acide cyanhydrique (HCN) :

Le nombre des isolats producteurs d'HCN est plus élevé par rapport à la production de l'AIA. Parmi ces isolats fongiques testés, dix (B₁₂₈₃, B₁₃₃₁, B₂₁₇₂, B₂₁₉₈, B₂₂₃₅, B₂₃₈₇, S₂₃₈₁, T₁₁₇₂, T₂₂₅₇, T₁₂₁₂₂) produisent l'acide cyanhydrique, avec des taux variables selon les isolats (Tableau 3). La production de l'HCN par ces isolats fongiques est indiquée par un léger virage du papier Wattman du jaune vers le marron qui devient net entre deux à trois jours. Le papier Wattman devient brun-rougeâtre après cinq jours d'incubation, en dépassant une semaine le papier prend l'aspect noirâtre pour quelques isolats.

Les cinq isolats (B₂₁₁₃₁, B₂₁₁₁₀₂, S₂₃₇₁, T₁₁₂₃, T₂₂₁₀₉) ne produisent pas l'acide cyanhydrique ; révélé par la couleur du papier Wattman qui reste jaune dans les mêmes conditions d'expérimentation (Figure 6).

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

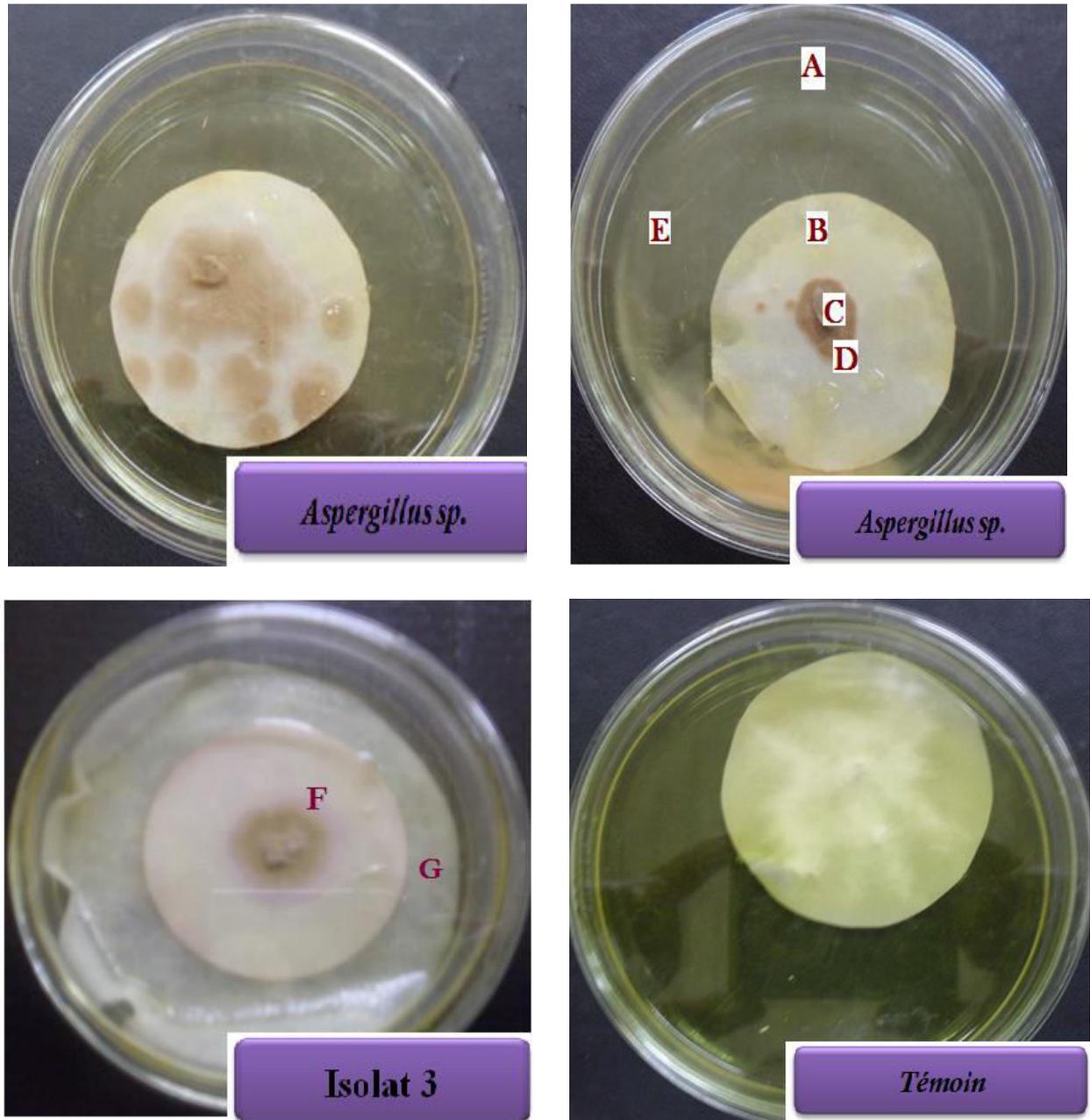


Figure 13 : Production d'AIA par les isolats fongiques.

A : Boite en verre stérile, B : Papier filtre stérile, C : Disque mycélien.

D : Coloration marron, E : Réactif de Salkowski, F : Coloration rose.

G : Papier Wattman de 9cm.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

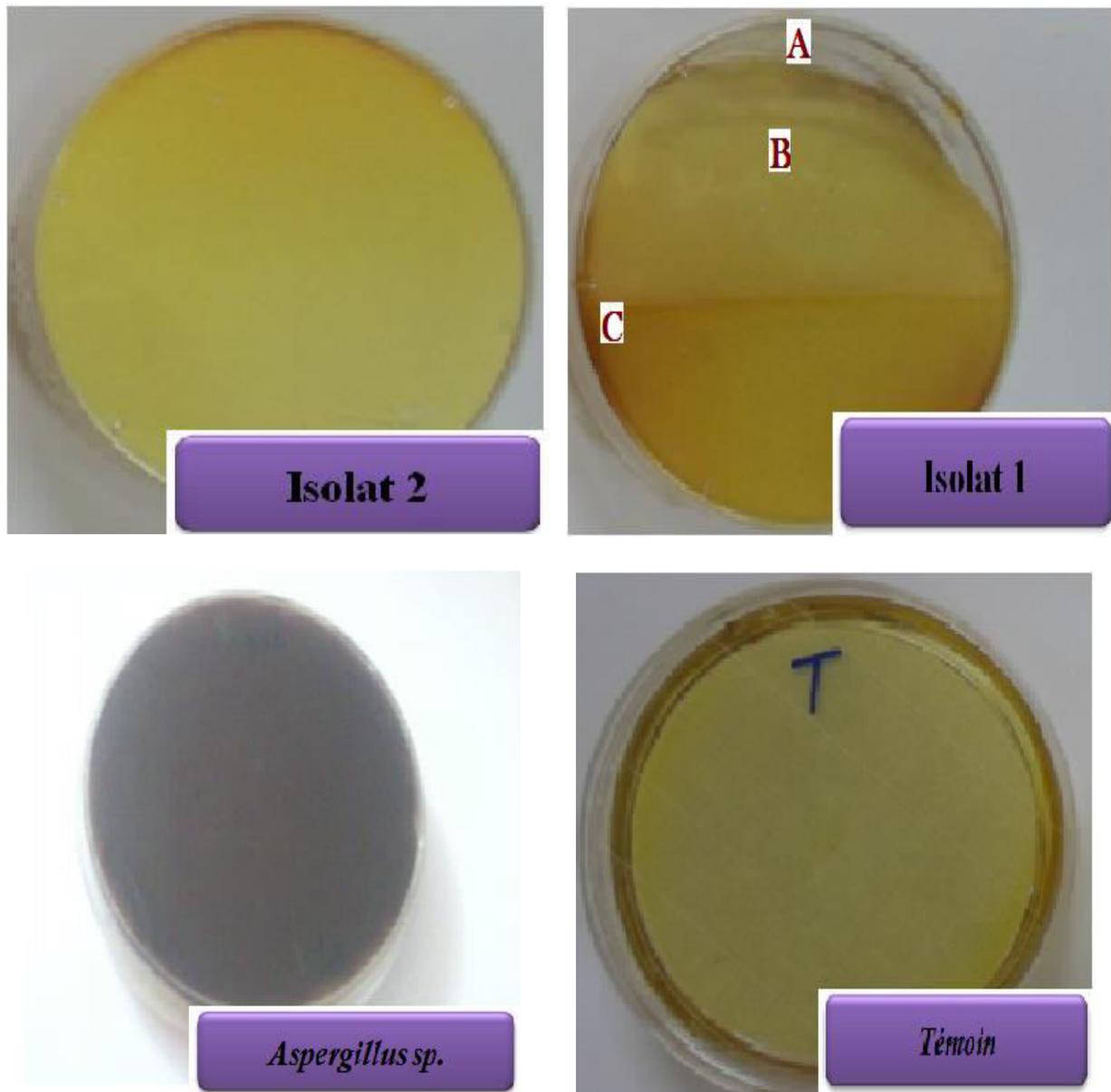


Figure 14 : Production d'HCN par les isolats fongiques

A : Boite de pétri. **B** : Papier Wattman n°1 saturés en picrate alcalin.

C : Couleur marron.

III.1.3. Production des enzymes :

Les tests qualitatifs permettant de démontrer la production des enzymes extracellulaires ; la phosphatase, la pectinase et la protéase à partir des isolats fongiques endophytes nous ont permis d'obtenir les résultats ainsi résumés dans le (Tableau 3) et les (Figures 7, 8, 9).

III.1.3.1. Production des phosphatases :

Le test de solubilisation du phosphore montre que parmi les quinze isolats fongiques testés, sept seulement (B₁₂₈₃, B₁₃₃₁, B₂₂₃₅, T₁₁₂₃, T₁₁₇₂, T₂₂₅₇, T₂₂₁₀₉) ont pu synthétiser la phosphatase pour solubiliser le phosphore inorganique sous forme bi-calcique. Cette solubilisation est révélée soit par la présence d'un halo transparent autour de la colonie fongique soit par un changement de couleur du milieu de culture au moment où les huit isolats (B₂₁₇₂, B₂₁₉₈, B₂₃₈₇, B₂₁₁₃₁, B₂₁₁₁₀₂, S₂₃₇₁, S₂₃₈₁, T₁₂₁₂₂) ne produisent pas la phosphatase (Tableau 3). La variation du diamètre de cet halo montre qu'il y a une variabilité dans le pouvoir de solubilisation du phosphore entre les isolats (B₁₃₃₁, T₁₁₂₃, T₂₂₁₀₉) fongiques testés.

Les isolats fongiques (B₁₂₈₃, B₂₂₃₅, T₁₁₇₂, T₂₂₅₇) ont provoqués un changement de couleur du milieu de culture du bleu vers le vert clair ; est expliqué par l'utilisation du bleu de bromophénol comme indicateur coloré de pH acido-basique. C'est une substance qu'on a ajoutée au milieu de culture et a donné la couleur bleu clair en fonction du pH de ce milieu. La plupart du temps il donne deux couleurs distinctes et dans une zone de 1,2 à 2,0 unités de pH des teintes correspondantes au mélange de ces deux couleurs, c'est la zone de virage de l'indicateur. Par exemple le bleu de bromophénol (BBP) (tétrabromophénol sulfonephthaléine) est jaune pâle pour un pH<3, et bleu pour un pH>4,6. Il peut parfois être utilisé comme teinture bleue en milieu neutre. Sa zone de virage: 3<pH<4.6 est donc verte (Figure 7) (Lecomte, 2011).

III.1.3.2. Production des pectinases :

D'après ce test on a constaté que notre collection des différents isolats fongiques n'a pas la capacité de produire la pectinase qui dégrade la pectine malgré l'addition d'un réactif révélateur ; l'acide chlorhydrique à deux moles (Figure 8) (Tableau 3).

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

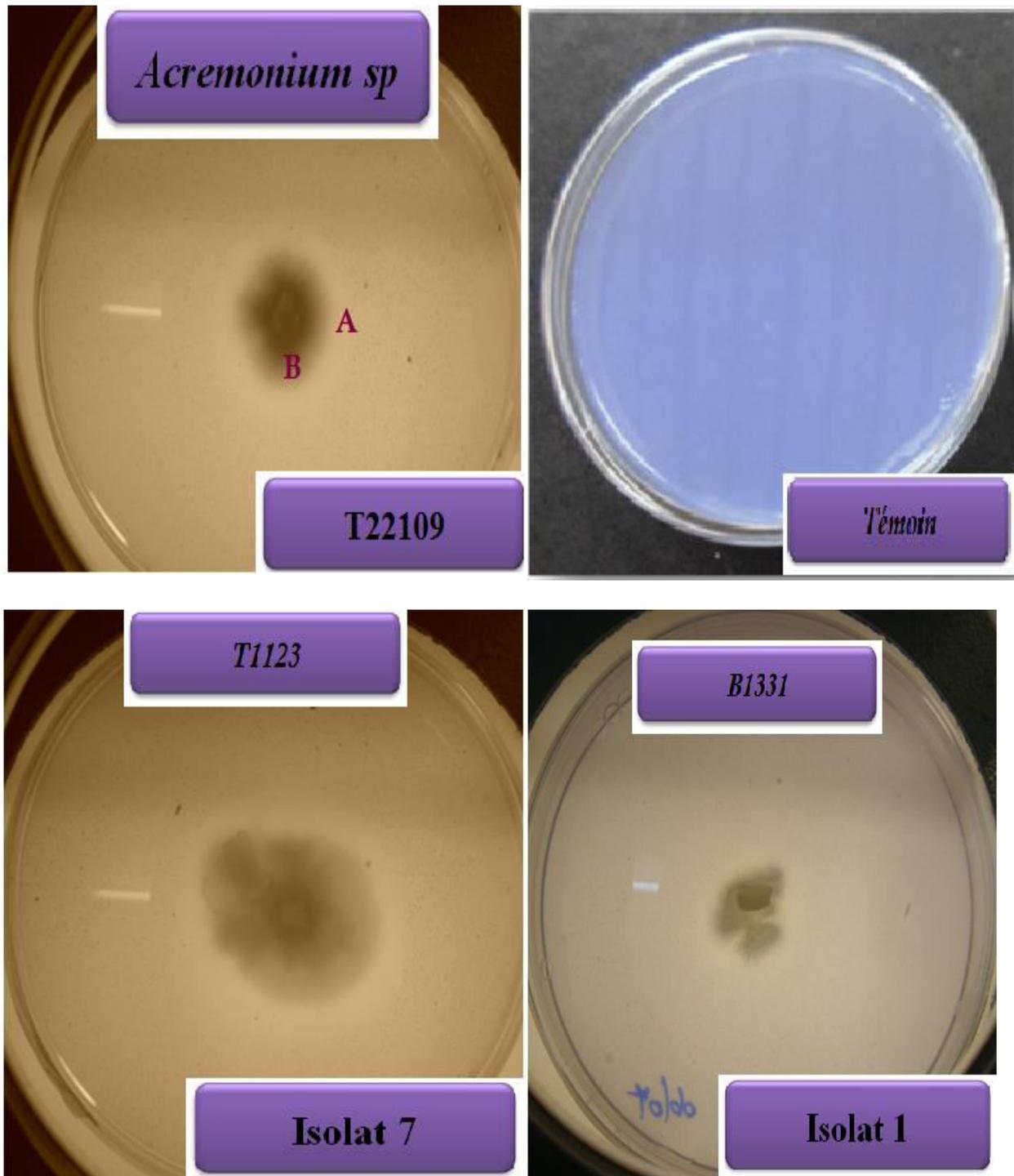


Figure 15 : La solubilisation du phosphore bi-calcique par les isolats fongiques.

A : Halo transparent.

B : Disque mycélien.

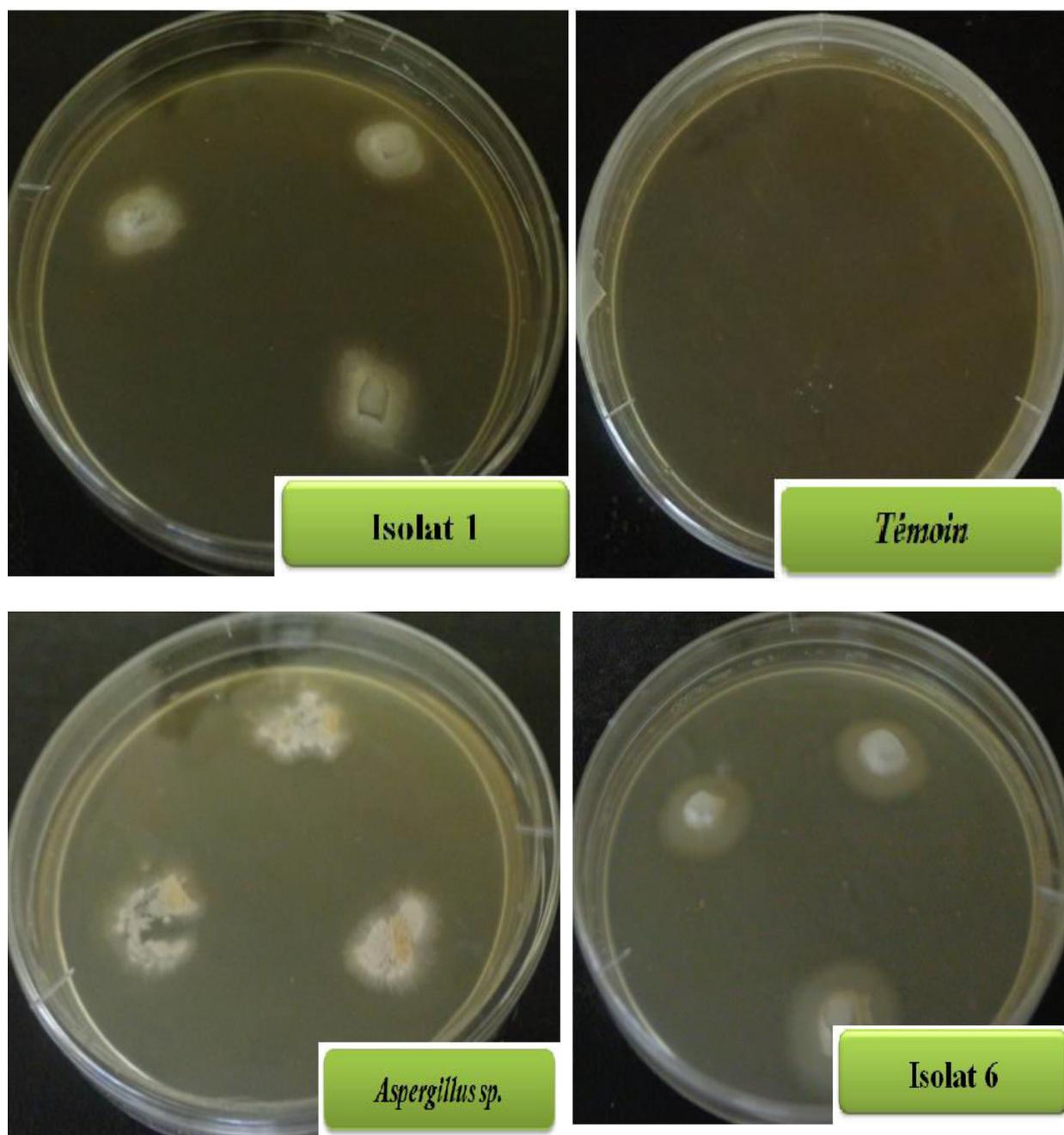


Figure 16 : Les isolats fongiques ne produisent pas la pectine.

III.1.3.3. Production des protéases :

Tous les isolats fongiques produisent la protéase contrairement à la pectinase après 48h d'incubation, ce sont des enzymes qui dégradent les parois cellulaires (Figure 9) (Tableau 3).

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

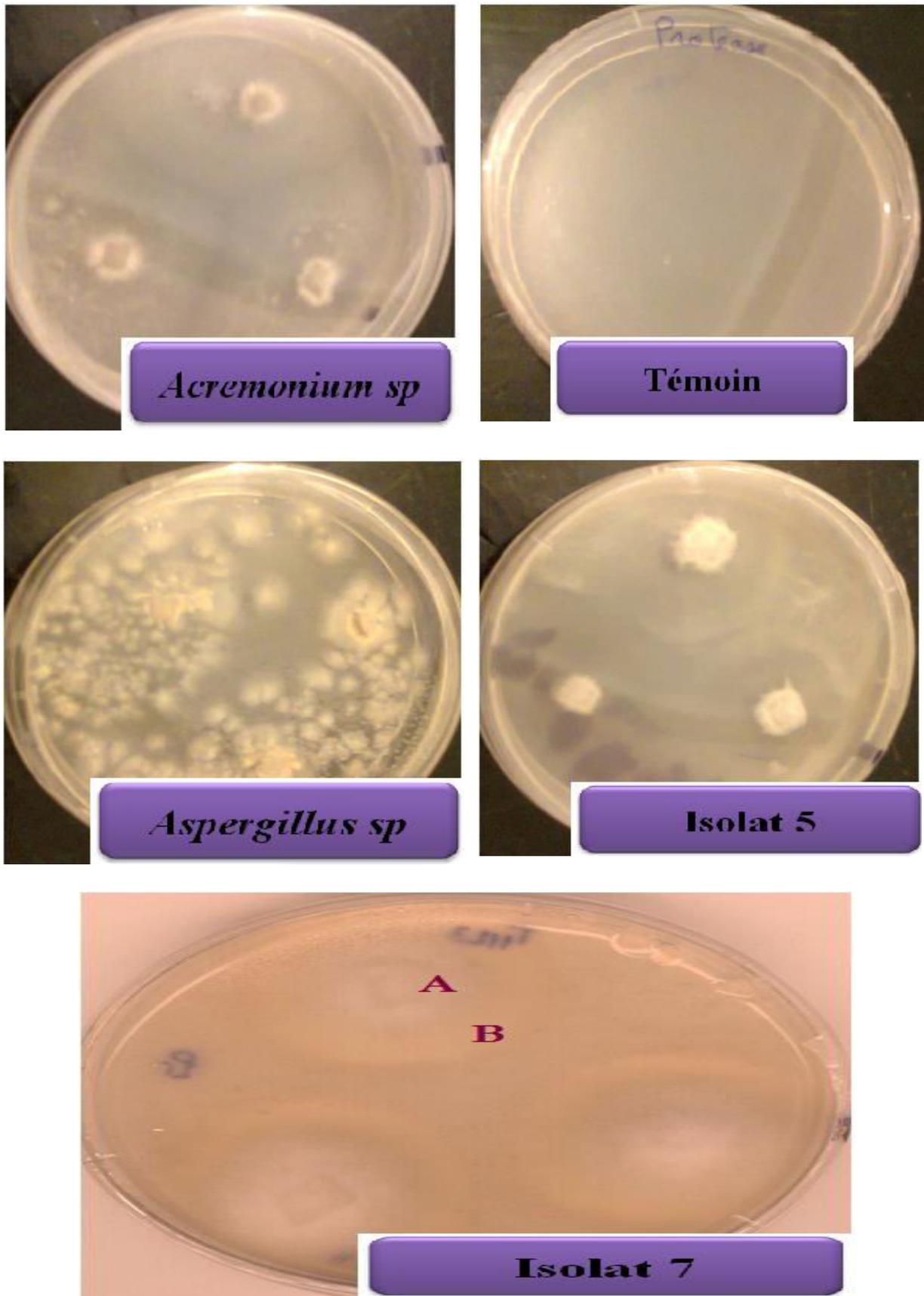


Figure 17 : Production de protéase par les isolats fongiques.

A : Disque mycélien

B : Halo transparent.

III.2. Analyse statistique :

III.2.1. Effet des métabolites secondaires sur les isolats fongiques : D'après les résultats obtenus dans cette expérimentation, l'étude statistique par l'analyse de la variance et de l'écart-type, aussi l'étude du coefficient de corrélation entre les différents isolats fongiques endophytes ; nous a permis d'élaborer la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) et l'Analyse en Composantes Principales (ACP) pour affilier les quinze isolats fongiques par rapport au taux de production et de dresser des diagrammes en bâtons et en secteurs pour la comparaison entre les cinq métabolites secondaires.

III.2.1.1. Classification Ascendante Hiérarchique des quinze isolats fongiques (CAH) :

La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) (Figure 10 et 11) et l'Analyse en Composantes Principales (ACP) (Figure 12), montrent la présence de quatre groupes de statuts comportementaux différents.

Le groupe 1 regroupe neuf isolats fongiques qui sont : **B₁₂₈₃**, **B₂₁₇₂**, **B₂₂₃₅**, **S₂₃₇₁**, **T₁₁₂₃**, **T₁₁₇₂**, **T₂₂₅₇**, **T₂₂₁₀₉**. Ce groupe est corrélé positivement avec les vecteurs, c'est-à-dire les isolats fongiques sont producteurs des différents métabolites secondaires. A l'exception de l'isolat **B₂₁₁₁₀₂** qui ne produit que la protéase.

Le deuxième groupe est corrélé négativement avec les différents vecteurs. Il regroupe deux isolats fongiques **B₂₃₈₇**, **B₁₃₃₁** qui sont producteurs des métabolites secondaires.

Le groupe trois représente le groupe qui est corrélé négativement aux vecteurs. Il englobe l'isolat **T₁₂₁₂₂**, **B₂₁₉₈** et l'isolat **S₂₃₈₁** qui sont producteurs des métabolites secondaires.

L'isolat **B₂₁₁₃₁**, constitue le groupe quatre qui est corrélé négativement avec les vecteurs. Il produit que la protéase et l'acide indole acétique.

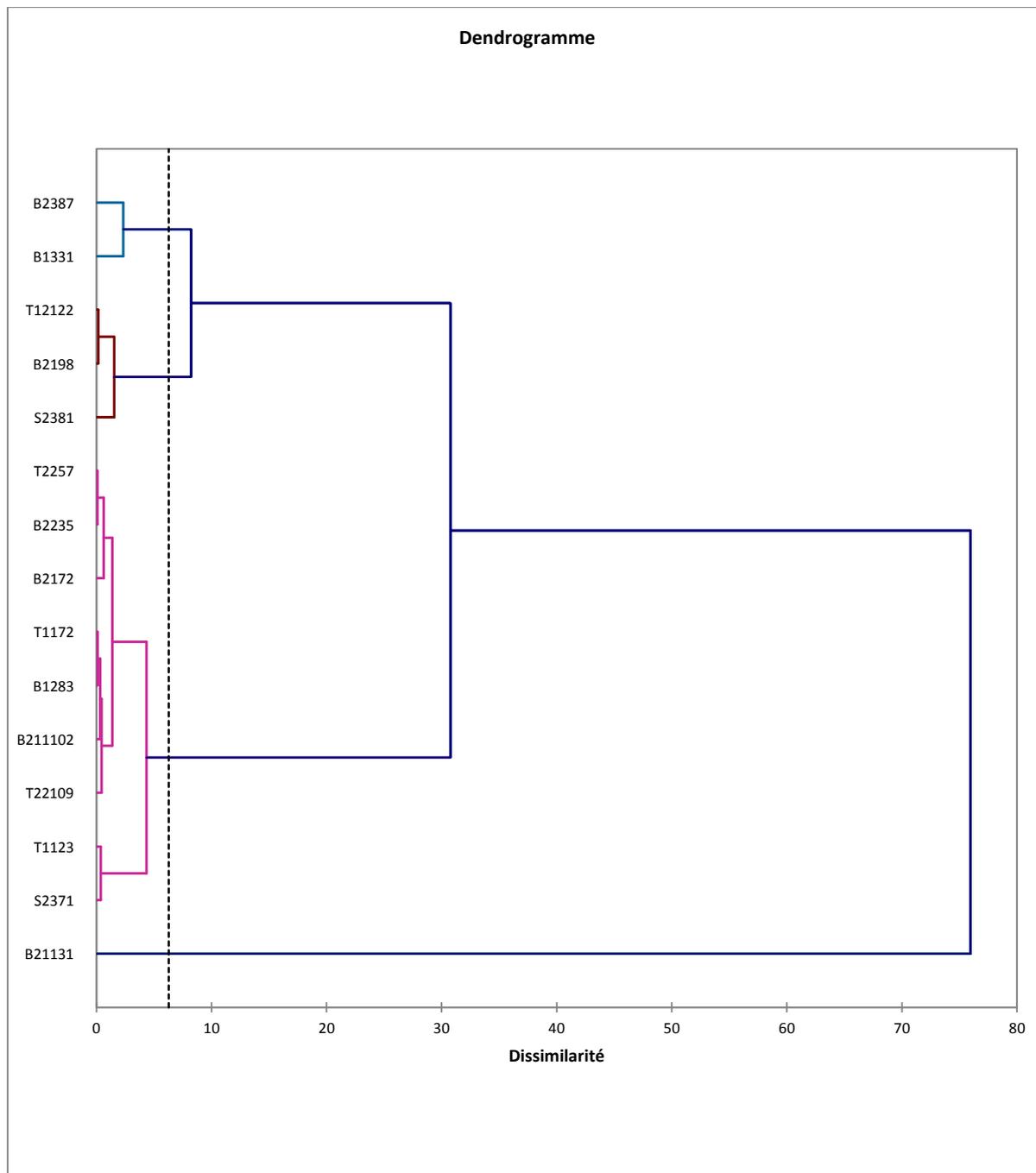


Figure 18 : Classification ascendante hiérarchique des différents isolats fongiques.

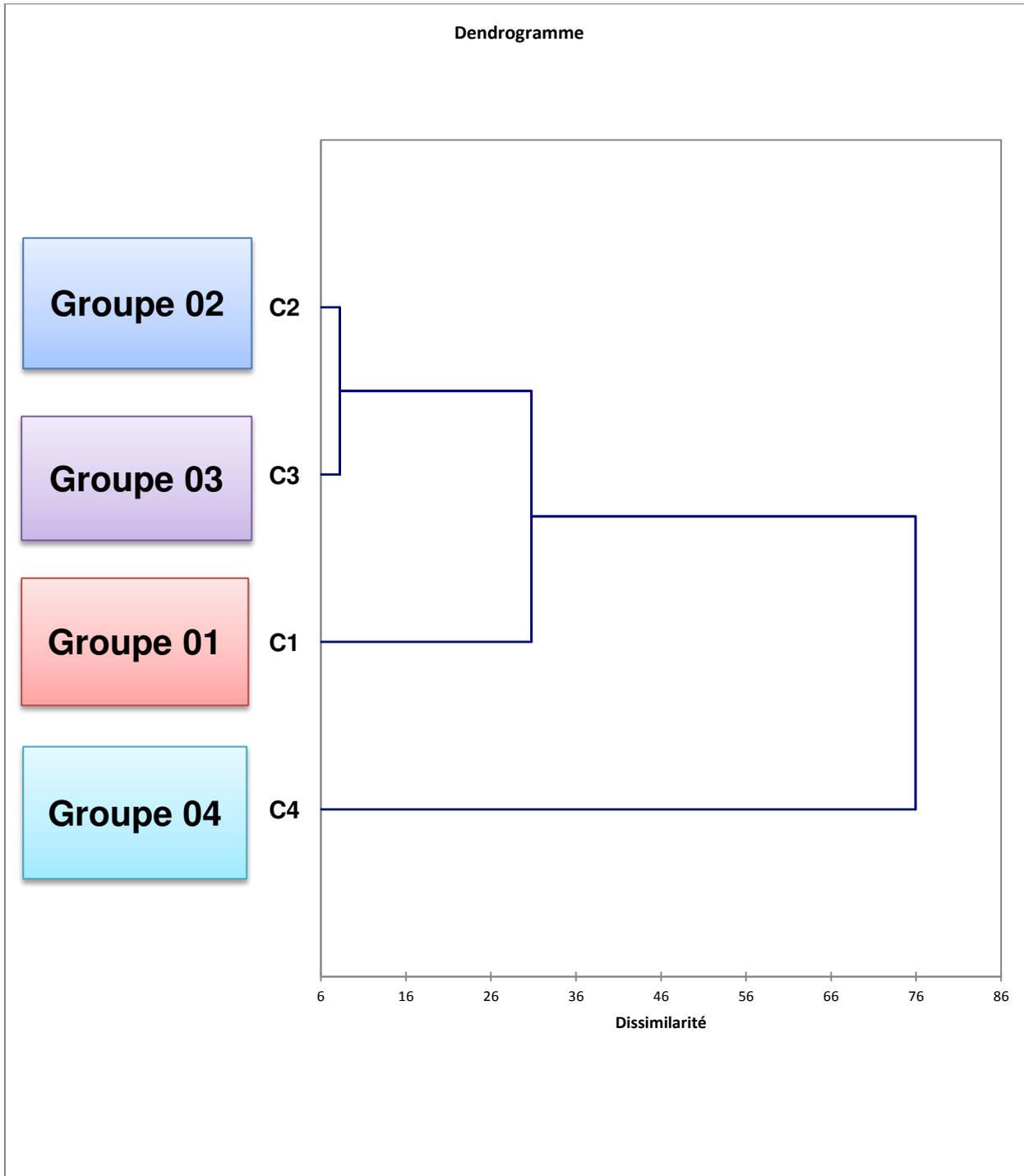


Figure 19 : Classification ascendante hiérarchique des différents isolats fongiques répartis en quatre groupes.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

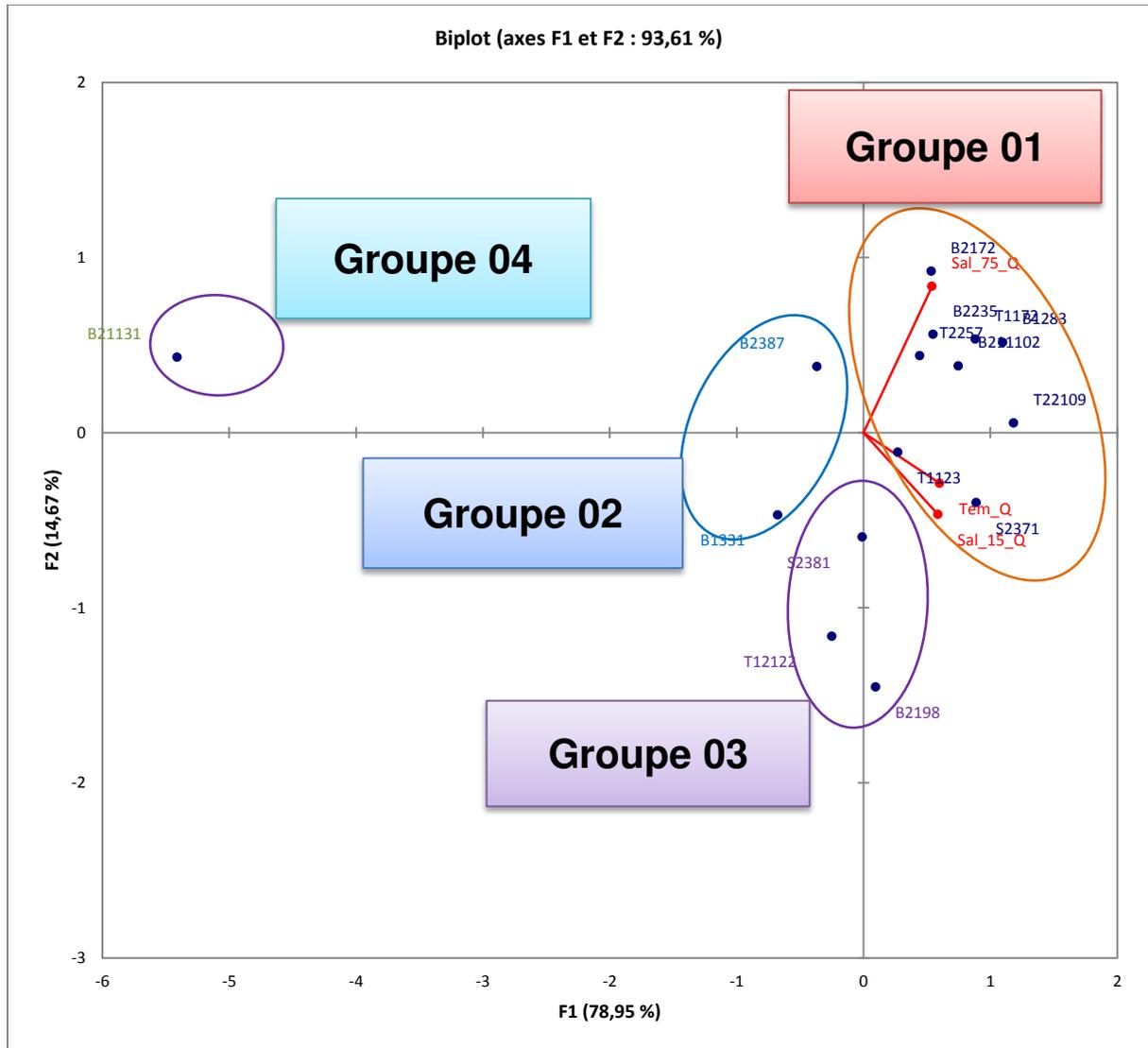


Figure 20 : Analyse en Composante Principale (ACP) des isolats fongiques testés.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

III.2.2. Différence entre les isolats fongiques producteurs et non producteurs des métabolites secondaires:

Il s'avère intéressant de représenter nos résultats en diagrammes en bâtons et en secteurs pour les comparer :

- ✓ Par ailleurs, la figure 21 montre que pour le test de production de l'acide indole acétique ; la plupart des isolats n'ont pas la capacité de sécréter cette auxine ; représenté par la fréquence de 53,33%. Par contre les isolats qui produisent l'auxine sont représentés par la fréquence de 46,67%.
- ✓ La figure 22 révèle que les dix isolats fongiques endophytes produisant l'acide cyanhydrique à un taux de production très élevé ; il est de 66,67% et pour les isolats ne produisant pas, il est donc de 33,33%.
- ✓ La figure 23, montre une faible fréquence de production de la phosphatase, elle est de 46,67%.
- ✓ La figure 24 montre que tous les isolats fongiques ne produisent pas la pectinase avec une fréquence de 100%.
- ✓ La figure 25 montre qu'il y a une production maximum de la protéase par les isolats fongiques endophytes avec une fréquence de 100%.

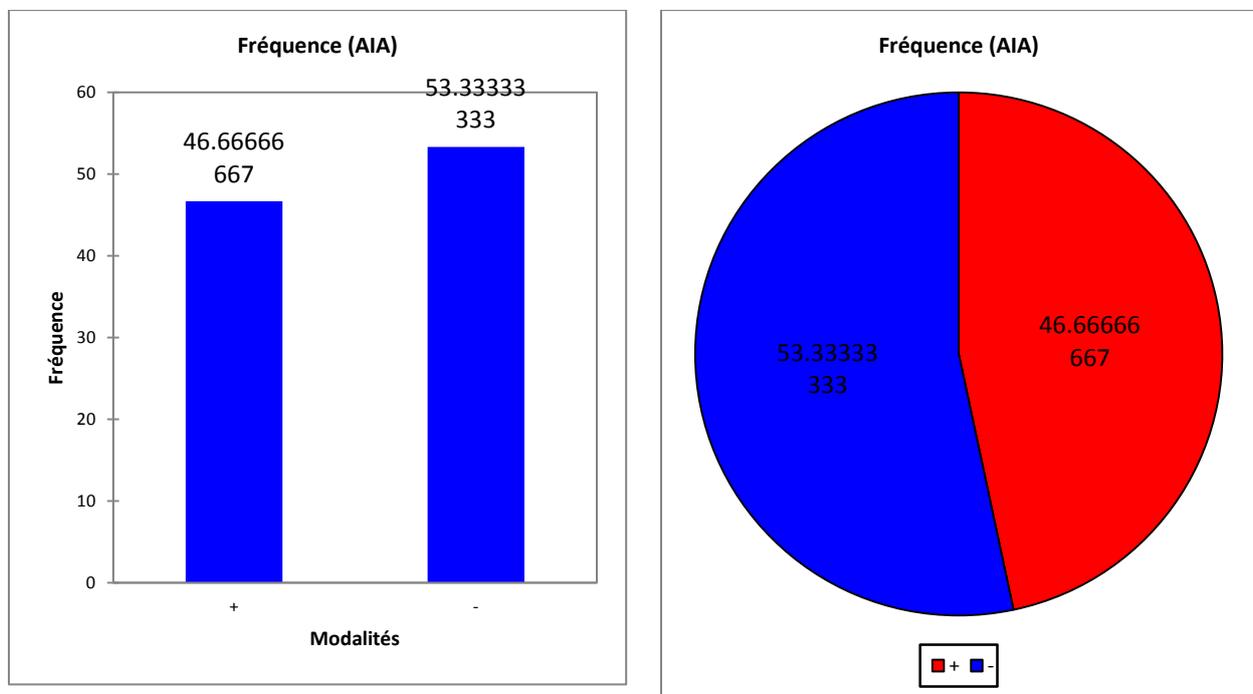


Figure 21 : Taux de production de l'acide indole acétique.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

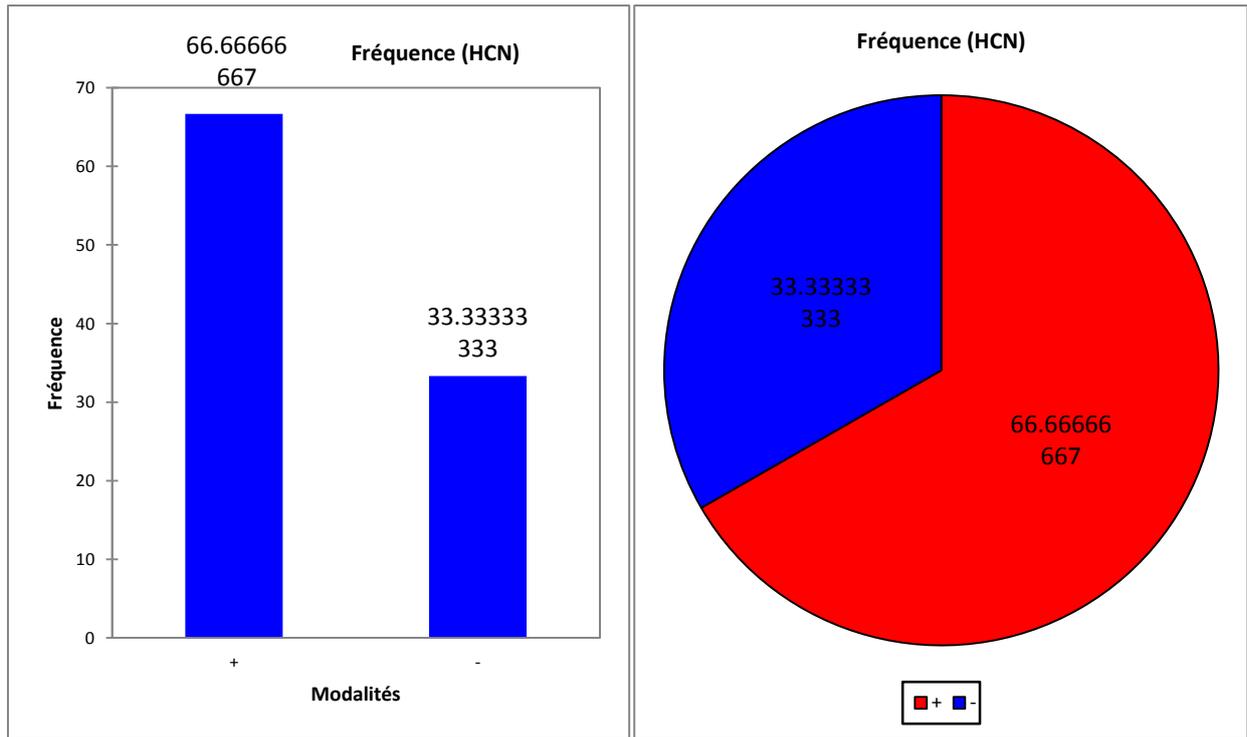


Figure 22: Taux de production de l'acide cyanhydrique.

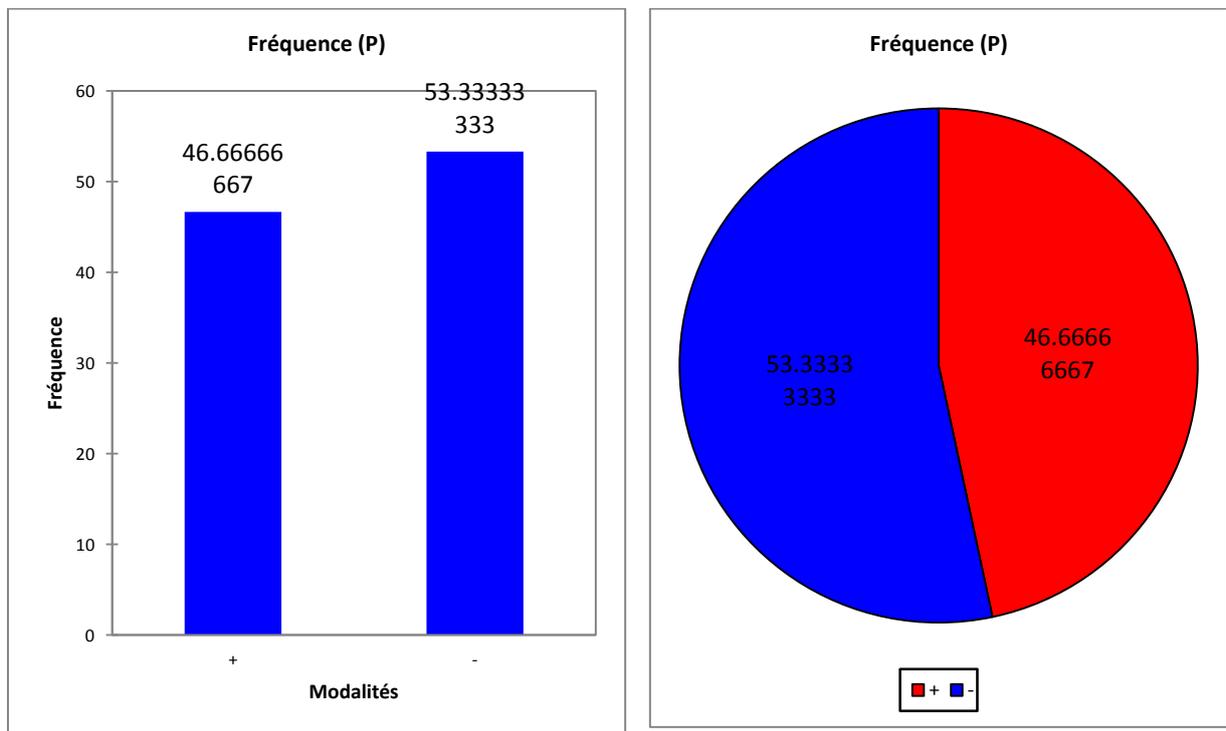


Figure 23 : Taux de production de la phosphatase.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

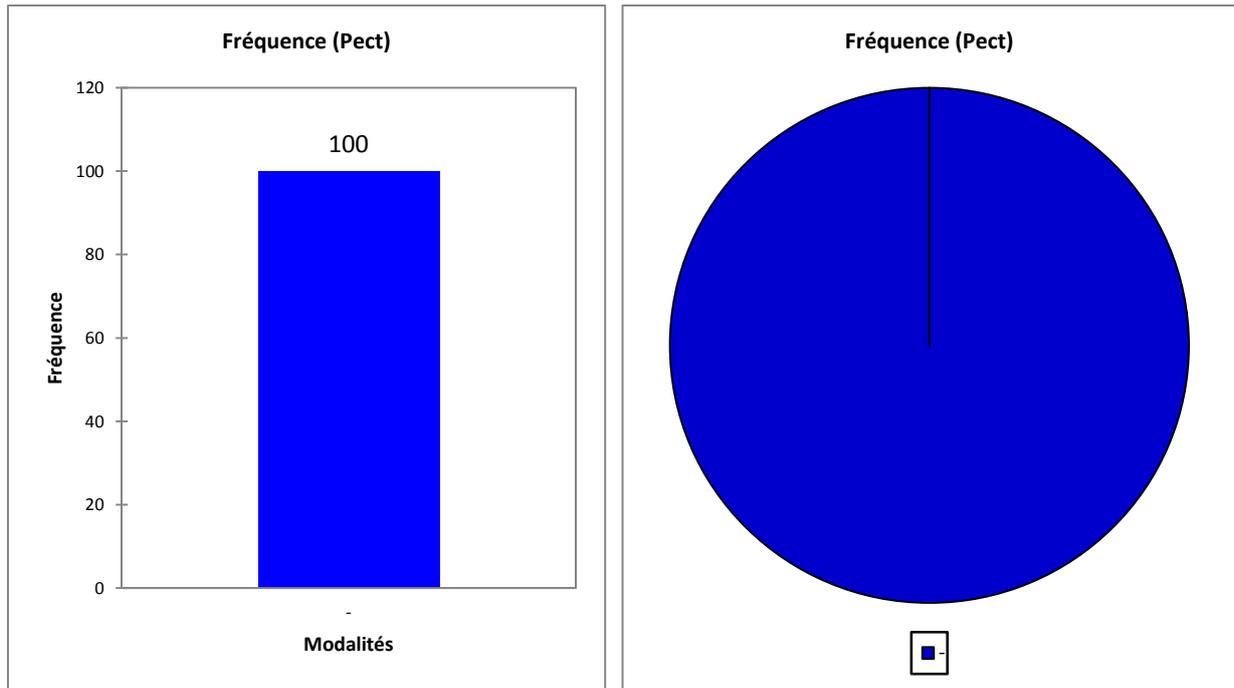


Figure 24 : Taux de production de pectinase.

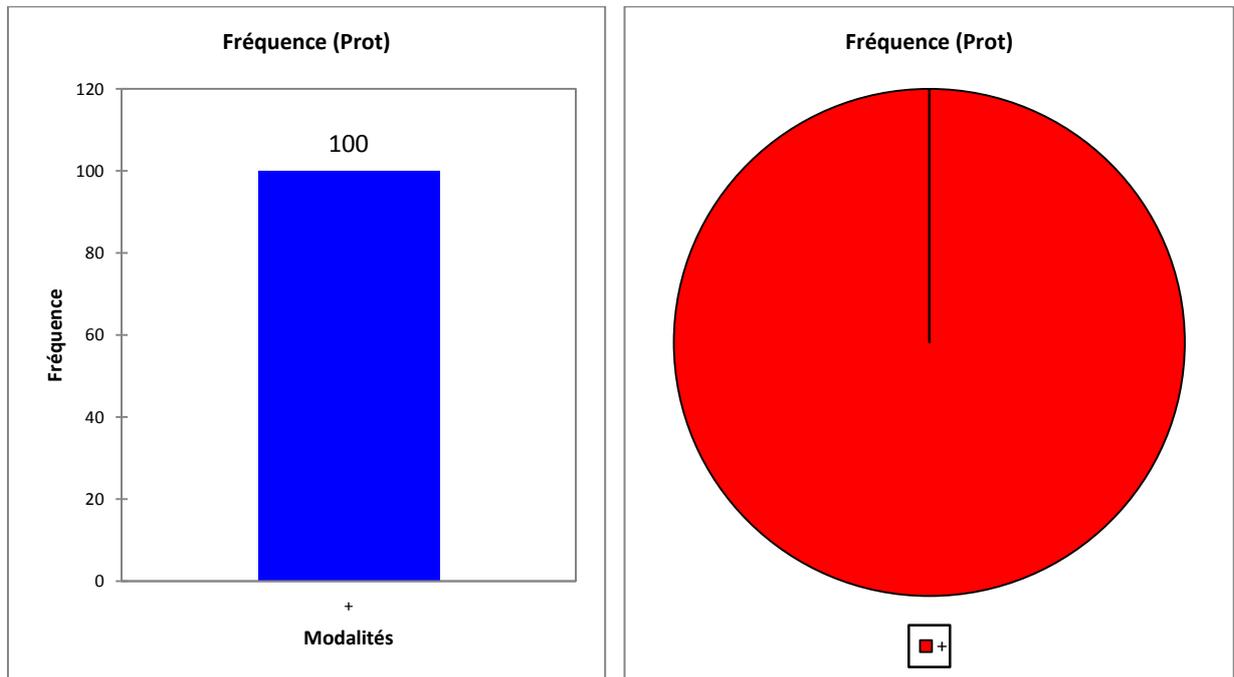


Figure 25 : Taux de production de protéase.

III.3. Tolérance à la salinité :

Le test de salinité détermine la tolérance des isolats fongiques au stress salin ; pour la première concentration [15] de NaCl, on a eu une bonne moyenne de diamètres de croissance du champignon (Figure 18) qui varie de 73,5 à 85mm par rapport au témoin à l'exception de l'isolat B₂₁₁₃₁ qui donne une moyenne de diamètres de croissance mycélienne de 38,5mm, après 62 jours d'incubation il est de 45mm (Tableau 4).

Pour la deuxième concentration [75] de NaCl ; la croissance mycélienne des isolats fongiques a été faible (Figure 18) par rapport au témoin, la moyenne de diamètres de croissance varie de 32,5 à 83mm. L'isolat B₂₁₁₃₁ n'a aucun développement dans cette concentration ; mais après 55 jours on a observé une moyenne de diamètres de croissance de 12mm (Tableau 4).

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

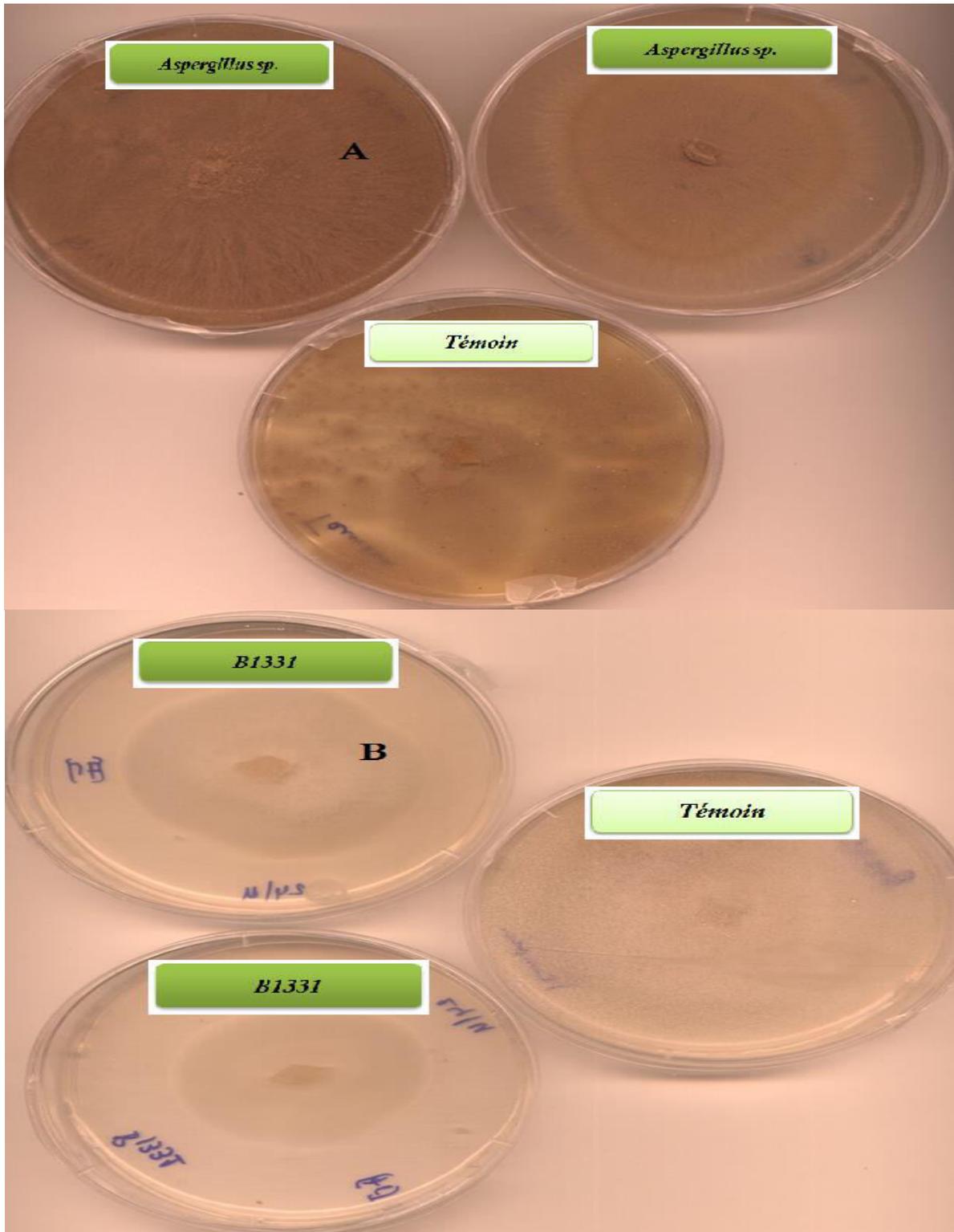


Figure 26 : Croissance des mycètes dans la concentration [15] et [75] de NaCl.

A : Croissance du mycélium a une concentration de 15g de NaCl.

B : Croissance du mycélium a une concentration de 75g de NaCl.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Tableau 4 : Croissance des isolats fongiques dans le milieu PDA additionne de 15g et de 75g de chlorure de sodium :

Isolats fongiques	Diamètre de Témoin (Mm)	Moyenne des diamètres de la concentration [15] (Mm)	Moyenne des diamètres de la concentration [75] (Mm)
B ₁₂₈₃	76	83	83
B ₁₃₃₁	60	80	43,5
B ₂₁₇₂	75	73,5	82,5
B ₂₁₉₈	78	85	32,5
B ₂₂₃₅	78	74,5	75,5
B ₂₃₈₇	55	80,5	64,5
B ₂₁₁₃₁	25	38,5	00
B ₂₁₁₀₂	72	82,5	76,5
S ₂₃₇₁	80	85	62,5
S ₂₃₈₁	80	75,5	46
T ₁₁₂₃	75	78,5	60
T ₁₁₇₂	77	79,5	80
T ₂₂₅₇	79	73,5	71,5
T ₁₂₁₂₂	75	80,5	33,5
T ₂₂₁₀₉	80	85	75

Par conséquent, ces champignons sont des micro-organismes qui produisent les enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques tels les protéases même peut être les chitinases. Ils favorisent la croissance des plantes parce qu'ils produisent les métabolites secondaires comme les auxines et les composés organiques volatiles et se sont des champignons halophiles extrêmes qui tolère le sel jusqu'à 75g.

Tableau 3 : Production des métabolites secondaires :

Isolats fongiques	Métabolites secondaires	Acide indole- acétique (AIA)	Acide cyanhydrique (HCN)	Phosphatase (P)	Pectinase (Pc)	Protéase (Pr)
B₁₂₈₃		++	+++	*	-	+
B₁₃₃₁		-	+	+	-	+
B₂₁₇₂		-	+	-	-	+
B₂₁₉₈		-	+++	-	-	+
B₂₂₃₅		+	+	*	-	+
B₂₃₈₇		++	+	-	-	+
B₂₁₁₃₁		+	-	-	-	+
B₂₁₁₁₀₂		-	-	-	-	+
S₂₃₇₁		+	-	-	-	+
S₂₃₈₁		-	+	-	-	+
T₁₁₂₃		-	-	+	-	+
T₁₁₇₂		++	++	*	-	+
T₂₂₅₇		++	+++	*	-	+
T₁₂₁₂₂		-	+	-	-	+
T₂₂₁₀₉		-	-	+	-	+

+ : Production.

- : Pas de production.

* : Vert clair.

CHAPITRE IV: DISCUSSION

Les champignons endophytes des racines sont considérés comme des alternatives prometteurs pour remplacer les fertilisants chimiques et les pesticides dans les systèmes d'agriculture durable et biologique. La formation de structure des champignons endophytes joue un rôle primordial dans l'association symbiotique intracellulaire avec les racines des plantes (Abdellatif *et al.*, 2009). Il est établi que les zones arides en général sont peu riches en espèces biotiques, néanmoins, elles abritent de nombreuses espèces indigènes animales, végétales et microbiennes, ayant élaborés des stratégies particulières pour s'adapter aux conditions environnementales extrêmes (LeBerre et Ramousse, 2001). Par ailleurs, Badrani (1995) a indiqué que les sols steppiques sont caractérisés par la présence d'accumulation calcaire, le faible teneur en matière organiques, en azote et une forte sensibilité à l'érosion et à la dégradation (les ressources hydriques sont faibles). Ainsi, les sols arides de Sud d'Algérie (Adrar) qui constituent des milieux pratiquement extrêmes semblent être des environnements promoteurs pour isoler des mycètes producteurs de nouveaux métabolites secondaires.

La capacité de production des métabolites secondaires, telles que les molécules antibiotiques, ont favorisé l'utilisation biotechnologique des champignons. On recensait en 2006 plus de 8600 métabolites bioactifs produits par des souches fongiques, dont 4900 auraient une activité antibiotique. La majorité des organismes producteurs de molécules bioactives seraient filamenteux et une très faible part d'organismes levuriformes serait impliquée. Par exemple, 900 composés bioactifs ont pu être isolés des champignons du genre *Penicillium* (Bérdy, 2005). Cependant, en considérant le grand nombre d'espèces fongiques non cultivées, de nombreuses souches productrices de molécules bioactives restent à découvrir.

Pour exploiter efficacement sa niche écologique, les endophytes ont besoin de concurrence avec d'autres endophytes, agents pathogènes et la plante hôte ; les antibiotiques entant que métabolites secondaires jouent un rôle important dans le processus. De nombreux champignons endophytes produisent des métabolites secondaires et certains de ces composés sont antifongiques et antibactériens qui inhibent fortement la croissance d'autres microorganismes. Ces organismes se sont avérées être une source exceptionnellement riche de nouveaux produits naturels, et constituent une source précieuse de métabolites secondaires bioactifs (Li *et al.*, 2000). Les métabolites secondaires isolés des microorganismes et qui exhibent soit une activité antimicrobienne (antibactérienne, antifongique ou anti-protozoaire), anti-tumorale et/ou antivirale, sont dits antibiotiques. Les antibiotiques incluent un groupe organique chimiquement hétérogène, de faible poids moléculaire, produits par des microorganismes, à de faibles concentrations, ayant une activité délétère sur la croissance et les activités métaboliques d'autres microorganismes (Fravel, 1988 ; Thomashow *et al.*, 1997).

L'étude est faite sur quinze (15) isolats fongiques testés *in vitro*, pour déduire leur capacité de produire deux (2) hormones (AIA, HCN) et trois (3) enzymes (Phosphatase, Protéase, Pectinase) et même leur tolérance au sel.

Aussi, la stratégie de notre travail repose sur deux axes principaux :

- 1- Estimation des métabolites secondaires synthétisés par des isolats fongiques isolés à partir des sols des régions arides et des racines du palmier dattier ;
- 2- Etudier la tolérance de ces isolats fongiques à la salinité.

D'après les résultats obtenus, on a constaté que 46,67% des isolats fongiques ont pu synthétisés les auxines (l'acide Indole-3 acétique) en présence de tryptophane.

Les auxines sont des hormones impliquées dans divers aspects de la croissance et le développement des plantes. Elles régulent plusieurs fonctions dans les plantes, y compris la croissance des racines, tropisme, la dominance apicale, la sénescence des tissus végétaux et l'expansion des cellules (Davies, 2004).

L'acide Indole-3 acétique (AIA) est l'auxine la plus commune, elle est produite par les plantes ; par les apex de la tige et sa concentration est la clé de régulation de la croissance des plantes et leur développement (Muller, 2003).

Le tryptophane est naturellement secrété dans les exsudats racinaires, et la plus part des auxines retrouvées dans la rhizosphère proviennent de l'activité biosynthétique des microorganismes. Parmi les souches productrices d'AIA, le *Fusarium* sp. et le Noire+pigment blanc ont produits de l'AIA en présence de tryptophane, alors que l'*Aspergillus* sp. a produit une quantité d'AIA importante en présence de la même quantité de tryptophane 1,02g/l. Karnwal (2009), a montré que *P. aeruginosa* AK2 produisait quatre fois plus d'AIA que la souche *P. fluorescens* AK1 en absence de tryptophane, alors qu'en augmentant la concentration de ce dernier de 0,05 à 0,2g/l (50 à 200µg/ml), voyait la concentration d'AIA triplait ou quadruplait. La synthèse d'AIA est largement réponde chez les rhizobactéries. Nos observations sont en accord avec celles de Naik et Sakhivel (2006), qui avaient suggéré l'induction de la production d'AIA en phase stationnaire de croissance, probablement due à l'induction d'enzymes clé impliquées dans la biosynthèse d'AIA (Garcia de Salmone *et al.*, 2001).

Dans le premier test ; la différence entre l'apparition de la couleur rose et la couleur marron est peut être due à la variation des différents composés secrétés tels que : l'acide Indole-3 acétique, indole-3 éthanol et plusieurs indole-glycérols suggère qu'ils peuvent également avoir un impact physiologique chez la plante. Bien que la plupart d'entre eux ont été isolé à partir des endophytes cultivés *in vitro* et même des extraits de culture de *Neotyphodium tembladerae* et *Epichloe festucae* ; l'acide Indole-3 acétique, indole-3 éthanol, ont été identifiés et avérés inhibitrices à d'autres champignons (Yue et al. 2000).

L'étude des composés organiques volatils (COVs) fongiques a pris du retard par rapport à l'étude des autres métabolites fongiques due aux contraintes méthodologique et technologique. En outre, la production des COVs est biologiquement dynamique.

Beaucoup de composés organiques volatils (COVs) ont des odeurs distinctives de sorte qu'il n'est pas surprenant que l'intérêt pour les COVs fongiques a commencé avec les champignons que les humains peuvent sentir. Par exemple, les bouquets distincts des macro-champignons tels que les champignons et les truffes, très appréciés dans les arts culinaires, y compris des mélanges de différents COVs, des alcools, des aldéhydes, des terpènes, des hydrocarbures aromatiques et des thiols dominent (Cho *et al.*, 2008 ; Fraatz et Zorn, 2010). Le profil de COV d'une espèce ou d'une souche sera varier en fonction du substrat, de la durée de l'incubation, type de nutriments, la température, et d'autres paramètres de l'environnement (Fiedler *et al.*, 2005).

Dans la collection dix isolats ont produits de l'HCN. Parmi eux *Fusarium sp.*, Le Noire et la souche la plus productive de l'HCN est bien *Aspergillus sp.*, caractérisée par l'aspect noirâtre du papier filtre. Alors que cinq isolats fongiques n'ont pas produits de l'HCN. Certains PGPR produisent des antibiotiques volatiles, dont le plus important est l'HCN qui inhibe le cytochrome oxydase de nombreux organismes. Les souches productrices possèdent une cytochrome oxydase alternative résistante à l'HCN, et sont relativement insensibles à ce dernier. On ne lui connaît pas de rôle comme métabolite primaire. Le cyanure d'hydrogène est un métabolite secondaire produit par les bactéries à Gram négatifs *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, et *Chromobacterium violaceum*. L'HCN et le CO₂ se forment à partir d'un acide aminé en l'occurrence la glycine par l'HCN synthétase (Castric, 1994).

Chez les *Pseudomonas sp.* Cette enzyme oxyde la glycine en présence d'accepteurs d'électrons, comme le méthosulfate phénazine. *P. fluorescens* CHAO est une bactérie aérobie, agent de biocontrôle, colonisant les racines et protégeant de nombreuses plantes des maladies causées par les champignons telluriques. La production d'HCN par la souche CHAO est suppressive vis-à-vis de la pourriture noire du tabac causé par *Thielaviopsis basicola*. GacA- mutant de la souche CHAO, défectueux en la production d'HCN, d'antibiotiques et d'exo-enzymes, perd son habilité à protéger le tabac de la pourriture noire (Sacherer *et al.*, 1994).

Le phosphore, est le second macronutriment requis pour la croissance des plantes après l'azote. Et même dans des sols qui en sont riches, le phosphore se trouve sous une forme insoluble: oxydes de fer et d'aluminium dans les sols acides, et oxydes de calcium dans les sols basiques, et seulement une faible proportion (0.1%) est assimilable par les plantes. En plus les ¾ du phosphore apporté par les fertilisants appliqués au sol précipitent en des formes insolubles, augmentant ainsi le besoin des cultures en cet élément (Goldstein, 1986).

Le test fait sur la solubilisation du phosphore montre que parmi les isolats testés, le genre *Aspergillus* et le genre *Acremonium* ont un pouvoir producteur de phosphatase.

Les bactéries solubilisant le phosphore (PB) secrètent des acides organiques et des phosphatases, qui convertissent les formes insolubles de phosphates en ions de phosphates

soluble monobasique ($H_2PO_4^-$) et dibasique (HPO_4^{2-}). Ce phénomène est attribué à la solubilisation minérale du phosphate (MP). Quelques uns de nos isolats solubilisent le phosphate, mais cette solubilisation n'est pas due à une production d'acides organiques, mais plutôt à une production d'enzymes.

D'après le test de pectinase ; tous les isolats (15) fongiques n'ont pas la capacité de dégrader la pectine qui peut être d'ordre physiologique ou bien génétique ou par rapport au produit (Pectine). Les enzymes pectiques sont induits en présence des substances pectiques par les mycètes pathogènes et endophytes. Les pectinases microbiennes sont importantes dans le processus phytopathologiques, symbiotique dans l'interaction plante-microorganisme et dans la décomposition de la matière végétale morte (Bezerra et al., 2012). La dégradation du tissu de la plante-hôte par des phytopathogènes commence généralement par la production des enzymes pectinolytiques, qui sont les enzymes principales impliquées dans l'attaque des plantes (Brett, 1990 et Hoondal et al., 2002). Si un endophyte peut dégrader les substances pectiques, ceci implique que le mycète est susceptible d'être un microbe pathogène latent (Choi et al., 2005). Schulz et Boyle, 2005 présument que l'interaction endophyte fongique-plante hôte est caractérisée par l'équilibre entre la virulence fongiques et la défense de la plante, si cet équilibre est troublé par une diminution de la défense de la plante ou une augmentation de virulence fongique, la maladie se développe.

La protéase ; est une enzyme qui dégrade les protéines, elle est produite par tous les isolats fongiques testés. En comparant avec les travaux de (Sunitha et al., 2013) de l'activité extracellulaire maximum de protéase dans les espèces d'*aspergille*, d'*Isaria* suivies de *fusarium solani*. Les espèces d'*aspergille* et un mycélium stérile, *Colletotrichum* et *Alternaria* isolé à partir de *calcarata d'Alpinia* ont montré l'activité modérée de protéase. Bezerra et al., 2003 ont rapporté que 88% d'isolats pectinolytiques positifs de moulin *ficus-indica d'opuntia*. Venkatesagowda et al., 2012 a rapporté l'activité protéolytique est élevée chez les endophytes *gloeosporioides*, *citrinum d'aspergille noir*, de *penicillium* et de *palmarum de Pestalotiopsis*. Jalgaonwala et Mahajan, 2011 ont rapporté que le mycélium stérile des racines de *roseus de Catharanthus* ont eu une plus grande activité protéolytique qu'autre les isolats fongiques examinés. L'activité de protéase a été également vue dans certains endophytes par Maria et al., 2005.

Les résultats montrent qu'il existe trois isolats fongiques qui sont halotolérants et producteurs de métabolites secondaires et qui ont des capacités antagonistes d'après (Hamel et Samet, 2011).

Ces trois isolats (B₁₂₈₃, T₁₁₇₂, T₂₂₅₇) appartiennent au genre *Aspergillus*, ils tolèrent le sel jusqu'à 75g/l, ils produisent l'acide indole acétique, acide cyanhydrique, la phosphatase et la protéase. *Acremonium sp.* représenté par l'isolat T₂₂₁₀₉ tolère le sel jusqu'à 75g/l, il produit la phosphatase et la protéase

D'après Hamel et Samet (2011) ces trois isolats (B₁₂₈₃, T₁₁₇₂, T₂₂₅₇) appartiennent au genre *Aspergillus*, ont un taux d'inhibition de 57,09% vis-à-vis *Fusarium oxysporum f.sp. albidinis* et 66,66% vis-à-vis *Fusarium oxysporum f.sp. albidinis* ; la souche de référence et *Acremonium sp* a un taux d'inhibition de 54,54% vis-à-vis *Fusarium oxysporum f.sp. albidinis* et 56,11 vis-à-vis *Fusarium oxysporum f.sp. albidinis* ; la souche de référence.

Par ailleurs, lorsque la conductivité électrique (CE), facteur indiquant le degré de la salinité, est supérieure à 10, c'est-à-dire la concentration en sel du sol est très élevée (la salinité élevée). Ainsi, Sardin *et al.*, (2003) ont indiqué que la salinité du sol aride est devenue une issue environnementale importante et la salinité excessive dans le sol a été considérée comme un facteur limitateur principal pour la croissance des plantes et la production végétale et limite la flore microbienne. En outre, la salinité du sol peut diminuer l'activité microbienne et amoindrir le cycle d'éléments nutritifs.

Les résultats des tests de tolérance à la salinité ont révélé qu'*Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.2*, *Acremonium sp.*, sont de nature halotolérant et il se développe normalement sur des milieux de culture contenant jusqu'à 75 g/L de NaCl. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Gund-Cimerman *et al.*, (2002) révélant que des mycètes ont été découverts dans des environnements contenant des concentrations de 15 à 332 % de NaCl, où jusqu'ici supposé, seules les bactéries pouvaient se développer. Par ailleurs, Kispapo *et al.*, (2003) ont rapporté que récemment, des variétés de mycètes filamenteux ont été isolées à partir de la mer morte (340 g/l de NaCl). Pour s'adapter à ces conditions, les halophiles accumulent généralement des concentrations élevées des substances dissoutes ou les osmolytes et des cryoprotectants dans leur cytoplasme. Les osmolytes qui s'accumulent dans la cellule des halophiles sont habituellement des acides aminées et des polyols comme ; de Bétaine, de glycine, de l'acétoïne, de tréhalose et de glycérol qui ne perturbent pas le processus métaboliques et qui n'ont aucune charge à l'exception de leur effet sur le pH (DasSarma et Arora, 2001 ; Kojeg *et al.*, 2006).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'écologie fongique est basée sur le groupe des plantes symbiontes qui ont été appelées collectivement «endophytes microbiens». De façon générale, les endophytes microbiens sont couramment considérés comme étant n'importe quel groupe varié de bactéries, de cyanobactéries ou de champignons qui colonisent les tissus internes des plantes. S'ils sont partiellement endophytes ou entièrement endophytes, ils sont venus pour représenter une pléthore «d'avantages inconnus» pour les plantes, parmi eux ; la bio-stimulation de la croissance et l'antagonisme par le biais des sources potentielles de nouveaux métabolites secondaires qui pourraient servir en produits agrochimiques et en médecine (Alvarez-Loayza *et al.*, 2011).

La présente étude a examiné l'état actuel des connaissances sur nos champignons endophytes, ainsi que de sélectionner et de mettre en évidence la gamme des métabolites secondaires produits par ces champignons. Nous avons montré dans cette étude les potentialités de production *in vitro* de ces métabolites chez 15 isolats fongiques endophytes. Sept champignons endophytes (Isolat 3, Isolat 4, Isolat 5, *Fusarium sp.*, et trois isolats du genre *Aspergillus*) ont produits l'AIA ou les produits apparentés, et dix champignons

(Isolat 1, Isolat 2, Isolat 3, Isolat 4, Isolat 6, Isolat 8, *Fusarium sp.*, et trois isolats du genre *Aspergillus*) ont produits l'HCN considéré comme un antibiotique pourraient avantager l'isolat dans sa compétition et son adaptation à divers écosystèmes.

Sept champignons (Isolat 1, Isolat 3, Isolat 7, *Acremonium sp.*, et trois isolats du genre *Aspergillus*) ont la capacité de solubiliser les phosphates par la production des phosphatase. La production des enzymes protéolytiques (qui peuvent intervenir dans le parasitisme) a été retrouvée chez tous les isolats étudiées, par contre la pectinase n'a pas été produite par tous les quinze isolats fongiques endophytes.

Tandis que la culture des isolats fongiques sur milieu PDA contenant des concentrations progressives du NaCl allant de 0 ; considéré comme témoin, jusqu'à 75g/L a permis de constater que la croissance des isolats est normale même à 75 g/L ; les quinze champignons endophytes tolère le sel, les champignons (Isolat 1, Isolat 3, Isolat 4, Isolat 6, Isolat 7,

Isolat 8, Isolat 2, *Penicillium sp.2*, *Acremonium sp.*, deux isolats du genre *Fusarium* et trois isolats du genre *Aspergillus*) sont des halophiles extrêmes qui tolère le sel à 75g/l et le champignon (Isolat 5) est halophile modéré n'a pu se développer à 75g/l. Ces trois isolats (B₁₂₈₃, T₁₁₇₂, T₂₂₅₇) appartiennent au genre *Aspergillus*, ils tolèrent le sel jusqu'à 75g/l, ils produisent l'acide indole acétique, acide cyanhydrique, la phosphatase et la protéase.

Dans une certaine mesure, la grande majorité d'endophytes sont des microbes mystérieux dont les valeurs potentielles doivent être découvertes encore. Au terme de cette étude, nous fixons certains points en perspectives ; Nos travaux sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- ✚ Isolement, purification et identification des métabolites secondaires produits par les champignons endophytes et la détermination des autres métabolites secondaires produits par les isolats fongiques étudiés.
- ✚ Quantification de la production enzymatique de ces champignons endophytes.
- ✚ Identification du genre et de l'espèce de chaque isolat endophyte et identification des champignons endophytes qui se fera à l'échelle moléculaire par séquençage de la sous-unité 18S et des ITS de l'ADNr puis comparaison des séquences obtenues avec les bases de données.
- ✚ Etudier le test d'antagonisme *in vitro* et *in situ* des isolats endophytes (Blanc 2, *Aspergillus sp.*) avec des champignons phytopathogènes et caractériser la nature des antibiotiques secrétés.
- ✚ Etudier la tolérance des quatre isolats (Blanc 2, *Aspergillus sp.*) aux stress abiotique aux conditions extrêmes de différentes température 60, 80, 90 et 100 °C et de salinité allant jusqu'à 300g/l.

Annexe 1

Milieux de culture utilisés

(MEA, Malt Extract Agar) : (Dutton et Penn, 1989). Milieu préparé déshydraté	
Poudre	35,6g
Eau distillée	1L
PH= 4,6	

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) : (Johnston et Booth, 1982).	
Pomme de terre	200g
Dextrose	20g
Agar	17g
Eau distillée	1L
PH= 6,8	

Milieu LBT (Luria Bertani enrichi du tryptophane) : (Bric et <i>al.</i>, 1982).	
Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
L-tryptophane	1,02g
Gélose	20g
Eau distillée	1L
Agar	20g
PH= 7,5	
La préparation de réactif de Salkowski est opérée sous une haute aspiratoire réservée pour la manipulation des produits chimiques (en mélangeant ; 2% de FeCl ₃ à 0.5M dans 35% d'acide perchlorique).	

Milieu de production d'H₂CN : (Lorck, 1948).	
Milieu PDA + 4,4gde glycine.	
PH= 6,8	

Milieu de production de pectinase : (Cattelan et <i>al.</i>, 1999).	
Milieu minimum M9 agar + 10g de pectine + 1,2g d'extrait de levure.	
PH= 6,8	

Milieu PVK (Pikovskaya, 1948).	
(NH ₂) ₂ SO ₄	0,5g
Extrait de levure	0,5g
Phosphate bicalcique	5g
KCl	0,2g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1g
Glucose	10g
MnSO ₄	Trace
FeSO ₄	Trace
Bleu bromophénol	4ml/l
Eau distillée	1L
Agar	17g
PH= 6,7	

Milieu minimum M9 Agar (Miller, 1974)	
Na ₂ HPO ₄	6g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0,5g
NH ₄ Cl	1g
Eau doublement distillée	1L
Agar	20g
PH= 6,8	
Après autoclavage à 120°C et refroidissement du milieu ; on ajoute 10ml stérilisée par filtration : de 100mM MgSO ₄ , 20% de glucose, 10mM CaCl ₂ et 100 mM thiamine-HCl avant utilisation.	

Lait écrémé Agar : (Sunish Kumar et al., 2005).	
Caséine	5g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1g
Solution de 7% de lait écrémé	100ml
Eau distillée	1L
Agar	15g
PH= 7,5	

Annexe 2

Résultats des analyses statistiques de la partie *in vitro*

Statistiques descriptives

Tableau 1 : Statistiques descriptives.

Variable	Moyenne	Ecart-type	Variance
Sal_15_Q	7,700	1,139	1,297
Sal_75_Q	5,910	2,367	5,604
Tem_Q	7,100	1,466	2,149

Tableau 2 : Résultats par classe des quinze isolats endophytes fongiques.

Classe	C1	C2	C3	C4
Objets	9	2	3	1
Variance intra-classe	0,962	2,331	0,855	0,000
	B1283	B1331	B2198	B21131
	B2172	B2387	S2381	
	B2235		T12122	
	B211102			
	S2371			
	T1123			
	T1172			
	T2257			
	T22109			

Tableau 3 : Matrice de corrélation [Pearson (n)].

Variables	Sal_15_Q	Sal_75_Q	Tem_Q
Sal_15_Q	1	0,595	0,804
Sal_75_Q	0,595	1	0,647
Tem_Q	0,804	0,647	1

Tableau 4 : Valeurs propres.

	F1	F2	F3
Valeur propre	2,368	0,440	0,192
Variabilité (%)	78,946	14,668	6,386
% cumulé	78,946	93,614	100,000

Tableau 5 : Coordonnées des observations.

Observation	F1	F2	F3
B1283	1,098	0,513	-0,213
B1331	-0,675	-0,471	-0,682
B2172	0,536	0,921	0,306
B2198	0,097	-1,455	0,018
B2235	0,551	0,561	0,438
B2387	-0,365	0,376	-1,077
B21131	-5,409	0,430	0,175
B211102	0,748	0,380	-0,361
S2371	0,890	-0,402	-0,022
S2381	-0,007	-0,598	0,626
T1123	0,271	-0,113	0,116
T1172	0,882	0,533	0,064
T2257	0,446	0,437	0,570
T12122	-0,248	-1,165	0,125
T22109	1,186	0,054	-0,083

Tableau 6 : Statistiques descriptives (Données qualitatives).

Echantillon	Modalité	Effectif par modalité	Fréquence par modalité (%)
Isolats	B1283		
	B1331		
	B211102		
	B21131		
	B2172		
	B2198		
	B2235		
	B2387		
	S2371		
	S2381		
	T1123		
	T1172		
	T12122		
	T22109		
T2257			
AIA	+	7	46,667
	-	8	53,333
HCN	+	10	66,667
	-	5	33,333
P	+	7	46,667
	-	8	53,333
Pectinase	-	15	100,000
Protéase	+	15	100,000

Tableau 7: Matrice de proximité (Distance euclidienne entre les quinze isolats fongiques endophytes) :

Isolats fongiques	B1283	B1331	B2172	B2198	B2235	B2387	B21131	B211102	S2371	S2381	T1123	T1172	T2257	T12122	T22109
B1283	0	4,272	0,957	5,058	1,151	2,810	10,710	0,765	2,098	3,796	2,346	0,472	1,522	4,957	0,917
B1331	4,272	0	4,229	2,168	3,712	2,159	6,957	3,520	2,804	2,065	2,235	4,027	3,446	1,803	3,765
B2172	0,957	4,229	0	5,139	0,768	2,780	10,262	1,122	2,361	3,690	2,305	0,680	1,170	4,950	1,461
B2198	5,058	2,168	5,139	0	4,426	3,966	7,764	4,448	3,007	1,663	2,842	4,783	4,067	0,550	4,255
B2235	1,151	3,712	0,768	4,426	0	2,619	9,902	1,005	1,683	2,958	1,629	0,680	0,424	4,253	1,070
B2387	2,810	2,159	2,780	3,966	2,619	0	8,261	2,090	2,548	3,150	2,060	2,693	2,596	3,689	2,749
B21131	10,710	6,957	10,262	7,764	9,902	8,261	0	9,999	9,536	8,068	8,775	10,385	9,619	7,339	10,398
B211102	0,765	3,520	1,122	4,448	1,005	2,090	9,999	0	1,632	3,230	1,724	0,680	1,245	4,315	0,851
S2371	2,098	2,804	2,361	3,007	1,683	2,548	9,536	1,632	0	1,904	0,857	1,859	1,464	2,977	1,250
S2381	3,796	2,065	3,690	1,663	2,958	3,150	8,068	3,230	1,904	0	1,517	3,437	2,560	1,436	3,052
T1123	2,346	2,235	2,305	2,842	1,629	2,060	8,775	1,724	0,857	1,517	0	2,012	1,316	2,658	1,710
T1172	0,472	4,027	0,680	4,783	0,680	2,693	10,385	0,680	1,859	3,437	2,012	0	1,059	4,655	0,802
T2257	1,522	3,446	1,170	4,067	0,424	2,596	9,619	1,245	1,464	2,560	1,316	1,059	0	3,885	1,206
T12122	4,957	1,803	4,950	0,550	4,253	3,689	7,339	4,315	2,977	1,436	2,658	4,655	3,885	0	4,204
T22109	0,917	3,765	1,461	4,255	1,070	2,749	10,398	0,851	1,250	3,052	1,710	0,802	1,206	4,204	0

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Abd Alla MH, 1994: Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 18 : 294–296.

Aberlenc-bertossi, 2012 : La détermination du sexe du palmier dattier. *Diade news letters* 3 : 1-8.

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS., 2008: Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163: 173-181,.

Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H., 2005: Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435:824-827. This paper describes the plant sesquiterpene 5-deoxy-strigol as the signal that triggers branching in AMF. Strigolactones are a group of sesquiterpene lactones, previously isolated as seed-germination stimulants for the parasitic weeds *Striga* and *Orobanche*.

Alspaught J.A., Perfect J.R and Hatman j., 1997: *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G- protein Alpha subunit GPAI and Camp. *Genes.Dev.*11:3206-3217.

Alvarez-Loayza P, White Jr JF, Torres MS, Balslev H, Kristiansen T, 2011: Light converts endosymbiotic fungus to pathogen, influencing seedling survival and niche-space filling of a common tropical tree, *Iriartea deltoidea*. *PLoS ONE* 6 (1): e16386. doi:10.1371/journal.pone.0016386.

Anonyme, 2007 : Une gamme complète pour protéger naturellement vos cultures, biophytech ; P2/5P.

Anonyme, 2012: Palmier-dattier. http://fr.wikipedia.org/wiki/Phoenix_dactylifera.

Arnold A. E., 2007: Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 2007; **21**: 51-66.

Arnon I., 1972: Crop production in dry region, (edn) Londres.

Arshad M., Jr Frankenberger WT., 1993: Microbial production of plant growth regulators. In Soil microbial ecology applications in agricultural and environmental management. F.B. Metting, Marcel Dekker Inc., New York.

Bedrani S., 1995 : Une stratégie pour le développement des parcours en zones arides et semi arides. Rapp. Techn. Algérie.Doc.Banque mondiales. Tann.

Bent, 2006: induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: Multigenic and Induced systemic resistance in plants (Tuzun S. and Bent E., eds), springer science+ Business Media, New York , USA.pp.225-258.

Bérdy J, 2005: Bioactive microbial metabolites: a personal view. The Journal of Antibiotics 58: 1–26.

Bezato T.Z.F., 2013 : Les palmiers dattiers « *Phoenix dactylifera* » à Toliara : étude de la filière, utilisation et diversité variétale. Université de Toliara, 85p.

Bezerra, J.D.P., M.G.S. Santos, V.M. Svedese, D.M.M. Lima, M.J.S. Fernandes, L.M. Paiva and C.M. Souza-Motta, 2012: World J. Microbiol. Biotechnol., 28: 1989-1995.

Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R., 2005: Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. Proc Natl Acad Sci USA, 102:3135-3140. This study provides evidence of a host plasmamembrane subdomain beneath the fungal infection structure that is locally enriched in MLO and ROR2. Fluorescence resonance energy transfer experiments show that MLO interacts with calmodulin and the syntaxin ROR2 in vivo (RA Bhat, P Schulze-Lefert, R Panstruga, pers. comm).

Bhat RA, Miklis M, Schmelzer E, Schulze-Lefert P, Panstruga R: Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. Proc Natl Acad Sci USA 2005, 102:3135-3140.

Bloemberg GV, Lugtenberg BJ., 2001: Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Current Opinion Plant Biology. 4:343–350.

Bouna Z.E.A.O., 2002: Contribution à l'étude biosystématique, ethnobotanique, biochimique, alimentaire et diététique de 11 cultivars de dattiers, *Phoenix dactylifera* L., des palmeraies de Mauritanie. Thèse de 3ème cycle, Département de biologie végétale, faculté des sciences et techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 250 p.

Brett, C.T., 1990: Cell wall structure and the skeletal functions of the wall. In: Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls., Eds., C.T. Brett and Waldron, Unwin, Hyman, London, pp: 4-57.

Bric *et al.*, 1991: Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2636-2642.

Calvo A.M., Gardner H. Wand Keller N.P., 2001: Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 276 : 20766-20774.

Cattelan A.J., Hartel P.G., Fuhrmann J.J., 1999: Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci Soc Am J* 63: 1670-1680.

Chevalier A., 1952 : Les productions végétales du Sahara et de ses confins Nord et sud, passé, présent, avenir. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture tropicale.* Pp 669-924.

Choi, Y.W., I.J. Hodgkiss and K.D. Hyde, 2005: Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *J. Agricultural Technol.*, 1: 55-66.

Cihangir N, Aksöz N., 1993: *Aspergillus niger*'den gibberellik asit eldesive uygun fizyolojik koşulların saptanması. *Doğa* 17: 63-74,.

Daher A.M., 2010 : Détermination du sexe chez le palmier dattier : approches histocytologiques et moléculaires. Thèse de doctorat en Biologie cellulaire. Université Montpellier 2.

DasSarma et Arora, 2001: Halophytes. *Encyclopedia of life native.* Publishing Groupe.

De Bary, 1866: Morphology and physiology of the mushrooms, lichens and Myxomyceten. Hofmeister's handbook of physiological botany, VOL. II, Leipzig, Germany.

Djerbi M., 1992 : Pollinisation et soins apportés aux régimes. *Précis de phoeniciculture.* Edition FAO. Pp 97-93.

Dutton S., C.W. Penn, 1989 : Biological attributes of colony-type variants of *Candida albicans*, *J. Gen. Microbiol.* 135, 3363.

Egamberdiyeva D., Gafurova L., Islam K.R. (2007): Salinity effects on irrigated soil chemical and biological properties in the Syr Darya Basin of Uzbekistan. In: Lal R., Sulaimanov M., Stewart B., Hansen D., Doraiswamy P. (eds.): *Climate Change and Terrestrial Carbon Sequestration in Central Asia.* Taylor-Francis, New York, 88–96.

Flaishman MA., Eyal ZA., Zilberstein A., Voisard C., Hass D., 1996: Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide producing strains of *Pseudomonas putida*. Mol Plant microbe Intract 9: 642-645.

Frankenberger J.W.T., Arshad M., 1995: Microbial synthesis of auxins. In: Frankenberger W.T., Arshad M. (eds.): Phytohormones in Soils. Marcel Dekker Inc, New York, 35–71.

Galinski E.A., 1993 : Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interactions, stress protection. *Experientia* 49: 487–496.

Gaur AC., 1990 : Phosphate solubilising microorganisms as biofertilizers. Omega Scientific Publishers. New Delhi.

Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG, 2005: Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell*, 17:3489-3499. The work described in this paper shows that the host plant in an AMF interaction prepares for infection by the fungal symbiont by reorganizing the host actin and tubulin cytoskeleton and endoplasmic reticulum. This creates a cytoplasmic apparatus that is tunnelled for plasma membrane invagination and fungal entry.

Gummadi, S.N. and T. Panda, 2003: Purification and biochemical properties of microbial pectinases: A review. *Process Biochem.*, 38: 987-996.

Hamel et Samet, 2011 : Evaluation du pouvoir antagoniste *in vitro* de quelques souches endophytes vis-a-vis des champignons d'origine telluriques.

Hariprasad P., Navya HM., Chandra nayaka S., Niranjana SR., 2009: Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biological control* 50: 307-316.

Hoondal, G.S., R.P. Tiwari, R. Tewari, N. Dahiya and Q.K. Beg, 2002: Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 409-18.

Idris H.A., Labuschagne N., and Korsten L., Suppression of *Pythium ultimum* root rot of sorghum by rhizobacterial isolates from Ethiopia and South Africa. *Biological Control* 45, 2010, 72-84.

Jalgaonwala, R.E. and R.T. Mahajan, 2011: Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from some indigenous medicinal plants. *J. Agricultural Technol.*, 7(6): 1733-1741

Kawamura C., Tsujimoto T. and Tsug T., 1999: Targeted disruption of melanin biosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the japonese pear pathotype of *Alternaria alternate*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 12: 59- 63.

Khalid et al., 2004 Khalid A, Arshad M, Zahir ZA. 2004. “Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat”. *J Appl Microbiol.* 96: 473_480

Kim Seunghyun. Antifungal activity of *Stereptomyces* sp. against *Puccinia recondite* wheat leaf rust. *J. Microbial. Biotechnol.*, 1017-7825(2003).

Kispapo T., Oren A., Wasser S.P. and Nevo E., 2003:Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. *Micro. Ecol.* 45 (2): 183- 190.

Kistner C, Winzer T, Pitzschke A, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Webb KJ et al., 2005: Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell*, 17:2217-2229.

Klopper JW., Lifshitz R., Zablotowicz RM., 1989: Free- living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7: 39-43.

Kogej T., Gostincas C., Vlkman M., GorbushinaA.A. and Gund-Cimerman N., 2006: Mycosporins in extremophilic fungi – Novel complementary Osmolytes ; *.Environ.Chem.* 3:105-110. doi: 10.1071/EN012.

Kojeg T., Ramas J., Pleminita A. and Gun-Cimerman N., 2005: The halophilic fungus *Hortea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidia* Intracellular Cation Concentration in Hypersaline Environment.*App Environ Microbiol.* 71.

Krieg N. R and J. Dobereiner J. Genus *Azospirillum* in Hoh J. G., and Krieg N.R. (eds.), *Bergey s Manual of systematic Bacteriology* 9th ed., V.I. Willams and Willkins, Baltimore. pp.44-104(1984).

Kusari et al., 2014 : Biotechnological potentiel of plant associated endophytic fungi : hope versus hypo. *science directe.*

LeBerre M. and Ramousse R., 2001: Les enjeux de la conservation de la biodiversité en milieu saharien, (edn) Université Claud Bernard. Lion 1.

Lecomte Marcel, 2011 : (Cercle Mycologique de Namur & Cercle des M.L.B.).

Lee ASY., Ma Z, Ge L, et al., 2008 : Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Anal Chim Acta* 610: 274-281,.

Li J. Y., Strobel G. A., Harper J. K., Lobkovsky E. and Cllardy J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Organic letters* 2000; 2: 767-770.

Li J.-Y., Strobel G., Sidhu R., Hess W. M. and Ford E. J. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology* 1996; 142: 2223-2226.

Lind K, Lafer G, Schloffer K, Innerhoffer G, Meister H. 2003. "Organic Fruit Growing". CABI Publishing, Wallingford, UK.

Litchfield C.D. and Gilevet P.M., 2002:Microbiol diversity and complexity in hypersaline environments : a pariliminary assessment .*J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*J. 28(1) : 48- 55.

Liu JY, Blaylock LA, Endre G, Cho J, Town CD, VandenBosch KA, Harrison MJ., 2003: Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell*, 15:2106-2123.

Maccheroni, W. and J.L. Azevedo, 1998: Synthesis and secretion of phosphatases by endophytic isolates of *Colletotrichum musae* grown under conditions of nutritional starvation. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44: 381-387.

Malinowski D. P. and Belesky D. P. Adaptation of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Corp Science* 2000; 40: 923-940.

Maria, G.L., K.R. Sridhar and N.S. Raviraja, 2005: Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *J. Agricultural Technol.*, 1: 67-80.

Mazure P., Nakanishi K., El-Zayat A.A.E. and Champ S.P., 1991: Structure and synthesis of sporogenic psifactors from *Aspergillus nidulans* .*J. Chem.Soc. Chem. Commun* . 20: 1486-1487.

Memadji-le-allah, 2011 : Étude de la modélisation de l'architecture des palmes du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), relations entre les paramètres caractéristiques des morphotypes cultivés en Europ ; UM (Université de Montpellier 2- sciences et techniques), 8/51p.

Morath et al., 2012 : Fungal volatile organic compounds: A review 26; of British Mycological Society (bms) with emphasis on their biotechnological potential 73-83p.

Munier P., 1973 : Le palmier-dattier. Editions Maisonneuve et Larose, Coll. Techniques Agricoles et Productions Tropicales. Paris. 221 p.

Nakamura A, Umemura I, Gomi K et al., 2006: Production and characterization of auxin-insensitive rice by overexpression of a mutagenized rice IAA protein. Plant J 46: 297-306,.

O'Connell PF", 1992: Sustainable agriculture_a valide alternative. Outlook Agric. 21: 5_12

Okon Y and Y. Kapulink. Development and function of Azospirillum inoculation roots. Plant & Soil, 90, 3-16(1986).

Opalski KS, Schultheiss H, Kogel K-H, Hu' ckelhoven R., 2005: The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis f. sp. hordei*. Plant J, 41:291-303. This study demonstrates differential host actin reorganisation in susceptible MLO-barley and resistant mlo-mutant genotypes. It further shows a potential contribution of the host actin cytoskeleton in establishing the parasitic haustorium of *Blumeria graminis*.

Oses R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E. and Rodriguez J. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity* 2008; **33**: 77-86.

Pandey A and S. Kumar. Potential of *Azotobacter* and *Asozprillum* for upland agriculture: A review. J. Sci.Ind. Res., 48, 134-144(1998).

Parmar N and K. R. Dadarwal. Rhizobacteria from the rhizosphere and rhizoplane of chickpea (*Cicer arietinum L.*). J. Microbiol., 37, 205-210 (1997).

Pikovskaya RI, 1948: Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17 :362–370.

Redman R. S., Sheehan K. B., Stout R. G., Rodriguez R. J. and Henson J. M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 2002; doi: 10.1126/science.1078055.

Rodriguez R. J., Redman R. S. and Henson J. M. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Migration and Adaptation Strategies for Global Change* 2004; **9**: 261-272.

Saar D. E., Polans N. O., Sorensen P. D. and Duvall M. R. Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter* 2001; **19**: 249-260

Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M. and Sullivan T. J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1998; **29**: 319-343.

Saikkonen K., Helander M. and Faeth S. H. Fungal endophytes: hich- hikers of the green world. In: Gillings M. and Holmes A. J.(eds). *Plant microbiology*. Garland Science 2004a; pp. 81-101.

Saikkonen K., Wali P. R. and Helander M. Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PLoS One* 2010; **5**(6): e11395. doi:10.1371/journal.pone.0011395.

Sallon S., Solowey E., Cohen Y., Korchinsky R., Egli M., Woodhatch I., Simchoni O., Kislev M., 2008: Germination, Genetics, and Growth of an Ancient Date Seed. *Science* **320**: 1464.

Sardin M.F., Mullner H., Scherisky R., Joer gensen G., 2003: Microbial performance in soil along salinity gradient inder acidic conditions. *Applied Soil.Ecology*. **23**: 237-244.

Schulz, B. et C. Boyle, 2005 : The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, **109**: 661-686.

Shanahan P., O'Sullivan DJ., Simpson P., Glennon JD., O'Gara F., 1992: Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl Environ Microbiol* **58**: 353-358.

Stone J. K, White J. F., Jr. and Polishook J. D. **Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills G and Foster M.(eds).** Measuring and Monitoring Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods, Elsevier Academic Press, Boston, MA 2004; pp. 241-270.

Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczyglowski K, Parniske M: A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 2002, 417:959-962.

Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 2004; **67**: 257-268.

Sunitha V.H. D. , Nirmala Devi et C. Srinivas, 2013 : Activité enzymatique extracellulaire d'Endophytic fongique Contraintes d'isolement dans les plantes médicinales ; université de Bangalore, Bangalore, Inde.

Suto, M., M. Takebayashi, K. Saito, M. Tanaka, A. Yokota and F. Tomita, 2002. Endophytes as producers of Xylanase, 93(1): 88-90.

Ting, A.S.Y., S. Meon, J. Kadir, S. Radu and G. Singh, 2007: Field evaluation of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates UPM31P1 and UPM39B3 for the control of Fusarium wilt in 'Pisang Berangan' (*Musa*, AAA). Proceeding of the International Symposium on Recent Advances in Banana Crop Protection for Sustainable Production and Improved Livelihoods, Sept. 2007, ISHS Acta Horticulturae, pp: 139-144.

Ting, A.S.Y., S. Meon, J. Kadir, S. Radu and G. Singh, 2008: Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *BioControl*, 53: 541-553. DOI: 10.1007/s10526-007-9093-1

Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.I., 2003: *Introduction à la microbiologie* , (edn) ISBN.Canada.

Venkatesagowda, B., E. Ponugupaty, A.M. Barbosa and R.F.H. Dekker, 2012: Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 71-80.

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. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2005; 102: 13386-13391.

White Jr JF Jr., Torres MS, 2010. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiologia Plantarum* 138: 440e446.

Whitelaw MA, 2000: Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Edited by Donald L. Sparks. *Advances in Agronomy*, Academic press 69 : 99-151.

Yue CC, Miller J, White J, Richardson M, 2000. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4687e4692.

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

Zangoo, 2011 : Étude comparative de l'architecture et de la géométrie de l'inflorescence mâle et femelle du palmier dattier. *Biodiversité Végétale Tropicale (BVT)*. Pp. 1-47.

Zipfel C, Felix G: Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* 2005, 8:353-360.