

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB. BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Laboratoire Ressources Naturelles de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou

Laboratoire Biotechnologies, Environnement et Santé de l'Université Blida 1

THESE DE DOCTORAT

En Biologie

Spécialité : Biologie et Santé

Diversité et activité antimicrobienne des champignons endophytes associés
aux feuilles de *Limoniastrum feei* (de Gir.) Batt. Oued Aghlal (Béchar, Algérie)

Par

MEDJEBER Mohammed

Devant le jury composé de :

F. HAMAI-DI-CHERGUI	MCA., USD. Blida1	Présidente
K. HOUALI	Professeur, UMM. Tizi Ouzou	Examineur
S. CHERIF-HAMIDA	MCA., USD. Blida1	Examinatrice
N. SMAIL-SAADOUN	Professeur, UMM. Tizi Ouzou	Directrice de thèse
F. SAIDI	Professeur, USD. Blida1	Co-promotrice

Blida, 2019

Remerciements

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier Madame **SMAIL-SAADOUN Noria** (Professeur et Directrice du Laboratoire Ressources Naturelles à l'UMMTO), qui a accepté de m'encadrer, je la remercie infiniment pour son aide et ses conseils précieux, surtout pour sa présence et sa disponibilité à tout moment, durant la réalisation de ce travail.

Je vous exprime, Madame, toute ma reconnaissance pour m'avoir initié à la recherche scientifique. J'ai beaucoup apprécié le travail à vos côtés, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de votre expérience.

Mes vifs remerciements et ma profonde gratitude s'adressent notamment à Madame le professeur **SAIDI Fairouz** (Directrice du Laboratoire Biotechnologie, Environnement et Santé à l'Université de Blida), qui a accepté de co-encadrer ce travail. Je vous remercie pour votre soutien et vos encouragements, ainsi que pour votre patience.

Qu'il me soit ici permis de remercier très sincèrement Madame **HAMAIDI-CHERGUI Fella**, et de lui adresser toute ma reconnaissance pour avoir jugé ce travail, malgré ses nombreuses obligations. Je suis particulièrement honoré de vous voir assurer la présidence de ce jury de thèse.

Je suis également très honoré que Monsieur le Professeur **HAOULI Karim**, ait accepté de juger et de siéger dans le jury de ma thèse. Trouvez ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.

Un grand merci aussi à Madame **CHERIF-HAMIDA Saida**, je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de faire partie du jury de soutenance. Cela me fait extrêmement plaisir que vous ayez accepté d'examiner mon travail.

Mes respectueuses reconnaissances vont également à :

Mr MESSAOUDENE Kamel, mon ami BRAHIMI Ibrahim et ami Mustapha pour leur aide très précieuse au cours de l'échantillonnage de la plante à Béchar ;

Mme REZKI-SEKHI L. et Mme BELKEBIR-BOUKAIS A. de m'avoir aidé au laboratoire ;

Enfin, je ne voudrais pas oublier tous mes collègues que j'ai côtoyé au Laboratoire ; ZAREB A., BENFODDIL O., OUZID Y., GHAZI A., MECHIAH F., pour leurs esprits conviviales, leurs soutiens et leurs coopérations.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

À mes très chers parents, source de mon bonheur ;

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

À mes chers frères et sœurs ;

À tous ceux qui me sont chers.

Je dédie ce travail

Résumé

La plupart des plantes étudiées dans les différents écosystèmes naturels se trouvent infestées par des champignons microscopiques appelés mycoendophytes. Dans ce travail, notre intérêt s'est porté sur les champignons endophytes présents chez les feuilles de *Limoniastrum feei* de la région de Oued Aghlal (Béchar). L'espèce étudiée est médicinale et endémique du Sahara septentrional algérien et marocain. Afin de bien cerner cette étude, nous nous sommes fixé les objectifs suivants : l'isolement, le recensement, l'identification, l'évaluation de la diversité et enfin les tests des activités antimicrobienne et antimitotique de ces mycoendophytes. L'échantillonnage a concerné 23 sujets sains. 20 feuilles sont prélevées sur chaque pied, 10 ont été colorées au bleu trypan pour une mise en évidence de la présence des endophytes, les autres ont été fraîchementensemencées sur milieu PDA. Après purification et identification à l'échelle phénotypique, une extraction des métabolites actifs par méthode hydroalcoolique a été menée, en utilisant deux solvants : l'acétate d'éthyle et le méthanol. L'activité antimicrobienne sur neuf bactéries et une levure de référence a été réalisée en premier temps par un dépistage direct du pouvoir antimicrobien, puis par méthode de disques en utilisant les extraits fongiques. Enfin, l'effet antimitotique de deux espèces d'*Aspergillus* a été évalué *in vitro* sur des cellules méristématiques d'*Allium cepa*. Après 02 mois d'incubation, nous avons obtenu une fréquence de colonisation de 73,22%, avec un total de 842 isolats fongiques, répartis en 56 espèces appartenant à 20 genres fongiques. Leurs abondances foliaires montre que les espèces des genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont les plus dominantes. Des corrélations parfois positives et pour d'autres négatives sont décrites entre la majorité des genres fongiques inventoriés. Les indices de diversité ont révélé une richesse remarquable de la mycoflore endophyte. Le test de diffusion sur disques a démontré que tous les extraits fongiques d'acétate d'éthyle avaient une activité inhibitrice sur les souches microbiennes testées. L'effet antimicrobien de ces extraits est comparable à celui des antibiotiques témoins et parfois meilleur, à l'inverse des extraits méthanoliques qui ont présentés une faible activité, parfois nulle. Le calcul des indices mitotiques et des indices des phases a montré une efficacité comparable à celle de la colchicine utilisée comme témoin positif. Une Anova avec un témoin négatif des cellules non traitées a révélé une différence hautement significative ($p=0,00$). Nous avons conclu que les feuilles de *L. feei* sont un véritable hotspot de biodiversité fongique et que les mycoendophytes représentent une source prometteuse dans la production des substances naturelles d'intérêt thérapeutique antimicrobien et antimitotique.

Mot clés : mycoendophytes foliaires, *Limoniastrum feei*, diversité fongique, activités biologiques, Béchar (Algérie).

Abstract

Most of plants studied in the different natural ecosystems are infested by microscopic fungi called mycoendophytes. In this work, our interest was on the endophytic fungi present in the leaves of *Limoniastrum feei* of the region Oued Aghlal (Bechar). The species studied is medicinal and endemic to the northern Sahara of Algeria and Morocco. In order to clearly define this study, we have set the following objectives: isolation, census, identification, evaluation of diversity and finally testing the antimicrobial and antimitotic activities of these endophytic fungi. Sampling involved 23 healthy subjects. 20 leaves were taken from each subject, 10 were stained with blue trypan to demonstrate the presence of endophytes, others subjects were freshly seeded on PDA medium. After purification and identification at the phenotypic scale, extraction of the active metabolites by hydroalcoholic method was carried out, by putting two solvents: ethyl acetate and methanol. So, the antimicrobial activity on nine bacteria and the yeast *Candida albicans* was carried out by direct screening of the antimicrobial power, then by disk method, using the fungal extracts. Finally, the antimitotic effect of two species of *Aspergillus* was evaluated *in vitro* on meristematic cells of *Allium cepa*. After 02 months of incubation, we obtained a colonization frequency of 73.22%, with a total of 842 fungal isolates, divided into 56 species belonging to 20 fungal genera. Their leaf abundance shows that *Penicillium* and *Aspergillus* species are the most dominant. Correlations sometimes positive and for other negative are described between the majority of fungal genera inventoried. The diversity index revealed a remarkable richness of the endophytic mycoflora. The assay of disk diffusion demonstrated that all fungal extracts of ethyl acetate had inhibitory activity on the microbial strains tested. The antimicrobial effect of these extracts was comparable to that of the synthetic antibiotics, unlike the methanolic extracts which showed a low activity and sometimes absent. The calculation of mitotic index and phase index showed efficacy comparable to that of colchicine used as a positive control. Anova with a negative control of untreated cells revealed a highly significant difference ($p = 0.00$). We concluded that leaves of *L. feei* are a true hotspot of fungal biodiversity and these endophytic fungi represent a promising source in the production of natural substances of therapeutic antimicrobial and antimitotic interest.

Keywords : foliar endophytic fungi, *Limoniastrum feei*, fungal diversity, biological activities, Bechar (Algeria).

ملخص

معظم النباتات التي تمت دراستها في النظم البيئية الطبيعية المختلفة موبوءة بفطريات مجهرية تسمى بالفطريات الباطنية. في هذا العمل، كان اهتمامنا بالفطريات الباطنية الموجودة في أوراق ملفة الخادم لمنطقة وادي أغلال (بشار). النبتة المدروسة طبيّة ومتوطنة في الصحراء الشمالية للجزائر والمغرب. من أجل الإلمام بهذه الدراسة، وضعنا الأهداف التالية: عزلة وتحديد وتقييم التنوع الفطري وفي نهاية المطاف اختبار الأنشطة المضادة للجراثيم والمضادة للانقسام الخلوي لهذه الفطريات الباطنية. أخذ العينات تم على مستوى 23 نبتة سليمة حيث تم أخذ 20 ورقة من كل واحدة، 10 منها عولجت بالملون الأزرق التريباتي لإثبات وجود الفطريات الباطنية، في حين أن الأوراق المتبقية تم زرعها على وسط PDA. بعد تنقيتها وتحديد تنوعها على المستوى المظهري، تم استخلاص المستقلبات بطريقة مائية كحولية من خلال وضع اثنين من المذيبات (خلات الإيثيل والميثانول). تم تنفيذ النشاط المضاد للميكروبات على تسعة أنواع من البكتيريا وخميرة مرجعية من خلال الفحص المباشر للقدرة المضادة للميكروبات لهذه الفطريات، ثم باستخدام طريقة الأقراص باستخدام المستخلصات الفطرية. وأخيرا، تم تقييم التأثير المضاد للانقسام الخلوي لنوعين من الاسباغجيلوس على الخلايا الفتية من الأليوم سيبا (بصل). بعد شهرين من الحضانه، تحصلنا على تردد الاستعمار بنسبة 73.22%، مع مجموع 842 عزلة فطرية، مقسمة إلى 56 نوعًا تنتمي إلى 20 جنسًا فطريًا. تظهر وفرة أوراقها أن جنس البنسيليوم و الاسباغجيلوس هما الأكثر انتشارًا. عدة علاقات إيجابية في بعض الأحيان وغيرها سلبية رصدت بين غالبية الأجناس الفطرية. كشفت مؤشرات التنوع عن ثراء ملحوظ في الميكوفلورا. أظهر اختبار نشر القرص أن جميع المستخلصات الفطرية من خلات الإيثيل لها نشاط تثبيطي على السلالات الميكروبية التي تم اختبارها. كان التأثير المضاد للميكروبات لهذه المستخلصات مشابهًا للمضادات الحيوية وأحيانًا أفضل، على عكس المستخلصات الميثانولية التي أظهرت نشاطًا منخفضًا وأحيانًا منعدم. أظهرت حسابات المؤشرات الإنقسامية ومؤشرات طور الانقسام الخلوي فعالية مماثلة لتلك المستخدمة في الكولشيسين كعنصر تحكم إيجابي. أظهرت التحاليل الإحصائية Anova بالقرنة مع الخلايا غير المعالجة فرقا كبيرا للغاية ($P = 0.00$). خلصنا في الأخير إلى أن أوراق ملفة الخادم هي بؤرة حقيقية للتنوع البيولوجي الفطري وان الفطريات الباطنية تمثل مصدرا واعداد في إنتاج المواد الطبيعية ذات الأثر العلاجي المضاد للجراثيم والمضاد للانقسام الخلوي.

كلمات المفتاح: الفطريات الباطنية، ملفة الخادم، التنوع الفطري، الأنشطة البيولوجية، بشار (الجزائر).

Liste des tableaux

N° de tableau	Titre de tableau	N° page
Tableau 1	Cumuls annuels en mm relevés à la station de Béchar (1995-2017)...	31
Tableau 2	Moyennes des précipitations mensuelles et annuelles en mm relevées à la station de Béchar (1995-2017).....	32
Tableau 3	Précipitations mensuelles en mm relevées à la station de Béchar pour l'année d'échantillonnage (2013-2014).....	33
Tableau 4	Variation des températures mensuelles minimales, maximales et moyennes (°C) de la station de Béchar (1995-2017).....	33
Tableau 5	Tableau n°5. Critères symbiotiques utilisées pour caractériser les classes de champignons endophytes [101].....	47
Tableau 6	Fréquences de colonisation (FC) au niveau des 23 sujets de <i>L. feei</i> ...	79
Tableau 7	Pourcentage relatif d'occurrence (PRO) des genres fongiques de feuilles de <i>L. feei</i>	82
Tableau 8	Pourcentages des espèces du <i>Penicillium</i> au sein des feuilles de <i>L. feei</i>	85
Tableau 9	Pourcentages des espèces de l' <i>Aspergillus</i> au sein des feuilles de <i>L. feei</i>	87
Tableau 10	Pourcentages des espèces du <i>Gliocladium</i> au sein des feuilles de <i>L. feei</i>	89
Tableau 11	Pourcentages des espèces du <i>Cladosporium</i> au sein des feuilles de <i>L. feei</i>	90
Tableau 12	Pourcentages des espèces du <i>Phoma</i> au sein des feuilles de <i>L. feei</i> ...	92
Tableau 13	Abondances (%) des mycoendophytes au sein des sujets de <i>L. feei</i> ...	108
Tableau 14	Matrice des corrélations entre les genres fongiques des tissus foliaires de <i>L. feei</i>	109
Tableau 15	Indices de diversité (H') au niveau des sujets de <i>L. feei</i>	116
Tableau 16	Champignons producteurs d'antibiotiques [349].....	125
Tableau 17	Dépistage antimicrobien des mycoendophytes isolés de <i>L. feei</i>	140
Tableau 18	Poids nets (mg/100ml) des résidus secs de l'extraction fongique.....	142
Tableau 19	Diamètres d'inhibition (mm) des antibiotiques synthétiques sur les souches bactériennes (n=3, moyenne ± erreur standard).....	143

N° de tableau	Titre de tableau	N° page
Tableau 20	Diamètres d'inhibition (mm) des extraits fongiques d'acétate d'éthyle (n=3, moyenne ± erreur standard).....	144
Tableau 21	Diamètres d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique des mycoendophytes testés (n=3, moyenne ± erreur standard).....	146
Tableau 22	Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez <i>E. coli</i>	149
Tableau 23	Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez <i>S. aureus</i>	151
Tableau 24	Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez <i>P. aeruginosa</i>	153
Tableau 25	Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez <i>E. faecalis</i>	155
Tableau 26	Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez <i>B. subtilis</i>	157
Tableau 27	Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez <i>K. pneumoniae</i>	159
Tableau 28	Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez <i>S. typhi</i>	161
Tableau 29	Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez <i>L. monocytogenes</i>	163
Tableau 30	Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez MRSA.....	165
Tableau 31	Diamètres d'inhibition (mm) d'antifongique témoin sur <i>Candida albicans</i>	168
Tableau 32	Diamètres d'inhibition (mm) des extraits fongiques sur <i>Candida albicans</i>	168
Tableau 33	Indices des phases des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i>	170
Tableau 34	Indices mitotiques des cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> avec leurs groupes homogènes.....	172
Tableau 35	Moyennes des précipitations mensuelles moyennes dans la région de Béchar durant la période (1995 – 2017).....	annexes
Tableau 36	Moyennes des températures mensuelles maximales dans la région de Béchar durant la période (1995 – 2017).....	annexes

N° de tableau	Titre de tableau	N° page
Tableau 37	Moyennes des températures mensuelles minimales dans la région de Béchar durant la période (1995 – 2017).....	annexes
Tableau 38	Moyennes des températures mensuelles moyennes dans la région de Béchar durant la période (1995 – 2017).....	annexes
Tableau 39	Fréquences de colonisation (FC%) des mycoendophytes par boîte de culture (feuille) dans les 23 sujets de <i>L. feei</i>	annexes

Liste des figures

N° de figure	Titre de figure	N° page
Figure 01	morphologie générale de <i>Limoniastrum feei</i> [17].....	22
Figure 02	fleurs du genre <i>Limoniastrum</i> [19].....	22
Figure 03	structures des sept flavonoïdes isolés de <i>L. feei</i> [36].....	25
Figure 04	structures des trois composés antimicrobiens isolés de <i>L. feei</i> [37].....	26
Figure 05	position géographique de Béchar en Algérie [40].....	28
Figure 06	situation géographique de Oued Aghlal dans la wilaya de Béchar.....	29
Figure 07	photo satellite du site de prélèvement.....	30
Figure 08	photographie du site de prélèvement.....	30
Figure 09	répartition moyenne saisonnière des précipitations.....	32
Figure 10	courbes représentant les écarts entre les températures mensuelles minimales et maximales dans la région de Béchar.....	34
Figure 11	diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen pour la station de Béchar (1995-2017).....	35
Figure 12	abaque de l'indice d'aridité de De Martonne.....	36
Figure 13	structure de la paroi des micromycètes [68].....	40
Figure 14	estimation de la répartition des espèces dans les règnes du vivant [74]..	40
Figure 15	phyla fongiques et nombre d'espèces décrites. Classification extraite de Blackwell [73] et nombre d'espèces de Kirk [81].....	42
Figure 16	Schéma de synthèse sur la classification générale des champignons.....	45
Figure 17	cycle de vie et modes de transmission (horizontale et verticale) du champignon endophyte <i>Neotyphodium</i> sur son hôte <i>Festuca arundinacea</i> [149].....	51
Figure 18	illustration d'une colonisation par un champignon endophyte (développement symbiotique) [158].....	53
Figure 19	modes de formation des conidies [65].....	64
Figure 20	modes de groupement des conidies des champignons filamenteux [65]..	64
Figure 21	structures protectrices [71].....	66
Figure 22	partie aérienne de <i>Limoniastrum feei</i> (de Gir.) Batt.....	67
Figure 23	Protocole de coloration, stérilisation et mise en culture des feuilles de <i>L. feei</i>	70

N° de figure	Titre de figure	N° page
Figure 24	tissu foliaire de <i>L. feei</i> , indemne de colonisation fongique.....	74
Figure 25	infections fongiques inter et intracellulaire au niveau de l'épiderme chez les feuilles de <i>L. feei</i>	75
Figure 26	observations microscopiques de la colonisation fongique au niveau des stomates et des glandes à calcaire chez les feuilles de <i>L. feei</i>	76
Figure 27	observations microscopiques de l'infection fongique au niveau du parenchyme et de la nervure principale chez les feuilles de <i>L. feei</i>	77
Figure 28	phyla des mycoendophytes recensés au niveau des feuilles de <i>L. feei</i>	81
Figure 29	aperçu sur les principales espèces de <i>Penicillium</i>	86
Figure 30	aperçu sur les principales espèces d' <i>Aspergillus</i>	88
Figure 31	aperçu sur les espèces de <i>Gliocladium</i>	90
Figure 32	aperçu sur les principales espèces de <i>Cladosporium</i>	91
Figure 33	aperçu sur les espèces de <i>Phoma</i>	93
Figure 34	aperçu sur les espèces de <i>Trichophyton</i>	95
Figure 35	aperçu sur les espèces d' <i>Acremonium</i>	96
Figure 36	aperçu sur les espèces d' <i>Exophiala</i>	97
Figure 37	aperçu sur les espèces d' <i>Alternaria</i>	98
Figure 38	aperçu sur les espèces d' <i>Absidia</i>	99
Figure 39	aperçu sur les espèces de <i>Phialophora</i>	100
Figure 40	aperçu sur les espèces de <i>Fusarium</i>	101
Figure 41	aperçu sur les espèces de <i>Paecilomyces</i>	102
Figure 42	aperçu sur les genres <i>Trichoderma</i> , <i>Epicoccum</i> , <i>Rhizoctonia</i> et <i>Verticillium</i>	104
Figure 43	aperçu sur les genres <i>Aureobasidium</i> , <i>Scytalidium</i> et <i>Scopulariopsis</i>	105
Figure 44	observations microscopiques de quelques structures fongiques non identifiées.....	106
Figure 45	dominance et envahissement total d' <i>Exophiala canacera</i> par <i>Aspergillus niger</i>	110
Figure 46	envahissement partiel de <i>Penicillium digitatum</i> par <i>Eupenicillium sp</i>	111
Figure 47	barrières d'inhibition entre les mycoendophytes antagonistes.....	112
Figure 48	diffusion de pigments par <i>Eupenicillium sp</i> contre les genres antagonistes.....	113

N° de figure	Titre de figure	N° page
Figure 49	synergie entre deux espèces de <i>Penicillium</i> contre les mycoendophytes opposés.....	115
Figure 50	schéma représentant les voies du métabolisme chez les champignons [105].....	124
Figure 51	schéma représentant la structure de phomopsichalasin de <i>Phomopsis sp</i> [105].....	125
Figure 52	schéma représentant la structure d'une molécule de jesterone [147].....	126
Figure 53	schéma représentant la structure d'une molécule de taxol [147].....	127
Figure 54	schéma représentant la structure d'une molécule d'acide torreyanique [105].....	127
Figure 55	principaux sites d'action des antiméiotiques [365].....	128
Figure 56	principaux sites d'action des agents alkylants [364].....	129
Figure 57	protocole de fermentation et d'extraction des mycoendophytes.....	135
Figure 58	test d' <i>Allium cepa</i>	138
Figure 59	exemple de sensibilité de <i>S. aureus</i> au dépistage antibactérien.....	139
Figure 60	comparaison entre moyennes générales des diamètres d'inhibition des bactéries.....	147
Figure 61	diamètres d'inhibition moyens de <i>E. coli</i>	148
Figure 62	diamètres d'inhibition moyens de <i>S. aureus</i>	150
Figure 63	diamètres d'inhibition moyens de <i>P. aeruginosa</i>	152
Figure 64	diamètres d'inhibition moyens de <i>E. faecalis</i>	154
Figure 65	diamètres d'inhibition moyens de <i>B. subtilis</i>	156
Figure 66	diamètres d'inhibition moyens de <i>K. pneumoniae</i>	158
Figure 67	diamètres d'inhibition moyens de <i>S. Typhi</i>	160
Figure 68	diamètres d'inhibition moyens de <i>L. monocytogenes</i>	162
Figure 69	diamètres d'inhibition moyens de MRSA.....	164
Figure 70	comparaison entre moyennes générales des diamètres d'inhibition des bactéries Gram+ et Gram-.....	167
Figure 71	comparaison entre moyennes générales des diamètres d'inhibition de <i>C. albicans</i>	169
Figure 72	cellules méristématiques d' <i>Allium cepa</i> représentant les différentes phases de la mitose.....	169

N° de figure	Titre de figure	N° page
Figure 73	exemple sur les différents aspects de colonies d' <i>Aspergillus nidulans</i> selon les conditions de culture.....	179
Figure 74	coloration au bleu Trypan des feuilles de <i>L. feei</i>	annexes
Figure 75	stérilisation des feuilles, culture, fermentation et extraction des mycoendophytes.....	annexes
Figure 76	mycoendophytes isolés secrétant des substances colorantes sur PDA....	annexes
Figure 77	observations microscopiques de quelques champignons épiphytes chez <i>L. feei</i>	annexes
Figure 78	développement d'une galle (cécidie) chez un fragment de feuille de <i>L. feei</i> sur milieu PDA.....	annexes
Figure 79	formation d'un bouchon de champagne (synergie) entre tétracycline et <i>Penicillium sp2</i> contre <i>S. aureus</i>	annexes

Table des matières

	N° page
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale.....	18
Chapitre 1 : Description de l'espèce étudiée (<i>Limoniastrum feei</i>)	21
1- Introduction.....	21
2- Description botanique de l'espèce <i>Limoniastrum feei</i>	21
3- Nomenclature et taxonomie de <i>Limoniastrum feei</i>	23
4- Ecologie de <i>Limoniastrum feei</i>	23
5- Activités biologiques de <i>Limoniastrum feei</i>	24
6- Composés isolés de <i>Limoniastrum feei</i>	24
7- Conclusion.....	26
Chapitre 2 : Zone d'étude.....	28
1- Description de la région d'étude.....	28
2- Situation géographique du site de prélèvement.....	29
3- Contexte climatologique de la zone d'étude.....	31
3-1- Pluviométrie.....	31
3-2- Température.....	33
3-3- Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen.....	35
3-4- Indice d'aridité de De Martonne.....	35
4- Conclusion.....	36
Chapitre 3 : Diversité fongique des feuilles de <i>Limoniastrum feei</i>.....	38
1- Introduction.....	38
2- Synthèse bibliographique.....	39
2-1- Introduction.....	39
2-2- Mode de vie des champignons.....	41
2-3- Systématique des champignons.....	41
2-4- Champignons endophytes.....	46

	N° page
2-4-1- Introduction.....	46
2-4-2- Taxonomie des mycoendophytes.....	47
2-4-3- Diversité des mycoendophytes au sein des plantes.....	48
2-4-3-1- Diversité des mycoendophytes au niveau des feuilles.....	49
2-4-3-2- Facteurs influençant la diversité des mycoendophytes.....	49
2-4-4- Modes de transmission des mycoendophytes.....	51
2-4-5- Interaction entre plante et mycoendophytes.....	54
2-4-6- Rôles des mycoendophytes.....	55
2-4-6-1- Rôles physiologiques.....	55
2-4-6-1-1- Nutrition et croissance.....	55
2-4-6-1-2- Protection contre les microorganismes pathogènes.....	56
2-4-6-1-3- Protection contre les herbivores et les insectes.....	58
2-4-6-2- Rôle écologique.....	59
2-4-7- Critères d'identification des mycoendophytes.....	61
2-4-7-1- Critères d'identification macroscopique.....	61
2-4-7-2- Critères d'identification microscopique.....	62
3- Matériel et méthodes.....	67
3-1- Echantillonnage de <i>L. feei</i>	67
3-1-1- Collecte de <i>L. feei</i>	67
2-1-2- Traitement des échantillons.....	67
3-2- Mise en évidence histologique des mycoendophytes foliaires de <i>L. feei</i>	68
3-3- Mise en culture des feuilles de <i>L. feei</i>	68
3-3-1- Stérilisation superficielle des feuilles de <i>L. feei</i>	69
3-3-2- Préparation du milieu de culture.....	69
3-3-3- Ensemencement des feuilles de <i>L. feei</i> sur PDA.....	71
3-4- Isolement, purification et conservation des isolats.....	71
3-5- Identification des mycoendophytes recensés.....	72
3-5-1- Identification macroscopique.....	72
3-5-2- Identification microscopiques.....	72
3-6- Analyse des données.....	72
3-6-1- Fréquence moyenne de Colonisation (FC%).....	72
3-6-2- Abondances des genres fongiques au niveau des différents sujets de <i>L. feei</i>	73

	N° page
3-6-3- Pourcentage Relatif d'Occurrence (PRO%).....	73
3-6-4- Diversité générique.....	73
4- Résultats et discussion.....	74
4-1- Mise en évidence des mycoendophytes au niveau des feuilles de <i>L.feei</i>	74
4-2- Fréquence de colonisation des mycoendophytes au niveau des feuilles de <i>L.feei</i> ..	79
4-3- Répartition des mycoendophytes recensés au niveau des feuilles de <i>L.feei</i>	81
4-4- Identification et taxonomie des espèces fongiques recensées.....	84
4-5- Abondances et interactions des genres fongiques au sein des sujets de <i>L.feei</i>	107
4-6- Diversité fongique au niveau des feuilles de <i>L.feei</i>	115
5- Conclusion.....	117
Chapitre 4 : Activités biologiques des mycoendophytes associés au	
<i>Limoniastrum feei</i>.....	119
1- Introduction.....	119
2- Synthèse bibliographique.....	120
2-1- Métabolites secondaires microbiens.....	120
2-1-1- Caractéristiques des métabolites secondaires.....	120
2-1-2- Rôles des métabolites secondaires.....	121
2-2- Production des composés bioactifs chez les mycoendophytes.....	121
2-2-1- Mécanismes et voies de synthèse des métabolites actifs.....	122
2-2-1-1- Voie de l'acide mévalonique.....	122
2-2-1-2- Voie de polycétide.....	123
2-2-1-3- Voie shikimique-chorismate.....	123
2-2-2- Quelques composés bioactifs des mycoendophytes.....	124
2-2-2-1- Agents antimicrobiens.....	124
2-2-2-2- Agents anticancéreux.....	126
2-2-3- Mécanismes d'action des agents antimitotiques.....	127
3- Matériel et méthodes.....	132
3-1- Activité antimicrobienne.....	132
3-1-1- Choix des mycoendophytes pour l'activité antimicrobienne.....	132
3-1-2- Choix des microorganismes tests et les témoins synthétiques.....	133
3-1-3- Dépistage de l'activité antimicrobienne des mycoendophytes sélectionnés.....	134

	N° page
3-1-4- Fermentation et extraction fongique.....	134
3-1-5- Essai antimicrobien des extraits fongiques.....	136
3-1-6- Analyses statistiques.....	137
3-2- Activité antimitotique.....	137
3-2-1- Test d' <i>Allium cepa</i>	137
3-2-2- Analyse des données.....	138
4- Résultats et discussion.....	139
4-1- Dépistage primaire du pouvoir antimicrobien des mycoendophytes de <i>L. feei</i>	139
4-2- Rendement de l'extraction fongique.....	141
4-3- Activité antimicrobienne par diffusion sur disques.....	142
4-4- Activité antimitotique.....	169
4-4-1- Test d' <i>Allium cepa</i>	169
4-4-2- Indices des phases.....	170
4-4-3- Indices mitotiques.....	171
5- Conclusion.....	174
Synthèse et discussion générale.....	176
Conclusion générale et perspectives.....	185

Références bibliographiques

Liste des abréviations

annexes

A decorative graphic of a scroll with a blue border and a white-to-gray gradient fill. The scroll is unrolled at the top and bottom edges, with the top edge being white and the bottom edge being gray. The text "Introduction générale" is centered on the scroll.

Introduction générale

Le besoin de nouveaux composés bioactifs ne cesse d'augmenter au vu de l'émergence de nouvelles maladies, le développement de résistances aux antibiotiques et l'augmentation de l'incidence des infections fongiques et bactériennes, ainsi que les risques de toxicité associés à l'utilisation excessive des médicaments synthétiques. Cela pousse les chercheurs à explorer différentes sources naturelles, afin d'obtenir de nouvelles molécules qui seraient efficaces, possédant une faible toxicité et ayant un impact plus raisonnable pour la santé.

L'Algérie avec sa superficie étendue et ses différents étages bioclimatiques est caractérisée par une diversité floristique très riche et variée, elle est estimée à plus de trois mille espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées, avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques [1], ce qui donne à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable et confère une multitude de sources de produits naturels à intérêt médicinal.

Les végétaux, en tant qu'éléments pionniers du fonctionnement des écosystèmes terrestres, sont confrontés aux conditions environnementales toujours changeantes [2]. Les plantes spontanées sahariennes sont très caractéristiques par leurs modes d'adaptation particuliers à l'environnement désertique [3]. Parmi les formes d'adaptation qu'elles établissent ces plantes ; l'association symbiotique avec les champignons endophytes (mycoendophytes) qui constitue un mécanisme d'adaptation très important dans la nature.

Parmi les végétaux occupant le vaste territoire du Sahara algérien, nous trouvons *Limoniastrum feei* (de Gir.) Batt., actuellement connue sous le nom *Ceratolimon feei* (Girard) M.B. Crespo et Lied [4]. C'est une plante médicinale spontanée endémique du Sahara septentrional algérien et marocain. Elle appartient à la famille des Plumbaginacées. C'est un arbuste bas de 10 à 40 cm, à feuilles longues et plates serrés en rosettes basales [5]. Il s'agit donc d'une espèce pérenne saharo-arabique stricte, croissant en milieu désertique, et donc soumise à un environnement très dur [6].

La sélection de *Limoniastrum feei* dans cette étude est fondée principalement sur des critères écologiques. En effet, ce choix a été influencé par le fait que cette espèce est endémique, médicinale, pérenne, facile à prélever sans contrainte éthique et peu connue dans la littérature actuelle. L'un des objectifs de cette étude est la valorisation et la préservation de cette plante, par une meilleure connaissance de cette dernière.

Les mycoendophytes sont des champignons microscopiques qui représentent une trame fongique très importante. Ces microorganismes discrets vivent en interaction complexe avec les plantes, colonisant toutes les parties de ces dernières (feuilles, tiges, rameaux, troncs et racines), sans qu'on puisse en soupçonner la présence [7,8]. Ils se développent de façon intercellulaire ou intracellulaire, sans y causer de symptômes, ni d'affecter négativement ou altérer le statut biologique du végétal hôte. Ces mycètes représentent toutefois un important réservoir de biodiversité, puisqu'il semble que toutes les plantes dans les différents écosystèmes naturels se trouvent colonisées par ces champignons endophytes [9,10]. Ces symbiotes fongiques jouent ainsi un rôle essentiel au sein de leur partenaire végétal, ils permettent à la plante hôte de se protéger contre les agents pathogènes, les différents ravageurs, mais aussi contre la sécheresse [10,11]. En synthétisant certains métabolites fonctionnels, ils confèrent à la plante hôte une amélioration de son état de santé [12].

Afin de contribuer à une meilleure connaissance des champignons endophytes associés au *Limoniastrum feei*, nous avons jugé utile de mener un travail portant sur la partie foliaire de cette espèce, en mettant la lumière sur la diversité et les activités biologiques de sa trame fongique.

Ce travail s'est réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire Ressources Naturelles de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou et celui de Biotechnologie, Environnement et Santé de l'Université Saad Dahlab de Blida.

L'approche a été réalisée en quatre grands chapitres.

Le chapitre 1 a pour but une présentation de la plante étudiée, avec ses exigences climatiques et édaphiques, ainsi que son aire de répartition.

Le chapitre 2 consiste en une description de la zone d'étude, avec le cadre géographique et climatique.

Le chapitre 3 concerne les résultats proprement dits de ce travail, à savoir : la diversité des mycoendophytes au niveau des feuilles de *Limoniastrum feei*.

Le chapitre 4 présente les résultats des activités biologiques (l'activité antimicrobienne et l'activité antimototique) des mycoendophytes recensés et identifiés.

Ces chapitres ont été suivis par une synthèse et discussion générale et se terminent par des conclusions et des perspectives pour ce travail de recherche.

Chapitre 1

Description de l'espèce étudiée :

Limoniastrum feei

1- Introduction

Le Sahara algérien constitue un réservoir important de nombreuses plantes spontanées, qui restent insuffisamment exploitées. Parmi ces dernières, nous pouvons citer *Limoniastrum feei* (de Gir.) Batt., connue sous le nom vernaculaire arabe de Mlefet Khadem ou bien Ras Elkhadem. C'est une espèce endémique du Sahara septentrional algérien et marocain, appréciée pour ses propriétés médicinales. Elle appartient à la famille des Plumbaginacées. C'est une famille cosmopolite, comportent plus de 750 espèces, concentrée principalement en Asie centrale et sur le pourtour méditerranéen. Les plantes appartenant à cette famille sont des herbacées annuelles ou plus souvent vivaces, des arbustes, parfois des plantes grimpantes et des lianes [13]. Le nom de la famille vient de la propriété de la racine de certains *Plumbago* de laisser sur le papier une teinte semblable à celle de mines de plombs [14].

Nous décrivons dans ce chapitre les principales caractéristiques botaniques, écologiques et médicinales de cette plante.

2- Description botanique de l'espèce *Limoniastrum feei*

Le genre *Limoniastrum* comprend des plantes de type pérennes. Il s'agit d'arbustes. Les espèces de ce genre sont au nombre de cinq, dont quatre sont endémiques. Ces dernières représentent 80% de l'ensemble des espèces [15].

Limoniastrum feei est une espèce hémicryptophyte. Il s'agit d'un arbuste bas de 10 à 40 cm de hauteur, avec des feuilles longues d'environ 5 cm, plates, légèrement sinuées sur les bords et charnues, à limbe farineux par la présence de concrétions calcaires, ce qui leur confère un aspect coriace, rugueux au toucher [16]. Le limbe des feuilles porte des glandes épidermiques sécrétant du mucilage et / ou des sels de calcium [13]. Ces feuilles sont disposées en rosette à la base d'une tige aérienne, ligneuse et épaisse (Figure n°1).

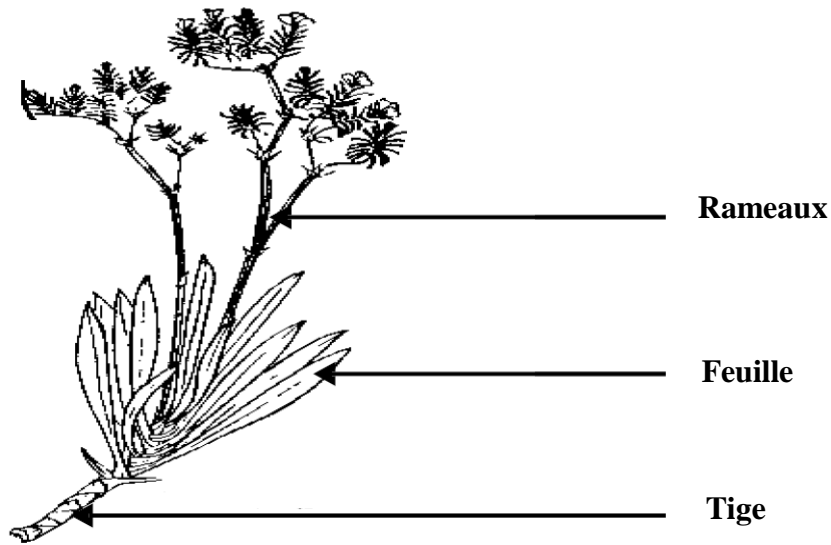


Figure n°1 : morphologie générale de *Limoniastrum feei* [17].

Au sommet des rameaux, la hampe florifère sans feuilles se termine par des inflorescences courtes et très fragiles, à fleurs entourées de bractées coriaces épineuses d'un rouge violacé [5]. Le calice tubulaire se compose de cinq sépales soudés, la corolle présente cinq pétales soudés en tube, l'androcée est formé de cinq étamines et l'ovaire supère est surmonté de cinq styles soudés dans leur partie inférieure (Figure n°2) [17]. Les fruits sont membraneux et indéhiscent [14]. La floraison commence au début du printemps (fin février) et continue jusqu'à la fin du printemps au mois de mai [18].



Figure n°2 : fleurs du genre *Limoniastrum* [19].

3- Nomenclature et taxonomie de *Limoniastrum feei*

Anciennement appelé *Bubania feei* Girard (1850), *Limoniastrum feei* (de Gir.) Batt. (1890), apparaît dans une récente nomenclature sous le nom de *Ceratolimon feei* (Girard) M.B. Crespo et Lledò [4].

Selon Chaabi [20], la taxonomie générale de cette plante est donnée comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Caryophyllidae

Ordre : Plumbaginales

Famille : Plumbaginaceae

Genre : *Limoniastrum*

Espèce : *feei*

4- Ecologie de *Limoniastrum feei*

Limoniastrum feei est une plante spontanée endémique du Sahara septentrional algérien et marocain. Elle est commune surtout dans le sud-oranais [5]. Cette espèce colonise le reg pierreux plus ou moins ensablés proches des dunes du Grand Erg occidental [21]. Elle occupe surtout les Hamada et les zones rocheuses [16]. Dans le sud-est marocain, elle couvre des surfaces assez vastes entre Bouârfa et Figuig [22], soit sur les surfaces plus ou moins planes ou encore dans Djebel Baní et Djebel Sarho dans le sud marocain [23]. Il s'agit d'une espèce dite saharo-arabique stricte [6].

Par le fait que cette espèce pérenne croît sous un bioclimat saharien, elle est donc soumise à un environnement très contraignant. En effet, elle subit un stress hydrique important et prolongé, un stress oxydant, irradiation UV et température très élevée [24]. Cependant, cette plante xérophyte est réputée pour sa forte résistance aux conditions climatiques extrêmes. C'est une espèce grasse qui sécrète des sels [25].

5- Activités biologiques de *Limoniastrum feei*

Dans les ethnopharmacopées sahariennes, *Limoniastrum feei* est connu pour ses multiples effets thérapeutiques. C'est une espèce à intérêts médicaux très larges. Différentes parties de cette plante sont employées en médecine populaire. Généralement, les parties aériennes de cet arbuste sont utilisées en décoctions pour traiter principalement ; les affections du tractus gastro-intestinal : les infections gastriques, ictère, hépatite, maux de ventre et diarrhée [16, 18, 26, 27, 28], les troubles des voies respiratoires : la bronchite et la toux [18, 28, 29], ainsi que la fièvre [30].

À cet effet, quelques études scientifiques liées à cette essence sont faites afin de dévoiler ses propriétés médicinales. Diverses activités biologiques sont décrites. Belboukhari et Cheriti [31] ont prouvé la présence d'une activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique des feuilles. Selon les travaux de Chaabi [24], El-haci [32] et El-haci [33], la partie aérienne de cette plante possède un grand pouvoir antioxydant. Keffous [34] précisent que la puissance de cette activité antioxydante est due à la présence élevée de composés phénoliques et de flavonoïdes. En plus, un effet anti-inflammatoire [28] et une activité antiproliférative [30] sont récemment décrites chez *Limoniastrum feei*.

6- Composés isolés de *Limoniastrum feei*

Les principales classes de métabolites secondaires liés à l'extraction de cette espèce sont les polyphénols, les saponines, les terpènes, les tanins, les flavonoïdes, les cardénolides et quelques stéroïdes [18, 28].

Une étude phytochimique a permis de caractériser quatre flavonoïdes **(1)** 6,3',4'-triméthoxy 3,5,5'-trihydroxy flavonol, **(2)** 3-(6"- malonyl 2"-ramnosyl glucosil) 6,3',4'-triméthoxy 5,5'- dihydroxy flavonol, **(3)** tetraacetate 7-dihydroxy-4'-méthoxy 8-O- β -glucopyranoside isoflavone, **(4)** tetraacetate 7,4'diméthoxy 8-O- β -glucopyranoside isoflavone [35]. Cette même équipe a identifié deux ans plus tard [27] deux autres flavonoïde, à savoir : 6-diméthyle 2,5 hexyl-7-O-glucopyranoside (1-6) glucopyranoside-5,7,3',4' hydroxyl flavone et 3-O-glucopyranoside 6-ester 3-méthyle hexanone 1 diene 2,4 -7-O-glucopyranosyle (1-6) (2-6) glucopyranoside trihydroxyl 5,3',4'-flavone.

En outre, sept nouveaux flavonoïdes ont été isolés de la partie aérienne de *Limoniastrum feei* (Figure n°3) [36].

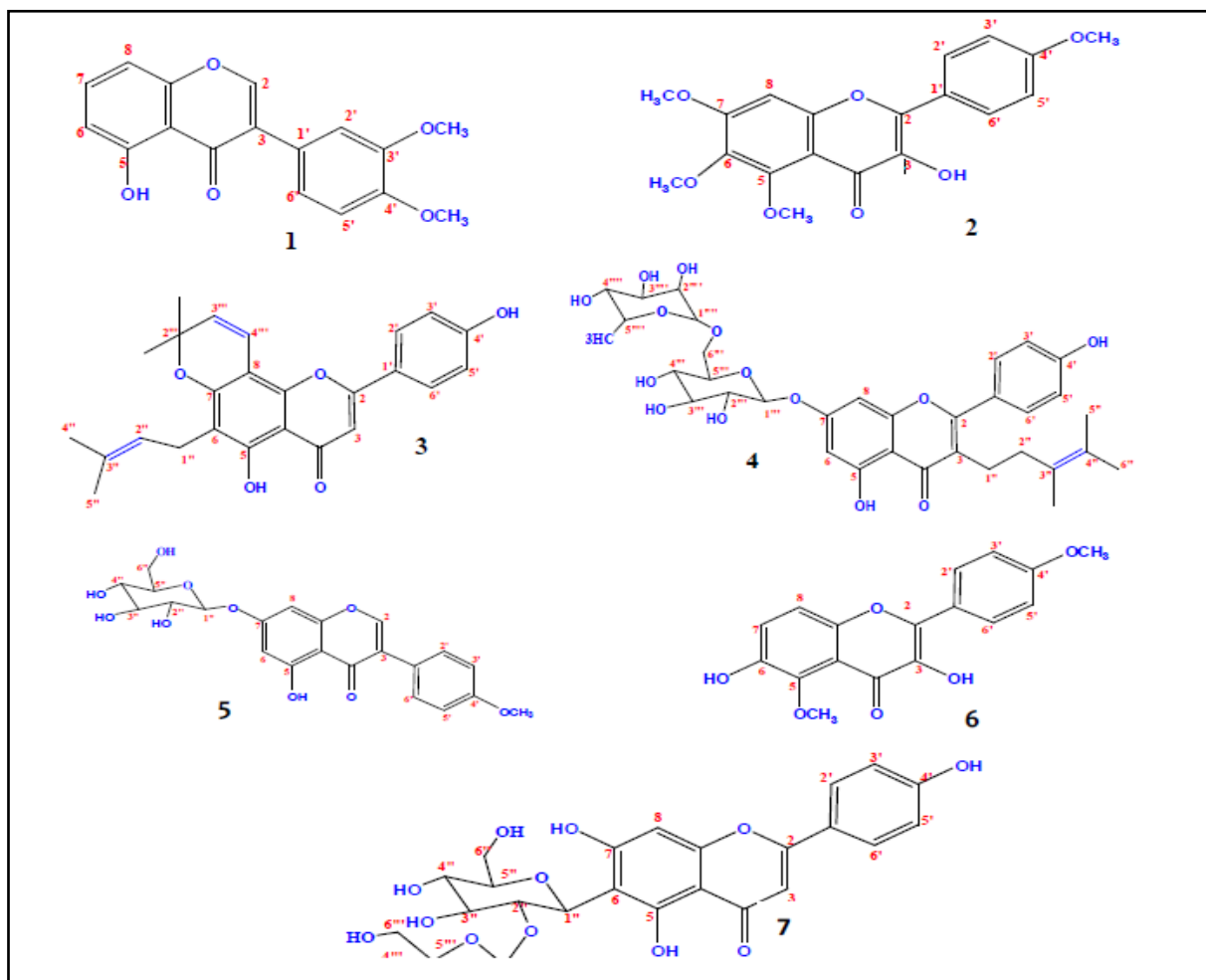


Figure n°3 : structures des sept flavonoïdes isolés de *L. feei* [36].

(1) 5 -hydroxy -3',4'-methoxyisoflavone, (2) 3 -hydroxy-5,6,7,4' -tetramethoxyflavone, (3) 7,8 -(2'',2'' -dimethylchromeno) -6 -prenyl -3,5,4' -trihydroxyflavone, (4) 7-O-(α -rhamnopyranosyl -(1-6)- β -glycopyranosyl) -3 -(3'',4''diméthyl-3'' pentényl) 4',5 -dihydroxy flavones, (5) 4' - methoxyisoflavone 7-O- β -glycopyranoside, (6) 5,4' -diméthoxy-3,6 -dihydroxy flavonol, (7) 6-C- β -(2''-O- β -glucopyranosyl)glucopyranosyl) -5,7,4' -trihydroxy flavone.

Chaabi et son équipe [24] ont décrit la présence de sept composés polyphénoliques : (1) acide gallique, (2) 4,6-dihydroxy-2-O-(β -D-glucopyranosyl) acétophénone ou myrciaphénone A, (3) myricétine-3-O- β -galactopyranoside, (4) épigallocatechine-3-O-gallate, (5) myricétine-3-O- α -rhamnopyranoside, (6) quercétine, (7) myricétine.

Récemment, trois composés phytochimiques antimicrobiens ont été également isolés et identifiés (Figure n°4) [37].

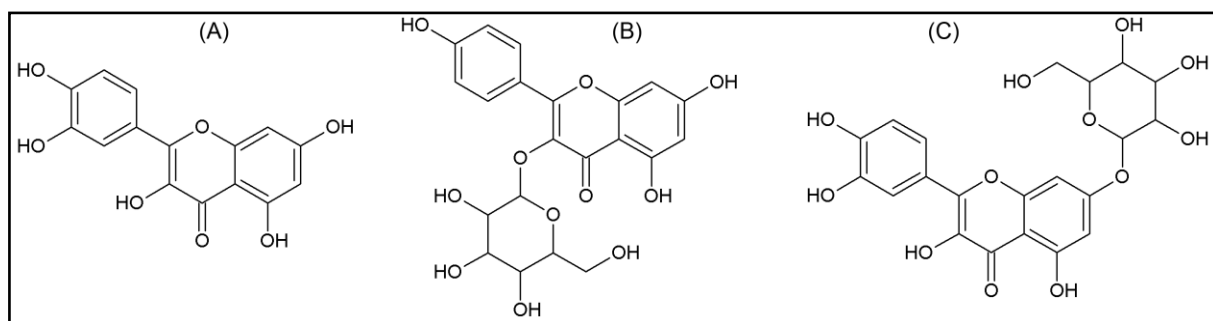


Figure n°4 : structures des trois composés antimicrobiens isolés de *L. feei* [37].

(A) quercétine 1, (B) kaempférol-3-*O*-β-D-glucopyranoside 2 (astragaline), (C) quercétine-7-*O*-β-D-glucopyranoside 3 (quercétine 7).

Une étude pharmacodynamique *in silico* de ces trois composés a révélé un grand potentiel d'activités biologiques. La quercétine a été proposée pour une activité antiallergique et anti-inflammatoire. Elle peut également, jouer un rôle dans le traitement des cataractes diabétiques et dystrophie musculaire. L'astragaline devait avoir une activité anticancéreuse. Tandis que quercétine 7 semble avoir un effet antiviral et une activité hémostatique [38].

7- Conclusion

L'espèce étudiée : *Limoniastrum feei* avec ses caractéristiques botaniques, écologiques et ses propriétés médicinales, représente une importante ressource naturelle à intérêts multiples. Cette plante endémique est utilisée par les populations sahariennes comme remède pour plusieurs affections humaines ; elle occupe également une surface pastorale considérable. Cependant, cette espèce spontanée reste timidement valorisée. À cet égard, il apparaît très important de mener plus d'études mettant l'accent sur la préservation de cette plante.

Chapitre 2

Zone d'étude

1- Description de la région d'étude

La région de Béchar se situe au nord du versant méridional de l'Atlas Saharien. Elle est à environ 1150 km au sud-ouest de la capitale Alger et à environ 80 km de la frontière algéro-marocaine (Figure n°5). La wilaya de Béchar est d'une superficie de 164 881 Km², elle est limitée au nord par les wilayas de Naâma et d'El Bayadh, à l'est par la wilaya d'Adrar, au sud par la wilaya de Tindouf et par le Royaume du Maroc à l'Ouest [39].



Figure n°5 : position géographique de Béchar en Algérie [40].

La géomorphologie de cette partie du Sahara est formée de cinq (5) principaux reliefs ; les montagnes (chaînes de Djebel Grouz, Djebel Béchar, Djebels Antar et Horeidh) ; les oueds (Oued Guir, Oued Messaouar, Oued Béchar, Oued Gharassa, Oued Manouarrar, Oued Kharoua, Oued Saoura et Oued Zousfana) ; les vallées de la Zousfana, du Guir et de la Saoura ; la Hamada du Guir à l'ouest et le Grand Erg Occidental à l'est [39].

Cette aire géographique est considérée comme une zone de refuge au sein du hotspot méditerranéen. Nonobstant, le tapis végétal est discontinu et très irrégulier. Les plantes permanentes ou vivaces dans cette région possèdent différents systèmes d'adaptations morphologiques et anatomiques, qui consistent surtout en un accroissement du système absorbant et une réduction de la surface évaporante. Elles ont la capacité de survivre en vie ralentie durant de longues périodes et sont dotées de mécanismes d'adsorption racinaire et de rétention d'eau performants [41].

2- Situation géographique du site de prélèvement

Notre zone d'étude (Oued Aghlal) se trouve dans la wilaya de Béchar. En coordonnées géographiques, elle est située entre les parallèles $31^{\circ} 07.126$ de latitude Nord et $2^{\circ} 09.255$ de longitude Ouest, avec une altitude de 695,25 m (Figure n°6, n°7 et n°8). Cet Oued est situé à 55 km de la ville de Béchar, juste après un reg (Hamada), définit comme étant des vastes étendues rocailleuses, recouvertes de débris à granulométrie variable, sur lesquels des éléments graveleux ou caillouteux protègent un substrat sableux [42].



Figure n°6 : situation géographique de Oued Aghlal dans la wilaya de Béchar (Google Earth).



Figure n°7 : photo satellite du site de prélèvement (Google Earth).



Figure n°8 : photographie du site de prélèvement.

A Oued Aghlal, en plus de la présence d'une palmeraie naturelle, les espèces végétales dominantes sont *Limoniastrum feei*, *Gymnocapsa decander*, *Acacia raddiana* et *Panicum turgidum* [43]. Dans le Sahara, il apparait que les lits d'oueds et les dayas sont les biotopes les plus riches en espèces, avec une supériorité des espèces annuelles. La richesse de ces dépressions est liée à leurs caractéristiques particulières. En effet, d'après Guinochet et Quézel [44], les lits d'oueds et les dayas sont les milieux où l'eau s'accumule quelques temps après chaque pluie. Ce sont les milieux les plus alimentés en eau et les plus riches en substrat argilo-sableux [45].

Le choix d'Oued Aghlal comme site de récolte est fondé sur plusieurs critères, dont les principaux sont la présence massive de *Limoniastrum feei* tout au long de cet oued et l'éloignement de ce site du milieu urbain et de la route nationale.

3- Contexte climatologique de la zone d'étude

Le Sahara septentrional algérien est caractérisé par des variations climatiques importantes. Le stress hydrique et l'aridité sont les éléments centraux qui constituent la spécificité du climat de cette région. Ils sont le résultat de la combinaison d'une faiblesse de précipitations et l'intensité des phénomènes d'évaporation, liés aux fortes températures [39].

Vu l'absence de station météorologique à Oued Aghlal, nous avons retenu les données climatiques de la station de Béchar pour caractériser le bioclimat de la zone d'étude. En effet, cette station est la plus proche. Les données climatiques disponibles pour cette station sont celles de la période entre 1995 et 2017. Elles ont été recueillies auprès de l'ONM de Béchar et sur les bases de données infoclimat.fr et historique-meteo.net.

3-1- Pluviométrie

Les cumuls annuels de la région d'étude sont relativement faibles, l'année la plus pluvieuse est celle de 2014 (248 mm), tandis que la plus faible valeur enregistrée pendant cette période de 23 ans est celle de l'année 2001 avec 16 mm (Tableau n°1).

Tableau n°1. Cumuls annuels en mm relevés à la station de Béchar (1995-2017).

Année	P (mm)	Année	P (mm)
1995	83	2007	95
1996	192	2008	135
1997	76	2009	166
1998	44	2010	108
1999	110	2011	138
2000	56	2012	116
2001	16	2013	80
2002	38	2014	248
2003	76	2015	142
2004	70	2016	134
2005	81	2017	83
2006	162	Moyenne	106

[P = précipitations annuelles].

Cette région est caractérisée par des faibles précipitations durant toute l'année. La saison la plus pluvieuse est l'automne (38 mm). Les valeurs des précipitations mensuelles enregistrées sont au maximum au mois de septembre, avec 14 mm et au minimum avec 3 mm au mois de juillet (Tableau n°2).

Tableau n°2. Moyennes des précipitations mensuelles et annuelles en mm relevées à la station de Béchar (1995-2017).

Saison	Automne			Hiver			Printemps			Eté		
Mois	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	Jlt	A
P(mm/mois)	14	13	11	10	9	8	10	8	7	7	3	7
P(mm/saison)	38			27			25			17		

[P = cumul des précipitations].

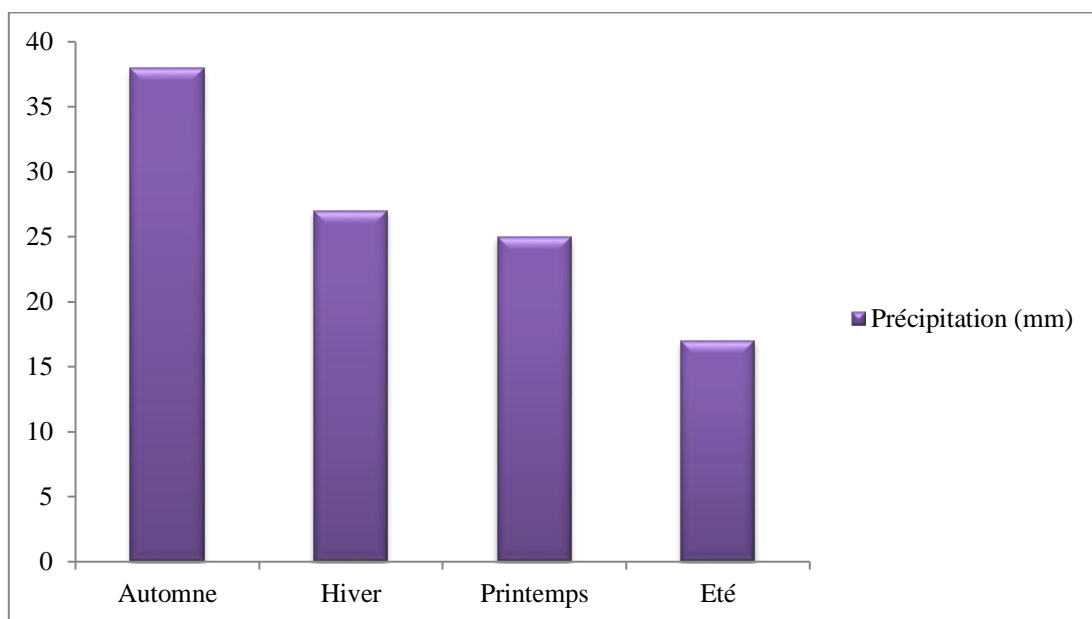


Figure n°9 : répartition moyenne saisonnière des précipitations.

La pluviométrie est le facteur le plus instable du climat saharien. Les faibles pluies qui caractérisent le Sahara sont dues à la rareté des masses d'air humides et non pas au manque de perturbations. La faible teneur en vapeur des basses couches de l'atmosphère saharien est principalement due à la forte continentalité du Sahara [46].

❖ Pluviométrie d'échantillonnage

Concernant la pluviométrie précédant notre échantillonnage, nous avons retenu les précipitations mensuelles moyennes pour 2013 qui précède notre échantillonnage de 2014 et les valeurs des cumuls mensuels sont données dans le tableau n°3.

Tableau n°3. Précipitations mensuelles en mm relevées à la station de Béchar pour l'année d'échantillonnage (2013).

Mois	Jan 2013	Fév 2013	Mar 2013	Avr 2013	Mai 2013	Jun 2013
P (mm)	1	1	18	4	1	5
Jlt 2013	Août 2013	Sep 2013	Oct 2013	Nov 2013	Déc 2013	Total
16	12	11	7	2	2	80

[P = précipitations mensuelles].

Le total des pluies cumulées durant cette année (80 mm) est proche à la moyenne générale des précipitations annuelles (106 mm) dans la région de Béchar, donc la quantité des précipitations pour cette année est représentative de la pluviométrie générale calculée précédemment sur une période de 23 ans.

3-2- Température

La température est l'un des facteurs majeurs limitant la distribution végétale. Elle varie généralement en fonction de l'altitude. Ce facteur devient plus important quand il est en interaction avec les autres facteurs climatiques. Les valeurs des températures minimales, maximales et moyennes de la région d'étude sont consignées dans le tableau n°4.

Tableau n°4. Variation des températures mensuelles minimales, maximales et moyennes (°C) de la station de Béchar (1995-2017).

Mois	J	F	M	A	M	J	Jlt	A	S	O	N	D
M (°C)	16	19	23	27	32	37	41	39	34	28	21	16
m (°C)	5	8	12	17	21	26	30	29	24	19	11	6
M+m/2 (°C)	11	13	17	22	26	31	35	34	29	23	16	12
M-m (°C)	11	11	11	10	11	11	11	10	10	9	10	10

[M = températures maximales ; m = températures minimales].

Les températures sont très élevées, les valeurs données dans le tableau n°4 montrent des étés très chauds, dont le maximum atteint 41°C au mois de juillet. Les minima ne descendent pas au dessous de 5°C en hiver. L'amplitude thermique maximale annuelle qui correspond à l'écart entre la température du mois le plus chaud et la température du mois le plus froid est de 36°C. Selon la classification de Debrach [47], le climat thermique de la région de Béchar est de type continental.

L'auteur propose la classification suivante :

- climat littoral : $15\text{ °C} < (M-m) < 25\text{ °C}$;
- climat semi continental : $25\text{ °C} < (M-m) < 35\text{ °C}$;
- climat continental : $(M-m) > 35\text{ °C}$.

Le caractère dominant de la variation thermique est celui du très fort contraste entre les valeurs extrêmes (températures minimale et maximale). Les températures mensuelles montrent que les 4 saisons sont très contrastées, au sens où les écarts peuvent atteindre des valeurs de 11°C sur la plupart des mois (Figure n°10). L'hiver reste la saison durant laquelle les valeurs des températures extrêmes sont les moins écartées. Ces contrastes thermiques ont une influence directe sur la végétation de la région concernée.

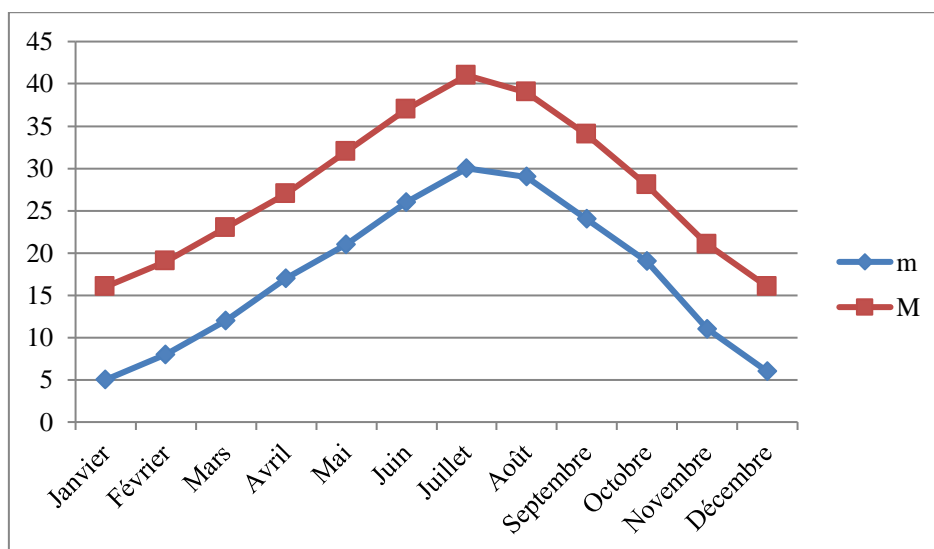


Figure n°10 : courbes représentant les températures mensuelles minimales et maximales dans la région de Béchar.

3-3- Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausсен

Pour limiter les périodes sèches et humides, Bagnouls et Gausсен [48] utilisent les précipitations et les températures moyennes mensuelles sur une échelle double. Ils considèrent qu'un mois est sec quand le total des précipitations exprimées en (mm) est inférieur ou égal au double de la température exprimée en (°C) ($P \leq 2T$).

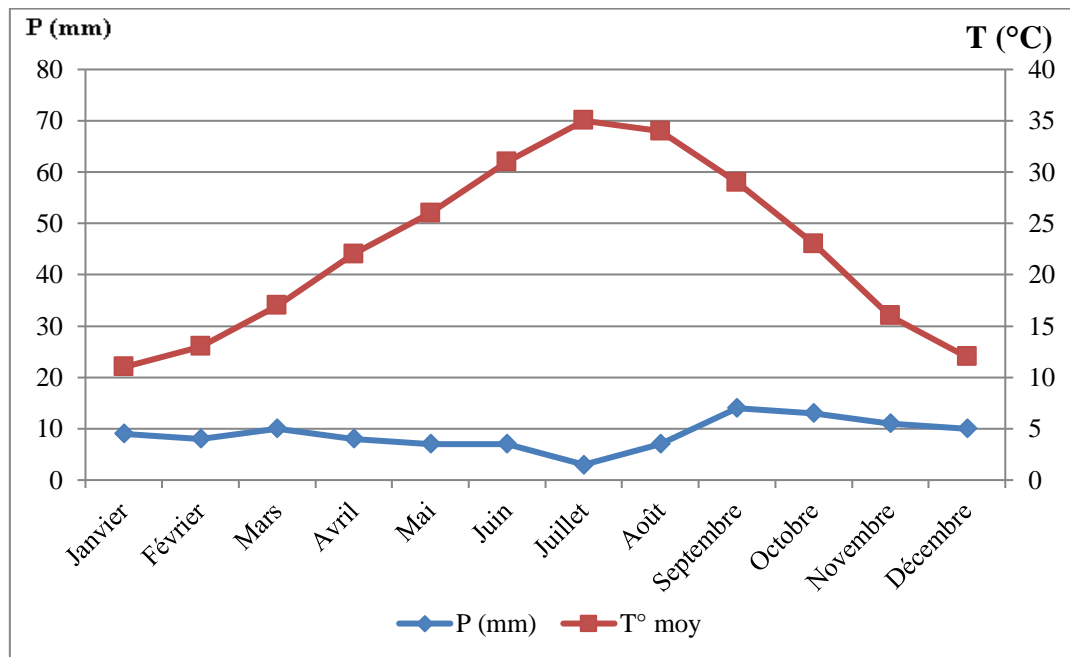


Figure n°11 : diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausсен pour la station de Béchar (1995-2017).

Le diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausсен confirme que la région d'étude est caractérisée par une période sèche durant toute l'année.

3-4- Indice d'aridité de De Martonne

Parmi les indices proposés pour étudier l'aridité, l'un des plus simples et le plus couramment utilisé est celui défini par le géographe De Martonne (1925) et exprimé par la relation suivante :

$$I = (P / T) + 10$$

Avec :

P : précipitations moyennes annuelles en mm ;

T : température moyenne annuelle en °C.

Pour la zone d'étude $P = 106 \text{ mm}$ et $T = 23 \text{ °C}$, l'indice d'aridité est donc :

$$I = (106 / 23) + 10 = 3.2$$

De Martonne considère la station comme :

- hyperaride : $I < 5$;
- aride : $5 < I < 10$;
- semi-aride : $10 < I < 20$;
- humide : $I > 20$.

L'indice d'aridité de la région de Béchar égal à 3.2, il correspond selon l'auteur à un climat hyperaride (Figure n°12). Le caractère d'hyperaridité est imprégné par la faiblesse des pluies et les fortes températures.

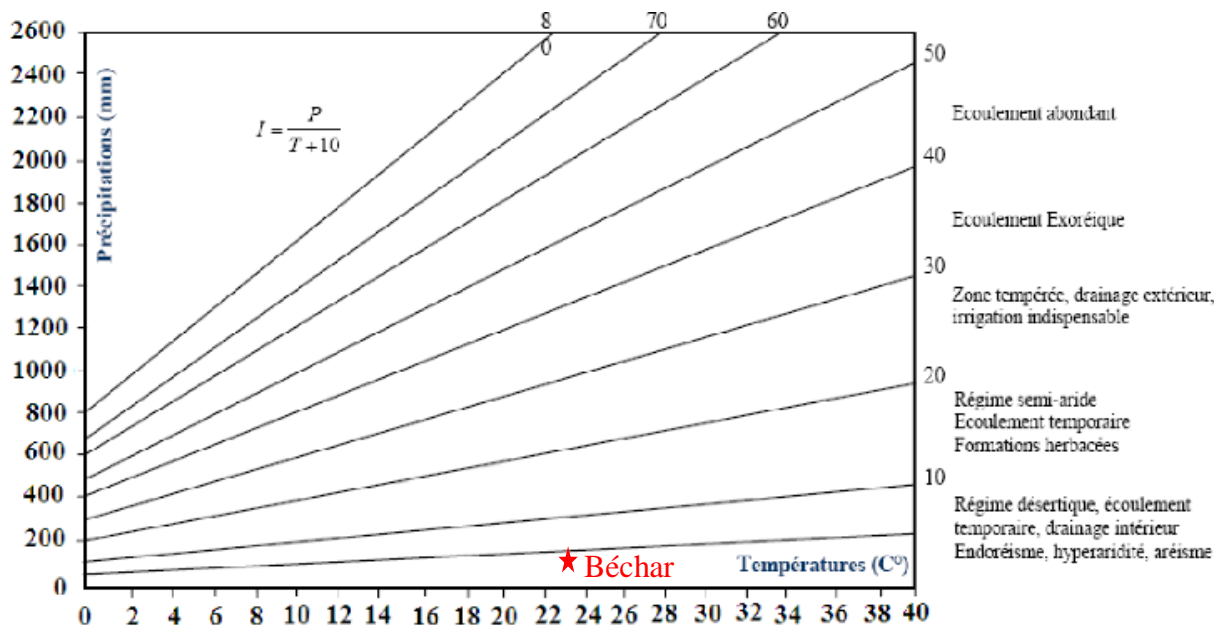


Figure n°12 : abaque de l'indice d'aridité de De Martonne.

4- Conclusion

Le bioclimat qui règne sur la région d'étude est de type hyperaride. Il est caractérisé par un hiver doux et une période de sécheresse prolongée sur toute l'année. Ce climat saharien est marquée notamment par la faiblesse et l'irrégularité des précipitations d'une part, et par les amplitudes thermiques et les températures trop élevées d'autre part. Les températures et les précipitations constituent les éléments majeurs qui régissent le climat d'une région. En plus de ces conditions climatiques extrêmes, cette zone est caractérisée par une évaporation importante, un rayonnement solaire excessif et un vent souvent présent.

Chapitre 3

Diversité fongique des feuilles de

Limoniastrum feei

1- Introduction

Dans la nature, les végétaux sont considérés comme des hôtes potentiels pour une large gamme de microorganismes, usuellement Bactéries [49, 50] et champignons [51, 52]. Les différentes parties du végétal hôte peuvent héberger ces derniers sur leur surface externe. Ils s'expriment alors en tant qu'épiphytes. Elles peuvent aussi les héberger au niveau des tissus internes, ils sont définis dans ce cas comme endophytes [53]. Les plantes peuvent donc servir de réservoir à une flore microbienne très importante connue sous le nom d'endophytes [54].

La phyllosphère représente l'interface entre les tissus végétaux des feuilles, fleurs, fruits, tiges et bourgeons et l'espace environnant [55]. La surface foliaire totale sur le globe est estimée à $4 \times 10^8 \text{ Km}^2$, soit plus que deux fois la surface couverte par les continents [56]. Cette partie des végétaux abrite de nombreuses espèces bactériennes et fongiques sous forme de levures, de champignons filamenteux ou encore de spores [57]. L'évolution des plantes au cours des ères était maintenue grâce à l'établissement des symbioses mutualistes avec certains microorganismes, dont les mycoendophytes constituent une catégorie majeure [58].

Ces derniers sont des espèces de champignons microscopiques. Ils se retrouvent dans les différentes parties des végétaux et vivent en symbiose avec la plante, car ils ne causent pas de dommages et contribuent même à lutter contre les agresseurs et les ravageurs de cette plante hôte [2, 59, 60]. Ils jouent notamment un rôle important dans l'aptitude de leurs plantes hôtes à leur environnement et contribuent par conséquent au maintien de la biodiversité végétale [61]. La relation entre le champignon endophyte et son hôte a été généralement considérée comme une relation mutualiste [62, 63], mais elle peut varier du mutualisme à l'antagonisme, en fonction du génotype du champignon et de l'hôte, ainsi que des conditions environnementales [63, 64]. Ces mycètes sont dotés d'une diversité génétique riche et conservée, avec des applications en pharmacologie et en agriculture.

2- Synthèse bibliographique

2-1- Introduction

Anciennement, les champignons ont été considérés comme des végétaux, plus précisément des Cryptogames, à la reproduction cachée, par opposition aux Phanérogames, ou plantes à fleurs donc à organes reproducteurs bien visibles. Avec l'avènement des nouvelles méthodes d'étude durant la seconde moitié du XX^{ème} siècle, notamment les progrès qu'a connus la biologie moléculaire, le caractère végétal des champignons a été contesté. Il est admis aujourd'hui que les champignons forment un règne à part, communément appelée dans la littérature règne des Mycota ou bien, règne fongique ou "Fungi". Malgré tout, la classification de certains groupes très particuliers reste encore ambiguë et incertaine.

Les champignons ou mycètes sont des Eucaryotes pluricellulaires, rarement unicellulaires, capables de coloniser des substrats très divers et ubiquistes (végétaux, litière, sol, insectes, air...). Ces organismes incluent des espèces macroscopiques (Macromycètes) et d'autres microscopiques (Micromycètes), d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ces derniers peuvent devenir visibles lorsque leur développement est important [65].

Une des particularités des champignons réside dans la composition structurale de leur paroi cellulaire riche en polysaccharides, dont les β glucanes et principalement de la chitine, celle-ci est une substance caractéristique du règne animal constituant l'exosquelette des Arthropodes. Par ailleurs, quelques champignons possèdent une paroi cellulosique proche à celle des cellules végétales [66]. Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines (Figure n°13). Les polysaccharides sont majoritairement la chitine, polymère de molécules de N-acétylglucosamine liées entre elles par une liaison de type β -1,4 et les glucanes, polymères de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons β -1,3 ou β -1,6. Ces deux polysaccharides assurent leur protection vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire, les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence et les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi [67].

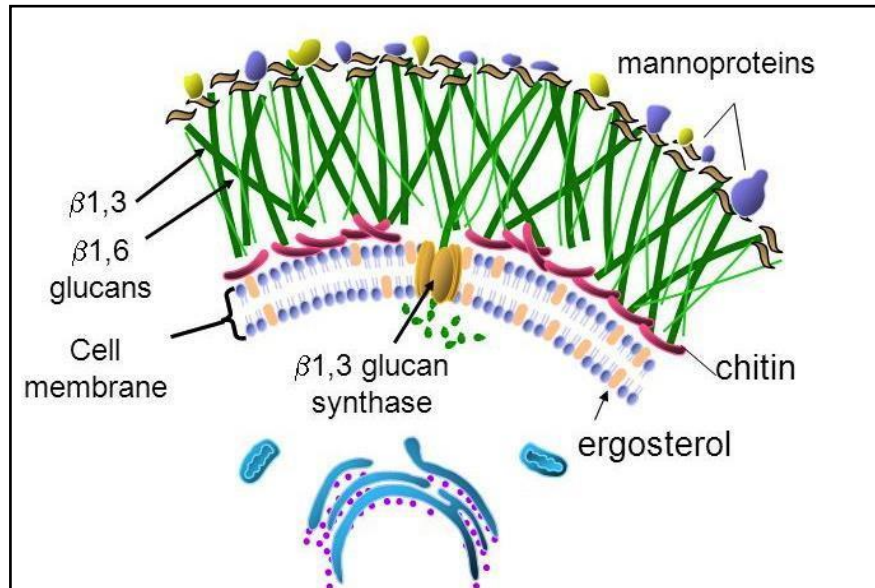


Figure n°13 : structure de la paroi des micromycètes [68].

Les champignons sont un règne du vivant regroupant plus de 100 000 espèces [69, 70, 71], réparties en une dizaine de phylums, dont la classification est régulièrement revue et le nombre d'espèces est en progression continue [72, 73]. Parmi tous les organismes vivants, on estime que les champignons représentent le deuxième règne le plus riche en espèces de la biosphère, les insectes étant de loin le règne le plus riche [56] (Figure n°14).

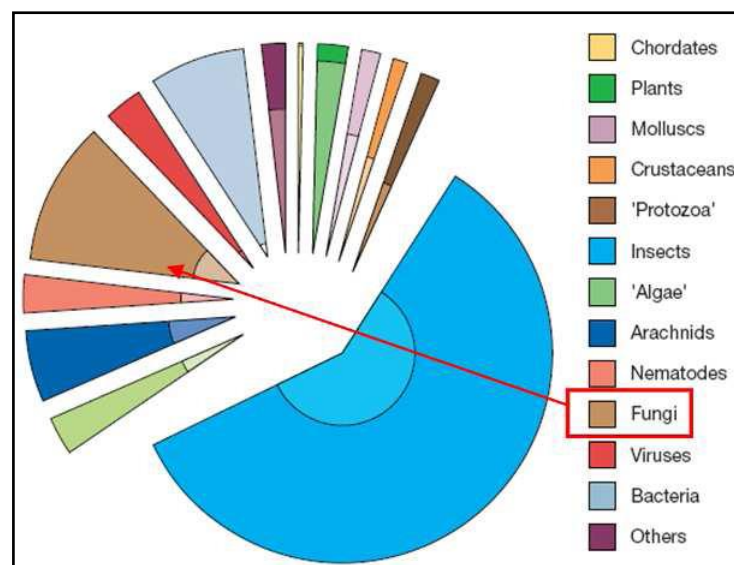


Figure n°14 : estimation de la répartition des espèces dans les règnes du vivant [74]. En plus clair au centre est représentée la proportion d'espèces décrites dans le règne.

2-2- Mode de vie des champignons

Les champignons sont une composante essentielle du fonctionnement des écosystèmes. Ce sont les principaux agents responsables des décompositions organiques dans la biosphère. Ils se nourrissent par absorption. Ils sont hétérotrophes comme les animaux, c'est-à-dire que leur source de composés hydrocarbonés est exogène, contrairement aux plantes et certaines bactéries photosynthétiques. En tant que saprophytes, ils permettent le recyclage par des voies métaboliques complexes de la matière organique morte végétale et animale, en éléments minéraux disponibles pour les plantes [75]. En tant que mutualistes de végétaux, ils facilitent la nutrition hydrique et minérale et augmentent ainsi la productivité primaire [76]. Enfin, en tant que parasites, ils causent des mortalités et peuvent structurer ainsi directement les communautés végétales et animales [77] et indirectement les organismes dépendant de ces hôtes par cascade trophique [78]. Plusieurs champignons ont une importance économique pour l'homme, parce qu'ils détruisent des denrées alimentaires et d'autres substances organiques. Le règne fongique comprend également des levures, des moisissures, des champignons comestibles, ainsi que des mycètes producteurs d'antibiotiques à intérêt médicale et agricole [79].

L'appareil végétatif des champignons filamenteux est un thalle ou mycélium, constitué par un réseau dense de filaments mycéliens ou hyphes souvent étendus, organisés en siphons ou segments. Ce mycélium se cloisonne dans certains groupes et certains stades du cycle de développement [79]. Une caractéristique majeure des champignons est leur mode de reproduction ; ils produisent un grand nombre de spores disséminées dans l'environnement, ce qui leur assure un pouvoir de diffusion et de contamination considérable. Les spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui représentent le principal critère de leur classification [65].

2-3- Systématique des champignons

La systématique des champignons est basée essentiellement sur des critères morphologiques. Bien que certaines approches modernes d'identification et de classification fongiques sont développées, telles que les études nutritionnelles, les tests sérologiques, biochimiques, immunologiques, phylogénétiques et moléculaires, ces dernières sont des outils de confirmation de données morphologiques [65, 80]. Parmi les phylums, on retrouve les Chytridiomycota, les Zygomycota, les Glomeromycota, les Basidiomycota et les Ascomycota.

Ces deux derniers phylums forment le sous règne des Dikarya et regroupent la grande majorité des espèces décrites à ce jour (Figure n°15).

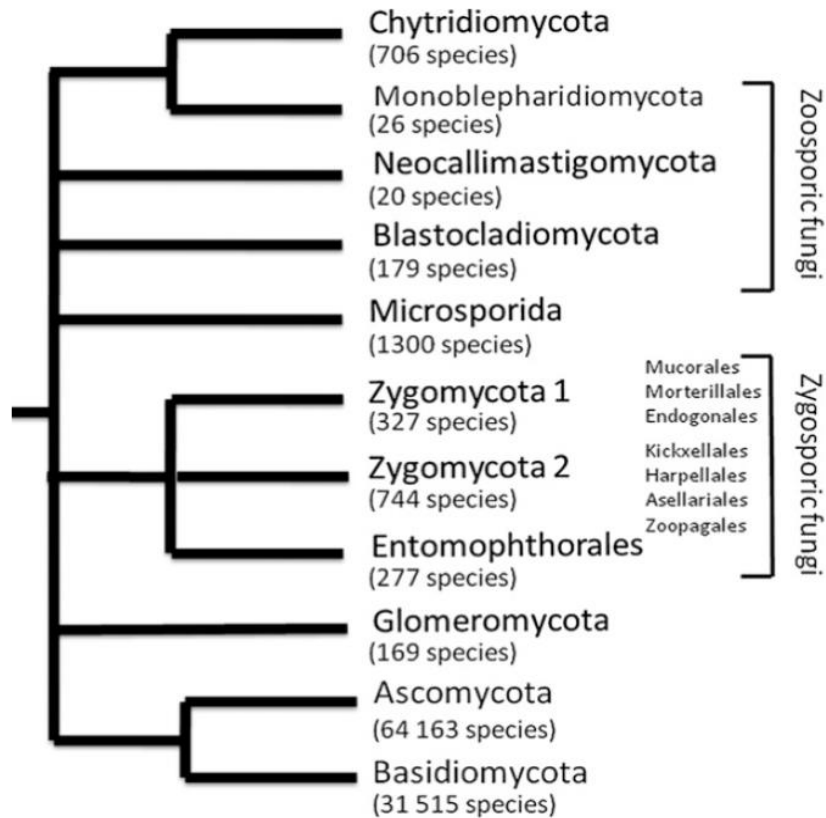


Figure n°15 : phyla fongiques et nombre d'espèces décrites. Classification extraite de Blackwell [73] et nombre d'espèces de Kirk [81].

❖ Phylum des Chytridiomycota

Les Chytridiomycètes constituent la lignée évolutive la plus ancienne des champignons, regroupés en espèces produisant des spores uniflagellées [72]. Ils sont les seuls champignons qui ont conservé la reproduction par des spores flagellées (zoospores). Ils comprennent des formes unicellulaires ou filamenteuses, qui produisent des cellules flagellées à un certain moment de leur cycle de vie [79, 82]. Les cellules mobiles possèdent le plus souvent un seul flagelle postérieur lisse. Les parois cellulaires sont formées de chitine, mais il peut exister aussi d'autres polymères, et leurs réserves sont composées de glycogène. Il existe environ 706 espèces. Ils vivent dans les habitats aquatiques et terrestres [82].

❖ **Phylum des Zygomycota**

Le groupe des Zygomycota est plus récent. Il comprend environ 1070 espèces décrites, dont de nombreux saprotrophes du sol (Mucorales) et les symbiotes des Arthropodes (Trichomycètes) ; certains sont des parasites d'insectes. Les Zygomycètes sont des champignons terrestres dont les hyphes ne sont cloisonnées que dans les organes reproducteurs [79]. Ils sont coenocytiques (dépourvus de filaments septés) et soumis à la reproduction sexuée par la formation d'une spore à paroi épaisse appelée zygospore [83]. Ils sont généralement faciles à reconnaître par leurs hyphes abondantes à croissance rapide [79].

❖ **Phylum des Glomeromycota**

Nouvellement reconnu comme un phylum à part, les Gloméromycètes regroupent des champignons symbiotiques et biotrophes stricts de plantes qui forment des mycorhizes à arbuscules avec les racines de l'ordre des deux tiers de toutes les espèces végétales [56, 84]. Ils sont principalement des champignons filamenteux et ne montrent pas de flagelles au niveau des spores [82].

❖ **Phylum des Basidiomycota**

La division des Basidiomycètes regroupe plus de 31 000 espèces décrites. Leur mode de vie est principalement saprophyte. Ce sont d'ailleurs les organismes fongiques ayant les capacités de dégradation de matériels ligno-cellulolytique les plus élaborées, la majorité compte parmi les champignons mycorhiziens à carpophores, mais aussi des parasites des plantes et des levures [56]. On y retrouve également certains organismes symbiotiques de plantes ou d'animaux [70]. Ces champignons terrestres montrent des hyphes perforées. Des cloisons complètes isolent les structures reproductrices, telles que les spores. La reproduction sexuée implique la formation des basidiospores. Les Basidiomycètes sont dicaryotiques pendant la plus grande partie de leur cycle de développement [79].

❖ **Phylum des Ascomycota**

Le groupe des Ascomycètes contient le plus grand nombre d'espèces recensées à ce jour, il comporte environ 65 000 espèces. Ils constituent la quasi-totalité des champignons capables de former des associations lichéniques [56, 65, 82], des levures utiles pour l'homme, y compris les espèces modèles importantes telles que *Saccharomyces cerevisiae* [56, 82]; utilisées en

agroalimentaire ou en pharmacologie tel le genre *Penicillium* [70] et encore, des espèces pathogènes pour l'homme et les animaux comme les *Aspergillus*. En plus, ils ont une grande importance économique. Certaines espèces sont des agents de biodégradation des substrats celluloses, d'autres peuvent entraîner des altérations aux denrées alimentaires et élaborer des toxines.

Les Ascomycètes sont des champignons terrestres et aquatiques dont l'appareil végétatif est un thalle septé [65]. Les hyphes sont cloisonnées, mais les cloisons sont perforées ; des cloisons complètes isolent les structures reproductrices, telles que les spores. Chez de nombreux Ascomycètes, les hyphes s'agglomèrent en structures complexes appelées ascomes [79]. En outre, ils présentent une structure caractéristique appelée asque, formé au cours de la reproduction sexuée, qui renferme un nombre défini d'ascospores. Ce sporocyste globuleux, cylindrique ou plus ou moins claviforme, avec une paroi simple ou double représente un important critère d'identification. Souvent les asques sont produits en grand nombre dans des structures de fructification nommés ascocarpes divisés en 3 catégories ; les cléistothèces (ascocarpes globuleux, clos) ; les périthèces (ascocarpes plus ou moins en forme de bouteille présentant un ostiole par lequel les spores sont expulsées) et les apothécies, ascocarpes ouverts en forme de coupe portant des asques en surface [65].

❖ Classe des champignons imparfaits (Deutéromycètes)

En dehors de la classification morphologique en phylums présentée précédemment, les champignons peuvent être divisés en deux classes différentes selon leur mode de reproduction. En effet, certains champignons peuvent se propager grâce à une reproduction sexuée, il s'agit de la classe des "Fungi perfecti" ou Eumycètes. Les champignons n'ayant qu'un mode de reproduction asexué sont appelés "Fungi imperfecti", dont font partie les Deutéromycètes ou champignons à conidies. En réalité, il existe certaines exceptions au sein de cette dernière classe, puisque pour certains champignons, il a été découvert en plus d'une forme asexuée connue anamorphe, une forme à reproduction sexuée dite téléomorphe. Le champignon a alors une appellation différente, avec par exemple *Aspergillus nidulans* qui devient *Emericella nidulans* [85].

Les Deutéromycètes réunissent le plus grand nombre d'espèces pathogènes pour l'homme et les animaux. La majorité des Deutéromycètes sont des formes imparfaites d'Ascomycètes [86, 87]. Ces champignons sont unicellulaires ou à thalle filamenteux. Ils sont divisés en 3 classes :

- les Blastomycètes : qui réunissent des levures tels les genres ; *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* ;
- les Hyphomycètes : champignons filamenteux stériles ou produisant des spores directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simples ou agrégés (Moniliaceae, Dematiaceae) ; les Hyphomycètes sont des champignons pour lesquels les conidies naissent de cellules banales ou de cellules spécialisées souvent portées par un filament différencié (le conidiophore) ; certaines Hyphomycètes (*Rhizoctonia*, *Sclerotium*) ne forment jamais de spores, ils sont classés dans le groupe Micellia sterilia (Mycélium stérile) ;
- les Coelomycètes : Champignons chez lesquels les conidies sont produites dans des structures de protection : les pycnides (Sphaeropsidales) et les acervules (Mélanconiales), généralement parasites de végétaux, forment des structures de fructification aplaties (acervules), sous l'épiderme ou la cuticule des cellules de la plante hôte [65, 71].

En résumé de la systématique générale des champignons, la figure n°16 illustre les principales divisions connues actuellement chez le règne fongique ; les flèches verticales représentent la classification selon le mode de reproduction (sexué ou asexué), tandis que les flèches en position horizontale traduisent la classification phylogénétique et morphologique.

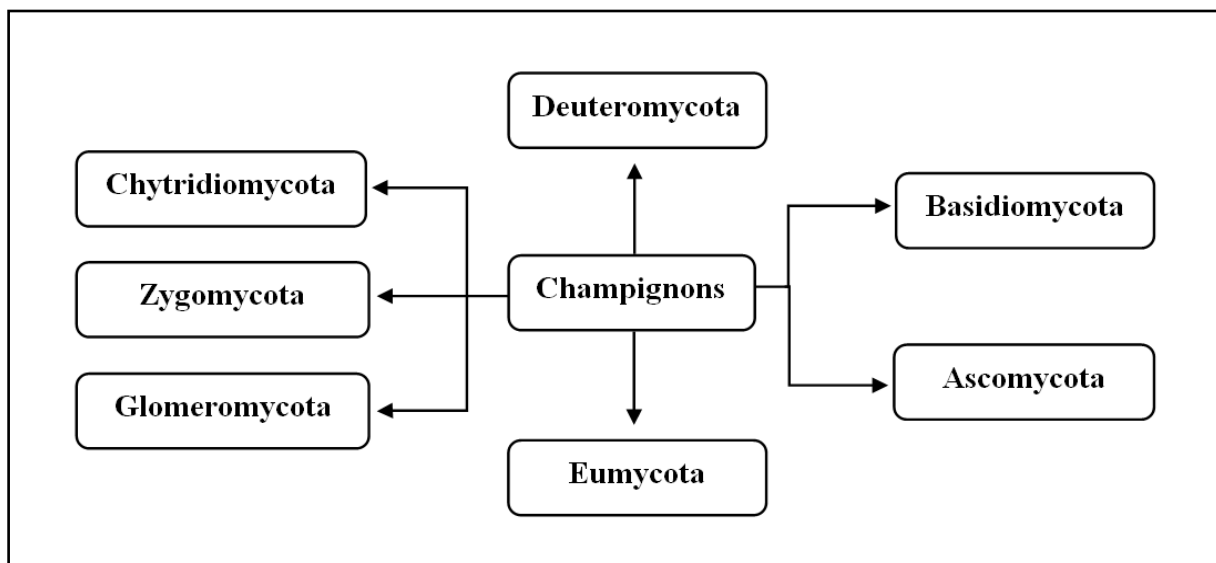


Figure n°16 : Schéma de synthèse sur la classification générale des champignons.

2-4- Champignons endophytes

2-4-1- Introduction

L'origine étymologique du mot endophyte provient du grec "endon" signifiant dedans et "phyton" désignant plante, donc l'endophyte est un organisme qui vit à l'intérieur des plantes [88, 89, 90]. L'usage de ce terme est aussi large que sa définition et le spectre des hôtes ainsi que les organismes qui les habitent (bactéries, champignons...etc) [91]. Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolés en tant qu'endophytes [92].

Le terme champignons endophytes fut utilisé pour la première fois pour décrire les champignons isolés à partir des tissus du végétal [93, 94, 95]. Contrairement aux épiphytes qui se développent à la surface, ces mycètes sont capables au moins pendant une partie ou la totalité de leur cycle de vie de coloniser les tissus sains internes des plantes vivantes [54, 96, 97], pour se développer de façon intercellulaire ou intracellulaire [52, 97, 98, 99, 100, 101, 102], sans déclencher de symptômes visibles de la maladie, ni d'affecter négativement ou altérer le statut biologique et physiologiques du végétal hôte [59, 90, 93, 94, 101, 103, 104, 105, 106, 107, 108].

Les champignons endophytes sont omniprésents dans la nature [90, 109, 110]. C'est une partie intégrante du microbiome de la plante, leurs façons de croître asymptomatiquement dans les tissus de plantes a induit que leurs relations avec l'hôte était de l'ordre du mutualisme et de la symbiose, mais leur biodiversité suggère qu'ils peuvent être également des saprophytes ou des pathogènes opportunistes [92, 96, 111, 112].

Mycoendophytes est le nouveau terme proposé pour ces champignons [101, 113]. Ils ont été trouvés dans les tissus sains de tous les taxons de végétaux étudiés à ce jour ; Algues, Bryophytes, Ptéridophytes, Gymnospermes et Angiospermes [90, 107, 114], et dans toutes les parties de la plante : feuilles, tiges, fleurs grains et racines [96, 97, 103, 115, 116]. Ils sont parfois limités au système racinaire, comme le cas des DSE (Dark Septate Endophytes) ou endophytes foncés à septation [99]. Ils sont parfois aussi confondus avec des champignons mycorhiziens, qui vivent en symbiose avec les racines des plantes [117, 118]. La définition du terme peut englober les champignons mycorhiziens, mais ils ont été exclus de ce groupe parce que leurs modes de vie sont différents [90, 118, 119].

2-4-2- Taxonomie des mycoendophytes

Les champignons endophytes peuvent être divisés en deux groupes taxonomiques différents : Clavicipitacées et non Clavicipitacées (Tableau n°5).

Tableau n°5. Critères symbiotiques utilisées pour caractériser les classes de champignons endophytes [101].

Critères	Clavicipitacées	Non-Clavicipitacées		
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Gamme d'hôtes	Restreinte	Vaste	Vaste	Vaste
Tissu(s) colonisé	Posses et rhizomes	Posses, racines et rhizomes	Posses	Racines
Colonisation au sein des plantes	Extensive	Extensive	Limitée	Extensive
Biodiversité au sein des plantes	Faible	Faible	Elevé	Inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Verticale et horizontale	Horizontale	Horizontale
Prestations de remise en forme	HNA	HNA et HA	HNA	HNA

(HNA) habitat non adapté : avantages comme la tolérance à la sécheresse et l'amélioration de la croissance.

(HA) habitat adapté: prestations résultent de la spécificité d'habitat et les pressions de sélection comme le pH, température et la salinité.

❖ Mycoendophytes Clavicipitacées (classe 1)

Ces champignons représentent un petit nombre d'espèces phylogénétiquement liés [101, 113]. Ils sont limités à quelques herbes comme les Graminées [120]. Les genres les plus réputés dans cette classe sont *Atkinsonella*, *Balansia*, *Epichloë*, *Myriogenospora*, *Nigrocornus* et *Parepichloë* [121].

❖ Mycoendophytes non-Clavicipitacées

Les champignons non-Clavicipitacées sont fortement diversifiés, représentant un assemblage polyphylétique composé principalement d'Ascomycètes, avec des rôles écologiques divers et souvent mal définis ou inconnus [101, 112]. Ils ont été isolés presque de toutes les principales familles de plantes (vasculaires et non vasculaires à la fois) et de tous les

écosystèmes terrestres, y compris des agroécosystèmes et des biomes s'étendant des tropiques à la toundra [101, 118, 122].

Mycoendophytes de la classe 2 : ces champignons appartiennent principalement au phylum des Ascomycota, avec quelques Basidiomycota. Ce sont des colonisateurs des racines, des tiges et des feuilles. Ils présentent une faible abondance dans la rhizosphère, mais ont généralement des fréquences d'infection élevées (90%-100%) chez les plantes des habitats très stressés [101, 113].

Mycoendophytes de la classe 3 : ce groupe comprend des champignons endophytes très diversifiés associés à des feuilles de plantes non vasculaires, des plantes vasculaires sans graines, des Conifères, des Angiospermes ligneuses et herbacées, dans les biomes allant des forêts tropicales à la forêt boréale et à l'arctique [101, 113].

Mycoendophytes de la classe 4 : ce sont des champignons Ascomycota qui forment des structures telles que des hyphes mélanisées inter et intracellulaires et des microsclérotés dans les racines [101, 113].

2-4-3- Diversité des mycoendophytes au sein des plantes

Les champignons endophytes forment un groupe extrêmement diversifié sur le plan écologique et taxonomique, avec une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante. La diversité marquante de ces derniers en la matière est significative à l'échelle interspécifique ou intraspécifique de l'hôte [8, 122]. On estime que le total des mycoendophytes dans le monde est de 500.000 à 600.000 espèces. Plus de 100 taxons ont été identifiés [123] et plus de 90% d'espèces, soit environ 465.000 d'entre elles ne sont pas encore décrites [124, 125].

Parmi les hôtes potentiels, les plantes médicinales sont l'un des groupes importants d'hôtes pour les mycoendophytes [106, 126, 127]. Particulièrement, les mycoendophytes des plantes médicinales chinoises qui ont démontré une forte production de composés pharmaceutiques et agricoles efficaces [126, 127, 128].

La colonisation des membres du règne des Planta par les champignons endophytes est ubiquiste. Une grande proportion de ces champignons fréquemment signalés chez les plantes appartient essentiellement à la classe des Ascomycètes. Dans une étude sur la richesse en espèces des champignons endophytes réalisée sur les feuilles des arbres des forêts tempérées, 49 taxons différents ont été isolés. A l'exception d'un seul taxon, la plupart était des Ascomycètes

filamenteux [129]. Márquez et son équipe [80] suggèrent aussi que la plupart des espèces de mycoendophytes identifiées sont des Ascomycètes : sur un total de 109 espèces recensées, seulement 9 espèces sont des Basidiomycètes et 2 des Zygomycètes. Ces mycoendophytes identifiés forment 54 genres différents regroupés au sein de 22 familles.

2-4-3-1- Diversité des mycoendophytes au niveau des feuilles

Une grande diversité des champignons endophytes a été signalée au sein des Angiospermes tropicales [104, 130], toutes les feuilles de ces espèces contiennent des champignons endophytes [104, 131].

Il existe des variations spatiales au sein d'une même feuille [132]. Des études ont également mis en évidence de fortes disparités d'assemblages d'endophytes entre les feuilles d'un même arbre [132, 133].

L'infection des parties foliaires des végétaux peut être localisée ou systémique. Par exemple, chez les aiguilles du sapin de douglas (*Pseudotsuga menziesii*), l'endophyte *Rhizoctonia parkeri* existe à une échelle d'infection discrète intracellulaire, limitée à quelques cellules épidermiques individualisées [134].

Par ailleurs, dans les feuilles, il peut y avoir des variations dans la concentration des mycoendophytes entre le pétiole, le limbe et la nervure principale [135]. Ils sont plus fréquents dans les nervures que dans les tissus internervaires, cela peut s'expliquer par les propriétés physiques de la feuille et la composition des nutriments offerts pour chaque compartiment tissulaire. En outre, les stomates situés sur des parties spécifiques de la feuille permettent de jouer un rôle dans la colonisation et l'accumulation des champignons suspendus dans l'air [136].

La densité en espèces fongiques augmente aussi avec de l'âge des feuilles. Les feuilles sénescents sont plus diversifiées par rapport aux jeunes feuilles [137].

2-4-3-2- Facteurs influençant la diversité des mycoendophytes

Les champignons endophytes exhibent généralement une vie discrète le plus souvent entière et quelquefois partielle, durant laquelle la colonisation et la croissance cesse temporairement, mais reprend à nouveau après un changement induit chez la plante hôte. Ce rythme de croissance épisodique est déterminant des endophytes, en général [8].

La colonisation et la différenciation des microorganismes endophytes au sein des plantes sont gouvernées par une multitude de facteurs intrinsèques liées directement à la physiologie de l'hôte et/ou des facteurs modulés par le milieu extérieur de l'hôte [138].

Les taux de l'infection et de la diversité fongique chez une espèce végétale donnée sont influencés par plusieurs paramètres, tels que l'identité et l'âge de la plante [123], l'état phytosanitaire et la génétique de l'hôte [109, 130], les changements biochimiques au niveau des concentrations des phytohormones ou des métabolites et/ou les changements physiques, comme la division et l'élongation cellulaire chez la plante [139]. En plus, ils peuvent varier qualitativement et quantitativement en fonction de leur propre cycle de vie, en réponse à l'environnement qui entoure la plante comme l'emplacement géographique [140], l'altitude, le vent, le bioclimat, les précipitations et les températures [122, 141, 142].

L'espèce hôte semble être le premier facteur structurant la communauté fongique, à la fois en milieu tempéré [133, 143] et en milieu tropical [104, 133, 143].

Nombreuses sont les études qui permettent de dire que les facteurs environnementaux, tels le stress hydrique, les régimes d'humidité saisonnière et même l'application d'engrais peuvent avoir un effet sur les communautés des champignons endophytes [144, 145, 146]. L'interaction de ces facteurs peut aussi avoir un impact significatif sur la composition endophytique [147].

Une forte corrélation a été observée entre les niveaux d'infection d'endophytes et les précipitations cumulées [137]. Ceci a déjà été observé chez le chêne, où l'eau libre et l'humidité élevées favorisent l'activité et la colonisation fongique de l'hôte [94]. Le même constat est noté chez *Plumeria rubra*, où les précipitations sont les principaux facteurs qui influencent l'infection par des endophytes foliaires. Les feuilles échantillonnées pendant la saison des pluies portent plus d'endophytes que celles prélevées durant la saison sèche [137].

Les plantes de la région méditerranéenne semblent montrer moins de richesse en champignons endophytes [125]. L'activité microbienne dans les sols désertiques dépend fortement des caractéristiques telles que la température, l'humidité et la disponibilité en carbone. Cependant, la disponibilité en eau est la principale contrainte affectant la diversité, la communauté microbienne et l'activité de la structure [148].

2-4-4- Modes de transmission des mycoendophytes

Il existe deux modes de transmission (reproduction) chez les champignons endophytes (Figure n° 17).

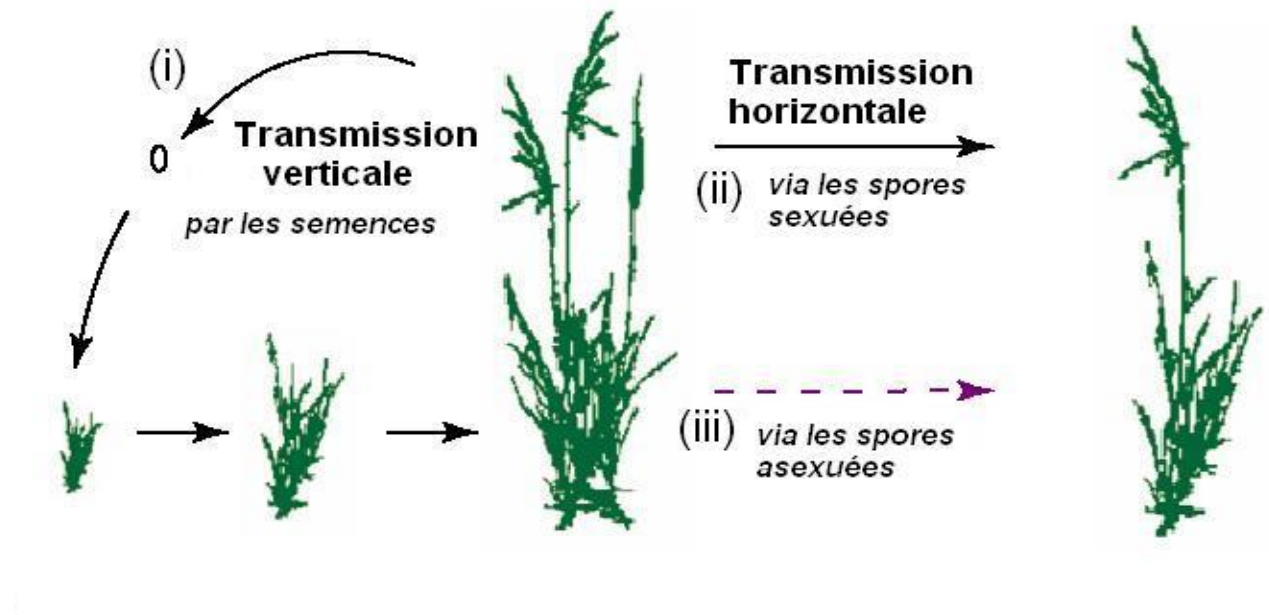


Figure n°17 : cycle de vie et modes de transmission (horizontale et verticale) du champignon endophyte *Neotyphodium* sur son hôte *Festuca arundinacea* [149].

❖ Transmission verticale (reproduction par croissance végétative)

C'est le principal mode de transmission des mycoendophytes [150]. Les champignons endophytes se transmettent à partir de la plante hôte vers la descendance. Les semences du végétal portent elles-mêmes leur propre inoculum d'endophytes.

Ce groupe fongique se développe entièrement à l'intérieur des tissus végétaux et ne produit jamais de structures externes ou fructifications sur la plante hôte [151]. Hardoim *et al.* [152] classent ces endophytes comme "obligatoires", car ils sont strictement dépendants de la plante hôte pour leur croissance et leur survie.

La reproduction est effectuée généralement via la croissance végétative de l'hyphe, pendant le développement des ovules de l'hôte qui causent l'infection des graines. Ce mode de transmission est connu principalement chez les Graminées [153].

❖ **Transmission horizontale (reproduction via les spores)**

Elle s'effectue entre les plantes de la même espèce ou d'espèces différentes via les spores [154]. Ces spores sont déposées sur les différentes parties du végétal, en particulier sur les feuilles [104] et les taux de manifestation externe de l'infection dépendent de l'hôte [105]. La transmission horizontale des champignons endophytes est communément trouvée chez les plantes ligneuses [105, 155].

Ces mycoendophytes sont classés comme "facultatifs". Ils vivent en dehors de l'hôte pendant une certaine étape de leur cycle de vie. Ils sont recrutés par la plante, principalement à travers la rhizosphère et à partir des communautés du sol adjacent [152]. Les spores de ces champignons sont emportées par des vecteurs (les insectes, le vent ou la pluie), se déposent sur les parties aériennes et les racines de la plante, pénètrent à travers les stomates ou en forment des appressoria (organes de fixation et de germination des spores) et colonisent finalement l'intérieur de la plante (Figure n°18) [156].

Dans ce mode de reproduction, le champignon peut être transmis soit par spores sexuées ou asexuées pour infecter d'autres plantes [109]. Etant donné que certains champignons peuvent produire soit des spores sexuées soit asexuées et que la reproduction sexuée est toujours horizontale, contrairement à la reproduction asexuée qui peut se faire verticalement, via les graines ou horizontalement par les spores [157].

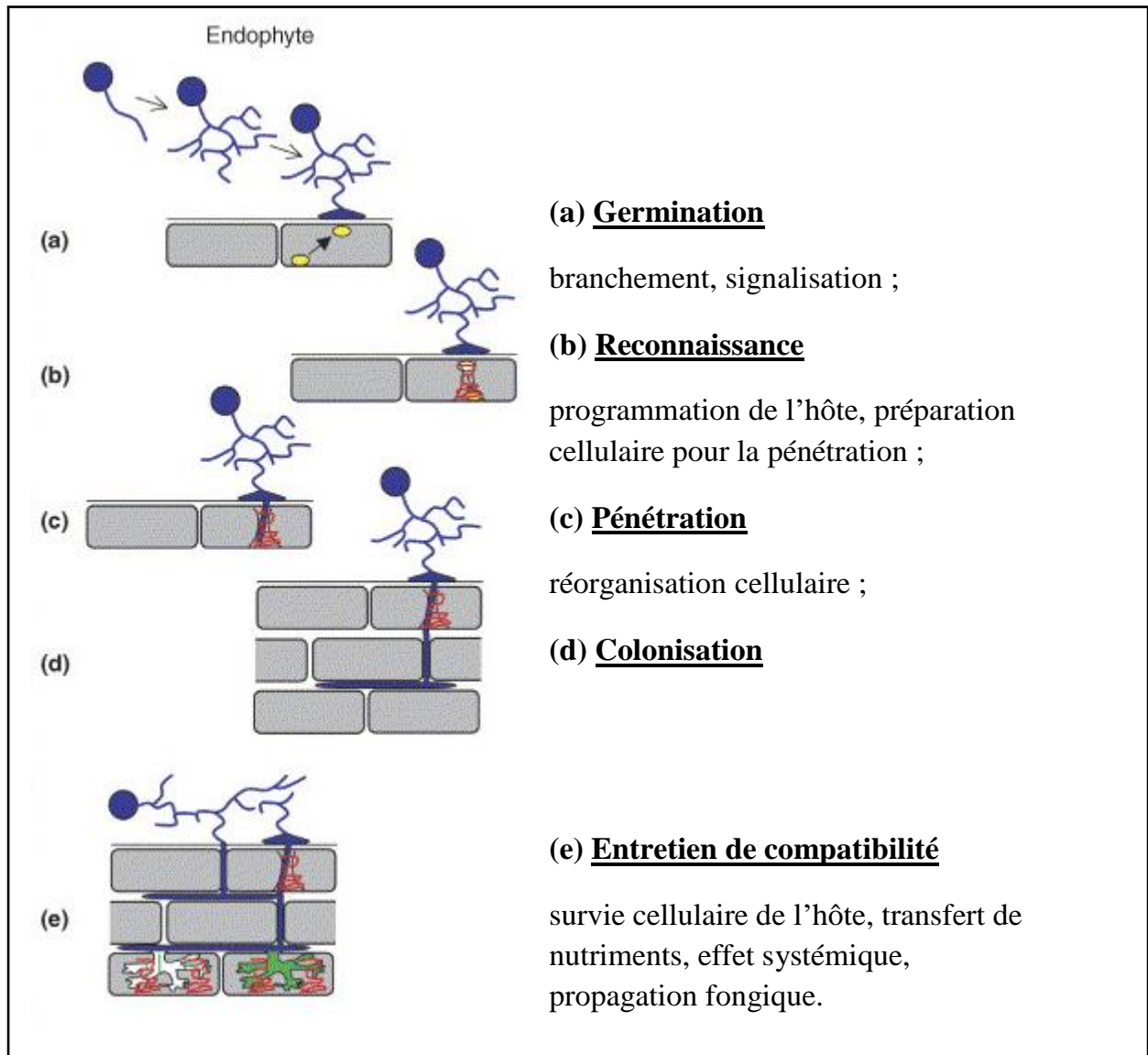


Figure n°18 : illustration d'une colonisation par un champignon endophyte (développement symbiotique) [158].

- (a) Une fois que les spores d'endophyte germent et approchent un appareil végétatif de l'hôte, la dominance apicale est abandonnée et le branchement d'hyphes est déclenché par le 5- désoxy-strigol ;
- (b) Dès le premier contact physique, le champignon forme un appressorium qui semble induire le mouvement du noyau de la plante vers le site du contact ;
- (c) Les éléments cytosquelettiques et le réticulum endoplasmique forment le dispositif de la pré-pénétration le long de l'axe du mouvement nucléaire ;
- (d) Quand le champignon atteint finalement le cortex intérieur, il pénètre la paroi cellulaire et construit une structure arborescente d'hyphes, comme un réseau filamenteux (arbuscule) ;
- (e) la colonisation des tissus commence. L'infection initiale est accompagnée par une induction équilibrée de gènes de la défense de la plante [156].

2-4-5- Interaction entre plantes et mycoendophytes

Toute interaction plante-champignon est précédée par une rencontre physique entre les deux, suivie de plusieurs barrières physiques et chimiques qui doivent être surmontés pour établir avec succès une association équilibrée [112].

Les mycoendophytes possèdent différents modes de vie, donnant différentes interactions qui sont variables d'un champignon à un autre et d'un hôte à un autre. La gamme d'interactions endophyte-plante est considérée donc comme un continuum [138], car elle peut aller d'un simple commensalisme [159], à la relation mutualistique, puis du commensalisme au parasitisme de manière continue [160].

Le mutualisme est défini comme une relation bénéfique pour les deux partenaires. En adoptant ce modèle symbiotique, les champignons endophytes confèrent à la plante hôte une amélioration de son état de santé, en synthétisant certains métabolites fonctionnels et des molécules de défense contre les phytopathogènes [161]. En retour, la plante procure à l'endophyte des éléments nutritifs, une protection contre la dessiccation et lui permet aussi en cas de transmission verticale, le passage à la prochaine génération [12, 138]. Cette association symbiotique est basée sur un équilibre finement élaboré entre les exigences de l'envahisseur et la réponse des plantes hôtes.

Si l'interaction est déséquilibrée, il est possible que l'endophyte devienne pathogène [112]. Les symptômes de la maladie apparaissent et le champignon est exclu par les réactions de défense induites par l'hôte [12]. La stabilité ou la variabilité de cette prestation asymptomatique dépendent de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, tels que le stress de l'environnement, la sénescence des plantes hôtes [90], la virulence des mycoendophytes, la réaction défensive de l'hôte [162], les génotypes des espèces en interactions [163], le mode de transmission, la quantité des nutriments disponibles, etc... [111, 164].

Maintenant, il y a suffisamment de preuves que les interactions plantes-champignons endophytes ont un rôle déterminant de l'évolution de la biodiversité végétale [165].

2-4-6- Rôles des mycoendophytes

Les mycoendophytes jouent plusieurs rôles physiologiques et écologiques auprès des végétaux avec qui ils vivent en association symbiotique. Leurs actions bénéfiques chez la plante hôte peuvent se traduire au niveau physique par des améliorations de l'état général notamment, l'augmentation de la nutrition et de la croissance et par conséquent, la protection contre les maladies et les pathogènes, contre les herbivores et les insectes défoliateurs. Ils contribuent aussi à l'adaptation aux changements climatiques et aux variations écologiques en augmentant la résistance de la plante aux stress environnementaux. Cependant, des études récentes viennent de montrer leur rôle promoteur dans la tolérance au stress abiotique.

Quoiqu'il en soit, il est clair que ces champignons peuvent avoir de profondes répercussions sur la survie et la santé des plantes dans tous les écosystèmes terrestres, et donc sans doute jouer un rôle important dans la biogéographie des plantes, l'évolution et la structure de la communauté [101].

2-4-6-1- Rôles physiologiques

Les champignons endophytes jouent un rôle important dans la physiologie et le fitness de la plante hôte. En contre partie de la nutrition offerte par la plante hôte, les champignons endophytes confèrent à cette dernière la capacité de maintenir et d'améliorer ses performances biotiques, même sous conditions écologiques sévères et même contre des facteurs de stress abiotiques (stress hydrique, salin, radiatif, pollution, etc...) [59, 60, 119, 166].

2-4-6-1-1- Nutrition et croissance

Dans le contexte de bioproduction primaire, il a été constaté que les plantes colonisées par les mycoendophytes se développent mieux. Effectivement, ces groupes fongiques peuvent avantageusement influencer sur la productivité primaire en augmentant la biomasse [110, 167].

Les champignons endophytes aident l'hôte en renforçant leur capacité de produire ou de capturer des ressources limitées : ce qui augmente sa croissance [155, 162, 168, 169]. Ceci est dû en partie à la synthèse de certains types de régulateurs de croissance, tels que l'acide 3-indolacétique (AIA), cytokinines et gibbérellines [170, 171] et par une interaction directe avec les phytohormones et d'autres substances favorisant la croissance [105]. De nombreuses études ont été menées pour prouver l'implication des endophytes dans la production de biomasse. Les

espèces bien étudiées sont *Festuca arundinacea* et *Lolium perenne*. Une expérience faite pour suivre le taux de croissance de ces deux dernières plantes a montré que le lot infecté par les mycoendophytes avait une biomasse significativement plus élevée que les plantes indemnes [154]. Les mêmes résultats ont été rapportés chez les Graminées *Festuca obtus* et *Poa sylvestris* [172].

Dans certaines communautés végétales, il a été observé également que les plantes infectées sont dominantes plutôt que celles non infectées [173]. Chez les plantes infectées par les mycoendophytes, on trouve une myriade de substances dont le rôle est l'ajustement osmotique entre autre, tels les sucres solubles et certains métabolites fongiques (polyols) tel que le mannitol et l'arabitol [174]. Malinowski *et al.* [175] ont constaté que les plantes infectées développent de longs poils absorbants et diminuent le diamètre des racines. Ces traits augmentent la surface racinaire qui optimise l'absorption de l'eau et l'acquisition des éléments minéraux. Cette accumulation de solutés en réponse au stress hydrique aide à maintenir la turgescence cellulaire et facilite les processus physiologiques et biochimiques. En outre, Gundel et ses collaborateurs [176] ont observé que dans le cas d'une faible disponibilité en eau, des graines infectées par des endophytes présentent une germination supérieure à celle des semences non infectées.

Les champignons endophytes jouent notamment un rôle déterminant en matière d'assimilation et de solubilisation des éléments minéraux comme l'azote (N), le phosphore (P) et le soufre (S) [84, 100, 113, 161, 170, 177]. A titre d'exemple, le champignon endophyte *Piriformospora indica* permet aux plantes de pousser dans un stress extrême en éléments nutritifs essentiels. Ce champignon a le potentiel de solubiliser les phosphates et les remettre en phosphore soluble utilisé dans le métabolisme de la plante hôte, grâce à l'enzyme phosphatase acide qu'il possède. *P. indica* est capable aussi d'améliorer l'absorption de nitrates et de réguler le métabolisme du carbone (C) et du soufre [169]. Le genre *Scedosporium* est aussi connu pour ses sidérophores, qui sont des molécules chélatrices de fer. L'association avec ce champignon améliore l'approvisionnement en fer, un oligoélément très important pour la croissance de la plante [178].

2-4-6-1-2- Protection contre les microorganismes pathogènes

Les plantes dans leur milieu naturel sont constamment remises en question par une variété d'agents pathogènes, comme les microorganismes (champignons, bactéries et virus). Les facteurs qui déterminent la survie des plantes contre ces agents comprennent un vaste arsenal de

mécanismes de défense active. Cependant, les plantes porteuses de champignons endophytes se protègent contre les microorganismes pathogènes, soit par l'interaction directe avec ces organismes ou par l'induction d'une résistance systémique, grâce au processus d'infection par les endophytes qui vient souvent renforcer et accélérer le système défensif constitutif de l'hôte, par la contribution à la formation d'obstacles structurels (cires, cutine, suber, lignine, composés phénoliques, cellulose, callose et protéines de la paroi cellulaire) [105], la production d'antibiotiques, la stimulation des mécanismes de défense de l'hôte, la concurrence pour la nourriture ou les sites de colonisation et le mycoparasitisme [179].

Il a été constaté que les plantes symbiotiques activent le système de défense plus rapidement que les plantes non symbiotiques, après l'épreuve pathogène. Les mécanismes de défense actifs des plantes impliquent principalement le métabolisme oxydatif, une mort rapide et localisée de cellules (réponses hypersensibles), l'accumulation de phytoalexines et la synthèse des protéines liées à la pathogénèse [119].

Les champignons sont connus pour être une riche source de substances antimicrobiennes. À cet égard, plusieurs investigations ont été menées en utilisant les mycoendophytes pour le contrôle des maladies des plantes. Arnold [180] a démontré une corrélation significative entre la présence d'endophytes et la réduction de l'incidence de la maladie d'arbres du cacao (*Theobroma cacao*), causée par *Phytophthora sp.* L'inoculation d'endophytes dans les semis de cacao, avant d'être infectés par *Phytophthora sp.*, a considérablement réduit l'incidence de la maladie et de ses effets néfastes. Cette protection est principalement localisée dans les tissus infectés d'endophytes. Par la suite, Herre et ses collaborateurs [181], en isolant les champignons endophytes de *T. cacao*, ont observé notamment leur effet antagoniste sur les agents pathogènes. Un autre essai sur le terrain a montré que l'utilisation de champignons endophytes *Colletotrichum sp.*, et *Botryosphaeria sp.*, réduit l'incidence de la maladie de la pourriture brune causée par *Phytophthora sp.* De plus, le seul agent potentiel connu de lutte biologique contre la rouille vésiculeuse du pin blanc est un champignon endophyte *Microshaeropsis arundinis* [9]. *Alternaria alternata* et *Fusarium proliferatum* sont identifiées comme agents de lutte biologique contre des pathologies spécifiques, tel que le mildiou de la vigne causé par *Plasmopara viticola* [123].

Des études récentes montrent que les mycoendophytes peuvent induire des mécanismes de résistance systémique et l'expression de gènes de défense, contre l'attaque de certains agents

pathogènes chez leurs hôtes par la production de métabolites secondaires [179, 182] et d'enzymes qui dégradent les parasites [123, 179]. En outre, les espèces endophytes pourraient éventuellement concurrencer les champignons pathogènes des plantes pour l'espace et les nutriments [123].

Acremonium, *Phoma glomerata*, *Chaetomium globosum* et *Aureobasidium pullulans* ont été signalés présentant une activité antagoniste contre certains microorganismes pathogènes. Les auteurs ont constaté que les communautés d'endophytes peuvent constituer une source de nouveaux agents fongiques de lutte biologique utiles pour contrôler les maladies, en particulier celles qui sont associées aux jeunes plantes produites dans les pépinières [123, 183].

2-4-6-1-3- Protection contre les herbivores et les insectes

Les végétaux peuvent également bénéficier de la présence symbiotique des mycoendophytes, car ces derniers limitent la croissance et la survie de différents ravageurs [124, 184, 185]. Ces mycètes mutualistes sont capables de modifier les habitudes alimentaires des herbivores, en produisant des métabolites toxiques [186]. Ils sont bien connus pour leur rôle de protéger l'hôte contre des insectes et des herbivores.

Bacon et ses collaborateurs [187] ont montré la toxicité de l'hôte porteur de champignons endophytes, pour les mammifères herbivores domestiques. Il est maintenant établi que les champignons endophytes sont capables de protéger leur hôte contre les herbivores [188]. Plusieurs types de maladies peuvent atteindre les animaux qui ont mangé des herbes infectées par des endophytes. Un exemple de ces maladies provoquées par les endophytes est la toxicose de *Festuca arundinaceae* touchant les ruminants et les chevaux, après avoir pris de la plante infectée par le champignon endophyte *Epichloë typhina* [189]. Des études supplémentaires ont montré que cette toxicité est due à la présence de certain nombre de composés, y compris des amides d'acide lysergique et d'ergopeptines. Ainsi, de forte concentration en alcaloïdes de l'ergot de seigle ont été trouvés dans des semences de gazon et des feuilles infectées [190].

Certains endophytes protègent leur hôte contre les insectes en produisant des métabolites bioactifs [166, 185, 191]. Par exemple, le champignon endophyte *Phomopsis oblonga* protège l'orme contre le coléoptère endroctone (*Physocnemum brevilineum*). Ce champignon stimule la plante pour produire certains métabolites qui contrôlent le vecteur *P. brevilineum*, responsable de la propagation d'un agent pathogène *Ceratocystis ulmi*, de la maladie hollandaise de l'orme

[166]. Un autre champignon endophyte rend les aiguilles de l'épinette blanche moins appétissantes pour la tordeuse des bourgeons (insecte défoliateur). Prestidge et Gallagher [192] ont démontré une corrélation entre la présence du champignon endophyte et les comportements : survie, alimentation et croissance des insectes. *Acremonium loth*, un champignon endophyte de *Lolium perenne*, produit lolitrem B, une forte toxine qui provoque la réduction des attaques d'insectes vers les plantes infectées. De même, *Neotyphodium sp* produit N-formilonine et un analogue paxiline qui tuent *Listronotus bonariensis* et d'autres insectes dans l'hôte *Echinopogum ovatus* [193]. Les métabolites toxiques, comme l'acide heptelidique et rugulosine de *Phyllosticia sp.* et *Hormonema dematioides*, endophytes de plantes ligneuses, ont été identifiés et rapportés à l'activité insecticide [194]. Lehtonen et son équipe [195] ont prouvé que l'inoculation de *Lolium pratense* par des champignons endophytes a considérablement diminuée l'attaque des pucerons sur cette plante.

Les alcaloïdes de l'ergot de seigle et les mycotoxines produits par les mycoendophytes sont principalement les responsables de l'activité insecticide. Ces alcaloïdes sont constitués de différents types et comprennent l'ergovaline, l'ergotamine, l'ergosine, l'ergostine, l'ergonine et la peramine. Ce dernier a été isolé à partir de *Neotyphodium coenophialum*, *N. lolii*, *Epichloe festucae* et *E. typhina* présent dans la tige et les feuilles de *Festuca arundinaceae* et autres Graminées. Le naphthalène, qui a une activité anti-moustiques, est produit par un champignon *Muscodor vitigenus*, isolé à partir d'une liane (*Paullina paullinioides*) [196]. L'acide nodulisporique est un agent insecticide isolé à partir du champignon *Nodulisporiwn sp* endophyte de plantes. Ce composé a montré une activité insecticide contre la larve de la mouche à viande. Son mode d'action est d'activer les canaux chlorures glutamate-dépendants insectes [105].

2-4-6-2- Rôles écologiques

L'ubiquité et l'hyperdiversité des mycoendophytes supposent que ces derniers peuvent jouer des rôles extrêmement importants dans le fonctionnement des écosystèmes. Ainsi, il est probable que leurs actions au sein d'un biotope donné soient multiples [119, 197].

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

biogéochimique des écosystèmes forestiers [198]. De plus, ces mycoendophytes sont considérés comme agents de dégradation précoces de la litière forestière, participant au recyclage de la matière organique [199]. Ces organismes sont donc des acteurs majeurs structurant les communautés végétales [200].

De nombreux facteurs environnementaux influencent la croissance et la survie des plantes. Les plantes infectées par les mycoendophytes ont été rapportés comme ayant une plus grande tolérance à la sécheresse, à la chaleur, à la toxicité des métaux, à la salinité élevée et au pH faible [119, 161].

Les mycoendophytes peuvent augmenter la tolérance à la chaleur de leur hôte. La relation symbiotique de tolérance thermique a été observée chez la plante *Dichanthelium lanuginosum* infectée à l'endophyte *Curvularia sp*, exposé à une température élevée de 65°C pendant 10 jours. Tous les plants non symbiotiques sont morts au cours du traitement thermique, tandis que les plants symbiotiques ont survécu. Cette résistance thermique est probablement due à la mélanine, un pigment de la paroi cellulaire de l'endophyte, qui peut dissiper la chaleur le long des hyphes et former un complexe avec les radicaux d'oxygène générés durant le stress thermique [160].

De même, la tolérance au sel est observée chez les plantes infectées par des mycoendophytes. Le champignon endophyte *Piriformospora indica* protège l'orge du stress salin, car il a été noté que l'exposition des plants infectés par ce champignon pendant deux semaines à une concentration modérée de sel, produisent une biomasse supérieure à celle des plants témoins non infectés et dans des conditions similaires [161].

Il est suggéré que certains mycoendophytes protègent également leur hôte de la sécheresse. Par exemple, l'infection endophytique chez *Festuca arundinacea* est capable d'induire un potentiel osmotique faible, surtout dans les jeunes feuilles, ce qui permet à *F. arundinacea* de rester stable au cours de la sécheresse [185].

Récemment, il a été montré que les mycoendophytes jouent un rôle clé dans l'adaptation de la plante hôte à l'environnement pollué. En sécrétant une faible quantité d'acides organiques, ils peuvent améliorer la phytoremédiation et la croissance des plantes par la mobilisation des métaux lourds, l'immobilisation ou la dégradation des contaminants de la plante, ce qui diminue la phytotoxicité et améliore la tolérance aux métaux chez ces plantes [171].

2-4-7- Critères d'identification des mycoendophytes

L'identification des champignons endophytes est traditionnellement fondée sur l'observation des caractères cultureux morphologiques macroscopiques et microscopiques de l'espèce. Cette identification nécessite donc en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rend impossible l'identification du mycélium. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Cependant, la complexité du règne fongique fait qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification.

2-4-7-1- Critères d'identification macroscopique

La différenciation entre les mycoendophytes à l'échelle macroscopique est basée principalement sur les aspects cités ci-dessous [65, 71].

❖ Texture des colonies

Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses (mycélium aérien court), laineuses (mycélium aérien abondant), poudreuses (mycélium aérien produisant de nombreuses conidies), cotonneuses, veloutées ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre due à l'absence ou la pauvreté du mycélium aérien.

❖ Relief des colonies

Il peut être plat ou plissé, avec consistance variable (molle, friable, élastique ou dure) et topographie (plane, surélevée, cérébriforme ou avec stries radiales).

❖ Vitesse et extrêmes de croissance

La vitesse peut-être rapide, modérée ou lente selon la taille des colonies mesurées généralement au septième jour d'incubation. Elle est variable en fonction des genres fongiques. Les colonies peuvent être petites (*Penicillium*) ou au contraire colonies étendues et envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).

❖ Couleur des colonies

La couleur est un élément très important d'identification qui change souvent avec la qualité du milieu de culture et les conditions environnantes. Les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le vert pour les champignons hyalins et le brun allant jusqu'au noir pour les champignons dématiés. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*). Cette couleur change parfois entre la surface et le revers.

❖ Structures de fructification

La présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de détermination macroscopique.

2-4-7-2- Critères d'identification microscopique

L'examen de la forme des thalles, des spores et des organes de fructification, ainsi leurs organisations sont des étapes importantes de l'identification fongique [201].

❖ Types de thalles

Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium. Le thalle peut être siphonné ou septé.

Thalle siphonné : constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 μm), non cloisonné ; il est caractéristique des Zygomycètes ;

Thalle septé ou cloisonné : constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 μm) et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires ; il est caractéristique des Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes [202].

❖ Types de spores

Les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes [65].

Spores endogènes (endospores) : sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les Mucorales, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité.

Spores exogènes (conidies) : retrouvées chez les Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

❖ Aspect des spores

D'après la forme et les modalités de septation, on distingue 5 groupes de spores [65].

amérospores : spores unicellulaires de petite taille (ex: *Penicillium*, *Aspergillus*) ;

didymospores : spores bicellulaires (ex: *Trichothecium*) ;

phragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales (ex: *Curvularia*) ;

dictyospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (ex: *Alternaria*) ;

scolécospores : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (ex: *Fusarium*).

❖ Modes de formation des conidies

On distingue généralement deux modes de formation des conidies (Figure n°19).

Mode thallique : la formation des spores s'effectue à partir d'éléments préexistants du thalle. On en retrouve deux variantes principales : type thallique solitaire (ex: *Chrysosporium*) et type thallique arthrique (ex: *Geotrichum*).

Mode blastique : les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou pas, puis une cloison se forme à l'émergence du bourgeon et la cellule fille (la spore) se sépare de la cellule mère. On en distingue plusieurs variantes ; type blastique acropète (ex: *Cladosporium*, *Alternaria*), blastique synchrone (ex: *Botrytis*), blastique sympodial (ex: *Beauveria*), blastique régressif (ex: *Trichothecium*), blastique phialidique (ex: *Aspergillus*, *Penicillium*) ,blastique porique (ex: *Alternaria*, *Curvularia*) et type blastique percurrent ou annellidique (ex : *Scopulariopsis*) [86].

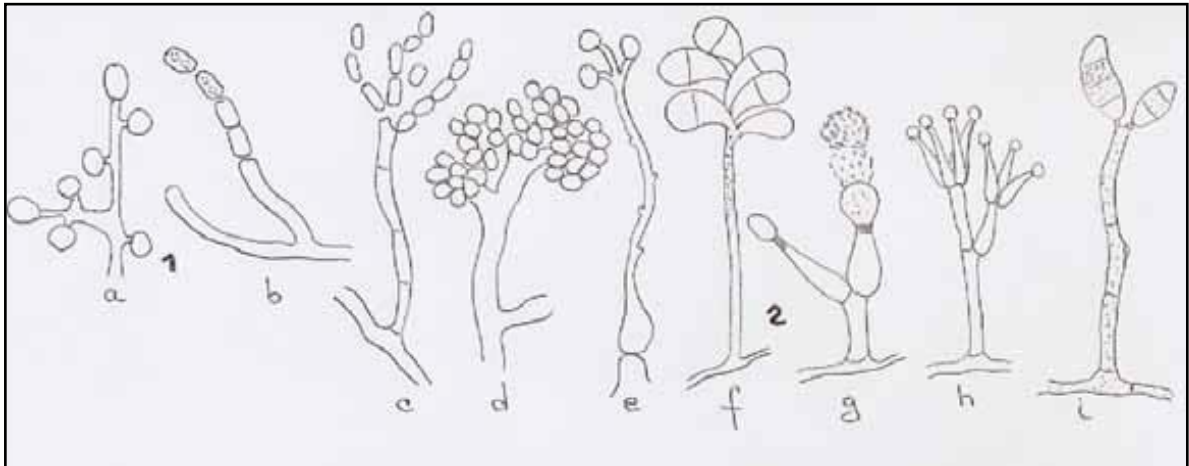


Figure n°19 : modes de formation des conidies [65].

1. Formation thalique : **a :** solitaire (*Chrysogenum*), **b :** arthritique (*Geotrichum*). **2. Formation blastique :** **c :** acropète (*Cladosporium*), **d :** synchrone (*Botrytis*), **e :** sympodial (*Beauveria*), **f :** regressif (*Trichothecium*), **g :** annelidique (*Scopulariopsis*), **h :** phialidique (*Penicillium*), **i :** porique (*Curvularia*).

❖ Mode de groupement des conidies

Les conidies sont en général regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène. Les principaux types de regroupement sont sous forme de grappes (ex: *Beauveria*, *Trichothecium*), masse (ex: *Botrytis*), chaînes basipètes (ex: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*), chaînes acropètes (ex: *Cladosporium*, *Alternaria*), têtes ou balles (ex: *Acremonium*, *Trichoderma*) (Figure n°20) [86].

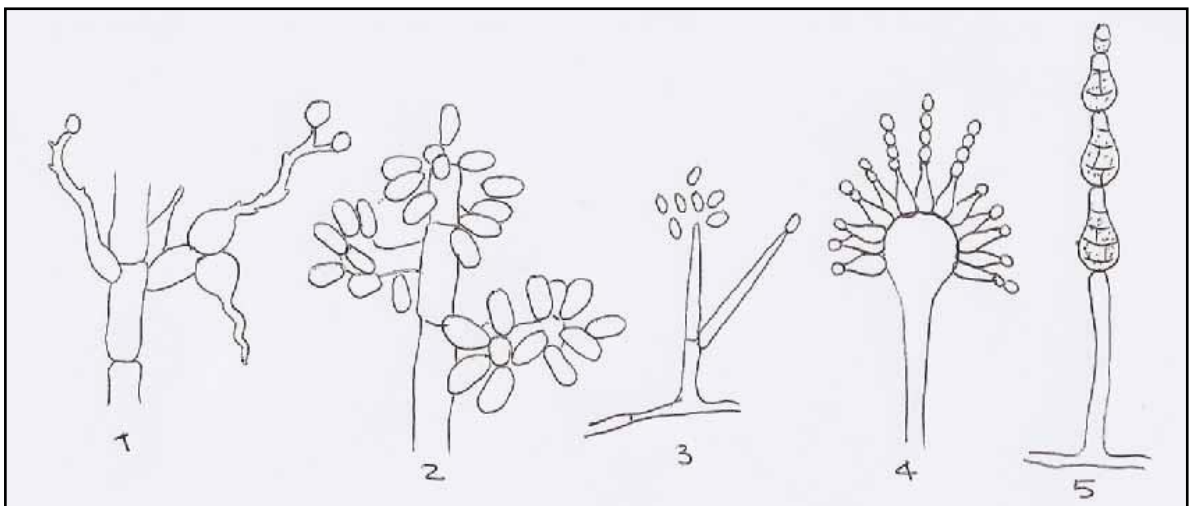


Figure n°20 : modes de groupement des conidies des champignons filamenteux [65].

1. grappes (*Beauveria*), **2.** masses (*Botrytis*), **3.** têtes (*Acremonium*), **4.** chaînes basipètes (*Aspergillus*), **5.** chaînes acropètes (*Alternaria*).

❖ Mode d'implantation des cellules conidiogènes

Les cellules conidiogènes ou les phialides peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif. Ceci est utilisé pour l'identification de genres et d'espèces [203]. Ces cellules peuvent être non différenciées et dans ce cas elles sont soit intégrées dans les hyphes intercalaires ou situées dans une position terminale (ex: *Aureobasidium*). Elles peuvent être différenciées et dans ce cas, elles peuvent être :

- insérées directement sur les filaments végétatifs (ex: *Acremonium*, *Fusarium*) ;
- bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif :
 - a) regroupées à l'extrémité dilatée du conidiophore, formant une tête (ex: *Aspergillus*) ;
 - b) regroupées en verticille au sommet du conidiophore, formant un pinceau (ex: *Penicillium*) ;
 - c) disposées en verticille le long du conidiophore (ex: *Verticillium*) ;
- bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores groupés :
 - a) conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère nommée corémie (ex: *Graphium*) ;
 - b) conidiophores agrégés en coussinets superficiels nommé sporodochie (ex: *Myrothecium*).

❖ Organes de fructification

Ce critère se manifeste par la présence ou l'absence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée. Les structures protectrices issues de la reproduction asexuée sont les pycnides et les acervules. Sur les milieux de culture, seules les pycnides sont visibles ; les acervules ne se forment que dans les tissus de l'hôte végétal [203].

Pycnides : sont des nodules mycéliens, creux, composés d'une paroi épaisse formée par un feutrage compact de filaments mycéliens. La face interne de la paroi est tapissée des conidiophores produisant des conidies qui sont libérées à maturité par l'ostiole (ex: *Phoma*) (Figure n°21).

Acervules : sont des agrégats de filaments mycéliens enchevêtrés, solidement attachés sur un végétal délimitant une cavité avec une ouverture. A l'intérieur, on retrouve une assise de conidiophores produisant les conidies.

Les structures protectrices issues de la reproduction sexuée peuvent être observées chez les Ascomycètes ; l'ascocarpe, qui protège l'asque peut être de plusieurs types [71].

Apothécies : l'ascocarpe est ouvert, en forme de coupe, portant les asques en surface.

Cléistothèces : l'ascocarpe est arrondi et lisse ; il n'y a pas de réseaux mycéliens périphériques, il est clos et sa paroi se fissure à maturité pour libérer les asques sphériques octosporées (ex: *Emericella*) (Figure n°21).

Périthèces : l'ascocarpe à la forme d'une bouteille avec, à l'extrémité rétrécie, une ouverture (ostiole) ; le périthèce renferme des asques allongés, entourés d'une paroi à simple membrane (unitunique) ou à deux membranes (bitunique) et contenant chacun 8 ascospores (ex: *Chaetomium*) (Figure n°21).

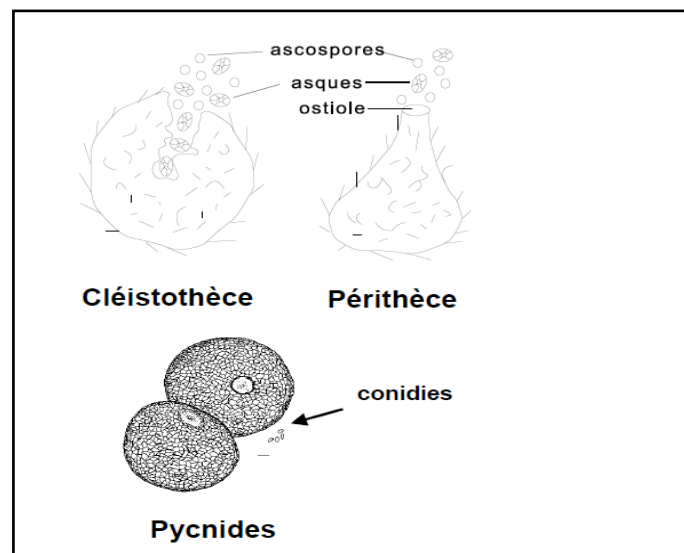


Figure n°21 : structures protectrices [71].

❖ Présence des chlamydozspores

Les chlamydozspores sont des éléments de résistance, qui sont formés à partir du filament mycélien ou à son extrémité. Elles ont une paroi épaisse. Contrairement aux autres spores, les chlamydozspores ne possèdent pas de mécanismes de libération permettant leur dissémination à maturité. Bien que peu spécifiques, puisqu'elles se retrouvent pratiquement chez toutes les espèces lorsque les conditions sont défavorables, elles peuvent cependant constituer une aide dans l'identification lorsqu'elles apparaissent précocement (comme chez certaines espèces de *Fusarium*).

3- Matériel et méthodes

3-1- Echantillonnage de *L. feei*

3-1-1- Collecte de *L. feei*

C'est au mois de février 2014 que s'est déroulé l'échantillonnage. Ainsi, 23 sujets de *L. feei* (Figure n°22) en bon état phytosanitaire ont été aléatoirement récoltés avec une distance séparant l'un de l'autre d'environ 50 m. Ces pieds ont été emballés individuellement dans des sacs en papier, afin d'éviter toute sorte de contamination. Elles sont ensuite placées soigneusement dans une glacière, pour être maintenues à l'état frais et transportés au laboratoire dans les 24 heures qui suivent la collecte, afin d'éviter la pourriture des feuilles qui entraîne la prolifération des souches pathogènes.



Figure n°22 : partie aérienne de *Limoniastrum feei* (de Gir.) Batt.

2-1-2- Traitement des échantillons

Une fois au laboratoire, 20 feuilles de chaque sujet de *L. feei* ont été sélectionnées et nettoyées à l'eau de robinet afin d'enlever la poussière, les débris et les particules de sol adhérents. Ces feuilles sont baignées dans l'HCl (1N) pendant 30 secondes, afin d'être débarrassées du calcaire qui les entoure et les rend coriaces. Puis, suivent 2 rinçages successifs à l'eau distillée stérilisée. 10 feuilles parmi les plus minces sont séchées et classées dans un herbier afin d'être colorées plus tard. Les 10 autres feuilles ont été utilisées directement à l'état frais pour une mise en culture. Ces manipulations consistent en une mise en évidence de la présence des champignons endophytes.

3-2- Mise en évidence histologique des mycoendophytes foliaires de *L. feei*

La méthode histologique est la manière permettant la détection des endophytes chez la plante hôte. Elle consiste à effectuer directement des observations microscopiques des tissus végétaux. C'est la méthode qui convient le plus pour distinguer à quel niveau le champignon endophyte a réellement colonisé son hôte [112].

Nous avons opté pour une méthode de coloration utilisée à l'origine pour des champignons mycorhiziens : celle de Phillips et Hayman (1970) avec quelques modifications pour l'adapter aux feuilles coriaces de *Limonistrum feei*. Le protocole utilisé est le suivant :

- 3 traitements successifs avec du KOH (hydroxyde de potassium) à 10% , dans une étuve à 90°C pendant respectivement 25, 15 et 10 minutes ; la solution de KOH a été remplacée à chaque fois ; cette étape a pour rôle de vider les cellules de leur contenu cytoplasmique ;
- 2 traitements à l'eau de javel (NaOCl) pendant 10 minutes pour le blanchissement des feuilles;
- rinçage à l'eau oxygénée (H₂O₂) à 10% pendant 20 mn à température 90°C, pour éliminer les pigments restants jusqu'au blanchissement total;
- plusieurs rinçages à l'eau courante;
- neutralisation des feuilles dans un bain d'acide lactique (10%) pendant 3 à 4 mn;
- mise dans la solution colorante (bleu trypan), à l'étuve à 90°C;
- rinçage à l'eau distillée;
- conservation dans du glycérol.

Après coloration, les feuilles sont ensuite placées entre lame et lamelle, en ajoutant de la gélatine glycinée, pour observer les structures fongiques au sein des tissus foliaires internes. Ces lames ont été examinées au microscope optique, à différents grossissements.

3-3- Mise en culture des feuilles de *L. feei*

Afin de pouvoir décrire des traits phénotypiques, la majorité des études consacrées aux champignons associés aux plantes ont été réalisées par isolement sur milieu de culture. L'avantage majeur de cette mise en culture est la détection d'une large gamme d'isolats purs de champignons. Concernant les champignons endophytes, la stérilisation du matériel végétal est une étape obligatoire [204].

3-3-1- Stérilisation superficielle des feuilles de *L. feei*

Cette étape précède la mise en culture. Elle consiste à éliminer les microorganismes épiphytes qui demeurent sur la surface des feuilles. Pour la stérilisation des feuilles, nous avons adopté le protocole de Helander *et al.* [205] modifié. Il comporte les 6 étapes suivantes :

- traitement à l'éthanol (96%) pour une durée de 2 minutes ;
- rinçage à l'eau distillée stérilisée ;
- traitement à l'eau de javel (NaOCl) pour une durée de 3 minutes ;
- 2ème rinçage à l'eau distillée stérilisée ;
- 2ème traitement à l'éthanol (96%) pour une durée de 30 secondes ;
- 3ème rinçage à l'eau distillée stérilisée.

3-3-2- Préparation du milieu de culture

Parmi les milieux de culture adoptés pour l'ensemencement des champignons endophytes, nous avons utilisé le plus cité, à savoir le milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar) [8, 58, 93, 105, 147, 206, 207, 208], amendé par un antibiotique, afin d'éliminer la croissance des bactéries endophytes. C'est un milieu semi-synthétique, dont la composition est la suivante :

- 200 g de pomme de terre ;
- 20 g de glucose ;
- 20 g d'agar-agar ;
- 1000 ml d'eau distillée.

Des tubercules de pommes de terre sont pelés, lavés et coupés en petits morceaux. Ils sont ensuite cuits dans 200 ml d'eau pendant 15 à 20 mn. La préparation obtenue est filtrée à travers une bande à gaz propre. Le filtrat est versé dans un Erlenmeyer d'un litre, placé sur un agitateur chauffant. On rajoute au filtrat le glucose et l'agar-agar, puis on complète le volume à 1000 ml. Le récipient est retiré de la plaque lorsque le milieu est homogène et clair.

Le milieu est versé dans un flacon d'un litre pour la stérilisation à l'étuve, à une température de 120°C. Après refroidissement alentour de 40°C, environ 400 mg d'antibiotique disponible au niveau de notre laboratoire (amoxicilline) a été additionné et enfin, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri, sous une hotte entre deux becs bunsen.

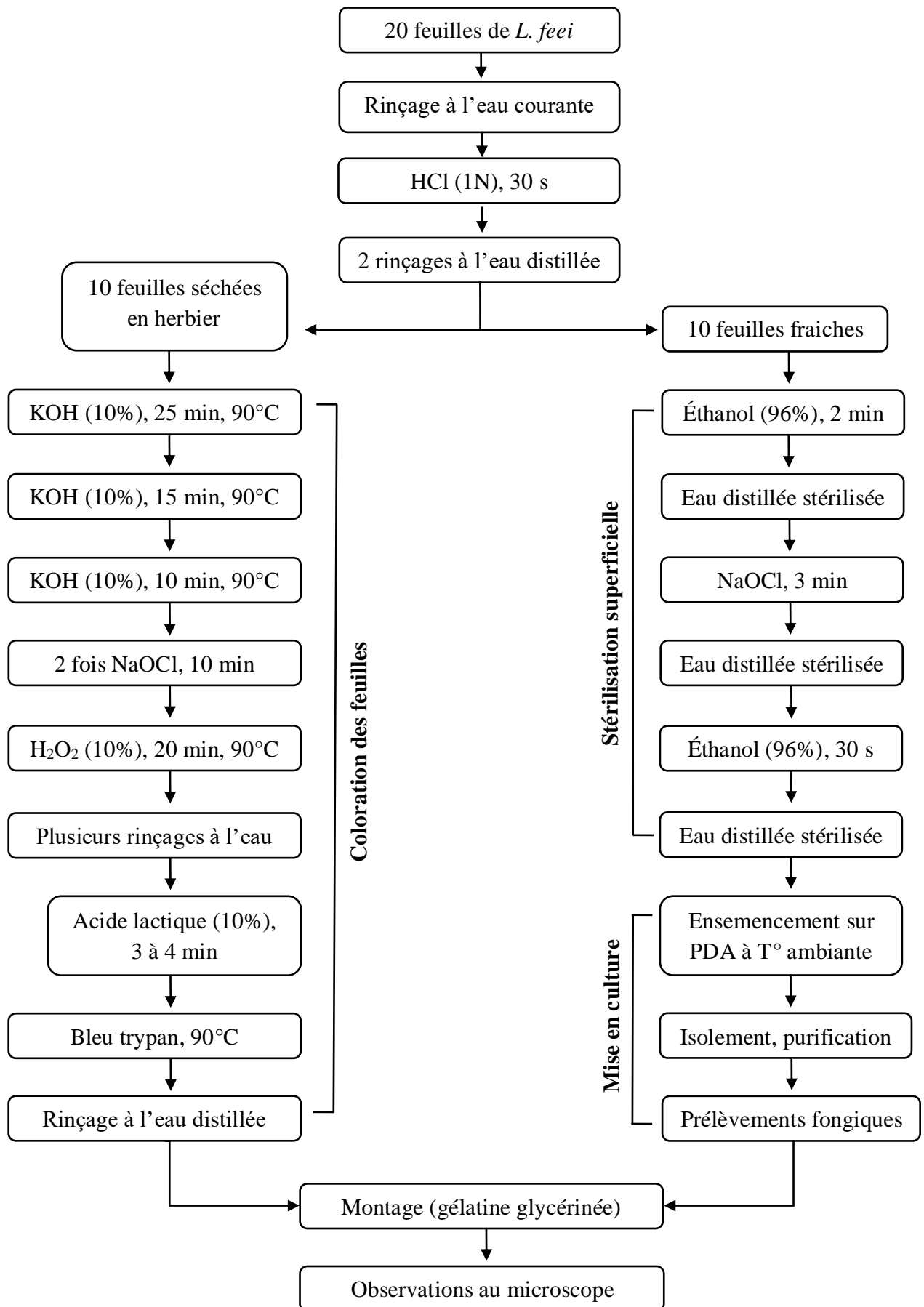


Figure n°23 : Protocole de coloration, stérilisation et mise en culture des feuilles de *L. feei*.

3-3-3- Ensemencement des feuilles de *L. feei* sur PDA

Les feuilles stérilisées ont été séchées à l'aide d'un papier absorbant (buvard) stérile. Sous une hotte et entre deux becs bunsen, les feuilles ont été coupées aseptiquement en petits fragments de 2 à 5 mm de largeur, en utilisant des bistouris jetables stériles. Un total de 1150 fragments a été distribué, à raison de 5 pièces de la même feuille par boîte de Pétri contenant du PDA. Les boîtes ont été scellées avec du parafilm et incubées à température ambiante, pendant une période allant jusqu'à deux mois.

3-4- Isolement, purification et conservation des isolats

Afin d'isoler et de purifier les champignons recensés, un repiquage minutieux à l'aide d'un matériel stérile a été réalisé durant toute la période de l'incubation. Les différents isolats fongiques présents autour des fragments de feuilles cultivées sur PDA, ont été repiqués sur des nouvelles boîtes de Pétri contenant le même milieu de culture, mais sans antibiotique. La période d'incubation pour chaque isolat a été enregistrée. Ainsi, des photos et des prélèvements microscopiques ont été pris tout au long de cette période, afin d'identifier ces mycètes et d'observer leurs comportements. Certains champignons ont été repiqués plusieurs fois, afin de les purifier.

Les espèces fongiques isolées et purifiées sont conservées pour des travaux ultérieurs selon deux protocoles en utilisant deux milieux de culture : le PDA et l'OA (Oatmeal Agar). Ce dernier est un milieu de culture solide, caractérisé par sa pauvreté en matière hydrocarbonée (Voir composition dans l'annexe n°02).

Des colonies fongiques en culture pure ont été repiquées et déposées aseptiquement dans des tubes en gélose pente (en culot), avec un étiquetage adéquat. Chaque tube a été marqué avec le numéro de code du sujet et de la feuille échantillonnés, le nom complet du champignon et la date de stockage. Après 5 jours d'incubation, les isolats des tubes contenant du PDA sont conservés dans le réfrigérateur à température entre 2 et 8 °C, tandis que les tubes avec milieu de culture OA sont complétés avec l'huile de paraffine et conservés dans un endroit sombre à température ambiante.

3-5- Identification des mycoendophytes recensés

Les isolats fongiques ont été identifiés à l'échelle phénotypique, c'est à dire une identification macroscopique et une autre microscopique, en suivant les caractéristiques et les critères morphologiques des mycoendophytes recensés cités auparavant en bibliographie.

3-5-1- Identification macroscopique

L'observation macroscopique est une technique utilisée en microbiologie pour qualifier une souche microbienne sur un milieu de culture solide et précis. Elle consiste en description des colonies selon les caractères morpho-cultureux, tel l'aspect général de la surface (taille, topographie, contours, relief, texture, consistance, couleur, pigmentation, transparence...etc), de leur revers, la vitesse et les extrêmes de croissance (rapide, modérée ou lente). Nous nous sommes ainsi référés aux clés d'identification macroscopique de Mansouri [58] et Suryanarayanan *et al.* [209].

3-5-2- Identification microscopique

Des prélèvements sur les différents isolats fongiques ont été étalés entre lame et lamelle en ajoutant de la gélatine glycinée afin d'être observer au microscope optique. Quelques préparations microscopiques ont été colorées au bleu trypan afin de permettre une observation plus détaillée des champignons hyalins, qui apparaissent transparents et sont donc difficiles à observer dans le détail. Cette identification microscopique est basée sur les critères morphologiques des hyphes (aspect du mycélium, cloisonnement, coloration...etc), des conidiophores (absents, simples, ramifiés) et des structures reproductrices (fructifications, formes, tailles et couleurs des spores), en se basant sur les clés de détermination de Tabuc [65] ; Dufresne et Germain [71] et Kiffer et Morelet [210].

3-6- Analyse des données

3-6-1- Fréquence moyenne de Colonisation (FC%)

Le taux d'infection ou de colonisation par les mycoendophytes exprimé en pourcentage a été calculé en se basant sur la méthode de Fisher et Petrini [211], donnée ci-dessous :

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

N_c = nombre total de segments colonisés par une espèce ou groupe fongique ;

N_t = nombre total des segments cultivés.

3-6-2- Abondances des genres fongiques au niveau des différents sujets de *L. feei*

Afin de préciser la distribution fongique au sein de chaque sujet de *L. feei*, l'ensemble des abondances pour chacun des genres fongiques a été calculé selon la règle suivante :

$$A = N_i / N$$

N_i = nombre de segments colonisés par un seul genre fongique chez un seul sujet

N = nombre total de segments colonisés chez un seul sujet.

3-6-3- Pourcentage Relatif d'Occurrence (PRO%)

Ce paramètre donne la moyenne générale des abondances d'un genre fongique pour l'ensemble des sujets échantillonnés. Il se calcule par l'équation suivante:

$$PRO\% = (FC_s / FC_t) \times 100$$

FC_s = fréquence de colonisation d'un genre fongique

FC_t = fréquence de colonisation totale.

3-6-4- Diversité générique

Afin d'évaluer la diversité des genres de mycoendophytes au sein des feuilles de *L. feei*, l'indice le plus adapté est celui de Shannon-Weaver (H'). Cet indice permet d'étudier la structure des peuplements en faisant référence ou non à un cadre spatio-temporel concret. Il permet d'avoir rapidement, en un seul chiffre, une évaluation de la biodiversité du peuplement. C'est le plus couramment utilisé pour l'évaluation de la diversité des endophytes [212]. Il est donné par la formule suivante :

$$H' = \sum[(N_i/N) \times \ln(N_i/N)]$$

N_i/N = abondance des mycoendophytes au niveau des sujets de *L. feei*.

Les résultats présentés sous forme de graphique ont été réalisés par le biais du logiciel Excel 2007. Des analyses de variance (ANOVA) sont faites pour mettre en évidence la présence d'une différence significative entre les sujets échantillonnés. Une analyse en composantes principales (ACP) a été établie en vue de mettre en évidence des interactions entre les différents genres fongiques au sein des différents sujets de *L. feei*. Ces analyses ont été faites grâce au logiciel Stat Box 6.40.

4- Résultats et discussion

4-1- Mise en évidence des mycoendophytes au niveau des feuilles de *L. feei*

La présence des champignons endophytes a été confirmée pour la première fois pour des feuilles de *L. feei* de la région de Oued Aghlal à Béchar. Après l'observation au microscope optique des différentes feuilles de *L. feei* colorées au bleu trypan, nous avons pu mettre en évidence l'infection des tissus foliaires internes par les champignons endophytes. Cette colonisation se manifeste ; à l'échelle de l'épiderme par la présence au niveau des espaces inter et intracellulaire de différentes formes fongiques (filaments mycéliens et spores), mais aussi au niveau des stomates et glandes sécrétrices de calcaire, ainsi qu'au sein du parenchyme et des nervures.

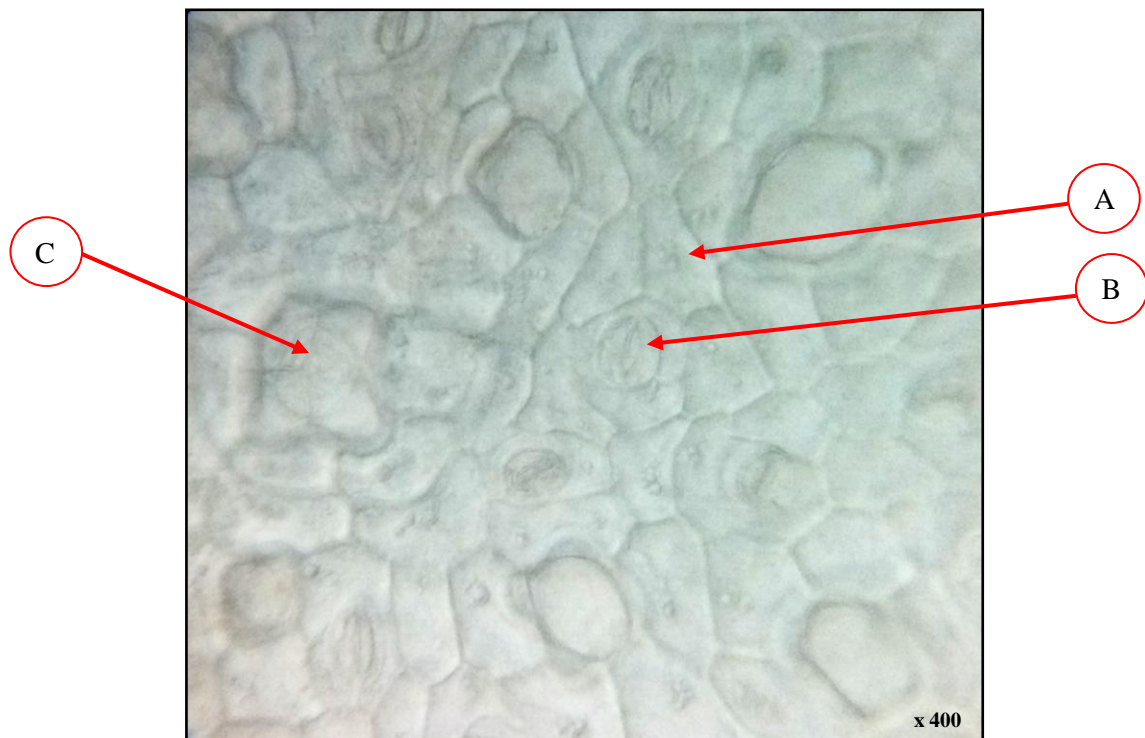


Figure n°24 : tissu foliaire de *L. feei*, indemne de colonisation fongique.

A : cellule épidermique ; B : stomate ; C : glande à calcaire.

La figure n°24 est une observation microscopique au sein d'une feuille de *L. feei* qui montre une partie indemne (non infectée par les champignons endophytes) des tissus, où les cellules restent incolores. Au niveau de l'épiderme, et d'après les multiples visualisations des feuilles *L. feei*, nous avons constaté une présence massive des glandes épidermiques sécrétrices de calcaire. Ces glandes sont spécifiques à cette espèce [13]. Les stomates sont nombreux et se répartissent de manière aléatoire au niveau de la surface épidermique.

Des hyphes mycéliennes et des spores fongiques de tailles et largeurs variables ont été trouvées insérées entre les différents compartiments tissulaires des feuilles de *L. feei*. La figure n°25 montre des observations de ces formes dissipées entre et à travers les cellules de l'épiderme.

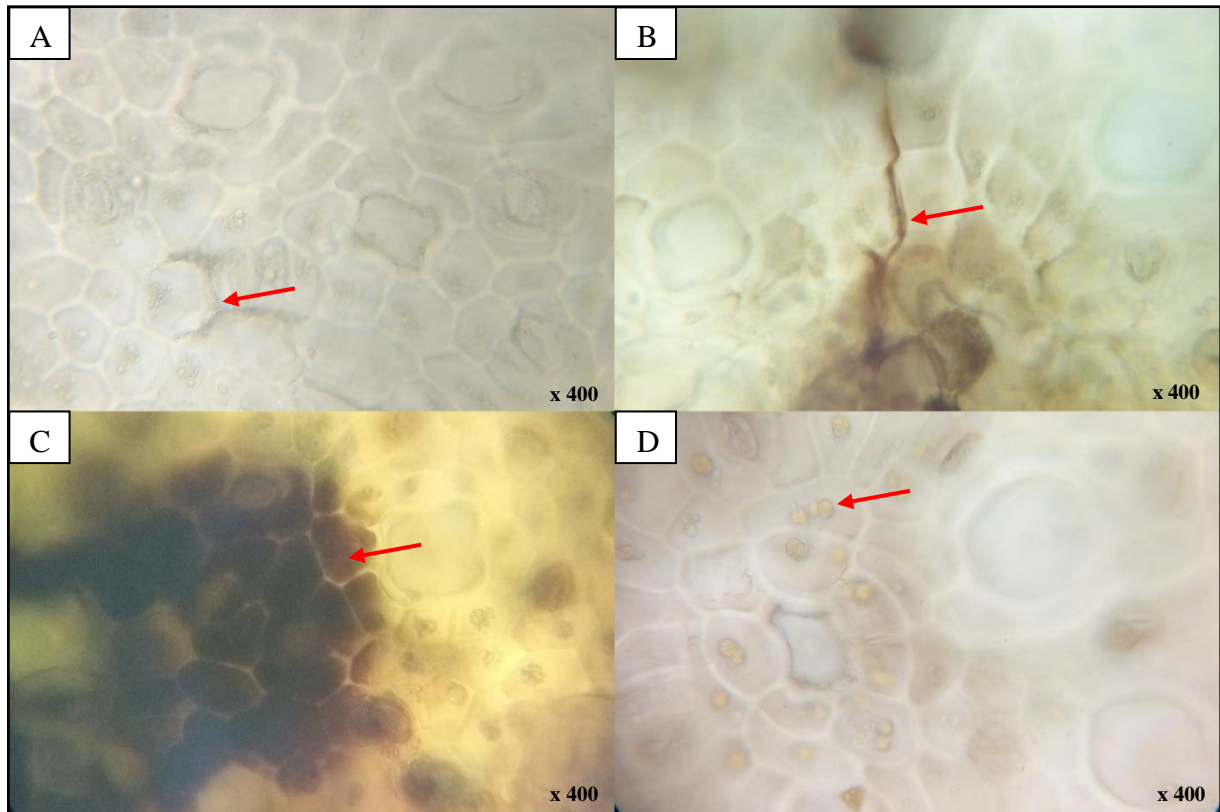


Figure n°25 : infections fongiques inter et intracellulaire au niveau de l'épiderme chez les feuilles de *L. feei*.

A : masse mycélienne entre les cellules épidermiques ; **B** : mycélium intercellulaire ; **C** : colonisation intracellulaire d'une partie de l'épiderme ; **D** : spores à l'intérieur des cellules épidermiques.

La coloration observée à la fois au niveau des espaces inter et intracellulaire au sein des tissus foliaires de *L. feei* confirme la présence des mycoendophytes à l'intérieur de ces feuilles.

Cette colonisation inter et intracellulaire a été mentionnée par plusieurs études [52, 97, 98, 99, 100, 101, 102]. De plus, Bernardi-Wenzel *et al.* [213], en utilisant le microscope à balayage (MEB) ont visualisé des peuplements fongiques aux niveaux inter et intracellulaire dans les feuilles de *Luhea divaricata*. El-Nagerabi et son équipe [214] ont montré la présence de ces mêmes structures chez les feuilles du jujubier d'Oman. Zareb [208] et Benfoddil [215] ont fait le même constat au niveau des feuilles du pistachier de l'Atlas de Laghouat en Algérie. Très

récemment, Ouzid [216] a observé la présence des hyphes mycéliennes pigmentées au niveau des espaces inter et intracellulaires des feuilles de *Peganum harmala* de la région de Laghouat (Algérie).

L'espace intercellulaire est riche en substances nécessaires pour soutenir la croissance des champignons endophytes. En plus, les concentrations de sucres signalées dans l'apoplasme non endophytique sont suffisantes pour soutenir la croissance fongique [217].

Almut Reiher [218] rapporte que l'introduction des hyphes de mycoendophytes peut se faire directement dans l'épiderme intact par les appressoriums, ou à travers des stomates de la feuille intacte. Elle peut être facilitée par des lésions sur les tissus de la plante causés par des dommages mécaniques ou par les herbivores.

La colonisation par les mycoendophytes chez les feuilles de *L. feei* a touchée également les cellules stomatiques et les différentes glandes disséminées dans l'épiderme de ces feuilles comme le montre la figure n°26.

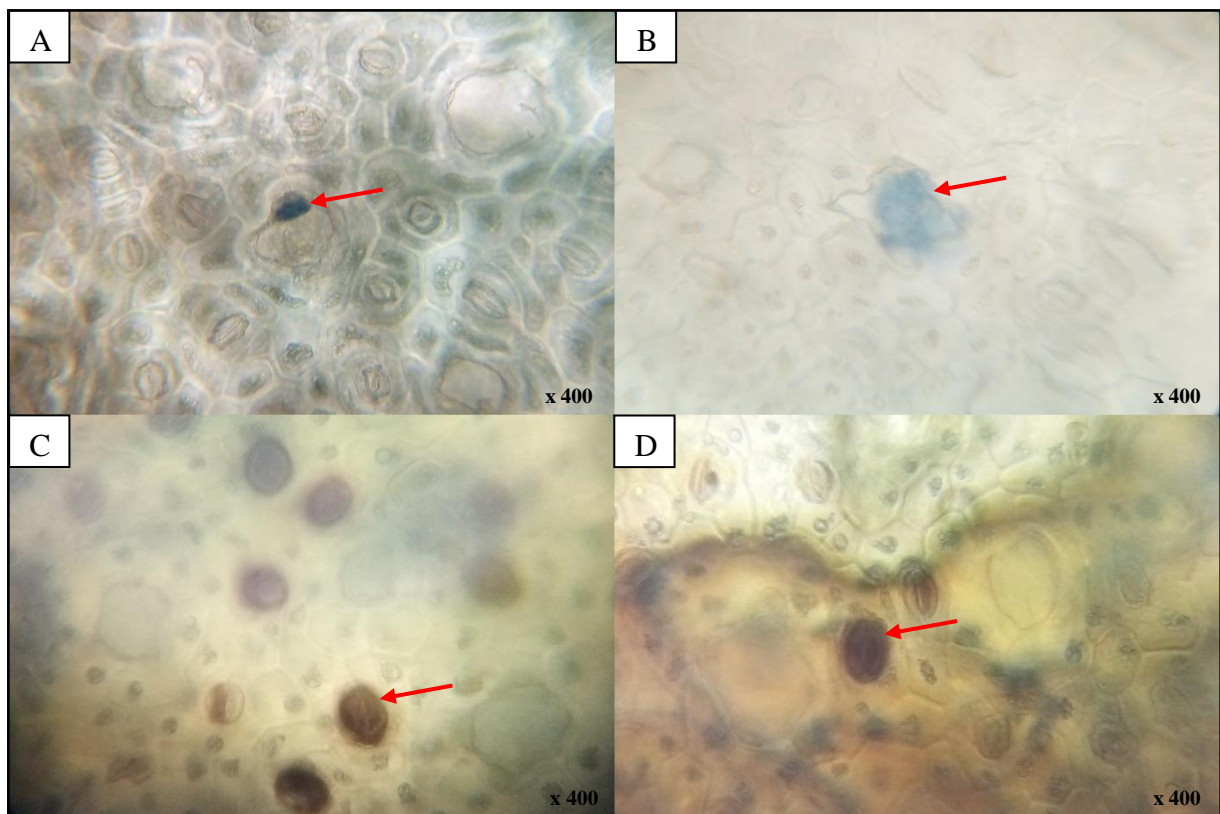


Figure n°26 : observations microscopiques de la colonisation fongique au niveau des stomates et des glandes à calcaire chez les feuilles de *L. feei*.

A-B : infections fongiques au niveau des glandes à calcaire; **C-D :** stomates colonisées par des mycoendophytes.

Les stomates représentent la voie naturelle de pénétration des mycoendophytes [112]. la pénétration de l'infection peut être intercellulaire ou intracellulaire et peut être limitée à une cellule ou dans une zone limitée autour du site de pénétration [219].

Cette infection fongique arrive jusqu'au parenchyme et des nervures (Figure n°27).

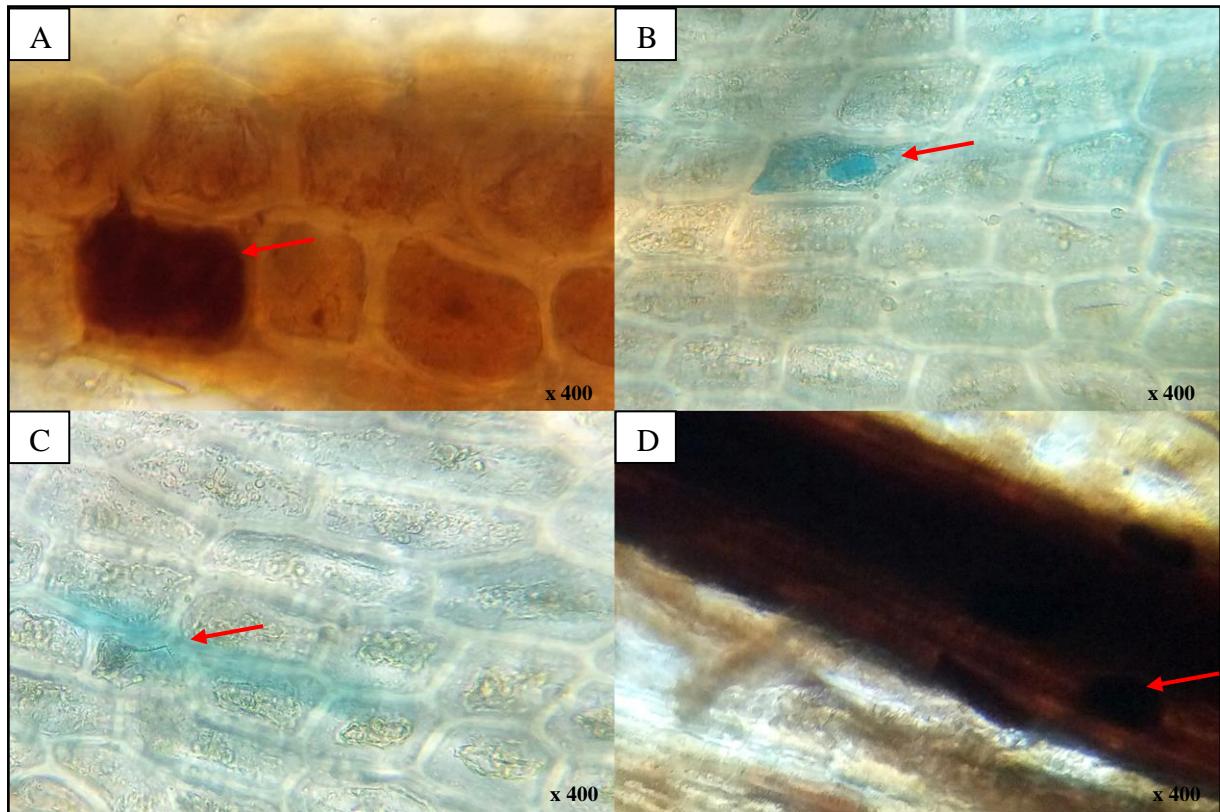


Figure n°27 : observations microscopiques de l'infection fongique au niveau du parenchyme et de la nervure principale chez les feuilles de *L. feei*.

A-B : colonisations fongiques intracellulaire au niveau du parenchyme; **C** : infection de l'espace intercellulaire d'une partie de parenchyme ; **D** : nervure centrale colonisée par les mycoendophytes.

Nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs. Durán *et al.* [220], ont observé des hyphes fongiques au niveau des cellules du parenchyme palissadique dans les feuilles de *Citrus limon*. Les endophytes sont généralement endémiques dans le parenchyme [221]. Sous microscope électronique à balayage et après observation des feuilles de *Sapindus saponaria*, il a été possible d'identifier la présence des hyphes dans les cellules au niveau des espaces intercellulaires et leur passage d'une cellule à l'autre du parenchyme palissadique et spongieux [222]. Des observations microscopiques des feuilles du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica*)

montrent l'existence de champignons endophytes à l'intérieur et entre les cellules du parenchyme [208, 2015].

Les observations microscopiques des feuilles de *L. feei* ont permis de noter aussi la présence de champignons endophytes au niveau des tissus conducteurs de la nervure principale (Figure n°27).

Les tissus conducteurs (phloème et xylème) des nervures principales et secondaires sont fortement colonisés par les mycoendophytes. Ils forment un excellent lieu de refuge pour plusieurs endophytes [8, 99]. Cela a été montré aussi par Zareb [208] et Ouzid [2016], lorsqu'ils ont noté que les vaisseaux conducteurs des feuilles de *Pistacia atlantica* et de *Peganum harmala* sont très riches en mycoendophytes. Il est possible que cette présence massive des mycoendophytes au niveau des nervures soit influencée par leur richesse en éléments nutritifs et explique parfaitement le comportement nutritionnel des champignons endophytes, qui dépendent toujours de la matière hydrocarbonée offerte par la plante hôte. Hata *et al.* [223], ont isolé des champignons endophytes à partir de feuilles de *Pasania edulis*, l'un des arbres les plus importants des forêts tempérées chaudes du Japon. La plupart des mycoendophytes ont été isolés à partir de la nervure centrale et moins fréquemment de pétioles. Ils suggèrent que parmi les causes possibles de cette distribution endophyte au sein de la feuille, les différences dans les modes d'infection, les interactions négatives des principaux endophytes et la composition de chaque compartiment tissulaire au sein de la même feuille.

Au cours de cette observation microscopique des feuilles traitées au bleu trypan de *L. feei*, nous avons remarqué également une étonnante présence de structures mycéliennes colorées en bleu et de spores entre marron et noire, en surface des feuilles. Ces formes extra-tissulaires sont des champignons épiphytes, (voir un exemple de ces structures dans la figure n°77 sur l'annexe n°03).

Généralement, les hyphes des mycoendophytes apparaissent colorés en bleu, tandis que les spores prennent souvent la couleur foncée entre marron et noire. Cette même coloration des structures fongiques a été constatée pour les feuilles de *Pistacia atlantica* [215]. Il est possible que la couleur observée chez les formes fongiques (mycéliums et spores) soit influencée par la nature et la composition de la paroi constitutive de ces derniers.

4-2- Fréquence de colonisation des mycoendophytes au niveau des feuilles de *L. feei*

Après deux mois d'incubation sur milieu PDA et à partir de 1150 fragments de feuilles cultivés, nous avons obtenu un total de 842 isolats fongiques au niveau des 23 sujets échantillonnés, ce qui représente un taux d'infection global de 73,22% (Tableau n°6).

Tableau n°6. Fréquences de colonisation (FC) au niveau des 23 sujets de *L. feei*.

Sujets	FC(%)±ES	Sujets	FC(%)±ES
Sujet 1	100±0	Sujet 13	54±12
Sujet 2	100±0	Sujet 14	62±12
Sujet 3	96±3	Sujet 15	58±12
Sujet 4	94±3	Sujet 16	62±13
Sujet 5	80±8	Sujet 17	66±10
Sujet 6	76±11	Sujet 18	88±6
Sujet 7	46±11	Sujet 19	90±4
Sujet 8	50±11	Sujet 20	84±5
Sujet 9	38±10	Sujet 21	82±6
Sujet 10	40±12	Sujet 22	92±4
Sujet 11	68±10	Sujet 23	84±7
Sujet 12	74±6	Moyenne	73,22±4

Une anova montre une différence hautement significative entre les fréquences de colonisation par les mycoendophytes calculées pour les différents sujets ($p < 0,00$). Les sujets numérotés de 7 à 17 apparaissent moins infectés par les champignons endophytes, contrairement aux autres sujets qui montrent des taux de colonisation élevés, parfois même de 100% : cas des sujets 1 et 2. La plus basse fréquence de colonisation enregistrée dans cette étude est celle du sujet 9 avec 38 %.

Des fréquences élevées de colonisation par les champignons endophytes ont été enregistrés dans plusieurs études : allant de 78% au niveau des feuilles de *Centila asiatica* (Apiaceae) de Madagascar [162], 89% chez les palmiers d'Australie [224] et jusqu'à 98% dans les feuilles de *Guarea guidonia* (Meliaceae) à Porto Rico [130]. Des taux moins élevés ont été signalés chez d'autres plantes hôtes, telles que la banane avec 29% [225] et entre 57% et 65% chez *Cedrus atlantica*, d'une zone subhumide à hiver froid en Algérie [226]. Des pourcentages

plus faibles encore ont été enregistrés chez *Saussurea involucrata* avec 11% [61], ainsi que chez *Withania somnifera* (5.11%) [227]. Zerroug [147] a obtenu pour *Retama retam* de Bordj Bou Arréridj (Algérie) une fréquence de colonisation de 8%.

La différence entre ces pourcentages d'infection peut être expliquée par la différence entre les espèces hôtes, le nombre d'échantillons, ainsi que les milieux de culture utilisés [228]. Il est évident que la stratégie d'échantillonnage et de mise en culture influence la richesse de la communauté fongique développée [52, 90, 124]. Généralement, l'utilisation de petits fragments de feuilles révèle l'existence de plus de taxons que celles de grande taille. Il y a lieu de noter que la variation de feuille à feuille est considérable [204].

La forte colonisation par les mycoendophytes au niveau des feuilles de *L. feei* peut être expliquée par la période d'échantillonnage. En effet, beaucoup de champignons endophytes se développent dans les tissus végétaux au printemps [214, 229]. Le printemps semble être associé à la mise en place de souches fongiques endophytes dans les tissus de la plante. Les précipitations plus importantes dans cette saison pourraient favoriser la libération et la dispersion de spores fongiques [230] et les températures modérées permettraient une plus grande viabilité des propagules fongiques et donc leurs succès dans la colonisation des tissus de la plante hôte [140]. En effet, une forte corrélation a été observée entre les niveaux d'infection par les mycoendophytes et les précipitations cumulées [137]. La disponibilité en eau joue un rôle important pour l'infection des plantes par des champignons endophytes.

D'après l'anova, nous constatons que les différences de colonisation par les mycoendophytes entre les sujets échantillonnés sont très significatives. La fréquence de colonisation peut varier en fonction de l'âge et de la morphologie des feuilles prélevées [138, 147, 231]. Harzalah *et al.* [226] ont démontré que les sujets âgés renferment plus de champignons endophytes par rapport aux sujets jeunes. Les feuilles matures subissent plus de photosynthèse et offrent également de grandes quantités de nutriments aux champignons endophytes [136]. D'autre part, cette colonisation accrue des feuilles âgées est due à une surinfection des feuilles au fil du temps par l'inoculum aérien [137]. Kumaresan et Suryanarayanan [232] ont montré que les communautés endophytes des feuilles ne sont pas statiques, mais subissent des changements permanents, ce qui montre que la communauté endophyte est dynamique. Cela pourrait expliquer les variations des taux d'infection par les champignons endophytes entre les sujets examinés de *L. feei*.

4-3- Répartition des mycoendophytes recensés au niveau des feuilles de *L. feei*

Il est à noter que la majorité des genres fongiques endophytes que nous avons pu identifiés au niveau des feuilles de *L. feei* est rangée en majorité (86,30%) au sein du phylum des Ascomycota. Le genre *Absidia* est le seul taxon qui appartient au phylum des Zygomycota (1,22%), tandis que, le phylum des Basidiomycota est représenté seulement par le genre *Rhizoctonia* avec un pourcentage de 1,17% (Figure n°28). D'autre part, les structures mycéliennes stériles (MS) qui n'exhibent aucune forme de reproduction et les souches non identifiées (SNI) ont été classées hors contexte de phylum. Ces derniers ensembles représentent 11,31% de la population fongique isolée.

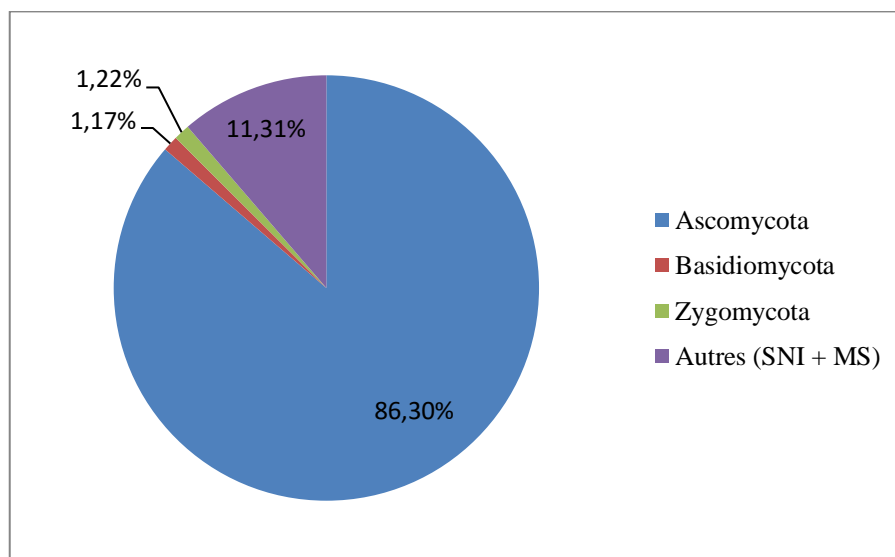


Figure n°28 : phyla des mycoendophytes recensés au niveau des feuilles de *L. feei*.

L'appartenance des mycètes isolés chez les feuilles de *L. feei* en grande majorité au phylum des Ascomycota corrobore les travaux de Wilson [93], Ganley et Newcombe [207], Jumpponen et Jones [233] et Kembel et Mueller [234] qui ont trouvé une nette prédominance des Ascomycota. Au Mexique, Rivera-Orduña *et al.* [235] ont trouvé que 77,2% des isolats fongiques de *Taxus globosa* sont des Ascomycètes. Chez *Centila asiatica*, 475 champignons ont été isolés et classés en 45 taxons différents. Toutes ces espèces appartiennent aux Ascomycota [162]. De plus, Buée et son équipe [236] ont envisagé que l'abondance de cette classe de champignons est due à leurs mécanismes adaptatifs contre la salinité et l'alcalinité.

L'ensemble des mycoendophytes que nous avons pu identifier appartiennent aux genres suivants : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Trichophyton*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Exophiala*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Absidia*, *Rhizoctonia*, *Aureobasidium*, *Phialophora*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Scytalidium* et *Scopulariopsis*. La distribution complète de ces genres fongiques est donnée dans le tableau n°7.

Tableau n°7. Pourcentage relatif d'occurrence (PRO) des genres fongiques de feuilles de *L. feei*.

Genres	Phylum	PRO(%)±ES
<i>Penicillium</i>	Ascomycota	29,83± 0,042
<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	15,96± 0,017
<i>Gliocladium</i>	Ascomycota	9,13± 0,021
<i>Cladosporium</i>	Ascomycota	7,61± 0,018
<i>Phoma</i>	Ascomycota	5,65± 0,015
<i>Trichophyton</i>	Ascomycota	3,65± 0,013
<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	2,57± 0,009
<i>Acremonium</i>	Ascomycota	2,17± 0,010
<i>Exophiala</i>	Ascomycota	1,52± 0,008
<i>Alternaria</i>	Ascomycota	1,48± 0,007
<i>Epicoccum</i>	Ascomycota	1,43± 0,006
<i>Absidia</i>	Zygomycota	1,22± 0,007
<i>Rhizoctonia</i>	Basidiomycota	1,17± 0,007
<i>Aureobasidium</i>	Ascomycota	1,13± 0,007
<i>Phialophora</i>	Ascomycota	1,13± 0,006
<i>Fusarium</i>	Ascomycota	0,91± 0,006
<i>Verticillium</i>	Ascomycota	0,87± 0,005
<i>Paecilomyces</i>	Ascomycota	0,78± 0,006
<i>Scytalidium</i>	Ascomycota	0,30± 0,003
<i>Scopulariopsis</i>	Ascomycota	0,17± 0,002
Mycélium stérile	/	0,57± 0,004
Structures non identifiées	/	10,74± 0,017

Les données du tableau n°7 montrent que certains genres fongiques sont particulièrement abondants. Parmi les mycotaxons qui présentent des taux d'occurrence élevés, nous trouvons *Penicillium* avec 29,83%, suivi par *Aspergillus* avec 15,96%. Ces deux genres ensemble représentent presque la moitié des abondances fongiques avec un taux de 45,79%. Les genres *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Phoma* et *Trichophyton* sont moyennement abondants vis-à-vis du reste des mycoendophytes recensés. Les occurrences des autres taxons sont relativement faibles.

Ceci est dû probablement à la dominance de certaines espèces fongiques, éliminant ou réduisant par conséquent l'apparition et le développement d'autres taxons endophytes au niveau des feuilles de *L. feei*. L'échantillonnage et les techniques de culture utilisées au laboratoire peuvent aussi expliquer cela [93].

Ce modèle d'infections à 2 ou 3 taxons dominants, accompagnés d'un ensemble d'opportunistes mineurs est également typique des champignons endophytes dans beaucoup de plantes vasculaires pérennes [96]. Il est indicatif de la Coévolution potentielle entre les champignons endophytes dominants et leurs hôtes [7, 139].

Selon la classification de Kiffer et Morelet [210], il est à noter que l'ensemble des genres mycoendophytes recensés est cosmopolite. La majorité des 20 genres recensés a un mode de vie saprophyte et un substrat d'origine tellurique. *Cladosporium* est le seul genre phytopathogène, tandis que *Phialophora* est le seul parasite potentiel. Les genres ayant une nature antagoniste sont : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Acremonium* et *Scytalidium*.

La mycoflore endophyte des feuilles de *L. feei* est relativement diverse. Plus de 96% des mycotaxons endophytes recensés sont attribués aux champignons imparfaits (Deutéromycètes), ce qui montre la dominance particulière de ce groupe fongique. Cette dominance spécifique est expliquée par le fait que la trame mycoendophyte de *L. feei* se caractérise par des groupes taxonomiques ayant perdu le mode reproductif sexué eut égard à la coévolution champignons-plantes, sans oublier le mode de transmission qui nécessite généralement des mécanismes simples faisant intervenir le système reproductif conidien [8] et que la stratégie symbiotique adopté par les endophytes associés à cette plante nécessite en général un recours à la reproduction asexuée [2].

Presque la moitié des mycotaxons recensés dans cette étude (*Cladosporium*, *Phoma*, *Exophiala*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Phialophora*, *Scytalidium* et *Scopulariopsis*) sont des Phaéohyphomycètes. Ils apparaissent avec des couleurs foncées entre marron vif et noir. Cette pigmentation donne l'aspect sombre caractéristique des champignons dématiés, qui ont le pouvoir d'accumuler la mélanine au niveau des hyphes [237]. La présence de la mélanine améliore la physiologie fongique en augmentant la rigidité de la paroi cellulaire, ce qui permet la pénétration de ces champignons dans les différents tissus de la plante hôte [238]. Selon Butler *et al.* [239], cette substance est responsable de la protection contre les radiations UV et contre les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire produites par les microbes antagonistes.

Les autres mycoendophytes identifiés sont considérés comme des Hyalohyphomycètes (champignons sans pigment brun dans la paroi de leurs cellules au niveau du mycélium). Les genres les plus abondants et qui ne figurent pas parmi les champignons dématiés sont *Penicillium*, *Aspergillus* et *Gliocladium*. Ils représentent ensemble 54,92% de la population fongique inventoriée chez *L. feei*. Ces derniers sont les plus communs sur le phylloplan de plusieurs végétaux [240]. Selon Chalfoun et Batista [241], les genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont d'occurrence cosmopolite et sont parmi les microorganismes les plus abondants dans la nature. Ils sont utilisés comme des bioindicateurs pour la conservation de la biodiversité [242]. Ces mycoendophytes sont considérés comme des antagonistes résident sur la plante hôte [210]. Ils s'opposent aux autres genres de la phyllosphère par l'établissement des corrélations négatives.

4-4- Identification et taxonomie des espèces fongiques recensées

Les isolats fongiques recensés appartiennent à 56 espèces et à 20 genres. Le genre le plus riche en espèces est *Penicillium* avec 10 espèces différentes, suivi par *Aspergillus* avec 8 espèces. Les genres *Cladosporium*, *Phoma*, *Gliocladium* comportent respectivement 6, 5 et 4 espèces. Pour *Trichophyton*, *Acremonium*, *Exophiala*, *Alternaria*, *Absidia*, *Phialophora*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, nous avons recensé 2 espèces pour chacun des genres. Le reste des mycoendophytes n'est composé que d'une seule espèce.

Espèces du genre *Penicillium*

À l'exception d'*Eupenicillium sp* (téléomorphe de *Penicillium sp*), l'ensemble des espèces recensées pour ce genre sont des formes anamorphes.

La répartition des 251 isolats fongiques du genre *Penicillium* recensés au niveau des feuilles de *L. feei* est donnée en pourcentage pour chaque espèce dans le tableau n°8.

Tableau n°8. Pourcentages des espèces du *Penicillium* au sein des feuilles de *L. feei*.

Espèce	Abondance (%)	Espèce	Abondance (%)
<i>P. chrysoginium</i> (Figure n°29 : C-D)	10,76	<i>P. sp3</i>	4,38
<i>P. digitatum</i> (Figure n°29 : G-H)	24,31	<i>P. sp4</i>	1,99
<i>P. notatum</i> (Figure n°29 : E-F)	12,35	<i>P. sp5</i>	2,39
<i>P. sp1</i> (Figure n°29 : I-J)	14,74	<i>P. sp6</i>	1,20
<i>P. sp2</i> (Figure n°29 : K)	19,12	<i>Eupenicillium sp</i> (Fig. n°29: A-B)	8,76

Les deux espèces *P. digitatum* et *P. sp2* sont les plus abondantes dans ce tableau.

Penicillium est un genre qui comporte plus de 200 espèces connues dans la nature. Certaines sont utilisées dans l'industrie fromagère ou pour la production de métabolites, d'autres peuvent être responsables de dégradations de la matière organique. C'est un genre très répandu dans la plupart des environnements terrestres [86, 243], il a été déjà isolé comme endophyte à partir de plusieurs plantes médicinales [147, 215, 227, 244, 245, 246, 247, 248]. *P. notatum* est la souche isolée par Fleming en 1928.

Certaines espèces de *Penicillium* ont été signalées comme agents protecteurs des plantes contre les champignons pathogènes. Ils combattent les maladies en utilisant divers systèmes de défense. De Cal *et al.* [249] ont observé l'effet suppressif de *P. oxalicum* au flétrissement de la tomate, causé par *Fusarium oxysporum*, ce qui suggère que *P. oxalicum* déclenche une réaction de défense de la plante. De même, *P. purpurogenum* produit des enzymes lytiques impliqués dans la dégradation des parois cellulaires des champignons phytopathogènes [250].

La forme téléomorphe de *Penicillium* a été isolée d'*Artemisia annua* [251], et à partir de *Glochidion ferdinandi* (Euphorbiaceae) recueillie en Australie. Le bouillon de culture de ce mycoendophyte montre la présence de trichodermamide C, un peptide cytotoxique efficace contre des lignées cellulaires humaines du carcinome colorectal et carcinome pulmonaire [252].

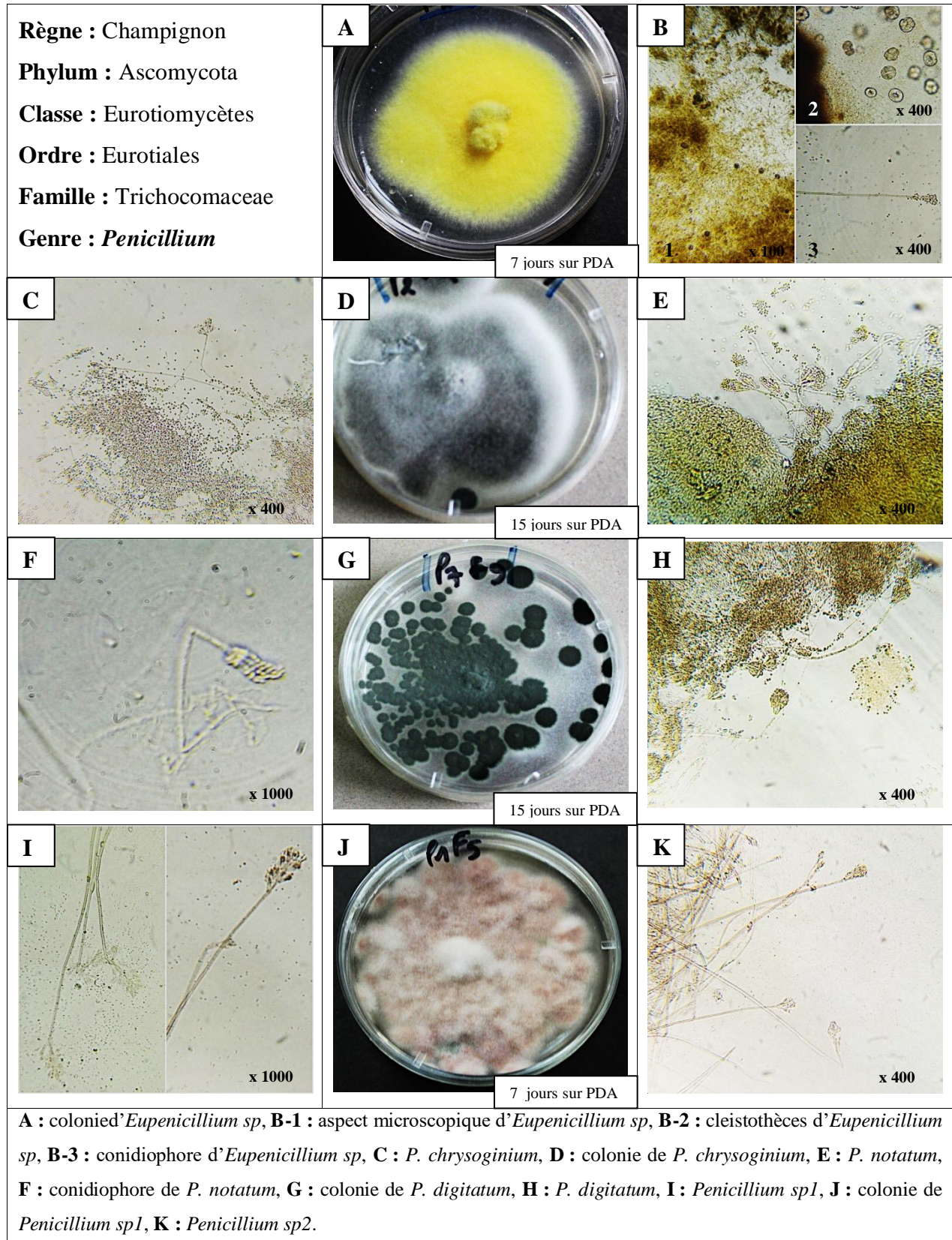


Figure n°29 : aperçu sur les principales espèces de *Penicillium*.

Espèces du genre *Aspergillus*

Toutes les espèces d'*Aspergillus* isolées chez les feuilles de *L. feei* sont des Deutéromycètes. Une seule exception pour *Emericella nidulans* qui est une téléomorphe d'*Aspergillus nidulans*.

La distribution des espèces au sein du genre *Aspergillus* chez les feuilles de *L. feei* est consignée dans le tableau n°9.

Tableau n°9. Pourcentages des espèces de l'*Aspergillus* au sein des feuilles de *L. feei*.

Espèce	Abondance (%)	Espèce	Abondance (%)
<i>A. flavus</i> (Figure n°30 : C)	16,42	<i>A. niger</i> (Figure n°30 : A-B)	21,64
<i>A. fumigatus</i> (Figure n°30 : I)	2,99	<i>A. sp1</i> (Figure n°30 : J-K)	18,66
<i>A. glaucus</i> (Figure n°30 : D-E)	5,22	<i>A. sp2</i>	2,99
<i>A. nidulans</i> (Figure n°30 : G-H)	29,85	<i>Emericella nidulans</i> (Fig. n°30 : F)	2,23

Le genre fongique *Aspergillus* est dominé par l'espèce *A. nidulans* avec 29,85%, suivi par celle de *A. niger* (21,64%).

Ce genre comprend dans la nature environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches [86], dont certaines ayant une valeur commerciale, médicale, ainsi que des espèces pathogènes [253].

Aspergillus est un genre capable de croître sur presque tout type d'habitat [245]. Il a été déjà isolé en tant qu'endophyte à partir de plusieurs plantes médicinales [106, 147, 208, 215, 227, 245, 246, 247]. Shankar et Shashikala [248] ont isolé ce genre à partir de *Clitoria ternatia*, une plante médicinale de la famille des Fabaceae.

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud [69]. Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost et les denrées alimentaires. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air. Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines, en étant capables d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*A. fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires ; *A. niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif) [254].

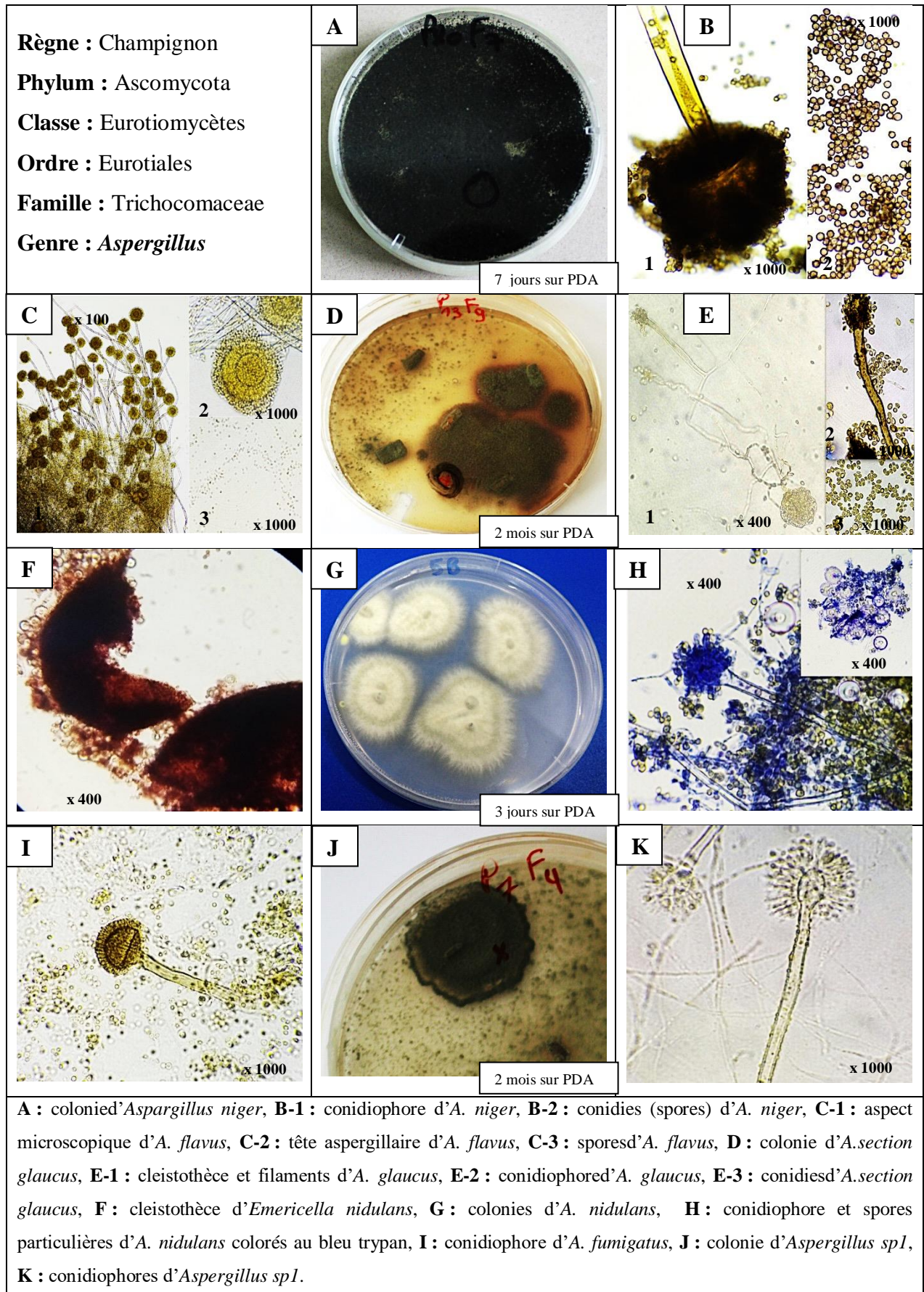


Figure n°30 : aperçu sur les principales espèces d'*Aspergillus*.

Espèces du genre *Gliocladium*

Les pourcentages des quatre espèces de *Gliocladium* isolées chez *L. feei* sont notés dans le tableau n°10.

Tableau n°10. Pourcentages des espèces du *Gliocladium* au sein des feuilles de *L. feei*.

Espèce	Abondance (%)	Espèce	Abondance (%)
<i>G. viride</i> (Figure n°31 : G-H)	45,45	<i>G. sp2</i> (Figure n°31 : C-E)	24,68
<i>G. sp1</i> (Figure n°31 : A-B)	16,88	<i>G. sp3</i> (Figure n°31 : F)	12,99

La plus grande portion d'abondance pour *Gliocladium* est occupée par l'espèce *Gliocladium viride* avec un pourcentage de 45,45%.

Gliocladium, morphologiquement très proche de *Trichoderma*, où ils forment souvent un habitat en commun, en particulier dans les sols et dans la matière organique. Ces mycètes peuvent vivre soit comme saprophytes, soit comme parasites sur d'autres organismes. Les champignons de ces deux genres sont bien connus pour leur comportement antagoniste et ont été largement utilisés dans les essais de biocontrôle [255]. Les mécanismes antagonistes réels n'ont pas toujours été élucidés, mais la compétition pour les nutriments, la production de composés inhibiteurs et d'enzymes hydrolytiques a souvent été décrite [256].

Plusieurs espèces de *Gliocladium* sont utilisées comme agents de lutte biologique et de contrôle des maladies causées par *Rhizoctonia*. Cette stratégie a porté ses fruits dans le cas de la lutte contre le mildiou chez le riz [256].

Gliocladium sp possède une activité antagoniste contre la maladie de la feuille de *Hevea brasiliensis* (plant de caoutchouc), causée par *Colletotrichum* [257]. Une autre espèce de *Gliocladium* isolée de différentes plantes hôtes telles que le maïs [258] et le cacao, Cette espèce à nouveau isolé de *Solanum lycopersicum* présente une activité contre *Meloidogyne*, un nématode racinaire ravageur de plusieurs plantes à intérêt agricole [259].

En culture double avec *Rhizoctonia solani*, *Gliocladium virens* a produit de la P-1,3-glucanase, de la N-acétylglucosaminidase, des lipases et des protéinases [260].

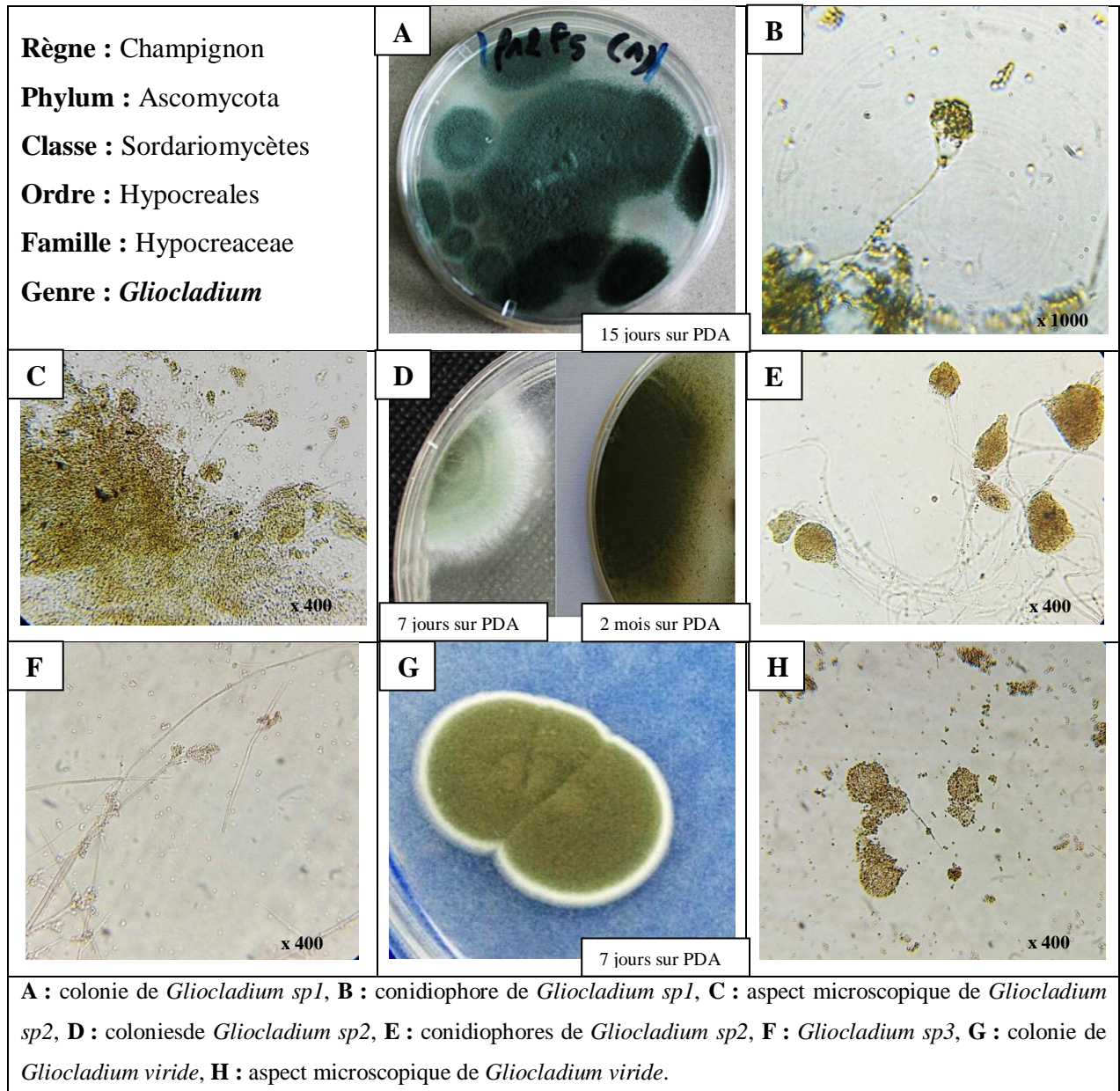


Figure n°31 : aperçu sur les espèces de *Gliocladium*.

Espèces du genre *Cladosporium*

Le tableau n°11 représente les pourcentages des espèces obtenues pour le genre *Cladosporium* chez les feuilles de *L. feei*.

Tableau n°11. Pourcentages des espèces du *Cladosporium* au sein des feuilles de *L. feei*.

Espèce	Abondance (%)	Espèce	Abondance (%)
<i>C. herbarum</i> (Figure n°32 : C-D)	23,44	<i>C. sp2</i> (Figure n°32 : G-H)	12,5
<i>C. tenuissimum</i> (Figure n°32 : A-B)	15,62	<i>C. sp3</i>	7,81
<i>C. sp1</i> (Figure n°32 : E-F)	34,38	<i>C. sp4</i>	6,25

Les espèces *C. sp1* suivi par *C. herbarum* présentent les abondances les plus élevées pour ce genre au niveau des feuilles de *L. feei*.

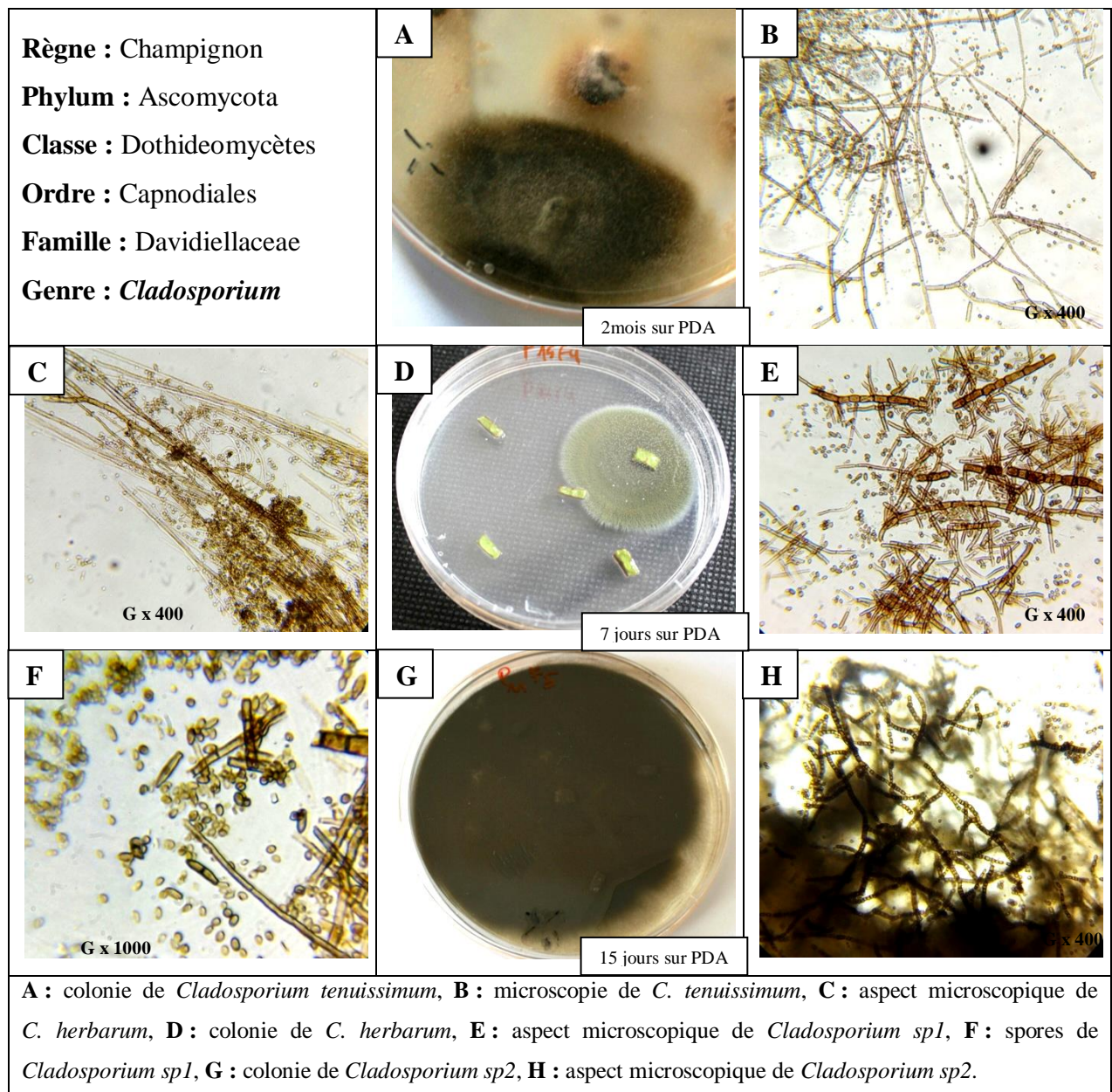


Figure n°32 : aperçu sur les principales espèces de *Cladosporium*.

Le genre *Cladosporium* est un Hyphomycète dématiacé. C'est un anamorphe de *Davidiella* [261]. Il est l'un des genres les plus hétérogènes d'Hyphomycètes [262]. C'est un genre mondialement répandu, il regroupe environ 35 espèces dont la plupart sont parasites de végétaux, saprophytes très communs ou phytopathogènes [86], il comprend notamment des espèces endophytes courants, où il a été isolé comme endophyte à partir de plusieurs plantes ; *Cephalotaxus mannii* [263], *Acacia catechu* [247], *Retama raetam* [147] et du pistachier de

l'Atlas [208, 215]. Les espèces de ce genre affectent la vie humaine quotidienne de différentes manières. Les membres saprophytes communs de *Cladosporium* sont présents sur tous les types de feuilles et de tiges sénescents et mortes de plantes herbacées et ligneuses, en tant qu'envahisseurs secondaires sur les lésions nécrotiques de la feuille causées par d'autres champignons; ils sont fréquemment isolés de l'air, du sol, d'autres matières organiques [225, 264].

Quelques espèces ayant des activités biologiques, tel l'activité insecticide du *C. sp*, isolé du laurier rose (*Nerium oleander*) vis à vis de la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus*), qui est le problème principal affectant l'haricot (*Phaseolus vulgaris*) [265]. Ceci laisse suggérer que ce champignon pourrait être utilisé en matière de lutte biologique contre les coléoptères.

Espèces du genre *Phoma*

Le genre *Phoma* au sein de *L. feei* comporte cinq espèces différentes. La partition de ces espèces est donnée dans le tableau n°12.

Tableau n°12. Pourcentages des espèces du *Phoma* au sein des feuilles de *L. feei*.

Espèce	Abondance (%)	Espèce	Abondance (%)
<i>Phoma glomerata</i> (Figure n°33 : A-B)	33,33	<i>Phoma sp2</i> (Figure n°33 : I-J)	18,75
<i>Phoma herbarum</i> (Figure n°33 : C-E)	27,09	<i>Phoma sp3</i> (Figure n°33 : K)	12,5
<i>Phoma sp1</i> (Figure n°33 : F-H)	8,33		

P. glomerata et *P. herbarum* sont les deux espèces les plus représentatives du genre *Phoma* au niveau des feuilles de *L. feei*.

Les espèces du genre *Phoma* sont omniprésentes dans l'environnement et occupent de nombreuses niches écologiques. À l'heure actuelle, plus de 220 espèces sont reconnues, mais le nombre réel de taxons de ce genre est probablement beaucoup plus élevé. Plusieurs espèces sont des saprophytes inoffensives. *Phoma* s'est également révélé être un important genre pathogène fongique des plantes présent sur des cultures d'importance économique [266].

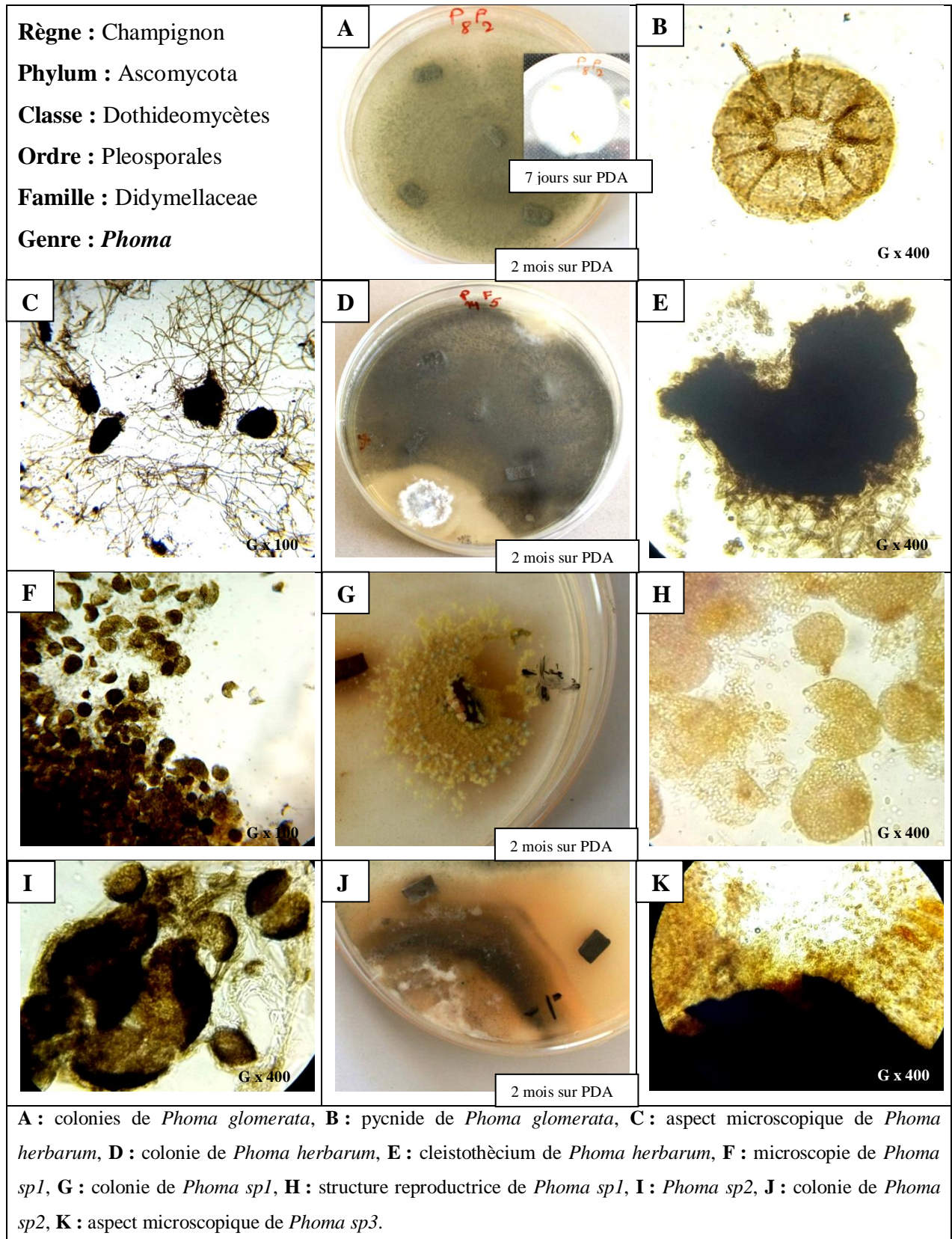


Figure n°33 : aperçu sur les espèces de *Phoma*.

Il se rencontre également dans différentes régions géographiques du monde comme endophyte de différentes plantes hôtes de divers groupes botaniques taxonomiques indépendants [267, 268, 269], notamment chez les feuilles des plantes médicinales de différentes régions [270]. Il est isolé d'*Artemisia annua* [251] et de *Larrea tridentata*, arbuste poussant dans la région désertique des États-Unis, ce champignon possédant des propriétés antifongiques, produit un mélange unique de composés organiques volatils (COV), une série de sesquiterpénoïdes, certains alcools et plusieurs dérivés de naphthalène. Le transcaryophyllène, un produit contenu dans les COV fongiques, a également été noté dans les COV de cette plante piquante [271]. Ce genre isolé également à partir de *Dendrobium thyrsiflorum*, *D. devonianum* et *D. loddigesii* et présente des activités antibactériennes et antifongiques fortes, ainsi que des activités de promotion de la production végétale [272]. Hoffman *et al.* [273] ont isolé un groupe d'acides phénoliques à partir du bouillon de culture d'un *Phoma sp.*, découvert comme endophyte sur une plante de Guinée.

Espèces du genre *Trichophyton*

Les espèces recensées pour le genre *Trichophyton* sont en nombre de deux. L'espèce *Trichophyton sp2* (Figure n°34 : C-E) est plus dominante (70,97%) par rapport *Trichophyton sp1* (Figure n°34 : A-B) avec 29,03%.

Ce genre très répandu comme pathogène humain, il est l'agent causal des dermapyhtes. *Trichophyton* est timidement étudié chez les plantes. Cependant, il a été isolé comme endophyte chez *Symphytum officinale*, où il présente une activité antagoniste contre le phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum*, agent de la pourriture blanche (sclérotiniose), maladie affectant diverses plantes dont le colza, le tournesol, les haricots, la carotte etc... [274]. Récemment, il a été rencontré sur les feuilles de dix plantes médicinales d'Inde [275].

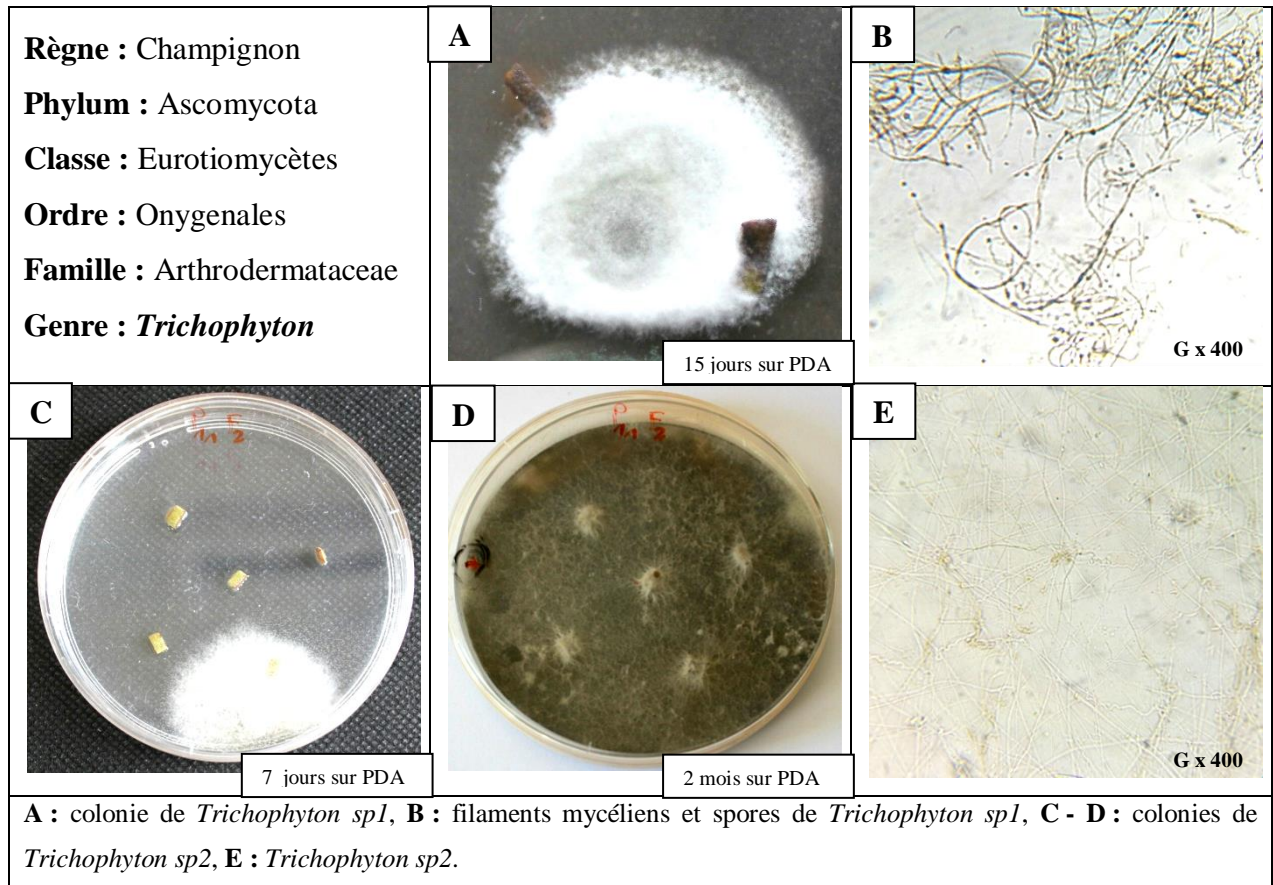


Figure n°34 : aperçu sur les espèces de *Trichophyton*.

Espèces du genre *Acremonium*

Parmi les 18 isolats du genre *Acremonium* isolés à partir des feuilles de *L. feei*, 11 champignons appartiennent à l'espèce *Acremonium sp1* (Figure n°35 : A-B), avec un pourcentage de 61,11%. Les 7 autres champignons (38,89%) sont des espèces d'*Acremonium sp2* (Figure n°35 : C-E).

Acremonium a une distribution mondiale dans la nature, il est présent dans le sol et sur la matière végétale en décomposition, entre autres le foin et les champignons morts, quelques espèces peuvent également être présentes dans les produits alimentaires. Les nombreuses espèces d'*Acremonium* sont surtout saprophytes et non pathogènes, à l'exception de quelques espèces qui sont pathogènes pour les plantes et les humains [276].

Acremonium zeae isolé du maïs produit deux nouveaux antibiotiques de nature alcaloïde (les pyrrocidines A et B), qui ont montré une activité antifongique significative contre *Aspergillus flavus* et *Fusarium verticillioides*. Tandis que, *Acremonium sp* endophyte de *Taxus baccata* produit un autre agent antimicrobien (la leuesnostatine A) [277, 278].

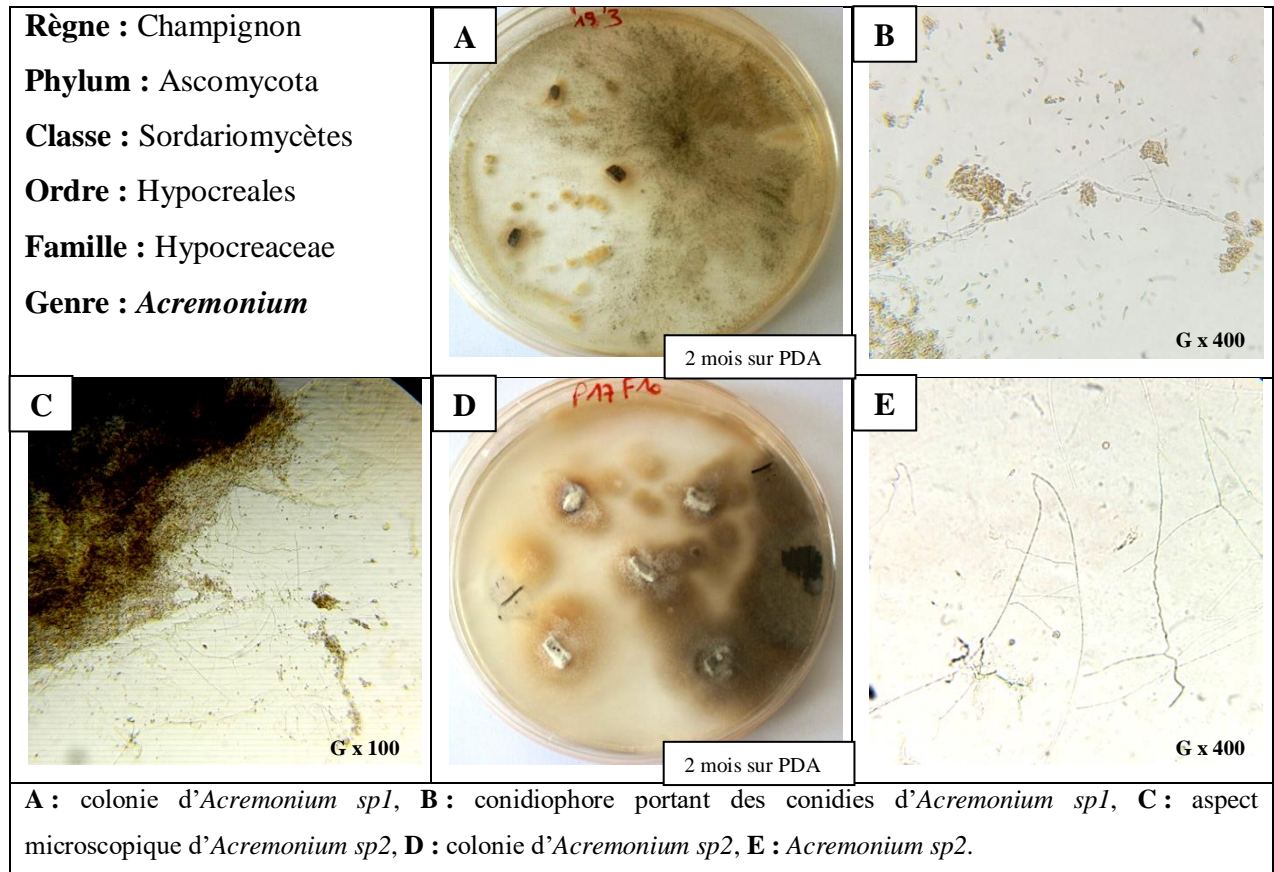


Figure n°35 : aperçu sur les espèces d'*Acremonium*.

Espèces du genre *Exophiala*

Les deux espèces inventoriées pour ce genre au niveau de *L. feei* sont réparties comme suit : *Exophiala canacera* (Figure n°36 : A-B) représente 30,77% des isolats. Tandis que, *Exophiala sp* (Figure n°36 : C-E) est plus dominant avec une abondance de 69,23%.

Parmi les champignons dématiacés responsables de la phaeohyphomycose humaine ou animale, le genre *Exophiala*, est un agent étiologique bien connu qui comprend actuellement plusieurs espèces considérées comme des agents pathogènes opportunistes [279].

Exophiala a été identifié à plusieurs reprises comme genre colonisateur spécifique aux racines de la plante hôte [280]. Dans cette étude nous avons prouvé sa présence au niveau foliaire. Ce genre possède une tolérance inhérente aux métaux lourds. Dans les sols pollués, la souche *Exophiala* tolérante aux métaux a clairement atténué les effets néfastes de l'excès d'ions de métaux lourds et sa colonisation a amélioré la tolérance aux métaux du maïs [281]. Diao *et al.* [282] ont montré le rôle de cette souche dans l'accumulation du zinc extracellulaire au niveau du mycélium, ce qui contribue à la dépollution du végétal hôte.

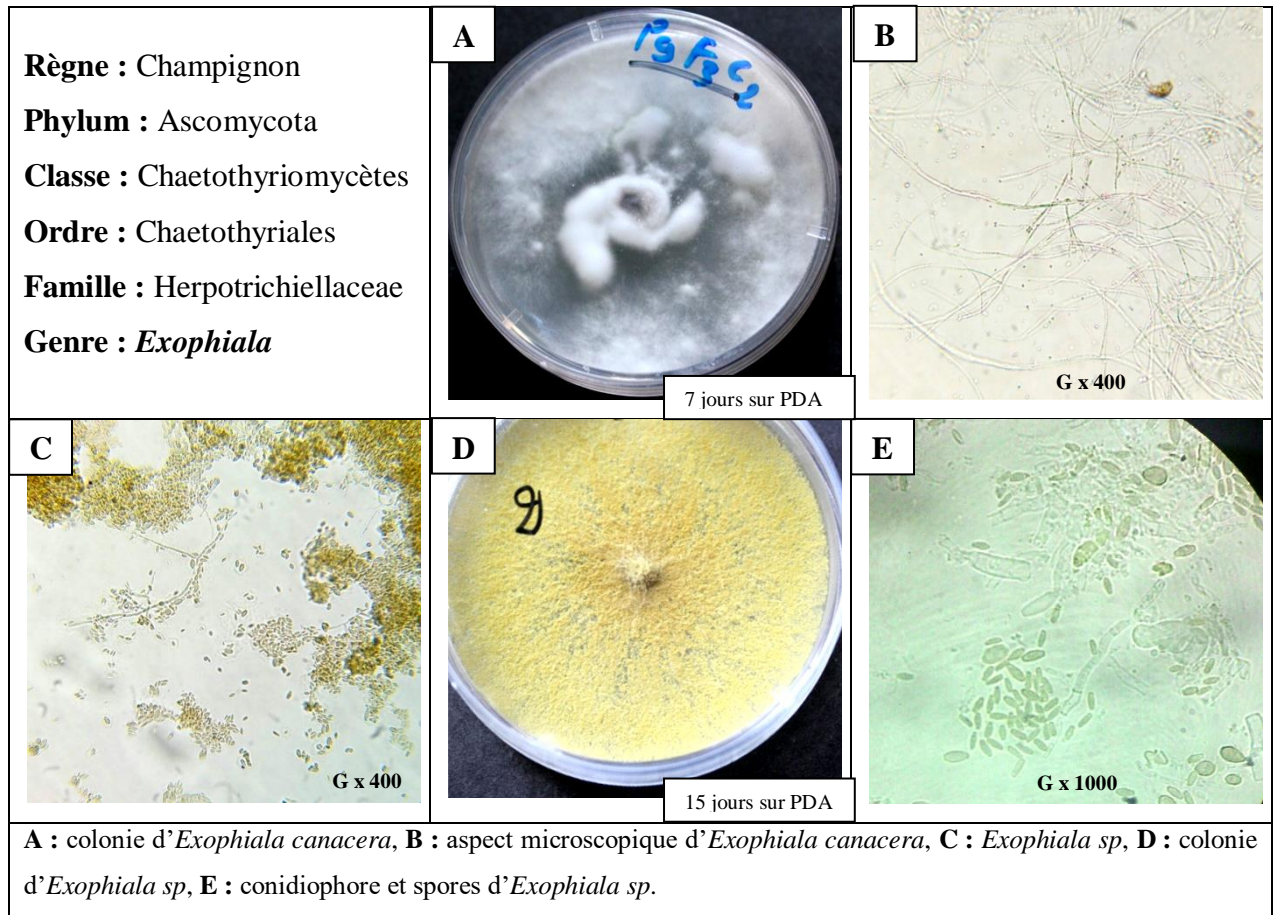


Figure n°36 : aperçu sur les espèces d'*Exophiala*.

Espèces du genre *Alternaria*

Le genre *Alternaria* isolé des feuilles de *L. feei* comporte 12 champignons répartis équitablement entre les deux espèces *Alternaria sp1* (Figure n°37 : A-B) et *Alternaria sp2* (Figure n°37 : C-E).

Alternaria est connu comme champignon de phylloplan, mais il est capable de pénétrer les couches superficielles de la feuille pour devenir endophyte [219]. Ce genre a fait preuve d'une bonne adaptation pour le mode endophyte dans de grandes variétés de plantes [283].

Ce champignon a été identifié comme agent de lutte biologique prometteur contre les pathologies spécifiques tel que le mildiou de la vigne causé par *Plasmopara viticola* [123]. Il est connu par sa production massive de métabolites secondaires, y compris ; alternariol, alternariol monométhyléther, altenusin, macrosporin et methylalaternin [284]. L'espèce *Alternaria sp.*, isolé à partir de feuilles de *Sonneratia alba*, plante chinoise de la famille Sonneratiaceae, a donné deux nouveaux composés nommés acides xanalteric I et II à côté de onze métabolites connus.

Les deux nouveaux composés présentent une activité antibiotique contre *Staphylococcus aureus* [285].

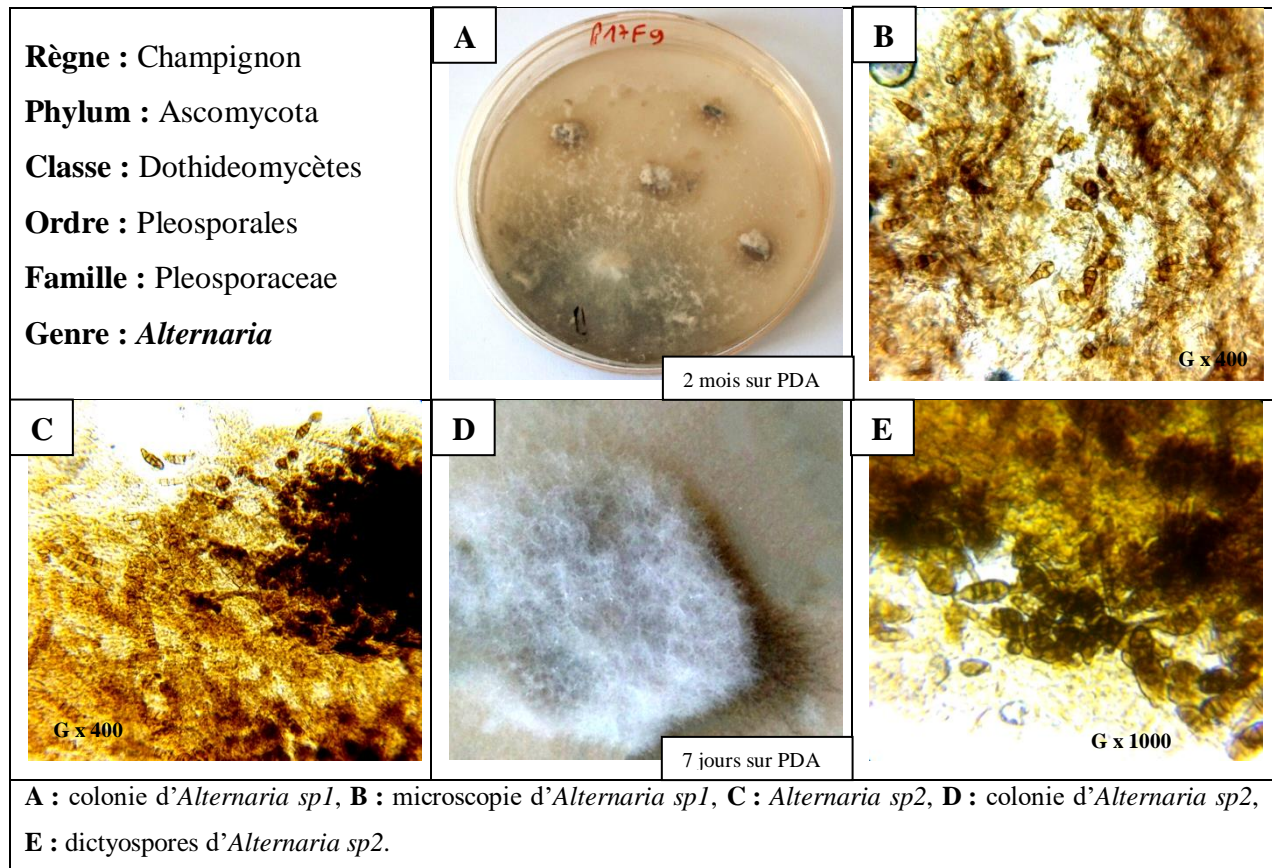


Figure n°37 : aperçu sur les espèces d'*Alternaria*.

Espèces du genre *Absidia*

Le recensement fongique du genre *Absidia* au sein des feuilles de *L. feei* a montré la présence de deux espèces. *Absidia sp1* (Figure n°38 : A-B) forme un pourcentage de 60%. Le reste (40%) est attribué à *Absidia sp2* (Figure n°38 : C-E).

Le genre *Absidia* comprend des champignons d'origine telluriques, à la distribution ubiquiste, ils vivent dans des températures optimales de croissance allant de 20 à 42 °C. Physiologiquement, Ce genre comprend des espèces mésophiles et thermotolérantes, parmi lesquelles des espèces potentiellement pathogènes chez l'être humain, en raison de leur capacité à se développer au-dessus de 37 °C. Certaines des espèces mésophiles jouent un rôle biotechnologique important dans la biotransformation des stéroïdes ou en tant que producteurs de composants analogues à la rénine, alors que les espèces présentant des optima de température de croissance plus élevés présentent un intérêt clinique en tant que pathogènes humains

opportunistes [286]. La morphologie du genre est bien caractérisée et se concentre sur les structures végétatives anamorphes (les sporanges) et sur les structures génératives téléomorphes (les zygospores) [287]. La conjugaison sexuelle entre deux partenaires individuels sexuellement compatibles (hétérothalliques) ou au sein d'un même individu (homothallique) conduit à la formation de zygospores. Jusqu'à présent, la délimitation des espèces et des genres liés à *Absidia* a été principalement basé sur des critères morphologiques de structures végétatives (sporangies) et génératives (zygospores) [286].

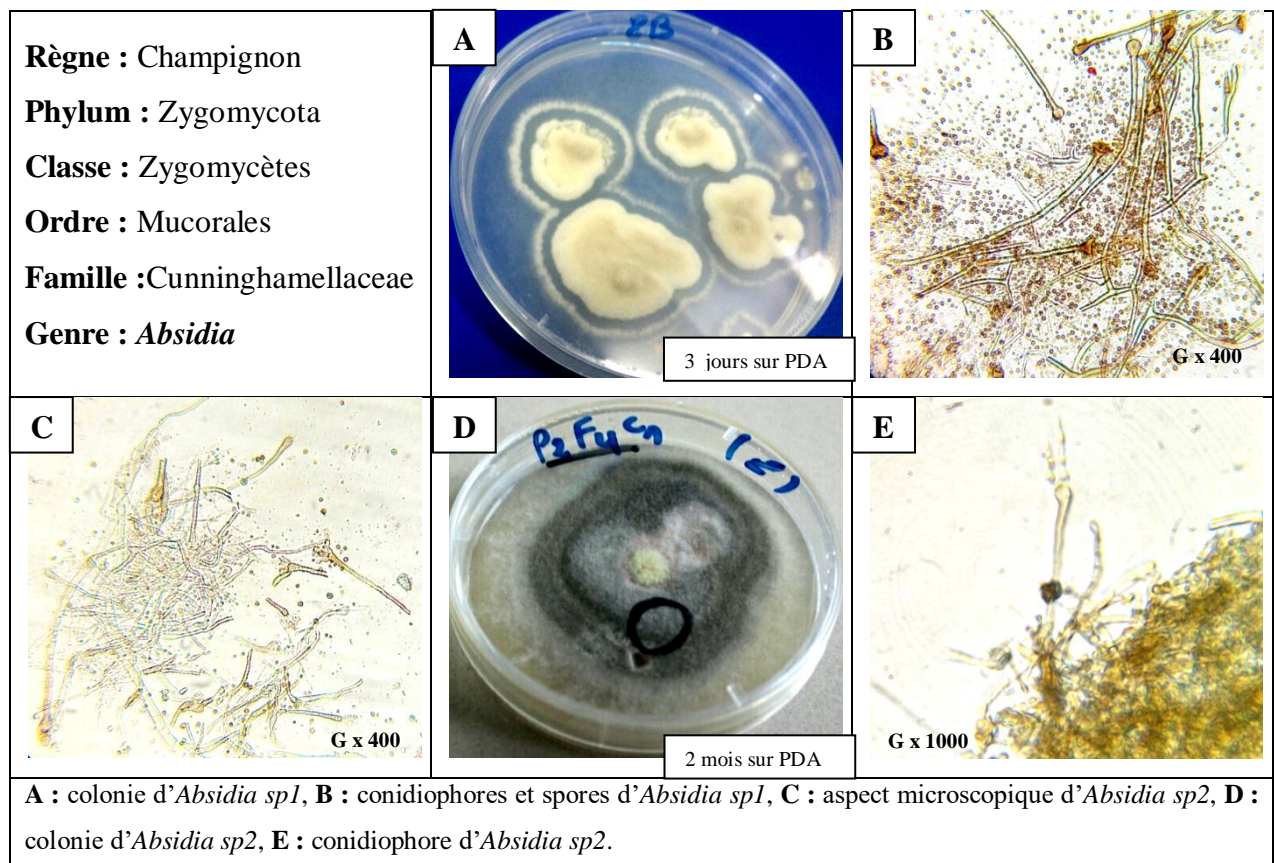


Figure n°38 : aperçu sur les espèces d'*Absidia*.

Espèces du genre *Phialophora*

Au sein de ce genre, la partie foliaire de *L. feei* a montré la présence de deux espèces. *Phialophora sp1* (Figure n°39 : A-B) est plus répandu (66,66%) qu'à l'autre espèce de *Phialophora* (Figure n°39 : C-E).

Phialophora est un genre de champignons à conidiophores courts, Il peut être parasite sur l'homme ou saprophyte sur les plantes, principalement les pommes. L'espèce endophyte *Phialophora lignicola*, isolée à partir des racines de *pin sylvestre* finlandais (plante de la famille

des Pinaceae), contient un antioxydant puissant, qui protègent les cellules contre l'oxydation [288]. Une autre endophyte, *Phialophora mustea* isolé de *Crocus sativus*, possède des nouveaux métabolites antimicrobiens et cytotoxiques dont Phialomustin AD est un exemple très répandu [289].

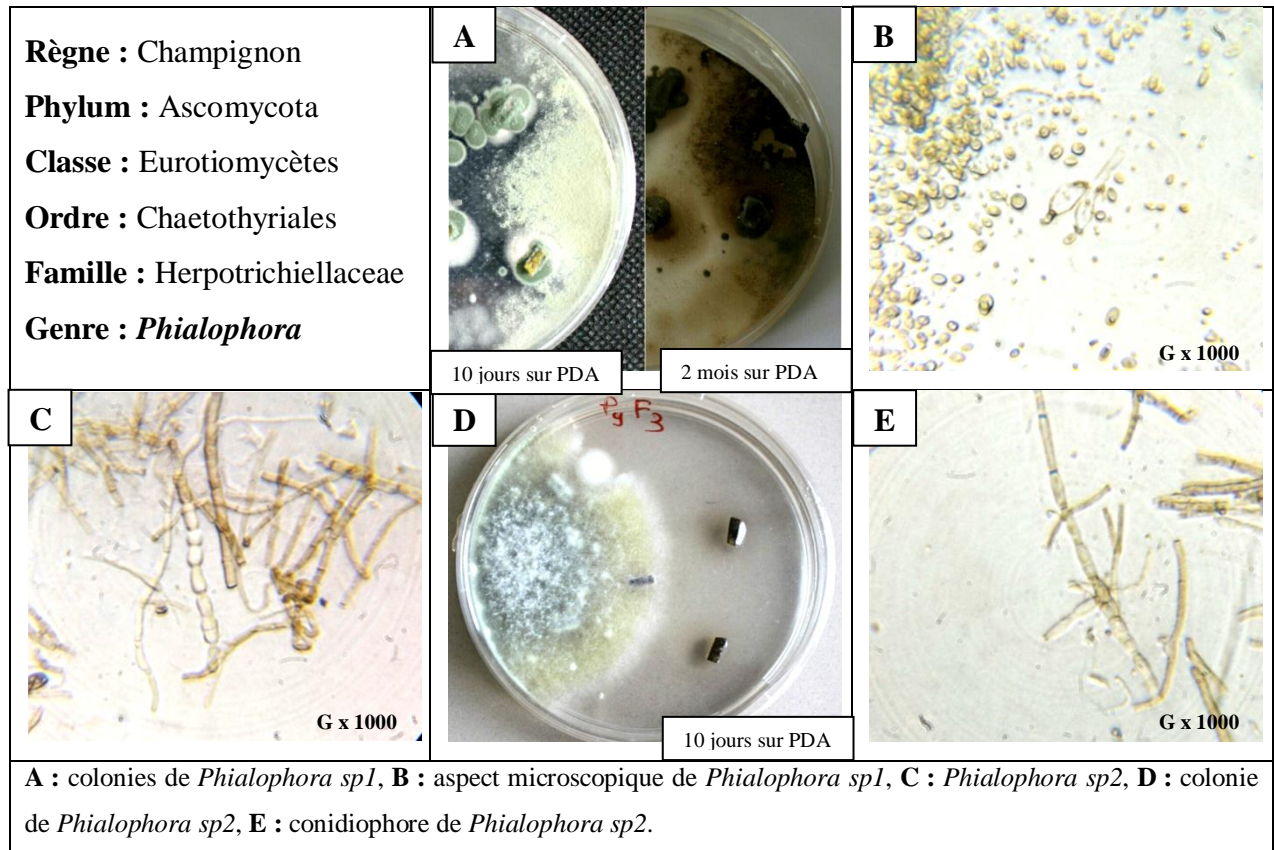


Figure n°39 : aperçu sur les espèces de *Phialophora*.

Espèces du genre *Fusarium*

Le total des isolats fongiques appartenant au *Fusarium* chez *L. feei* est de 8 champignons partagés en égalité entre deux espèces (Figure n°40).

Le genre *Fusarium*, est l'un des genres les plus remarquables des champignons. Les représentants peuvent être trouvés dans la plupart des régions bioclimatiques du monde ; y compris les prairies tropicales et tempérées, les zones arbustives, les forêts, ainsi que les environnements alpins rudes et les déserts. Certaines espèces produisent des mycotoxines, telles que les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone, qui peuvent contaminer la nourriture humaine et les stocks d'aliments pour animaux, conduisant ainsi à des mycotoxicoses graves [290].

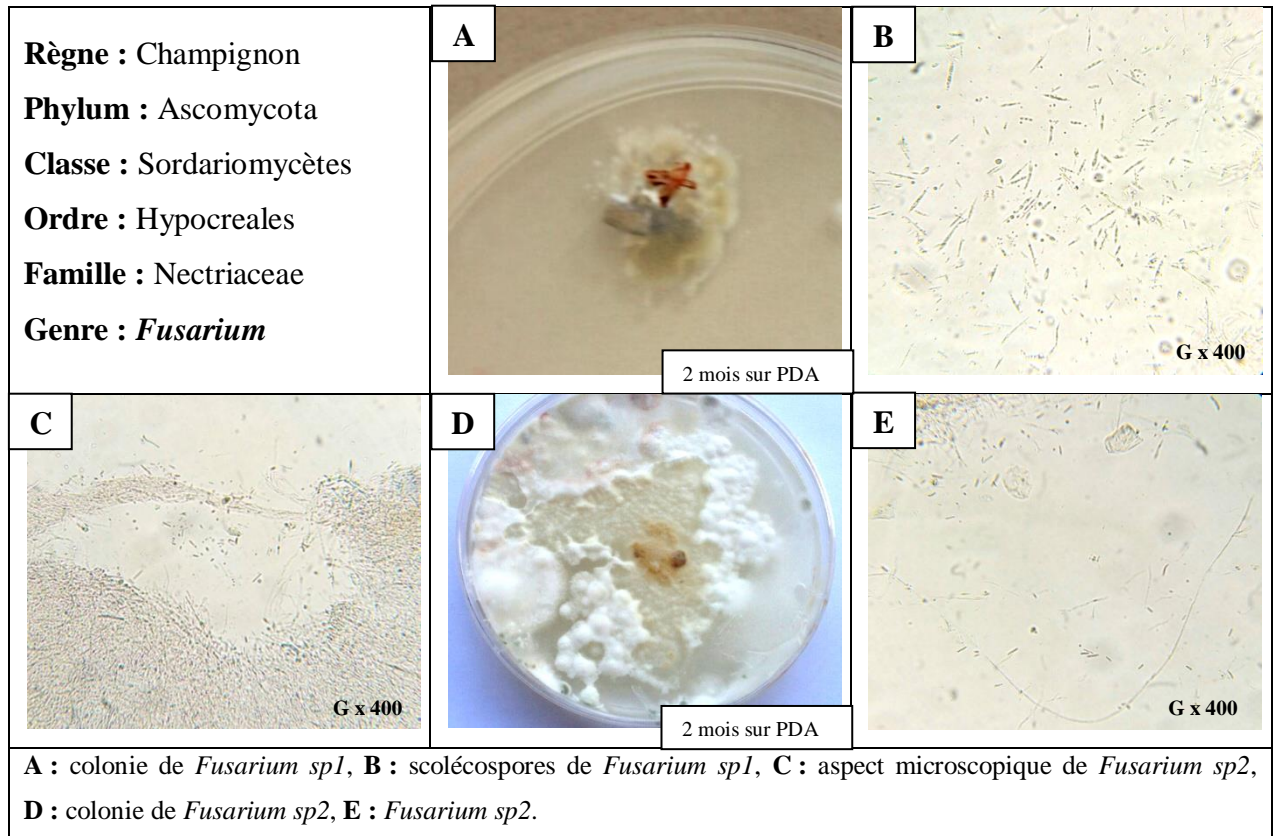


Figure n°40 : aperçu sur les espèces de *Fusarium*.

La présence de *Fusarium* sous la forme endophyte au niveau des feuilles de *L. feei* n'est plus une exception, car ce champignon est caractérisé par sa plasticité à l'égard de ses milieux où il se développe. La forme endophyte de *Fusarium* a été isolée notamment à partir des racines et du feuillage de plantes herbacées appartenant aux familles des Fabacées et des Poacées [291], mais également à partir des aiguilles et des écailles de *Pinus strobus* [292]. Il est isolé notamment d'*Artemisia annua* [251]. De même que pour *Alternaria*, ce genre a été rapporté comme agent de lutte biologique contre le mildiou de la vigne causé par *Plasmopara viticola* [123]. *Fusarium*, isolé à partir de trois espèces de *Dendrobium*, présente une forte activité antimicrobienne, ainsi que des activités de promotion de la production végétale, comme le cas de *Phoma* cité précédemment [272].

Espèces du genre *Paecilomyces*

Sept isolats fongiques de *Paecilomyces* sont isolés à partir des feuilles de *L. feei*. La majorité (5 champignons) appartient à l'espèce *Paecilomyces sp2* (Figure n°41 : C-E). Seulement, 2 champignons qui sont classés *Paecilomyces sp1* (Figure n°41 : A-B).

Les *Paecilomyces* sont des champignons dont la répartition géographique est cosmopolite. Ils regroupent 31 espèces différentes et produisent de nombreuses mycotoxines relativement dangereuses (acide byssochlamique, acide indole-3-acétique, ferrirubine, fusigène, paecilotoxines, patuline, variotine et viriditoxine). Ce genre a été isolé comme endophyte de piment rouge (plantes du genre *Capsicum* de la famille des Solanacées) en Corée [293]. Il est isolé évidemment de la plante médicinale *Artemisia annua* [251].

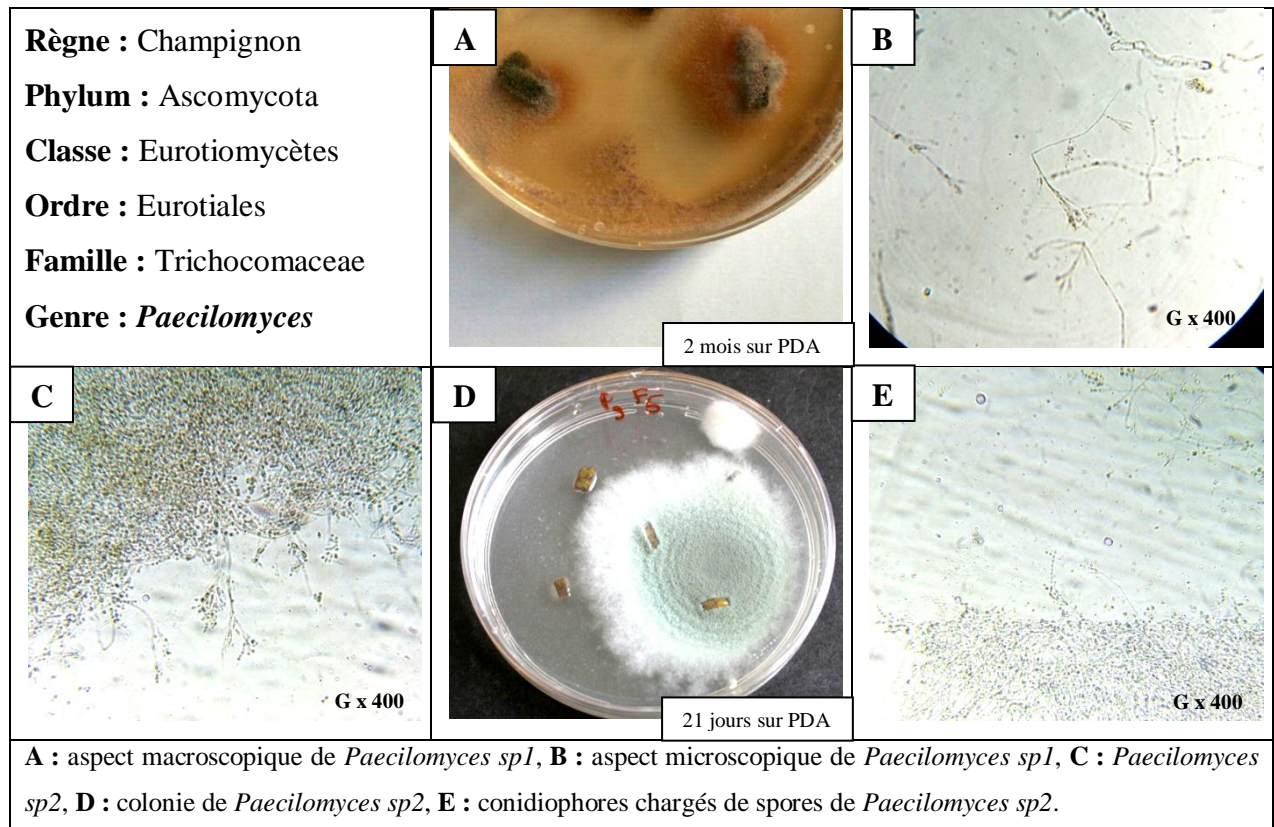


Figure n°41 : aperçu sur les espèces de *Paecilomyces*.

Espèces des genres *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Rhizoctonia* et *Verticillium*

Parmi les groupes de champignons omniprésents dans la nature, le genre *Trichoderma*. Qu'il présente des conidiophores semblables à ceux du *Gliocladium*, mais qui diffèrent dans les parois périthéciales [294]. Les espèces de ce genre sont économiquement importantes, avec un large éventail d'utilisations, telles que la lutte biologique contre plusieurs agents pathogènes des plantes [295, 296], la promotion de la croissance des plantes, l'induction de la résistance des plantes [297, 298] et la production d'enzymes industrielles et d'antibiotiques [299, 300]. Au cours des dernières années, elles ont été également utilisées pour réduire au minimum les

maladies des parties foliaires des plantes, en particulier pour supprimer les moisissures grises causées par les infections à *Botrytis cinerea* et le mildiou sur de nombreuses cultures. Sur les 89 espèces de *Trichoderma*, un certain nombre d'espèces présentent l'activité de biocontrôle. Les diverses enzymes lytiques et les composés toxiques volatils et non volatils produits par ces espèces constitue le mécanisme principal du contrôle biologique [301]. La trichodermine, un antifongique récemment caractérisé à partir de *Trichoderma harzianum*, un champignon endophyte de l'Houx cornu (Aquifoliaceae), avait un effet protecteur significatif contre le mildiou sur la tomate et le concombre [302].

Les deux genres *Epicoccum* et *Rhizoctonia*, ont été isolés ensemble de *Saussurea involucrata* de la Chine [61].

Epicoccum est un agent potentiel de lutte biologique contre les maladies des plantes telles que la moisissure blanche dans la fève (Fabaceae). Il produit des mycotoxines telles que l'épicorazine A et B et la flavipine indole-3-acétonitrile.

Les espèces de *Rhizoctonia* sont des champignons ubiquistes et variables dans la nature. Certains peuvent être des agents de lutte biologique utiles contre les maladies des plantes ornementales et d'autres sont des endophytes d'orchidées importantes pour le développement des plantes [256]. *Rhizoctonia* a été isolé à partir d'orchidées (*Dendrobium chrysanthum* et *D. nobile*) plantes médicinales chinoises [272]. Il semble que ce genre est totalement attaché d'orchidées car Toutes les orchidées nécessitent une infection fongique pour compléter leur cycle de vie [303]. Plusieurs taxons de *Rhizoctonia* provenant d'un certain nombre d'orchidées nord-américaines ont été décrits et validés [256].

Les *Verticillium*s sont cosmopolites. Ce genre comprend 18 espèces, dont certaines sont phytopathogènes responsables des maladies du flétrissement regroupées sous le terme de verticilliose, certaines autres sont utiles comme agents de lutte biologique contre les insectes nuisibles et les nématodes dans les cultures.

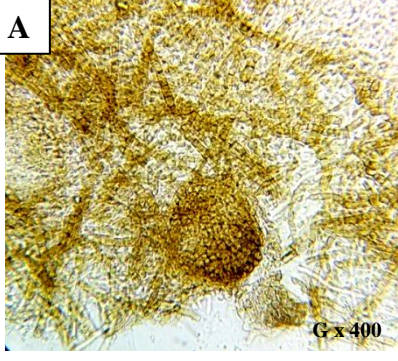

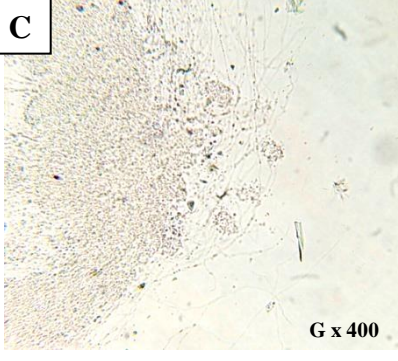
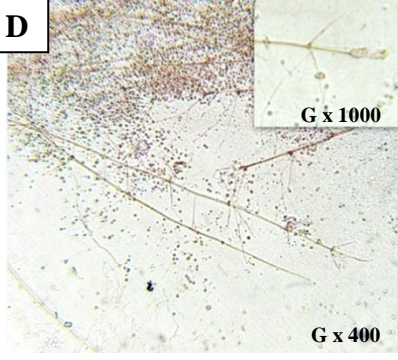
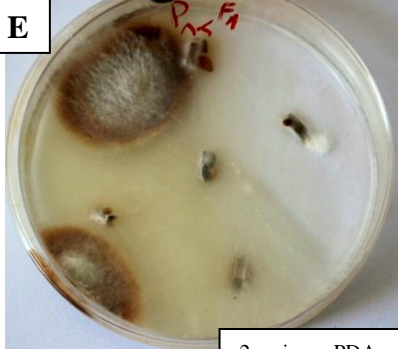
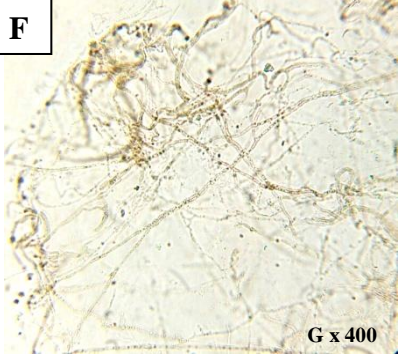
Règne :	Champignon	Champignon	Champignon	Champignon	
Phylum :	Ascomycota	Ascomycota	Basidiomycota	Ascomycota	
Classe :	Sordariomycètes	Dothidiomycètes	Agaricomycètes	Sordariomycètes	
Ordre :	Hypocreales	Pleosporales	Cantharellales	Non défini	
Famille :	Hypocreaceae	Pleosporaceae	Ceratobasidiaceae	Plectosphaerellaceae	
Genre :	<i>Trichoderma</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Verticillium</i>	
A	 G x 400	B	 2 mois sur PDA	C	 G x 400
D	 G x 400	E	 2 mois sur PDA	F	 G x 400
<p>A : <i>Epicoccum sp.</i>, B : colonie de <i>Trichoderma sp.</i>, C : aspect microscopique de <i>Trichoderma sp.</i>, D : conidiophores et spores de <i>Verticillium sp.</i>, E : colonies de <i>Rhizoctonia sp.</i>, F : microscopie de <i>Rhizoctonia sp.</i></p>					

Figure n°42 : aperçu sur les genres *Trichoderma*, *Epicoccum*, *Rhizoctonia* et *Verticillium*.

Espèces des genres *Aureobasidium*, *Scytalidium* et *Scopulariopsis*

Les espèces du genre *Aureobasidium* sont omniprésentes et se trouvent dans différents habitats [304]. Ce genre possède différents styles de vie tels que saprophyte, pathogène associé aux plantes et pathogène humain opportuniste ou bien endophyte [305]. Il a été isolé comme endophyte de *Acacia* en Australie [306], et à partir d'une tige de bambou en Iran [307]. *Aureobasidium pullulans*, espèce type du genre, est bien connu pour son importance commerciale en tant que producteur de pullulane, un polysaccharide extracellulaire biodégradable [308] et a été également envisagé comme agent de biocontrôle potentiel des agents phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum* [305, 308, 309].

Scytalidium est un genre dominant des feuilles de *Couroupita guianensis* [310] et dans les feuilles de *Plumeria rubra*, il est signalé comme genre cosmopolite [137].

Le genre *Scopulariopsis* comprend des espèces communément isolées du sol, du matériel végétal et des environnements intérieurs. Quelques espèces sont également reconnues comme des agents pathogènes opportunistes chez les insectes et les animaux, y compris les humains. Actuellement, 77 espèces sont décrites [311].

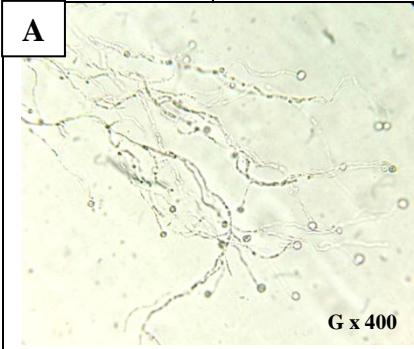
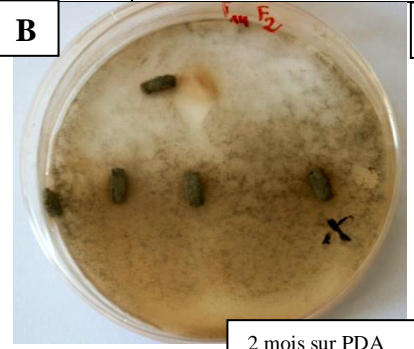
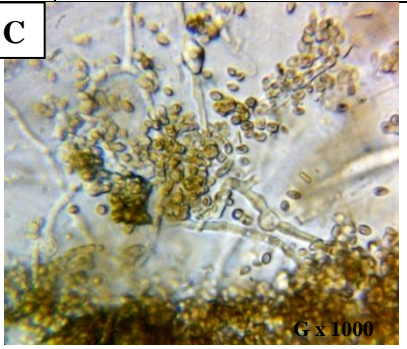
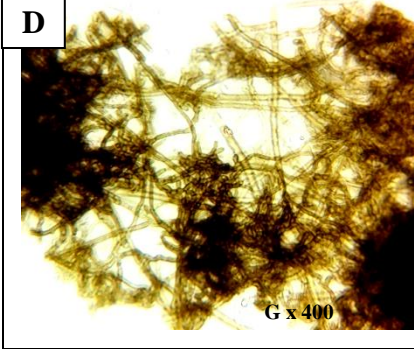
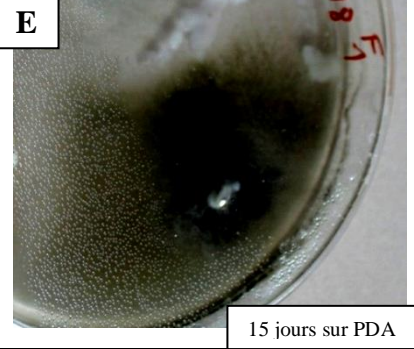
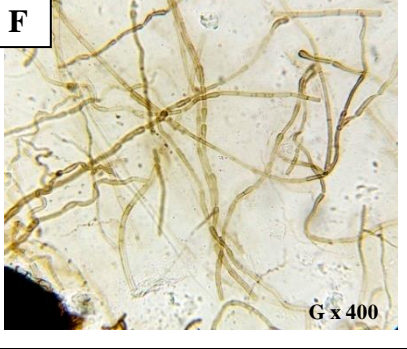
Règne :	Champignon	Champignon	Champignon
Phylum :	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota
Classe :	Dothideomycètes	Léotiomyces	Sordariomycètes
Ordre :	Dothideales	Helotiales	Microascales
Famille :	Dothioraceae	Non définie	Microascaceae
Genre :	<i>Aureobasidium</i>	<i>Scytalidium</i>	<i>Scopulariopsis</i>
A		B	
	G x 400		2 mois sur PDA
C			G x 1000
D		E	
	G x 400		15 jours sur PDA
F			G x 400
A : <i>Scopulariopsis</i> sp, B : aspect macroscopique d' <i>Aureobasidium</i> sp, C : aspect microscopique d' <i>Aureobasidium</i> sp, D : microscopie de <i>Scytalidium</i> sp, E : colonie de <i>Scytalidium</i> sp, F : chlamydospores de <i>Scytalidium</i> sp.			

Figure n°43 : aperçu sur les genres *Aureobasidium*, *Scytalidium* et *Scopulariopsis*.

Espèces des structures non identifiées

Plusieurs champignons endophytes qui montrent des structures mycéliennes et des spores mal reconnues à notre niveau ont été observés chez les feuilles de *L. feei*. Ces formes fongiques très difficile à identifier morphologiquement représentent 10,74% des isolats endophytes recensés. Ce groupe des mycoendophytes traduit une faiblesse dans la méthode d'identification utilisée. Donc, le recours aux autres méthodes d'identification notamment l'outil moléculaire est souhaitable lors des études sur la diversité fongique.

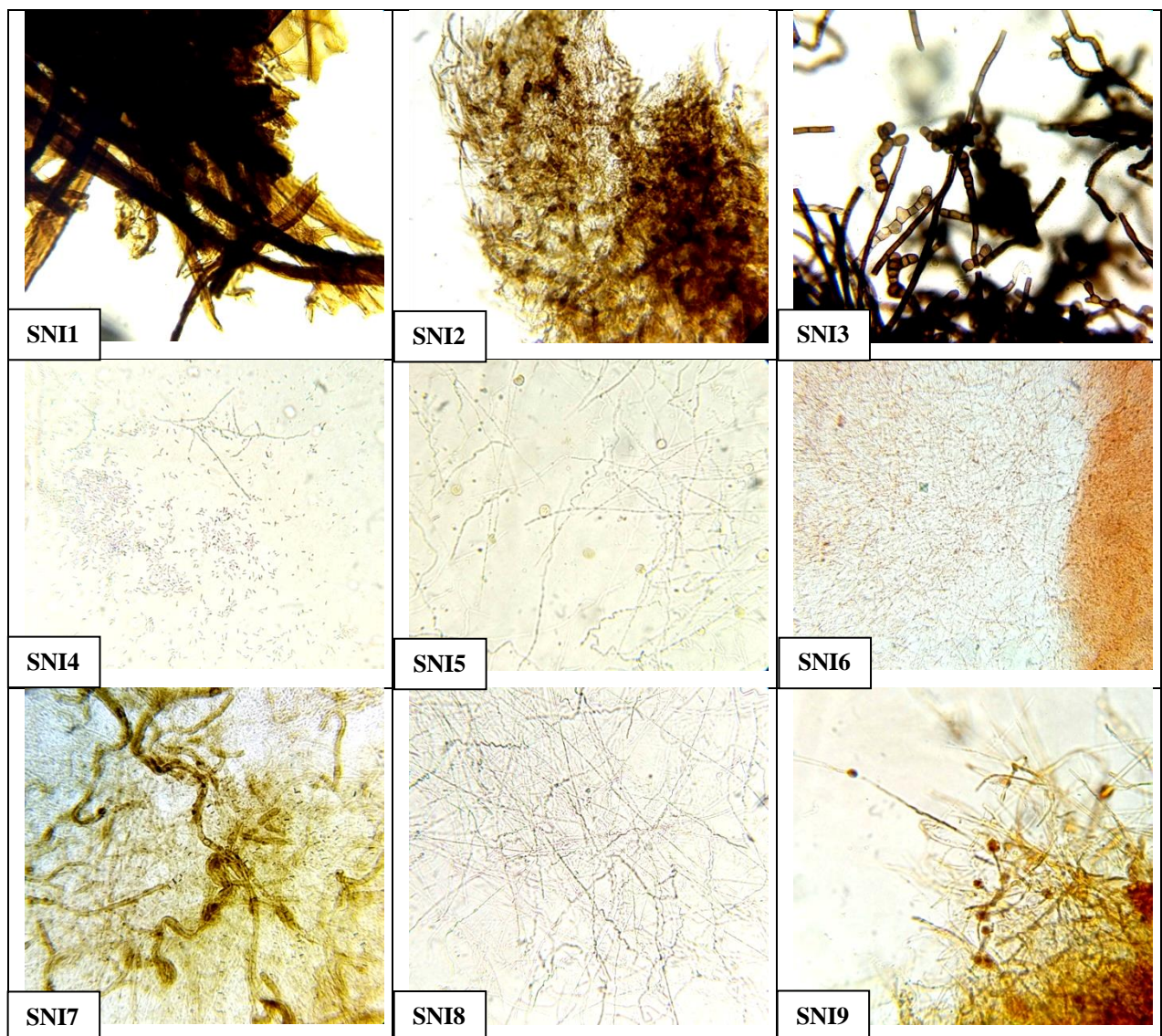


Figure n°44 : observations microscopiques de quelques structures fongiques non identifiées.

Les isolats qui n'ont pas été sporulé sont appelés mycéliums stériles, ils ont été laissé croître plus de deux mois et ils n'ont donné aucune forme de spores sexuées ou asexuées. Ils sont divisés en différents morphotypes en fonction de leurs caractéristiques de culture. Leur identification doit se faire moléculairement. Ces groupes de champignons sont communs dans les études d'endophytes [312]. Beaucoup de champignons stériles ont été isolés en tant qu'endophytes à partir de différentes plantes médicinales comme *Azadirachta indica* [313], la mangrove [314] et autres [106, 147, 208, 244, 245, 315].

En plus de différentes formes fongiques observées au cours de l'incubation microbienne, la présence de quelques bactéries endophytes a été constatée notamment, malgré l'utilisation d'antibiotique (amoxicilline). La persistance de ces bactéries est due éventuellement à leur résistance à l'amoxicilline ou bien à la concentration utilisée. Donc le choix d'antibiotique dans cette étude ne recouvre pas l'ensemble des bactéries. Il est recommandé dans les études ultérieures d'utiliser un antibiotique avec un large spectre d'inhibition comme la streptomycine ou bien une combinaison d'au moins deux antibiotiques.

4-5- Abondances et interactions des genres fongiques au sein des sujets de *L. feei*

Afin de donner une meilleure interprétation sur la distribution et les interactions existant entre les mycoendophytes foliaires de *L. feei*, nous avons procédé à un calcul plus détaillé des abondances fongiques pour chaque genre au sein de chaque sujet (Tableau n°13).

Nous pouvons voir de ce tableau que les deux genres dominants *Penicillium* et *Aspergillus* sont présents chez 22 sujets différents. Nous observons aussi que les sujets qui ont des abondances élevées en *Penicillium* et *Aspergillus* sont moins infectés par les autres genres de mycoendophytes. Ainsi, une faible abondance de ces deux genres augmente la richesse fongique, comme dans le cas du sujet numéro 15, qui se trouve dépourvu en *Aspergillus* et avec la plus faible abondance en *Penicillium* 3%. Ce sujet comporte 10 genres fongiques différents.

Santos *et al.* [316] ont obtenu chez *Melia azedarach*, un arbre exotique introduit au Brésil en provenance d'Asie un total de 55 isolats fongiques. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* étaient les plus communs dans cette plante. Ces deux champignons sont des plus anciennement connus. Ils occupent tous les sols, y compris ceux des régions arides. Ce sont des genres xérophiles pouvant survivre dans les zones où les précipitations sont très faibles, voir rares [317, 318]. Il apparaît que l'abondance élevée de ces mycoendophytes est lié à leur pouvoir

antagoniste, leur répartition géographique très étendue et leur résistance envers les conditions climatiques.

Tableau n°13. Abondances (%) des mycoendophytes au sein des sujets de *L. feei*.

Sujets	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Phoma</i>	<i>Trichophyton</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Exophiala</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Absidia</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Phialophora</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Verticillium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Scytalidium</i>	<i>Scopulariopsis</i>	mycélium stérile	SNI
S 1	46	10	8	10	0	8	0	0	0	0	4	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	6
S 2	52	14	0	6	0	0	0	0	12	0	0	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 3	58	17	0	0	0	13	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
S 4	57	26	0	9	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
S 5	52	13	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	10
S 6	53	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	13
S 7	13	17	17	9	13	0	0	0	13	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
S 8	12	8	24	24	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24
S 9	15	26	11	0	0	16	5	0	0	0	5	0	0	0	11	0	0	11	0	0	0	0
S 10	24	24	28	0	14	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S 11	15	12	0	20	6	12	0	9	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	17
S 12	5	16	22	22	19	0	8	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
S 13	7	11	19	22	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
S 14	6	7	23	0	19	0	6	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	10	16
S 15	5	0	7	16	21	0	10	0	0	7	10	0	14	0	0	0	0	0	0	0	3	7
S 16	0	23	23	16	0	6	16	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
S 17	19	15	0	0	6	0	0	15	0	12	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	24
S 18	38	11	0	0	0	0	0	09	0	7	0	9	0	5	0	0	0	0	7	0	0	14
S 19	48	13	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	7	0	0	0	0	16
S 20	43	10	0	7	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	21
S 21	56	7	10	0	5	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
S 22	28	35	11	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	15
S 23	34	26	7	14	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12

Devant cette richesse fongique au niveau des sujets de *L. feei*, des interactions parfois positives et pour d'autres négatives sont établies entre les différents genres de mycoendophytes. À cet effet et en se basant sur les abondances des genres fongiques au niveau des sujets

échantillonnés, la matrice des corrélations (Tableau n°14) présente les relations significatives et la nature de ces interactions entre ces mycètes.

Tableau n°14. Matrice de corrélations entre les genres fongiques des tissus foliaires de *L. feei*.

	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Phoma</i>	<i>Trichophyton</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Exophiala</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Epicoccum</i>	<i>Absidia</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Phialophora</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Verticillium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Syrialidium</i>	<i>Scopulariopsis</i>	Mycélium stérile	SNI	
<i>Penicillium</i>	1																						
<i>Aspergillus</i>	0,13	1																					
<i>Gliocladium</i>	-0,67	0,04	1																				
<i>Cladosporium</i>	-0,56	-0,25	0,34	1																			
<i>Phoma</i>	-0,48	-0,42	0,44	0,14	1																		
<i>Trichophyton</i>	-0,21	0,10	0,20	0,17	-0,26	1																	
<i>Trichoderma</i>	-0,45	-0,20	0,34	0,23	0,25	-0,07	1																
<i>Acremonium</i>	-0,20	-0,08	-0,22	0,31	-0,04	0,27	-0,07	1															
<i>Exophiala</i>	0,15	-0,05	-0,11	-0,10	0,11	-0,23	-0,23	-0,12	1														
<i>Alternaria</i>	-0,11	-0,13	-0,31	-0,23	0,05	-0,17	-0,06	0,04	-0,18	1													
<i>Epicoccum</i>	-0,41	-0,22	0,17	0,25	0,49	-0,02	0,27	-0,15	0,25	0,10	1												
<i>Absidia</i>	0,25	0,00	-0,29	-0,07	-0,30	-0,23	-0,22	-0,06	0,35	0,09	-0,18	1											
<i>Rhizoctonia</i>	-0,25	-0,38	-0,20	0,08	0,35	-0,21	0,21	-0,01	0,02	0,69	0,44	0,06	1										
<i>Aureobasidium</i>	-0,05	-0,12	0,08	-0,32	0,19	-0,22	0,04	-0,08	-0,14	-0,02	-0,17	0,06	-0,12	1									
<i>Phialophora</i>	0,08	0,07	-0,08	-0,20	-0,18	0,35	-0,04	-0,12	-0,15	-0,18	0,25	-0,14	-0,13	-0,14	1								
<i>Fusarium</i>	0,02	-0,19	-0,29	0,19	-0,13	0,08	0,10	0,54	-0,12	-0,14	-0,15	-0,12	-0,11	-0,11	-0,12	1							
<i>Verticillium</i>	0,45	-0,06	-0,36	-0,34	0,00	0,10	-0,23	-0,12	0,09	0,01	-0,18	-0,14	-0,13	-0,14	0,17	-0,12	1						
<i>Paecilomyces</i>	-0,14	0,50	0,05	-0,27	-0,24	0,31	0,03	-0,09	-0,12	0,01	0,17	-0,11	-0,10	-0,11	0,56	-0,09	-0,11	1					
<i>Syrialidium</i>	0,10	-0,13	-0,20	-0,19	-0,17	-0,13	-0,13	0,04	-0,08	0,38	-0,10	0,51	-0,07	0,26	-0,08	-0,07	-0,08	-0,06	1				
<i>Scopulariopsis</i>	0,29	0,26	-0,20	0,03	-0,17	-0,13	-0,13	-0,02	-0,08	-0,10	-0,10	-0,08	-0,07	-0,08	-0,08	-0,07	-0,08	-0,06	-0,05	1			
Mycélium stérile	-0,33	-0,37	0,28	-0,12	0,52	-0,16	0,27	-0,08	-0,10	0,01	0,08	-0,10	0,16	0,76	-0,10	-0,08	-0,10	-0,08	-0,06	-0,06	1		
SNI	-0,17	-0,36	-0,08	0,14	-0,02	-0,19	-0,18	0,21	-0,22	0,22	-0,30	-0,15	0,04	0,17	-0,22	0,34	-0,13	-0,19	0,09	-0,29	0,11	1	

Parmi les différentes corrélations établies entre les 22 groupes fongiques de *L. feei*. Nous pouvons noter 16 corrélations significatives données dans le tableau précédent.

La plus forte corrélation positive observée dans cette matrice est celle établie entre *Aureobasidium* et Mycélium stérile (0,76).

Penicillium et *Phoma* se trouvent corrélés négativement entre eux (-0,48). Ces deux genres sont les endophytes qui possèdent le plus grand nombre de corrélations significatives avec le reste des champignons. Ainsi, *Penicillium* dispose de 3 autres corrélations négatives avec *Cladosporium* (-0,56), *Gliocladium* (-0,67) et *Trichoderma* (-0,45) et une seule corrélation positive avec *Verticillium* (0,45). Le genre *Phoma* a une corrélation négative avec *Aspergillus* (-0,42) et 3 interactions positives avec *Gliocladium* (0,44), *Epicoccum* (0,49) et Mycélium stérile (0,52). La relation antagoniste de *Phoma* et du genre *Aspergillus* est notamment mentionnée par Strobel *et al.* [271].

Le genre *Rhizoctonia* est fortement corrélé positivement avec *Alternaria* (0,69) et *Epicoccum* (0,44). Tandis que pour *Paecilomyces*, il est corrélé avec *Aspergillus* (0,50) et

Phialophora (0,56). Les autres corrélations significatives positives sont celles établies entre *Acremonium* et *Fusarium* (0,54) et entre *Absidia* et *Scytalidium* (0,51).

Exophiala, *Scopulariopsis*, *Trichophyton* et SNI n'établissent aucune interaction significative avec les autres mycoendophytes.

Les corrélations positives et négatives données dans la matrice précédente sont aussi bien traduites au niveau des colonies fongiques. Ainsi, différents comportements se sont manifestés au cours de l'incubation chez les cultures mixtes, qui contiennent au moins deux espèces différentes. Ces comportements sont le résultat des relations établies entre les mycoendophytes qui partagent la même boîte de culture. Quelques relations fonctionnelles sont présentées ci-après.

❖ Relations de dominance et d'envahissement

Ces relations sont notées chez certaines espèces dominantes, qui ont un grand pouvoir de contamination et d'envahissement contre d'autres espèces dites fragiles. La sensibilité de ces dernières envers leur espèce dominante est différente. Certaines sont totalement envahies sans aucune manifestation de défense apparente, contrairement aux autres qui présentent des formes de résistance, certaines colonies produisent des pigments diffus, empêchant l'envahissement complet par l'espèce dominante (Figures n°45 et n°46).

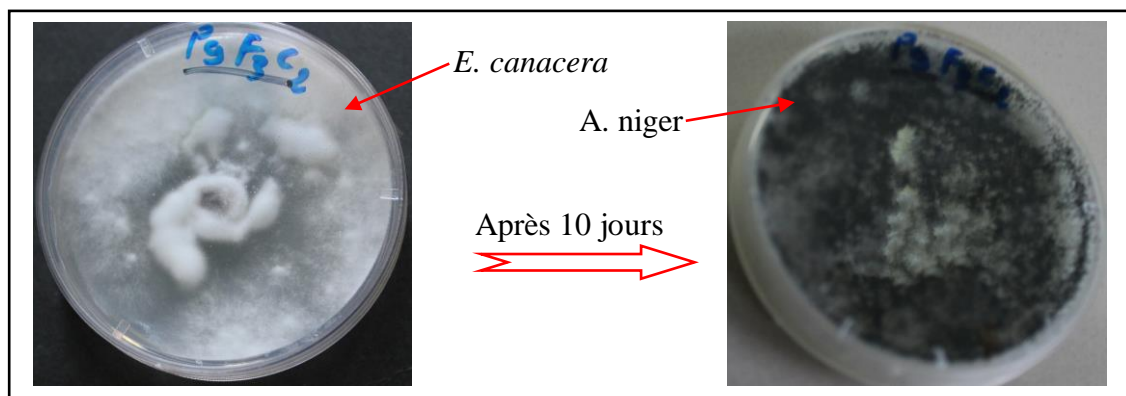


Figure n°45 : dominance et envahissement total d'*Exophiala canacera* par *Aspergillus niger*.

La figure montre un envahissement complet au bout de 10 jours de l'espèce *E. canacera* par *A. niger*. Ce dernier est un champignon dominant de plusieurs autres mycètes, il possède un pouvoir de contamination très large. Cette contamination étendue et rapide peut être due à la forme et la quantité des spores produites. En effet, *A. niger* produit une masse très considérable de spores aériennes volatiles, ces spores sont très fertiles, elles germinent rapidement et dans les

moindres exigences de conditions de culture, elles sont petites avec une forme globuleuse facilement dispersées dans le milieu.

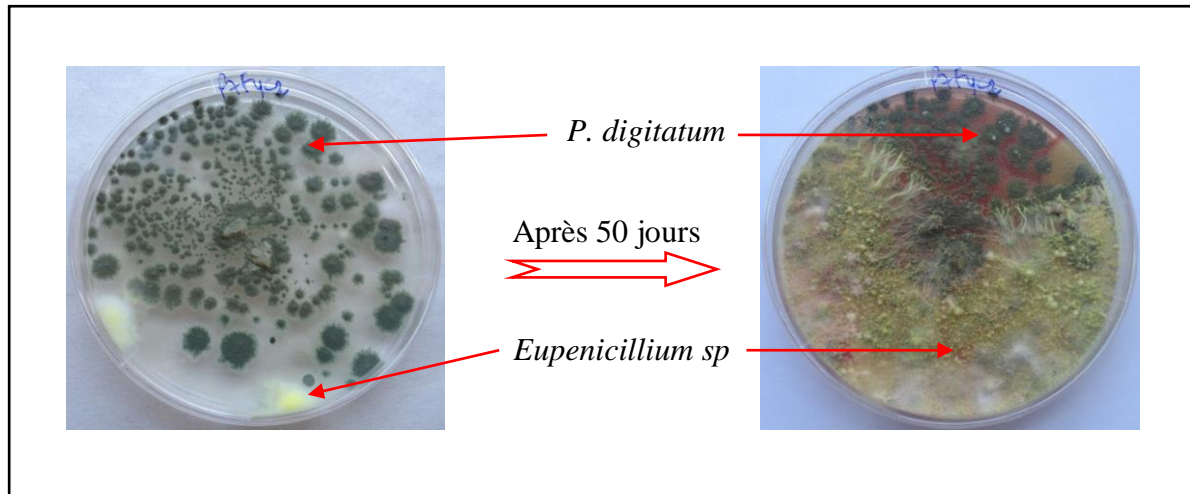


Figure n°46 : envahissement partiel de *Penicillium digitatum* par *Eupenicillium sp.*

Cette figure montre le deuxième exemple de dominance. Dans ce cas, l’envahissement est incomplet, car après un certain temps, *P. digitatum* commence à produire des molécules de résistance (pigmentation rouge) pour stopper l’avancement d’*Eupenicillium sp.* L’appartenance des deux espèces au *Penicillium* n’exclut pas la relation de domination.

Lors d’une culture double de deux genres fongiques en compétition : *Penicillium* (Ascomycète) et *Oudemansiella mucida* (Basidiomycète), Kettering *et al.* [319] ont constaté que l’envahissement de *Penicillium* n’a commencé qu’après épuisement du glucose libre dans le milieu de culture.

❖ Relations d’antagonisme et de compétition

L’antagonisme est l’une des images d’interaction la plus observée entre les différents mycoendophytes. Au niveau des cultures dans les boîtes de Pétri, cette relation se traduit chez les colonies fongiques par deux principaux comportements : soit par formation d’une zone d’inhibition (zone séparant les deux champignons en compétition), ou bien par production des pigmentations diffuses empêchant la contamination par l’espèce opposée. Les mycoendophytes qui présentent cette relation sont retrouvés corrélés négativement entre eux. Généralement, ce type d’interaction s’établit entre les champignons Hyalohyphomycètes et les Phaéohyphomycètes (dématiés). Ces derniers présentent une résistance élevée empêchant la domination de leurs concurrents.

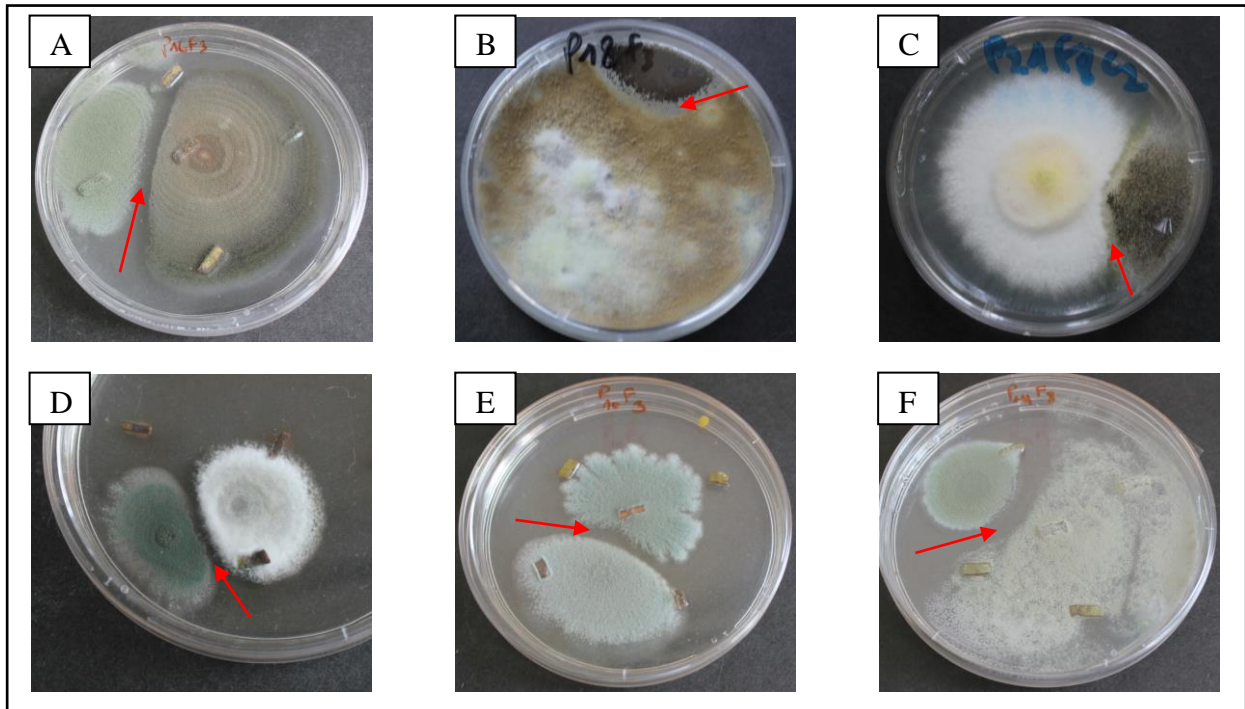


Figure n°47 : zones d'inhibition entre les mycoendophytes antagonistes.

A : barrière d'inhibition entre *Cladosporium herbarum* (colonie à droite) et *Paecilomyces sp* à gauche.

B : barrière d'inhibition entre *Phoma sp* (colonie en bas) et *Aspergillus niger* (petite colonie en haut).

C : zone d'inhibition entre mycélium stérile (colonie blanche à gauche) et *Aspergillus niger* à droite.

D : compétition entre une structure non identifiée (colonie à gauche) et *Trichophyton sp* à droite.

E : barrière d'inhibition entre *Aspergillus sp* (colonie en haut) et *Epicoccum sp* en bas.

F : barrière d'inhibition entre *Phialophora sp* (grande colonie à droite) et *Gliocladium sp* (colonie petite).

Ce type d'interaction antagoniste se caractérise par la formation d'une zone d'inhibition entre les deux souches. Cette barrière est le résultat d'un freinage de croissance équilibré de deux cotés. Dans ce cas, aucun champignon n'a la capacité de dominer l'autre et les deux colonies restent séparées, même avec épuisement total des éléments nutritifs dans le milieu de culture. Nous avons conclu de ce type de relation que ces mycoendophytes possèdent un pouvoir de résistance et de défense élevés. Il se peut que ces mycètes produisent des métabolites empêchant l'avancé des autres microorganismes antagonistes. Vivas *et al.* [320] montrent que le développement simultané de plusieurs champignons sur un milieu entièrement colonisé provoque des phénomènes de compétition stable.

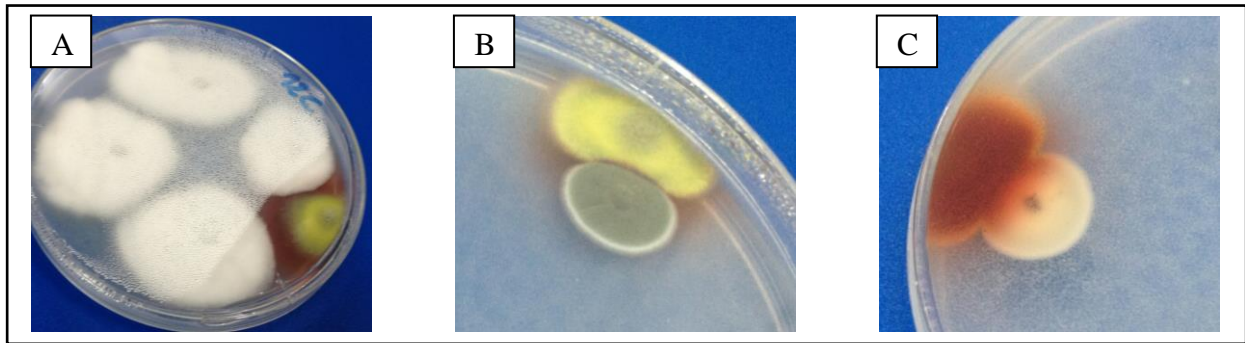


Figure n°48 : diffusion de pigments par *Eupenicillium sp* contre les genres antagonistes.

A : compétition productive d'*Eupenicillium sp* (colonie jaune) contre *Trichophyton sp* (colonies blanches).

B : compétition productive d'*Eupenicillium sp* (colonie jaune) contre *Gliocladium viride* (colonie verte).

C : revers de la figure B montrant la diffusion et l'émission des pigments rouges par *Eupenicillium sp*.

En plus de la formation d'une zone d'inhibition, le deuxième phénomène observé chez les mycoendophytes antagonistes est la compétition par production de pigments diffus et l'émission de ces pigments dans l'espace environnant, afin de freiner la progression de l'autre genre compétiteur. La figure ci-dessus montre une défense par production de métabolites diffusés dans le milieu par l'espèce *Eupenicillium sp*. pour combattre le partenaire antagoniste.

Ainsi dans cette étude, le genre *Penicillium* possède le pouvoir antagoniste le plus élevé avec quatre corrélations significatives négatives. Les espèces de ce genre sont connues pour leur activité antimicrobienne par la production des antibiotiques [321]. Ils produisent aussi des mycotoxines, qui sont des métabolites secondaires nocifs pour les animaux et pour l'homme [322, 323].

Les autres genres considérés comme antagonistes et qui possèdent des abondances assez élevées sont *Trichoderma* et *Acremonium*. Le genre fongique *Trichoderma* compte des espèces qui sont d'une grande importance, en raison de leur production d'antibiotiques et d'enzymes qui hydrolysent les parois cellulaires de différents microorganismes. Ils sont utilisés comme agents de lutte et de contrôle biologique [324, 325].

L'effet antagoniste pourrait être le résultat de la concurrence établie entre les mycoendophytes. Ces observations suggèrent que certaines espèces endophytes peuvent synthétiser des composés qui inhibent la croissance des autres. Ce phénomène est relativement responsable de la distribution fongique globale observée chez les feuilles de *L. feei*. La production de ces métabolites est utile dans plusieurs domaines. *L. feei* est connue comme plante

médicinale, possédant des activités biologiques telles les activités antimicrobienne et antioxydante [24, 31, 32]. Il est probable que ces activités ont une relation directe ou indirecte avec les mycoendophytes antagonistes qu'elle héberge et leurs produits métaboliques.

❖ Relations synergétiques

En plus des interactions d'antagonisme révélées dans cette étude, plusieurs corrélations positives indiquant la présence des relations synergétiques sont décrites entre les différents genres. La synergie est un phénomène qui consiste en une union entre deux espèces différentes qui s'aident afin de pouvoir mener une action bénéfique pour les deux. Dans l'exemple suivant, cette action se résume à un partenariat de défense contre un autre champignon concurrent.

La figure n°49 montre une collaboration défensive entre deux espèces du même genre (*Penicillium*). Il apparaît que ces deux espèces, lorsque elles sont ensemble, sont capables de mener une action de résistance et forment ainsi une barrière d'inhibition contre l'agent concurrent (ex : Figure A : *Cladosporium herbarum* ; Figure B : *Cladosporium tenuissimum* ; Figure C : SNI). Une fois seule, l'espèce *Penicillium sp3* est incapable d'empêcher l'envahissement du champignon concurrent (ex : Figure C : SNI).

Les deux espèces de *Penicillium* présentées dans cet exemple (*Penicillium sp1* et *Penicillium sp3*), en plus de leur attachement au niveau des cultures fongiques dans les mêmes boîtes de Pétri, ils ont été isolées ensemble sur la même feuille de *L. feei* à plusieurs reprises. Il semble qu'elles sont inséparables, cela justifie de plus en plus leur relation synergétique. Zareb [208] précise qu'une forte corrélation positive entre deux genres de champignons endophytes peut s'expliquer par la nécessité de ces deux champignons d'exister ensemble pour accomplir leur rôle convenablement, car l'absence de l'un limite la présence de l'autre (c'est une synergie). Cette relation intime indissociable entre les deux espèces de champignons permet de générer des propriétés avantageuses aux deux espèces de champignons et à la plante.

Bien que plusieurs capacités individuelles soient décrites chez les mycoendophytes, il est possible que ces champignons lorsqu'ils interagissent entre eux et agissent en tant que communauté, soient capables d'effectuer de nombreuses autres fonctions bénéfiques à l'hôte non détectables lorsque chaque groupe est étudié séparément [95, 162]. Ces interactions révèlent un impact profond sur le fonctionnement général des écosystèmes [326].

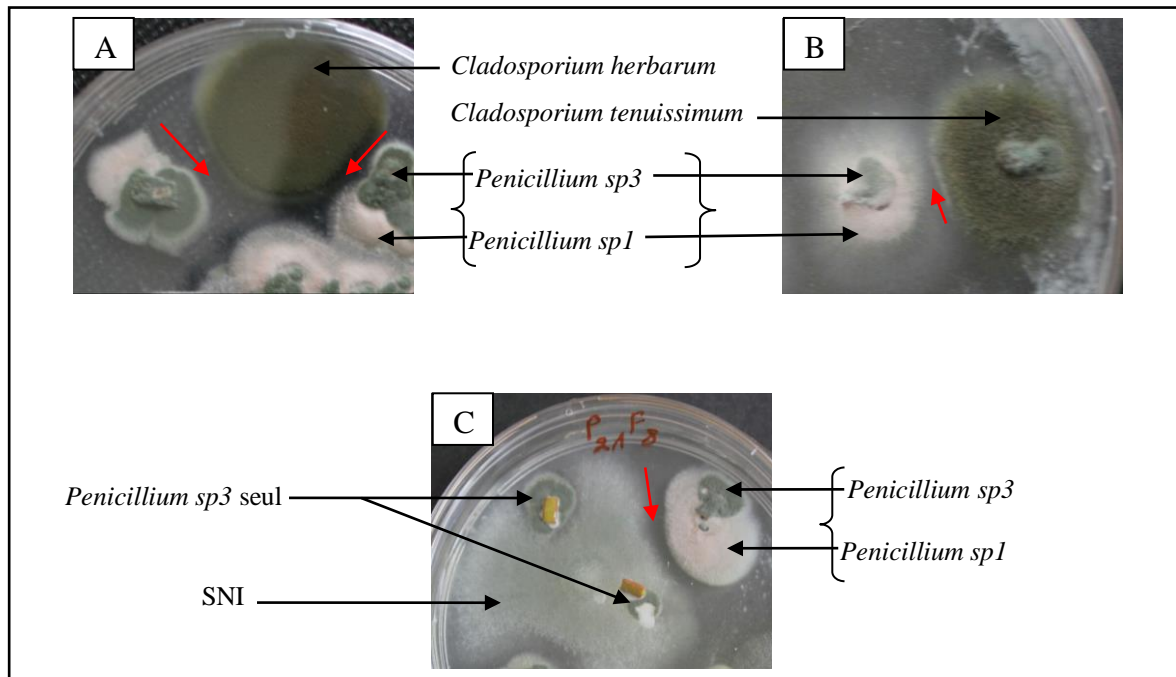


Figure n°49 : synergie entre deux espèces de *Penicillium* contre les mycoendophytes opposés.

A : synergie entre *Penicillium sp1* et *Penicillium sp3* contre *Cladosporium herbarum*.

B : synergie entre *Penicillium sp1* et *Penicillium sp3* contre *Cladosporium tenuissimum*.

C : synergie entre *Penicillium sp1* et *Penicillium sp3* contre un autre mycoendophyte non identifié (SNI).

4-6- Diversité fongique au niveau des feuilles de *L. feei*

Afin d'évaluer la diversité foliaire en champignons endophytes chez *L. feei* et en se basant sur la formule de Shannon-Weaver, des indices de diversité pour chaque sujet ont été calculés et rapportés dans le tableau n°15.

Le sujet possédant l'indice de diversité le plus élevé est le numéro 15 avec $H' = 2,16 \pm 0,18$, suivi par le sujet 7 ($H' = 2,07 \pm 0,13$) et le sujet 11 ($H' = 2,03 \pm 0,13$). Les autres sujets échantillonnés présentent des indices inférieurs à 2. Les sujets numérotés 3, 4 et 6 sont les moins diversifiés. L'anova ne montre aucune différence significative entre les indices de diversité ($p = 0,26$).

La lecture des indices de diversité de Shannon-Weaver nous a permis de constater que la diversité des champignons endophytes est très élevée au niveau des feuilles de *L. feei*. L'indice global est d'une valeur de $2,21 \pm 0,06$. Cet indice est comparable à celui trouvé chez *Smallanthus sonchifolius* avec $H' = 2,2$ [325]. Des indices plus forts sont notés au sein de la communauté

fongique de *Taxus globosa* $H' = 3,14$ [235] et du caféier du Brésil, avec des indices de diversité compris entre 2,91 et 4,42 [322]. Contrairement à d'autres qui ont trouvé des indices plus faibles, de 0,33 à 0,47 chez *Cedrus atlantica* en Algérie [226], entre 0,72 et 2,14 sur deux espèces de *Lycopodium* en Pologne [327]. Arnold *et al.* [52] précisent que la partie foliaire des végétaux est spécialement riches en mycoendophytes.

Tableau n°15. Indices de diversité (H') au niveau des sujets de *L. feei*.

Sujets	$H' \pm ES$	Sujets	$H' \pm ES$
S1	1,72±0,15	S13	1,73± 0,10
S2	1,42± 0,15	S14	1,96± 0,17
S3	1,21± 0,11	S15	2,16± 0,18
S4	1,15± 0,15	S16	1,81± 0,18
S5	1,45± 0,14	S17	1,85± 0,15
S6	1,16± 0,12	S18	1,86± 0,16
S7	2,07± 0,13	S19	1,51± 0,11
S8	1,67± 0,14	S20	1,55± 0,08
S9	1,95± 0,11	S21	1,36± 0,12
S10	1,54± 0,11	S22	1,57± 0,11
S11	2,03± 0,13	S23	1,63± 0,11
S12	1,88± 0,14	Global	2,21± 0,06

La diversité marquante des mycoendophytes des feuilles de *L. feei* au niveau de cette région indique un bon équilibre phytosanitaire, ce qui implique un bon fonctionnement de l'écosystème à ce niveau. Peut être ceci est dû à l'éloignement du site d'échantillonnage des effets anthropiques. Les champignons endophytes forment un système modèle dans les études sur la biodiversité [130]. Stone [328] signale que la saisonnalité et les conditions climatiques peuvent faire varier le statut général de la diversité des champignons endophytes. Il est donc préférable lors des études de mettre en considération les changements climatiques et la périodicité qui marquent la biologie et l'écologie de l'hôte.

5- Conclusion

Dans cette étude réalisée dans la région de Oued Aghlal (Béchar), il a été montré pour la première fois que les différents compartiments tissulaires de la partie foliaire de *L. feei*, comme chez la plupart des plantes étudiées jusque là, abrite diverses taxons fongiques endophytes. Cette mycoflore endophyte est relativement riche et diversifiée en espèces, dont la fréquence de colonisation globale est de $73,22 \pm 4\%$. Nous avons pu obtenir un total de 56 espèces fongiques différentes avec un indice de diversité global de $2,21 \pm 0,06$. De part cette diversité remarquable, les feuilles de *L. feei* peuvent être considérées comme un véritable hotspot de biodiversité microbienne.

Les espèces recensées et identifiées appartiennent pour la majorité au phylum des Ascomycota (86,30%) et dont la reproduction asexuée couvre plus de 96% des taxons inventoriés.

Les deux genres *Penicillium* et *Aspergillus* représentent ensemble presque la moitié des abondances fongiques, avec un taux de 45,79%. Ces deux mycoendophytes dominants au niveau des feuilles de *L. feei* sont connus pour leur pouvoir antagoniste et par la production de substances actives antimicrobiennes.

Plusieurs corrélations positives et négatives reflétant divers comportements établis entre les mycètes isolés dans cette étude. Ces interactions changent de l'ordre synergétique à la relation de dominance ou bien d'antagonisme entre les différentes espèces. Cette dynamique caractéristique des champignons endophytes pourrait être un excellent élément stimulant la production des métabolites secondaires efficaces pour plusieurs activités biologiques.

L'association symbiotique de *L. feei* avec ces champignons endophytes représente un système model dans l'écologie des régions sahariennes, très contraignante à la survie des êtres vivants. Cette association explique parfaitement le rôle promoteur de ces champignons au sein des plantes, par le maintien de la santé végétale et l'équilibre écologique au niveau de cette zone désertique.

Chapitre 4

**Activités biologiques des mycoendophytes
associés au *Limoniastrum feei***

1- Introduction

De nos jours, la quête de nouvelles substances naturelles bioactives est devenue une priorité de la recherche scientifique, surtout suite à l'augmentation des effets indésirables liés à l'utilisation de produits synthétiques, la diminution de l'efficacité des médicaments disponibles, l'émergence spectaculaire de nouvelles pathologies et la prévalence accrue des maladies rebelles, comme le ravage causé par le cancer (14,1 million de personnes atteintes de cancer selon la dernière estimation en 2012 de l'OMS) [329]. Plus de 30.000 maladies sont cliniquement décrites, mais le traitement est seulement disponible pour moins d'un tiers d'entre elles [330]. La liste des résistances bactériennes vers les antibiotiques est en augmentation permanente, rendant la situation actuelle pire que jamais. En effet, durant les 20 dernières années il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminué. En outre, la fréquence accrue des souches pathogènes multirésistantes a limité l'effet du traitement antimicrobien traditionnel et a créé un problème mondial de nouveaux agents thérapeutiques [105].

Les produits naturels ont énormément contribué à la santé humaine et ont servi comme une source importante de médicaments depuis l'antiquité et à propos de la moitié des médicaments utiles aujourd'hui provient de sources naturelles. Dans la nature, différentes sources (végétaux, animaux, microorganismes) peuvent être potentiellement un bon réservoir de molécules d'intérêt médical [331]. Plusieurs types de microorganismes, tels les champignons ont été exploités dans l'investigation de ces molécules, à la différence des mycoendophytes qui restent timidement étudiés dans cet axe.

Le rôle des mycoendophytes dans la lutte contre les microbes pathogènes de la plante hôte est devenu de plus en plus évident [332]. En tirant les éléments nutritifs dans la plante, ils produisent des métabolites nécessaires pour la protection de cette dernière contre les pathogènes et les différents ravageurs [10, 11].

Ce chapitre a porté sur les mycoendophytes foliaires de *L. feei* et a consisté à :

- (i) extraire les métabolites secondaires des mycoendophytes associés au *L. feei* ;
- (ii) tester et évaluer l'activité antimicrobienne de ces extraits fongiques ;
- (iii) tester l'activité antimutotique des extraits fongiques de deux espèces endophytes de *L. feei* , à savoir : *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus niger*.

2- Synthèse bibliographique

2-1- Métabolites secondaires microbiens

Les métabolites microbiens suscitent une attention croissante en tant qu'agents utiles dans divers domaines et particulièrement dans la conception des produits médicaux [333]. Dans cette section, les métabolites microbiens et principalement les métabolites secondaires, ainsi que leurs rôles et leurs voies de synthèse sont brièvement discutés.

2-1-1- Caractéristiques des métabolites secondaires

Le métabolisme est généralement divisé en deux catégories : des réactions cataboliques fournissent d'énergie, un exemple étant la répartition de la nourriture dans la respiration cellulaire. D'autre part, des réactions anabolisantes utilisent cette énergie pour construire des composants des cellules telles que des protéines et des acides nucléiques.

Il existe deux principaux types de métabolismes microbiens : primaire et secondaire. Le métabolisme primaire désigne les processus anaboliques et cataboliques nécessaires pour la respiration, l'assimilation des nutriments et la croissance et le développement, à savoir ceux des processus nécessaires à l'entretien et la prolifération cellulaire. En revanche, le métabolisme secondaire se réfère à des composés produits par les organismes et qui ne sont pas nécessaires à la croissance des cellules [334]. Certains métabolites secondaires peuvent permettre aux organismes de concurrencer plus efficacement d'autres formes de vie [335]. Les métabolites secondaires ont été reconnus par Sachs en 1873 et ils ont été désignés comme des produits naturels. Le nombre total de métabolites microbiens reconnus jusqu'à présent est d'environ 50.000 [336].

Dans le métabolisme secondaire, le produit n'est pas toujours dérivé du substrat de croissance primaire, mais à partir d'un produit qui a été formé à partir de ce substrat de croissance primaire. Ainsi, le métabolite secondaire est généralement produit à partir de plusieurs produits intermédiaires accumulés, que ce soit dans le milieu de culture ou dans les cellules, au cours du métabolisme [105].

Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que leur production n'est pas indispensable pour la croissance et la reproduction cellulaire [88] et que leurs voies de synthèse sont anabolisantes. Ils sont souvent produits comme un groupe de structures étroitement liées

[337]. Cette formation de métabolites secondaires est extrêmement dépendante des conditions de croissance, en particulier sur la composition du milieu [319].

Une des caractéristiques des métabolites secondaires est que les enzymes impliquées dans la production du métabolite secondaire sont régulées séparément de celles du métabolisme primaire. Dans certains cas, des inducteurs spécifiques de production de ces métabolites ont été identifiés. La production de streptomycine est induite par le composé désigné comme le facteur R [105].

La production de métabolites secondaires est sous contrôle réglementaire serré [338], elle est habituellement réprimée par des taux de croissance particulièrement élevés des cultures productrices [339]. Ces métabolites sont spécifiques à un groupe particulier de champignons [105].

2-1-2- Rôles des métabolites secondaires

La nature produit une étonnante richesse de métabolites secondaires ayant des fonctions biologiques importantes. Certaines de leurs activités biologiques sont encore inconnues [340]. Ils ont souvent des fonctions obscures ou inexplorées dans les organismes producteurs, mais une importance considérable pour l'humanité en ce qu'ils présentent un large éventail d'activités utiles, pharmaceutiques, antibiotiques, immunosuppressives et toxiques [341].

Les métabolites secondaires jouent un rôle apparent dans différents styles de vie chez les champignons. Par exemple, des phytotoxines produites par les champignons phytopathogènes contre les plantes hôtes sont des facteurs de virulence. Les antibiotiques produits par les saprophytes contre les concurrents jouent un rôle important dans le mécanisme de défense. Des toxines produites par des endophytes et autres champignons symbiotiques ont une importance dans le mutualisme et à l'adaptation écologique. Sachant que les produits naturels fongiques les plus évidents sont les pigments [105], ils donnent surtout la couleur des spores, d'appressoriums, des organes sexuels et d'autres structures de développement.

2-2- Production des composés bioactifs chez les mycoendophytes

Les mycètes sont une source riche de nombreuses substances thérapeutiques, dont un certain nombre de molécules d'importance pharmaceutique a été isolé et identifié. Chez les champignons, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au

développement morphologique, en particulier à la phase de sporulation [342, 343]. Les mycoendophytes sont également soupçonnés d'être une source potentielle de nouveaux composés bioactifs. Ils ont été projetés pour la production des antibiotiques, des antiviraux, des anticancéreux, des antioxydants, des insecticides et des composés immunomodulateurs [170].

2-2-1- Mécanismes et voies de synthèse des métabolites actifs

Il ya trois parcours reconnu pour les métabolites secondaires chez les champignons (Figure n°50).

2-2-1-1- Voie de l'acide mévalonique

L'acétyl-CoA est le point de départ le plus commun pour cette voie [340]. Cependant, la leucine peut être un précurseur alternatif possible dans certains champignons. Deux molécules d'acétyl-CoA condensent pour former l'acétoacétyl CoA, qui réagit ensuite avec une troisième acétyl-CoA pour former l'hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) et ensuite de l'acide mévalonique. Dans la voie alternative, la leucine est désaminé, carboxylé, et converti à l'HMG-CoA. L'acide mévalonique est ensuite phosphorylé, décarboxylé, et converti en isopenténylpyrophosphate (IPP). L'IPP est la première molécule dans la voie contenant le squelette carboné d'isoprène (hémiterpène). Un isomère de l'IPP, diméthylallylpyrophosphate, sert de l'unité de déclenchement de la chaîne pour la synthèse d'un grand terpénoïde. L'intermédiaire clé dans la biosynthèse des terpènes c'est le mévalonate. Ce dernier est converti en isopentényl pyrophosphate et diméthylallyle pyrophosphate, qui se condense en géraniol, farnésol, géranyl-géraniol et en squalène, et qui subit une série de réactions de cyclisation à partir, respectivement, des mono-, sesqui-, di-, et des triterpènes. La condensation de deux molécules de farnésyl-pyrophosphate donne le carbone 30 triterpene squalène. Le squalène réagit alors avec l'oxygène moléculaire et se cyclise en stéroïde lanostérol. Il est plus correctement classées comme un stérol; ce composé sert de précurseur pour tous les stérols fongiques, telles que l'ergostérol, le cholestérol, et le fucostérol. Ces composés pourraient être modifiés par alkylation en utilisant la S-adénosylméthionine, la déméthylation, la déshydrogénation et la réduction, il semble qu'il ya un réseau d'interaction varié en activité des voies de biosynthèse selon les organismes et le stade du cycle de vie. Le 20-carbone diterpène dérivé de géranylgéranyl-pyrophosphate sert de précurseur pour un certain nombre de composés biologiquement importants. Deux molécules de géranylgéranyl-pyrophosphate peuvent se condenser de façon queue-à-queue pour former le 40-carbone tetraterpenoides appelés

caroténoïdes. Le produit immédiat d'une telle condensation est le phytoène caroténoïdes. Le phytoène est déshydrogéné en plusieurs étapes pour donner le lycopène, qui est ensuite cyclisé en β - ou γ -carotène, qui sont toutes deux des pigments courants dans plusieurs cellules fongiques. En outre, les caroténoïdes oxygénés appelés xanthophylles sont parfois présents [105].

2-2-1-2- Voie de polycétide

De nombreux métabolites secondaires des champignons sont produits à partir de la voie polyketide que par toute autre voie [344]. Les polycétides sont formés par la condensation d'une molécule d'acétyl-CoA avec au moins trois molécules de malonyl-CoA, il apparaît que les limites de l'unité d'acétyle pour une protéine, et la condensation des unités acétyle, trois molécules de dioxyde de carbone sont libérés, la résultante tri- β -cétométhyléniques (triketide) la chaîne cyclise par un type d'aldolisation pour former une variété de composés aromatiques contenant de l'acide orsellinique, acide dihydroxydiméthylbenzoïc, l'acide 6- méthylsalisalic et acetylphloroglucinol. Une fois synthétisé, ces composés aromatiques peuvent être modifiés par réduction, hydroxylation, oxydation, décarboxylation et méthylation en générant une grande variété de composés [345]. En outre, le polycétide peut interagir avec des métabolites d'une autre voie de biosynthèse et génère de nouveaux métabolites.

2-2-1-3- Voie shikimique-chorismate

Cette voie est commune aux champignons, bactéries ainsi que les plantes, et responsable de la synthèse d'une grande variété de composés aromatiques [340]. Cette voie a commencé avec la condensation de phosphoenolpyruvate et érythrose-4-phosphate, deux intermédiaires de la glycolyse, pour former un acide déhydroquinique. Ce produit cyclisé est transformé par un complexe multi-enzymatique en acide shikimique puis en acide chorismique. À partir de ce dernier, sont synthétisés : les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane), la partie aromatique de l'ubiquinone et la fraction de l'acide p-aminobenzoïque d'acide folique. Il y a cinq étapes enzymatiques entre chorismate et tryptophane. Chacun des acides aminés aromatiques sert à son tour de jouer le rôle d'un précurseur pour la synthèse des composés plus complexes. La phénylalanine est le précurseur de l'acide cinnamique et ses dérivés. Les produits importants de cette voie comprennent ; les acides aminés (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) ; les dérivés de l'acide cinnamique tels que la coumarine et la méthyl-cis-férulate ; les antibiotiques (pénicillines et céphalosporines) ; ainsi que les différents alcaloïdes de l'ergot, comme l'acide lysergique et l'ergostérine [105].

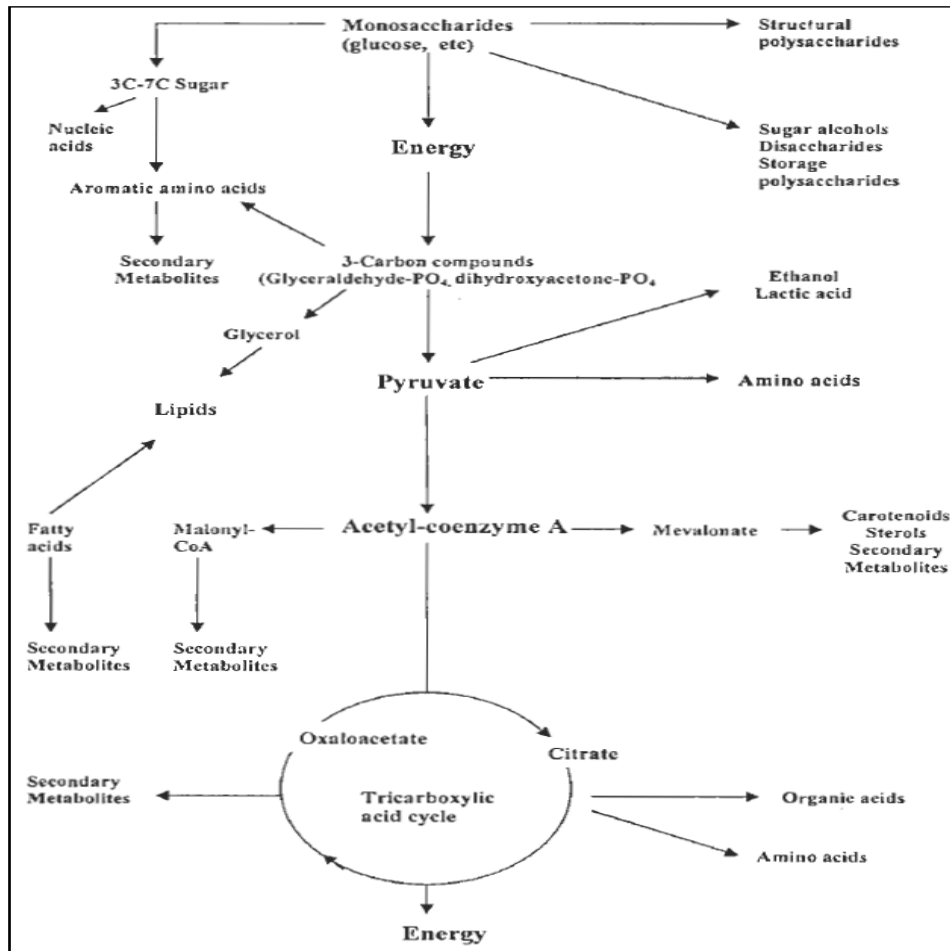


Figure n°50 : schéma représentant les voies du métabolisme chez les champignons [105].

2-2-2- Quelques composés bioactifs des mycoendophytes

2-2-2-1- Agents antimicrobiens

Durant les dernières décennies, les champignons ont été étudiés en tant que source d'antibiotiques, exactement depuis la découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming. Cette découverte donne une nouvelle dimension au traitement de maladies infectieuses, provoquées par des bactéries et sauve des millions de vies humaines. Les champignons endophytes sont également capables de produire des métabolites antimicrobiens. Cryptocandin est un peptide unique, isolé à partir du champignon endophyte *Cryptosporiopsis quercina* de *Tripterigewn wilfordii*, qui est une plante médicinale originaire d'Eurasie [346]. Des extraits bruts de champignons endophytes isolés à partir de *Smallanthus sonchifolius* ont également montré une efficacité antimicrobienne [347]. L'activité antibactérienne des azaphylones, citrinine et citrinine H-1 ont été identifiés dans les espèces de *Penicillium*, isolées comme des champignons endophytes de *Melia azedarach* (Meliaceae) et *Murraya paniculata* [348].

Phomopsichalasin (Figure n°51) a été caractérisée à partir de la culture de *Phomopsis sp.* Ce champignon endophyte est originaire de rameaux de *Salix gracilostyla var. melanostachys*. Il possède à la fois les propriétés antibactériennes et antifongiques [170].

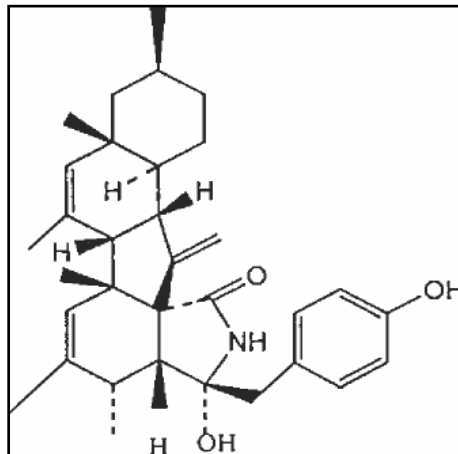


Figure n°51 : schéma représentant la structure de phomopsichalasin de *Phomopsis sp* [105].

❖ Agents antibactériens

Parmi les antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent des champignons. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ainsi que les espèces de l'ordre des Monilliales constituent les réservoirs les plus importants [86]. Un petit exemple sur les champignons producteurs d'antibiotiques est donné dans le tableau suivant :

Tableau n°16. Champignons producteurs d'antibiotiques [349].

Microorganisme producteur	Antibiotique
<i>Aspergillus flavus</i>	Acide aspergillique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilline
<i>Cephalosporium acremoniumu</i>	Sephalosporine
<i>Cephalosporium caerulens</i>	Cérulinine
<i>Fusidium coccineum</i>	Acide fusidique
<i>Helminthsporium siccans</i>	Siccanine
<i>Paecilomyces variotti</i>	Variotine
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pénicilline
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griséofluline

❖ Agents antifongiques

Les strobilurines et les oudémansines sont un groupe intéressant d'antifongiques produits par les champignons endophytes ; *Oudemansiella mucida*, *Strobilurus tenacellus*, *Strobilurus conigenoides* et *Xerula melanotricha*. Ils inhibent sélectivement le centre d'ubiquinoloydation du complexe bc1 mitochondrial [319]. Jesterone (Figure n°52) est un composé antifongique, isolé à partir de champignon *Pestalotiopsis jesteri*. Ce même champignon est capable de produire également l'hydroxyjesterone [350]. Un autre exemple de composé antifongique : phomopsilactone, qui a été isolé à partir de *Phomopsis cassiae*, un endophyte de *Cassia spectabilis* [351]. D'autre part, un agent antifongique CR377 extrait à partir du champignon endophyte *Fusarium sp.* isolé de *Selaginella pallescens* a montré une puissante activité contre *Candida albicans* [352].

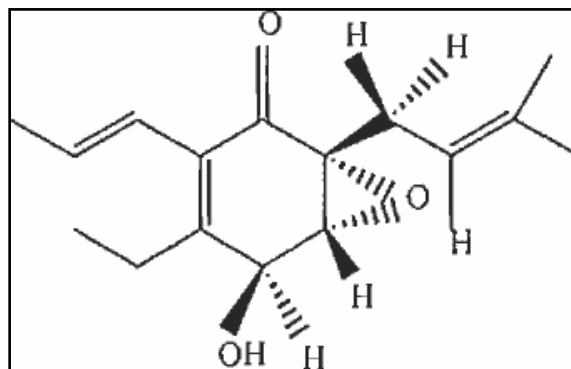


Figure n°52 : schéma représentant la structure d'une molécule de jesterone [147].

2-2-2-2- Agents anticancéreux

L'étude sur les mycoendophytes comme une source d'agents anticancéreux est en permanente progression, depuis l'isolement du taxol à partir du champignon endophyte *Taxomyces andreanae*, qui est endophyte de *Taxus brevifolia* [353]. Le taxol (Figure n°53) est un agent anticancéreux très puissant, d'abord isolé à partir de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*). Il stabilise la formation des microtubules en raison de son site spécifique de liaison sur le polymère de microtubules. Le taxol est une molécule complexe difficile à synthétiser chimiquement. Il est approuvé pour le traitement du cancer des ovaires et du sein [354]. Par conséquent, ce composé a été trouvé dans d'autres genres de champignons endophytes, soit associés ou non aux ifs tels que les champignons ; *Taxodium distichum* [355], *Pestalotiopsis guelpini* isolé du *Wollemia nobilis* [356], *Periconia sp.* [357], *Tubercularia sp.* isolé à partir de

Taxus mairei (l'if chinois) [358], *Pestalotiopsis microspora* isolé à partir de *Taxus wallichii* [359], *Phyllosticta spinarum* [360], *Bartalinia robillardoides* [361] et *Botryodiplodia theobromae* [362].

L'acide torreyanique est un autre agent anticancéreux potentiel. Il a été isolé du champignon endophyte *Pestalotiopsis microsporum* (Figure n°54). Ce champignon a été isolé à partir de la plante *Torreya taxifolia*. Ce composé est un agent cytotoxique très puissant, il est 5 à 10 fois plus puissant dans des lignées cellulaires qui sont sensibles à la protéine kinase C agonistes, il provoque la mort cellulaire par apoptose [363].

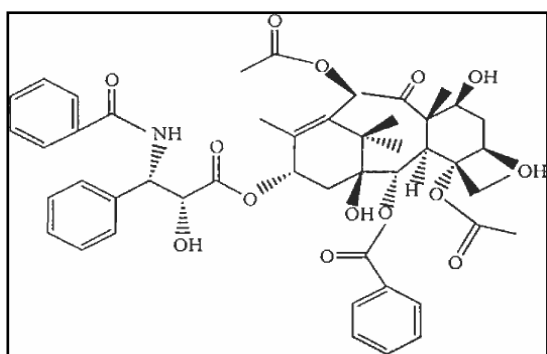


Figure n°53 : schéma représentant la structure d'une molécule de taxol [147].

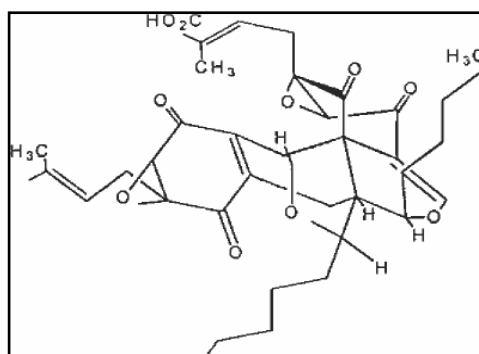


Figure n°54 : schéma représentant la structure d'une molécule d'acide torreyanique [105].

2-2-3- Mécanismes d'action des agents antimittotiques

Les agents antimittotiques sont des substances qui ont la capacité d'inhiber la mitose, de la perturber ou de l'arrêter, ou même de perturber et d'inhiber un ou plusieurs phénomènes de la préparation à la mitose, et ainsi d'empêcher la cellule d'entrer en cinèse [364]. Ils exercent des actions spécifiques au niveau de l'ADN, des enzymes mitotiques et des microtubules cellulaires (Figure n°55).

Ils peuvent être classés en 5 grandes familles en fonction de leur mode d'action. Ainsi les médicaments anticancéreux sont appelés alkylants, intercalants, scindants, antimétabolites ou encore poisons du fuseau.

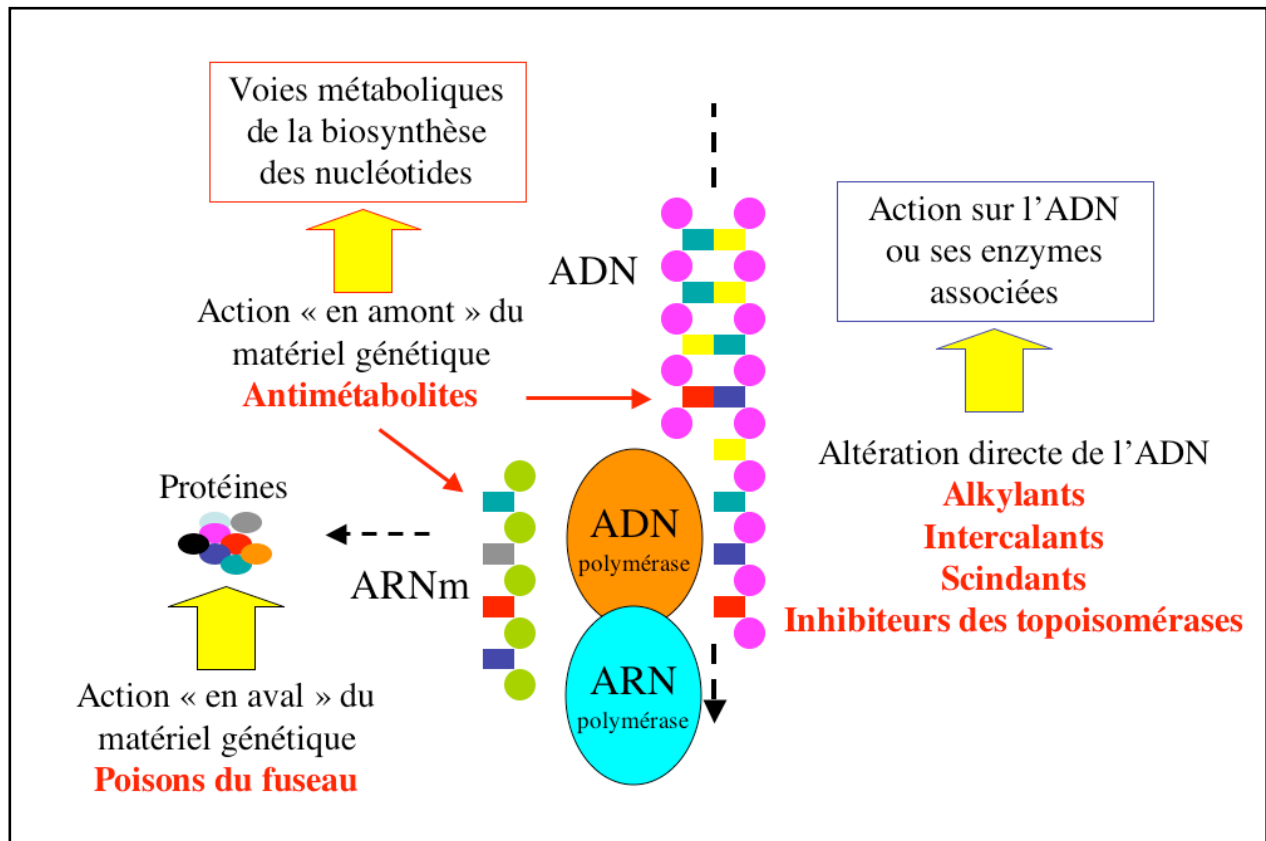


Figure n°55 : principaux sites d'action des antimétabolites [365].

❖ Action centrée sur l'ADN

Les antimétabolites de cette classe réagissent directement avec la molécule d'ADN, et on distingue deux modalités majeures.

➤ Alkylation

Est une réaction chimique constituée du transfert d'un groupement alkyle d'une molécule organique à une autre. Elle conduit donc à l'augmentation du nombre d'atomes de carbone d'un composé organique. Ce groupe d'agents possède en commun la propriété d'alkyler à la température de l'organisme plusieurs fonctions organiques : thiol (SH), hydroxyle (OH), carboxyle (COOH), amine (NH₂), inclus dans une chaîne linéaire ou dans un cycle comme celui des bases puriques et pyrimidiques, ainsi que les phosphates des liaisons phosphodiester [364].

L'alkylation des bases nucléiques porte principalement sur la guanine en C6 ou N7 (Figure n°56), ainsi on distingue [366] :

- les **alkylants monofonctionnels** : provoquent surtout des mutations GC-AT parce que la guanine en position 06 s'apparie à la thymine plutôt que la cytosine ;
- les **alkylants bifonctionnels** : forment des ponts entre résidus guanines voisines, bloquant ainsi la réplication de l'ADN.

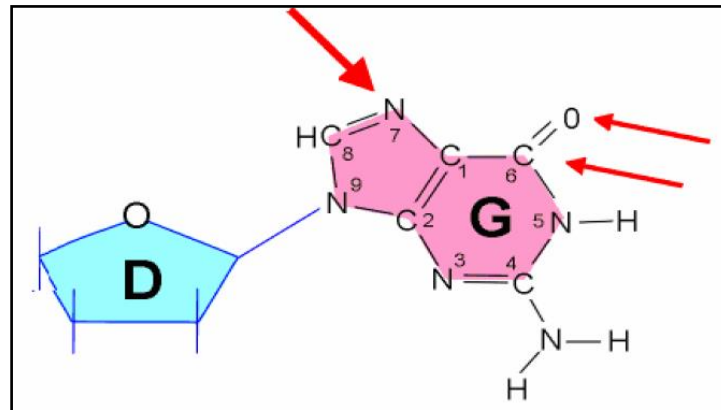


Figure n°56 : principaux sites d'action des agents alkylants [364].

D : désoxyribose ; G : guanine.

Les agents alkylants agissent préférentiellement sur les cellules à division rapide (qui n'ont pas le temps de réparer les erreurs avant la phase S), les cellules s'accumulent et meurent alors en phase G2. Ces agents sont mutagènes à faible concentration et antiméiotique à forte concentration [366]. Parmi les principaux agents alkylants, on distingue : les oxazophorines, l'éthylèneimines, les sulfonylcanes, les Triazènes et les Nitrosourées [367].

➤ Action des agents scindants

La bléomycine est le seul représentant de cette classe, isolée à partir de *Streptomyces verticillus* [368]. Par l'intermédiaire de son composant protéique, la bléomycine se fixe sur l'ADN et forme des ions superoxydes responsables de cassures simples et double brin de l'ADN à l'origine de délétions chromosomiques. La bléomycine est un cycle-dépendant, agissant préférentiellement en phase G2, en mitose mais atteint aussi les cellules en phase G1 [369].

❖ Action sur les enzymes

Cette action se résume principalement sur les enzymes du métabolisme nucléaire et les enzymes topoisomérases.

➤ Inhibiteurs du métabolisme nucléaire

Sont des substances dont la configuration spatiale est très voisine des métabolites indispensables aux synthèses cellulaires [370]. Dans certains cas, les antimétabolites sont des inhibiteurs compétitifs d'une enzyme comme le cas des antifoliques, dans d'autres cas, ils se substituent au métabolite obligatoire pour devenir un produit non fonctionnel ou incomplet qui perturbe la suite du métabolisme comme les analogues des purines ou pyrimidines [366].

Le fluorouracile inhibe la thymidilate synthétase, enzyme clé de la voie de synthèse des pyrimidines. La cytarabine entre en compétition avec la cytidine, substrat naturel de la cytidine kinase et inhibe l'ADN polymérase. Ce qui aboutit au blocage de la phase (S) du cycle cellulaire. Le gemcitabine, est un analogue de la cytidine, il inhibe l'activité de l'ADN polymérase et induit l'apoptose dans la cellule [364]. La pentostatine, analogue d'adénosine isolée à partir de *Streptomyces antibioticus*, est un inhibiteur irréversible de l'adénosine désaminase (ADA), enzyme qui contrôle le stock intracellulaire d'adénosine. Ce composé induit la réduction du stock d'ATP et du NAD intracellulaire et inhibe la synthèse et la transcription de l'ADN [367].

➤ Inhibiteurs des topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes chargées d'introduire des supertours négatifs à chaque extrémité de la bulle de réplication. Elles diminuent notamment le degré de surenroulement de l'hélice de l'ADN et permettent l'ouverture et la progression de la bulle de réplication.

La topoisomérase I se lie de façon covalente à un phosphate de l'ADN, coupant ainsi une liaison phosphodiester sur l'un des brins de l'ADN. Tandis que, La topoisomérase II s'attache de manière covalente aux deux chaînes de l'hélice au même temps, provoquant une coupure bicaténaire transitoire dans l'ADN.

Parmi les inhibiteurs de la topoisomérase I, on distingue ceux dérivés de la camptothécine extraits de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). Ces composés forment un complexe ternaire ADN-enzyme-inhibiteur en bloquant la progression de la fourche de réplication [367]. Les anthracyclines, l'acridines, les mitoxantrones, l'actinomycines D, l'étoposide et le téniposide sont les principaux agents inhibiteurs de la topoisomérase II [369].

❖ Action sur les microtubules : poisons du fuseau mitotique

Dans le cycle mitotique il y a deux moments favorables à l'action des poisons du fuseau ; au cours de la polymérisation des tubulines en microtubules, ce qui correspond à l'action des inhibiteurs d'assemblage de la tubuline en microtubules (alcaloïdes de Vinca, colchicine et podophyllotoxines) ou bien, au moment de la dépolymérisation des microtubules en tubuline ce qui correspond à l'action des inhibiteurs de désassemblage des microtubules en tubuline (taxol) [371]. A cet effet, on distingue 4 modalités.

➤ Inhibition d'assemblage de la tubuline en microtubules

Parmi les agents antimitotiques les plus connus actuellement dans le domaine médicale ; la colchicine. C'est un alcaloïde extrait des tiges souterraines charnues du colchique *colchicum autumnale* (Liliaceae) [364], qui en se fixant sur une molécule de la tubuline empêche sa polymérisation en microtubules. L'absence ou l'insuffisance des microtubules entraînent le blocage de la division cellulaire au stade métaphase et l'inhibition de la motilité cellulaire et le transport intracellulaire des vésicules et des organites [372].

Un autre exemple des inhibiteurs d'assemblage de la tubuline ; les vincalcaloïdes qu'ils exercent leur activité après liaison à la tubuline, cette protéine ubiquitaire (omniprésente) existe sous deux formes en équilibre ; dimère et polymère constitutif de l'appareil microtubulaire. Ces molécules ont une affinité pour la forme dimérique, après liaison avec celle-ci, elles inhibent la formation des microtubules (la forme polymérique) et interfèrent donc avec ses principales fonctions notamment, la formation du fuseau mitotique et l'établissement du cytosquelette [367]. Ceci conduit à un blocage de la mitose en métaphase en empêchant la formation du fuseau et la dispersion des chromosomes au hasard à travers le cytoplasme [369].

➤ Inhibition de désassemblage des microtubules en tubuline

Le taxol fait partie de ce groupe des inhibiteurs. Il est extrait du *Taxus baccata* ou du *Taxus brevifolia* de la famille des Taxaceae [373]. Les taxoïdes qui sont des dérivés du taxol, facilitent la polymérisation de la tubuline à laquelle ils se lient spécifiquement et réversiblement, inhibant ainsi la dépolymérisation des microtubules. Ils empêchent donc la disparition du fuseau mitotique [367].

➤ Inhibition des protéines motrices des microtubules

Cette classe d'agents antitubuline n'entrent pas en interaction directe avec la tubuline ou microtubule, mais interfèrent avec les fonctions des microtubules à travers l'inhibition des protéines qui les relient [374]. Ils induisent notamment, l'arrêt du cycle mitotique ce qui conduit à la mort de la cellule par apoptose [375]. Parmi ces agents ; l'estramustine qui se fixe sur les protéines associées aux microtubules MAPs (microtubules associated proteins), les dissocie, conduisant ainsi à l'inhibition de l'assemblage des microtubules et leur dépolymérisation [376].

➤ Inhibition des kinases cyclines-dépendantes

L'action principale de ces inhibiteurs compétitifs s'effectue au niveau du site de phosphorylation des protéines kinases par l'introduction d'un composé mimique qui ressemble à l'ATP. Les inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes ont des propriétés antimitotiques et induisent l'apoptose [377]. La quercétine, un flavonoïde inhibiteur de la CDK, il bloque la transition phasique entre G0 et G1, ce qui empêche la progression du cycle cellulaire à ce niveau [364].

3- Matériel et méthodes

3-1- Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des mycoendophytes associés au *L. feei* a été testée en deux étapes successives. Un test direct (sans extraction de métabolites microbiens) et par une deuxième méthode en utilisant les extraits fongiques.

3-1-1- Choix des mycoendophytes pour l'activité antimicrobienne

Dans la première étape de l'activité antimicrobienne (dépistage primaire), 24 souches fongiques ont été sélectionnées parmi tous les mycoendophytes inventoriés précédemment au niveau des feuilles de *L. feei*. Seules les espèces purifiées et identifiées ont été retenues. Ce choix a été fondé également sur la dominance et l'abondance élevée de ces mycètes.

Pour la deuxième étape de l'activité antimicrobienne, parmi les mycoendophytes qui ont présenté des effets positifs dans la première étape, seulement 12 souches fongiques ont été retenues pour l'extraction des métabolites actifs et la réalisation du test antimicrobien

proprement dit par la méthode de diffusion sur disque. Il était préférable de tester l'ensemble des 24 souches fongiques, mais l'inconvénient majeur dans cette étape a été le manque de moyens suffisants pour la réalisation de l'extraction, ce qui nous prive d'extraire les autres mycoendophytes. Parmi les 12 champignons endophytes que nous avons exclu dans cette étape, il se peut avoir un ou plus qui aurait donné un rendement meilleur par rapport aux autres endophytes extraits.

3-1-2- Choix des microorganismes tests et les témoins synthétiques

Le pouvoir antimicrobien des mycoendophytes recensés a été testé sur différentes souches bactériennes référenciées ATCC et une levure (*Candida albicans* ATCC 90028) d'intérêt médical. Les bactéries comprennent quatre Gram positif qui sont : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 49452), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) et quatre Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) et *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311). Le but de ce choix est de représenter le maximum des souches microbiennes qui causent les principales infections humaines et touchent plusieurs parties dans le corps.

Après le dépistage primaire du pouvoir antibactérien des mycoendophytes testés, une souche plus résistante de *Staphylococcus aureus* (MRSA : ATCC 43300) a été rajoutée parmi les bactéries testées dans la deuxième méthode antimicrobienne.

❖ Antibiotiques témoins

Six antibiotiques synthétiques à large spectre ont été utilisés sous forme de disques de 6 mm pour comparer et contrôler l'activité antibactérienne ; Céfotaxime (Céphalosporine de 3^{ème} génération), Gentamicine (Aminoside), Tétracycline (Cycline), Chloramphénicole (Phénicolé), Erythromycine (Macrolide) et Colistine (Polymyxine).

❖ Antifongique témoin

Trois concentrations d'antifongique synthétique Fungizone (Amphotéricine B) ont été préparées sur des disques de 6 mm de diamètre et appliquées comme témoins pour l'activité anticandidose. L'Amphotéricine B est un médicament antifongique polyène inhibiteur de la synthèse de l'ergostérol, le problème majeur dans l'utilisation de ce produit est la néphrotoxicité, parfois sont signalés également l'azotémie et l'anémie normocytaire hypochrome [378].

3-1-3- Dépistage de l'activité antimicrobienne des mycoendophytes sélectionnés

La méthode de contact direct ou double culture par diffusion sur gélose est une étape préliminaire qui consiste en test direct du pouvoir antimicrobien des endophytes choisis pour la première étape, elle vise à sélectionner les mycoendophytes les plus prometteurs pour être extraits. Cette technique a été décrite par Devaraju et Satish [379], à partir d'une culture de sept jours sur PDA, des blocs de 6 mm de diamètre sont coupés stérilement pour être appliqués à la place des disques d'antibiotiques sur des boîtes déjà inoculées avec 100 µl de bactéries et de levure. Les milieux de culture utilisés sont : le MH (Mueller-Hinton) pour les bactéries et la gélose Sabouraud additionné au chloramphénicol pour la levure. Pour une bonne diffusion des molécules antibiotiques dans le milieu de culture, les boîtes chargées doivent être conservées pendant 2 à 4 heures à une température de 4°C. Les boîtes ont été mises à incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 27 °C pendant 48 heures pour la levure. Les zones d'inhibition autour des blocs de champignons indiquant l'activité antimicrobienne ont été mesurées et enregistrées.

3-1-4- Fermentation et extraction fongique

Sur les 12 champignons ayant donné des résultats positifs au dépistage primaire, 4 pièces de 6 mm de diamètre pour chaque espèce ont été prélevées à partir d'une culture de 5 jours, préalablement cultivées sur PDA et incubées à 27°C. Ces morceaux sont ensuite inoculés aseptiquement dans des flacons de 500 ml contenant 200 ml de PDB (Potato - Dextrose - Broth). L'ensemble a été bien fermé et incubé sous agitation périodique dans les conditions d'anaérobiose sur une période allant jusqu'à 6 semaines. À l'aide d'une bande à gaze propre, le contenu des flacons a été filtré afin de séparer le mycélium du filtrat (fluide de culture). Ce dernier a été centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 minutes. Le culot qui contient le reste du mycélium et les spores a été rajouté au mycélium de filtration. Une macération de 7 jours dans le méthanol est faite sur les mycéliums, afin de récupérer l'extrait méthanolique. Le surnageant du filtrat est mélangé au même volume d'acétate d'éthyle et agité pendant 2 heures à une température de 40°C. Ce mélange est ensuite mis au repos dans des ampoules de décantation, pour séparer la phase organique de la phase aqueuse. L'expérience a été répétée une fois sur la phase aqueuse et la deuxième phase organique a été rajoutée à la première. Par la suite, les phases organiques ont été évaporées du solvant à l'aide d'un rotavapeur à 70°C. Enfin, le concentré d'évaporation a été dilué au DMSO (diméthyle de sulfoxyde) pour obtenir l'extrait d'acétate d'éthyle brut (Figure n°57).

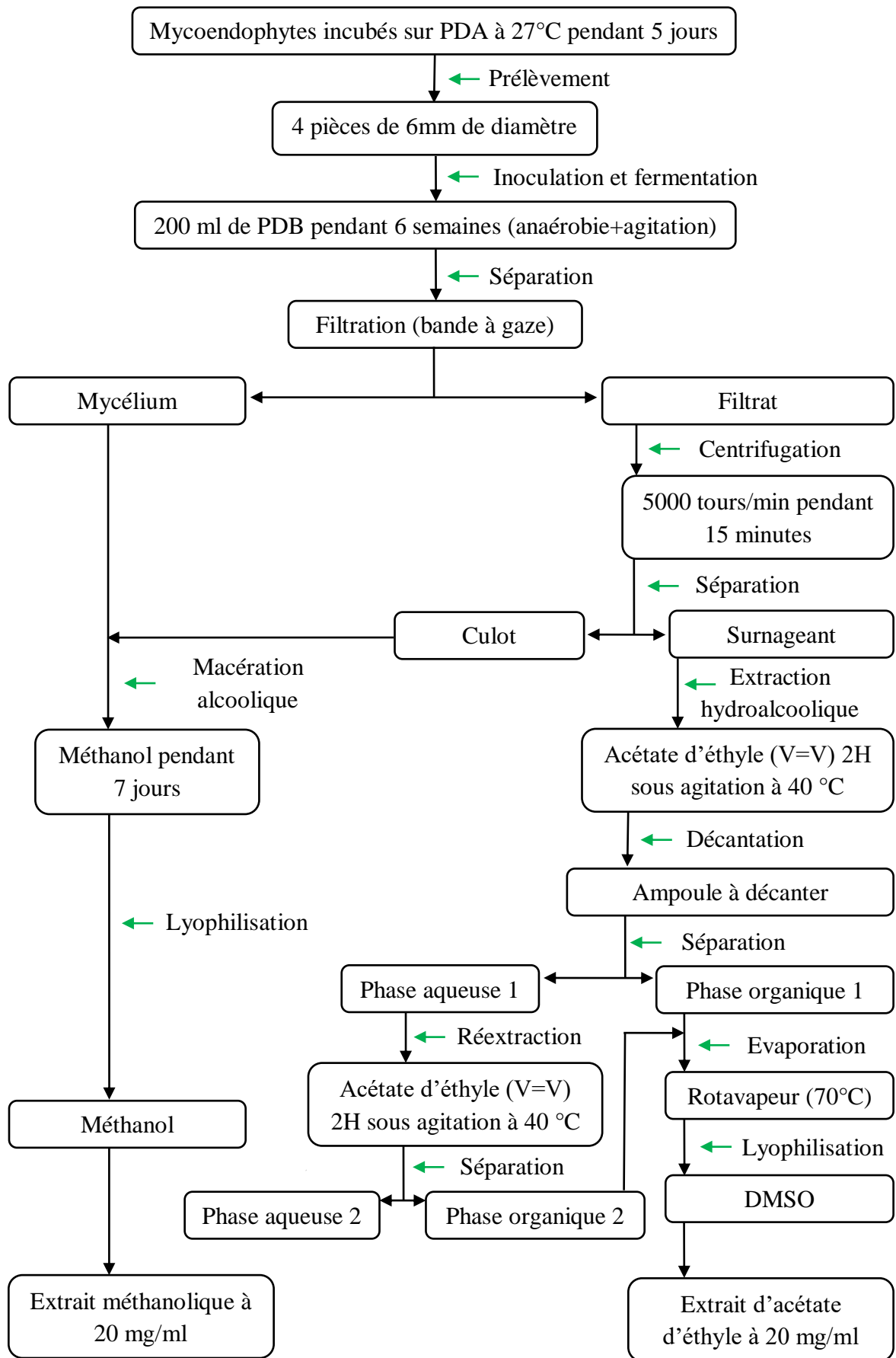


Figure n°57 : protocole de fermentation et d'extraction des mycoendophytes.

Après évaporation et lyophilisation, les deux extraits d'acétate d'éthyle et de méthanol ont été ajustés à une concentration de 20 mg/ml.

3-1-5- Essai antimicrobien des extraits fongiques

L'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode des disques, qui est initialement conçue pour les antibiotiques (antibiogramme). C'est une vieille méthode, mais toujours d'actualité puisque elle est encore utilisée mondialement dans les laboratoires de microbiologie pour la mesure du pouvoir antimicrobien des antibiotiques et/ou antifongiques de synthèse.

À l'aide d'une micropipette stérile et en utilisant des embouts jetables, des disques vierges de 6 mm de diamètre sont imbibés de 50 μ l d'extraits bruts méthanoliques et d'acétate d'éthyle de chaque champignon. D'autres disques utilisés comme témoins négatifs ont été imprégnés dans le DMSO dilué (1:9) et dans le méthanol, où la charge de disque est de 50 μ l.

Une fois secs, ces disques sont appliqués sur les microbes tests selon la technique d'antibiogramme par diffusion des disques, standardisée à l'échelle nationale et recommandée par le RASRBA (Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques) en collaboration avec l'OMS.

Les milieux de culture utilisés sont les mêmes décrites dans la méthode directe. Ainsi, les géloses doivent être colées en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm et bien séchées avant l'emploi. L'inoculation des géloses se fait à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement approprié, dans notre cas nous avons utilisé la GN (gélose nutritive).

Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine et déchargées dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. Après homogénéisation, l'opacité de la suspension bactérienne doit être équivalente à 0,5 MF ou a une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. Il est à signaler que la suspension bactérienne ne doit pas être utilisée au-delà de 15 minutes à partir de sa préparation.

L'ensemencement des milieux se fait par écouvillonnage, ainsi des écouvillons stériles sont trempés dans l'inoculum et frottés après l'avoir essorés contre la paroi interne du tube, sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas de façon à former des stries serrées. Cette opération doit être répétée 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et finir en le passant sur la périphérie de la gélose. Pour la même

souche bactérienne et pour une nouvelle boîte de Pétri, le même écouvillon peut être réutilisé mais doit être rechargé à nouveau dans les conditions d'asepsie.

Ensuite, les disques sont distribués à raison de 5 disques par boîte de 90 mm et l'ensemble a été incubé à 37°C pendant 24 heures. Concernant la levure *Candida albicans*, le même protocole a été adopté, mise à part l'incubation qui a été faite à 27 °C et pour 48 heures.

Les diamètres des zones claires autour des disques révélant l'activité antimicrobienne des extraits sont mesurés et les tests ont été effectués en triplicata.

3-1-6- Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été calculés et présentés sous forme de tableaux et d'histogrammes (Excel 2007). Des analyses de variance sont faites afin de comparer entre les différents diamètres d'inhibition. La différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est ≤ 0.05 . Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Stat Box 6.40.

3-2- Activité antimittotique

Les extraits fongiques retenus pour cette activité sont ceux d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus nidulans*.

3-2-1- Test d'*Allium cepa*

L'activité cytogénétique des extraits fongiques a été réalisée *in vitro* par le test d'*Allium cepa* adopté par Shweta *et al.* [380]. En effet, des bulbes d'oignon (*Allium cepa*) ont été placés dans des récipients remplis d'eau de façon à ce que les bases des bulbes baignent dans l'eau pendant 3 jours. Les apex racinaires dans lesquels les mitoses sont nombreuses ont été coupés et trempés 24h dans des cupules, contenant les extraits fongiques à deux concentrations différentes (10 et 5 mg/ml), la colchicine (témoin positif) et l'eau (témoin négatif). Ces apex sont ensuite fixés à l'alcool acétique pendant 3 heures et colorés au carmin acétique, afin d'observer au microscope optique les différents stades de la mitose (Figure n°58).

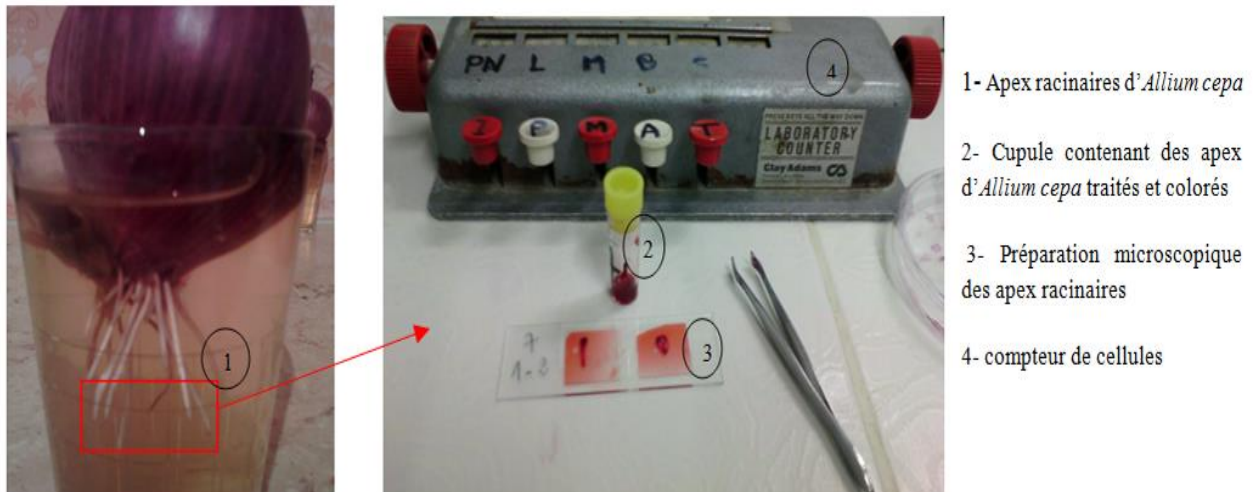


Figure n°58 : test d'*Allium cepa*.

3-2-2- Analyse des données

Pour chaque extrait, 5 apex ont été traités et 1000 cellules ont été observées. L'analyse cytogénétique a été mise au point par l'évaluation des 2 paramètres suivants :

- **Indice des phases** : cet indice est calculé afin de déterminer le pourcentage des cellules dans chaque phase de la mitose (P, M, A, T) [364, 381].

$$IP (\%) = \frac{\text{Nombre de cellules d'une seule phase mitotique}}{\text{Nombre total des cellules examinées}} \times 100$$

- **Indice mitotique** : cet indice consiste à comptabiliser le pourcentage des cellules arrêtées en mitose sur le total des cellules examinées [381, 382, 383, 384].

$$IM (\%) = \frac{P + M + A + T}{\text{Nombre total des cellules examinées}} \times 100$$

Avec : P = prophase ; M = métaphase ; A = anaphase ; T = télophase.

Les résultats obtenus ont été calculés et présentés sous forme de tableaux (Excel 2007). Ces résultats ont été exprimés en moyenne \pm erreur standard (ES). Des analyses de variance sont faites, afin de comparer entre les différents indices mitotiques. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Stat Box 6.40.

4- Résultats et discussion

4-1- Dépistage primaire du pouvoir antimicrobien des mycoendophytes de *L. feei*

La double culture a montrée des effets variables de sensibilité des souches microbiennes testées. Les mycoendophytes utilisés dans cet essai montrent des résultats positifs (inhibition de la croissance bactérienne) et autres négatifs (Figure n°59).

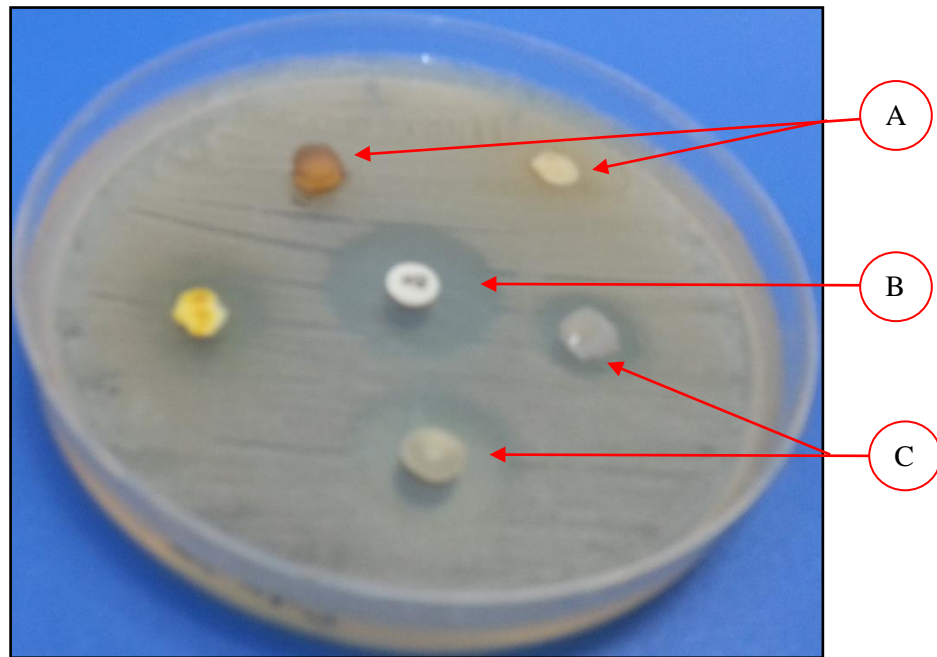


Figure n°59 : exemple de sensibilité de *S. aureus* au dépistage antibactérien.

A : absence d'inhibition (résistance de *S. aureus* contre les disques fongiques) ; **B :** zone d'inhibition autour d'un disque d'antibiotique (chloramphénicol) ; **C :** zones d'inhibition de *S. aureus* contre des blocs de mycoendophytes.

Les différentes zones d'inhibition autour des disques fongiques appliqués contre les microbes tests sont mesurées et enregistrées. Les diamètres d'inhibition compris entre 06 et 8 mm sont notés avec le signe (+), de 8 à 12 (++) et pour ceux supérieurs à 12 mm sont mentionnés (+++), tandis que les résultats négatifs (résistance de la souche microbienne) prennent le signe (-). Les résultats obtenus chez les 24 espèces fongiques sont consignés dans le tableau n°17.

Nos champignons comme la plupart des champignons endophytes de plantes, en particulier des plantes médicinales, produisent des métabolites secondaires aux effets antimicrobiens qui peuvent inhiber le développement de certaines bactéries avec des effets variables [385].

Tableau n°17. Dépistage antimicrobien des mycoendophytes isolés de *L. feei*.

souche	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Exophiala sp</i>	++	++	+	++	++	-	-	+	+++
<i>Aspergillus nidulans</i>	+	+++	-	++	+	-	-	+	++
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+++	+	-	+	+	+
<i>Aspergillus glaucus</i>	-	-	-	-	+++	+	-	-	-
<i>Absidia sp1</i>	++	+++	++	+	-	++	-	-	+
<i>Absidia sp2</i>	-	+++	+	+	+	-	-	-	+
<i>Trichoderma sp</i>	+	-	-	++	+	+++	-	+	-
<i>Acremonium sp2</i>	-	+	++	+	++	+	-	+	++
<i>Penicillium notatum</i>	+++	+++	-	-	++	++	-	+++	-
<i>Penicillium chrysoginum</i>	+	++	-	-	-	-	-	++	-
<i>Penicillium sp2</i>	+	+++	+	-	+++	-	-	-	+++
<i>Eupenicillium sp</i>	-	+++	-	-	+	++	+	-	+
<i>Fusarium sp2</i>	++	++	-	-	++	++	+	+	-
<i>Trichophyton sp1</i>	+	++	+	-	+	+++	-	-	-
<i>Gliocladium sp1</i>	++	+++	-	-	++	-	-	+++	+
<i>Gliocladium sp2</i>	-	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces sp1</i>	-	+	-	-	+	-	-	++	-
<i>Phialophora sp1</i>	+	-	-	+++	+	-	-	++	-
<i>Alternaria sp2</i>	+	++	-	++	-	-	+	-	-
<i>Phoma glomerata</i>	+	++	-	-	+	-	-	-	-
<i>Phoma sp2</i>	-	++	-	-	-	-	-	+	+
<i>Cladosporium herbarum</i>	-	+	-	-	++	-	-	-	+
<i>Cladosporium sp1</i>	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>Verticillium sp</i>	+	-	+	-	-	++	-	-	-

De ce tableau, nous avons constaté que tous les mycoendophytes testés présentent une activité inhibitrice de la croissance d'au moins une bactérie. Ces résultats positifs du dépistage antimicrobien concordent avec ceux obtenus antérieurement par Nuangmek *et al.* [386] ; Ting *et al.* [387] ; Devaraju et Satish [379] et Zerroug [147] selon lesquels, les endophytes peuvent avoir une activité antimicrobienne due probablement à la production de composés antimicrobiens, qui sont capables d'inhiber un large spectre de microorganismes.

S. aureus, *B. subtilis* et *E. coli* sont les bactéries les plus sensibles à l'effet inhibiteur des disques fongiques. *S. aureus* est la souche la plus inhibée, parmi tous les mycoendophytes testés, 19 d'entre eux présentent des résultats significatifs sur cette bactérie. C'est pour cette raison que la souche MRSA (*S. aureus* multi-résistante) a été rajoutée pour la deuxième étape de l'activité antimicrobienne, en utilisant les extraits fongiques. *S. typhi*, *P. aeruginosa* et *E. faecalis* présentent moins de sensibilité envers les champignons testés. *S. typhi* été la plus résistante parmi toutes les souches microbiennes, avec seulement 4 résultats positifs.

Aspergillus niger, *Acremonium sp2* et *Exophiala sp* sont les mycoendophytes ayant marqué le plus large spectre d'inhibition sur l'ensemble des microbes testés. Les deux espèces *Penicillium notatum* et *Penicillium sp2* possèdent l'effet antimicrobien le plus élevé (nombre de bactéries avec diamètres d'inhibition supérieurs à 12 mm). *Cladosporium sp1* et *Gliocladium sp2* sont moins efficaces dans le dépistage antimicrobien. Ladjal [388] a montré dans une étude sur l'activité antimicrobienne des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) que les mycoendophytes *Aspergillus*, *Penicillium* et *Acremonium* sont les genres les plus actifs contre trois bactéries testées (*E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*).

4-2- Rendement de l'extraction fongique

Afin de pouvoir tester l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion sur disque, l'extraction des métabolites fongiques a été faite sur les 12 mycoendophytes possèdent l'effet inhibiteur le plus large dans le dépistage antimicrobien. Les souches retenues sont *Exophiala sp*, *Aspergillus nidulans*, *Absidia sp1*, *Trichoderma sp*, *Aspergillus niger*, *Acremonium sp2*, *Penicillium sp2*, *Eupenicillium sp*, *Fusarium sp2*, *Trichophyton sp1*, *Penicillium notatum* et *Gliocladium sp1*.

Les résidus secs obtenus de l'extraction hydroalcoolique à froid des mycoendophytes sélectionnés ont été pesés. Pour 100 ml de filtrat, le poids net des extraits fongiques est donné en mg. Les valeurs obtenues sont consignées dans le tableau n°18.

Il est à noter de ce rendement que la teneur de l'extraction fongique est relativement faible chez l'ensemble des mycoendophytes. Elle est mesurée en mg et n'atteint pas l'ordre de g pour 100 ml de filtrat de culture.

L'extraction par le méthanol a offert un poids moyen général élevé plus de trois fois (189,7 mg) par rapport à l'extraction par l'acétate d'éthyle (52,8 mg). *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus niger* sont les deux espèces les plus rentables parmi tous les mycoendophytes extraits. Les plus faibles teneurs obtenues dans cette extraction sont celles enregistrées chez *Absidia sp1* et *Acremonium sp2*.

Tableau n°18. Poids nets (mg/100ml) des résidus secs de l'extraction fongique.

Espèce \ Solvant	Acétate d'éthyle	Méthanol
<i>Exophiala sp</i>	37,8	163,1
<i>Aspergillus nidulans</i>	132,5	481,2
<i>Absidia sp1</i>	9,2	45,5
<i>Trichoderma sp</i>	54,7	162,9
<i>Aspergillus niger</i>	98,3	300,3
<i>Acremonium sp2</i>	16,0	34,8
<i>Penicillium sp2</i>	55,0	245,2
<i>Eupenicillium sp</i>	30,1	165,7
<i>Fusarium sp2</i>	77,7	175,1
<i>Trichophyton sp1</i>	73,1	259,6
<i>Penicillium notatum</i>	25,1	137,3
<i>Gliocladium sp1</i>	24,1	105,6
Moyenne	52,8	189,7

4-3- Activité antimicrobienne par diffusion sur disques

Les zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques synthétiques (témoins) ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et sont rapportées dans le tableau n°19.

Les résultats du test antimicrobien sur les souches de référence ATCC montrent des effets plus ou moins variables en terme d'inhibition envers les antibiotiques utilisés. Ces résultats expriment la sensibilité ou la résistance naturelle des bactéries testées. La souche la plus sensible

dans ce test est *B. subtilis*, elle est sensible pour l'ensemble des antibiotiques utilisés. Tandis que, *E. faecalis* est totalement résistante vers tous les disques d'antibiotiques déployés. Par rapport à la carte de sensibilité établie par le réseau algérien de la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques, le résultat obtenu pour les antibiotiques témoins dans cette étude est comparable. Il corrobore les travaux de Rahal et son équipe [389]. Notre étude est une simple comparaison de sensibilité et/ou de résistance pour les bactéries choisies. Il est préférable dans l'avenir de comparer ce résultat avec la carte génétique de chaque souche bactérienne en prenant en compte ses diamètres d'inhibition.

La meilleure sensibilité enregistrée est celle pour la tétracycline contre la bactérie *K. pneumoniae* ($31 \pm 0,6$ mm). L'antibiotique qui a donné le plus large spectre d'inhibition est le chloramphénicol, il inhibe 7 bactéries parmi les 9 souches testées. Erythromycine présente le plus faible effet inhibiteur, il touche seulement 2 bactéries.

Tableau n°19. Diamètres d'inhibition (mm) des antibiotiques synthétiques sur les souches bactériennes (n=3, moyenne \pm erreur standard).

Antibiotiques	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	MRSA
Céfotaxime	18 \pm 1,2	25 \pm 1,2	R	R	16 \pm 0,3	23 \pm 1,7	17 \pm 1,7	R	R
Gentamicine	19 \pm 0,6	20 \pm 0,0	10 \pm 0,6	R	28 \pm 2,3	20 \pm 0,6	12 \pm 0,6	16 \pm 0,6	R
Tétracycline	21 \pm 0,6	28 \pm 0,9	R	R	23 \pm 1,2	31 \pm 0,6	R	12 \pm 0,0	R
Chloramphénicole	21 \pm 1,2	21 \pm 0,6	R	R	14 \pm 0,6	17 \pm 1,2	19 \pm 0,6	18 \pm 0,6	19 \pm 0,0
Erythromycine	R	21 \pm 0,9	R	R	20 \pm 1,2	R	R	R	R
Colistine	10 \pm 0,0	R	13 \pm 1,2	R	10 \pm 0,6	10 \pm 0,3	10 \pm 0,0	R	11 \pm 0,6

R= résistance naturelle.

L'effet antibiotique des extraits fongiques d'acétate d'éthyle contre les mêmes souches bactériennes utilisées précédemment est exprimé en diamètre d'inhibition et est résumé dans le tableau n°20.

L'essai antimicrobien des extraits d'acétate d'éthyle a montré des résultats positifs de sensibilité chez toutes les bactéries. En plus, tous les mycètes extraits inhibent la croissance

bactérienne au minimum pour trois souches différentes. Cette activité plus ou moins grande soutient le résultat de plusieurs études, qui ont démontré que les mycoendophytes isolés de différentes plantes peuvent avoir une activité antimicrobienne. Ils résistent à l'invasion et inhibent une grande variété de microorganismes nocifs pour l'homme, animaux et plantes par la production de métabolites secondaires [92, 102, 390].

Parmi toutes les bactéries testées, *S. aureus* reste la souche la plus sensible à l'effet inhibiteur des extraits d'acétate d'éthyle, suivie par *E. coli*, *B. subtilis* et MRSA. Tandis que, *S. typhi* apparaît comme la moins sensible, elle résiste à 8 extraits fongiques d'acétate d'éthyle. La souche *S. aureus* est évidemment trouvée la plus affectée par les extraits fongiques des champignons endophytes de *Retama raetam*, extraits par le même solvant [147].

Tableau n°20. Diamètres d'inhibition (mm) des extraits fongiques d'acétate d'éthyle (n=3, moyenne \pm erreur standard).

Extraits d'acétate d'éthyle	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	MRSA
<i>Exophiala sp</i>	13 \pm 0,9	13 \pm 0,6	11 \pm 0,3	15 \pm 1,2	11 \pm 0,6	R	R	12 \pm 0,6	11 \pm 0,5
<i>Aspergillus nidulans</i>	10 \pm 0,6	19 \pm 1,2	R	14 \pm 0,6	10 \pm 0,3	R	9 \pm 0,0	9 \pm 0,6	13 \pm 0,6
<i>Aspergillus niger</i>	12 \pm 0,6	8 \pm 0,0	11 \pm 1,2	22 \pm 1,7	10 \pm 0,6	R	14 \pm 0,0	11 \pm 0,3	R
<i>Absidia sp1</i>	14 \pm 0,6	16 \pm 1,2	15 \pm 0,6	12 \pm 0,3	R	14 \pm 1,2	R	R	16 \pm 0,3
<i>Trichoderma sp</i>	11 \pm 0,6	R	R	14 \pm 0,6	R	16 \pm 1,2	R	R	R
<i>Acremonium sp2</i>	R	12 \pm 0,6	14 \pm 0,6	10 \pm 0,6	14 \pm 1,2	12 \pm 0,9	R	12 \pm 0,0	14 \pm 0,9
<i>Penicillium notatum</i>	31 \pm 1,2	25 \pm 0,6	R	R	16 \pm 0,6	14 \pm 0,6	R	24 \pm 0,6	26 \pm 0,6
<i>Penicillium sp2</i>	11 \pm 0,3	16 \pm 1,4	12 \pm 0,6	R	18 \pm 1,2	R	R	R	15 \pm 0,3
<i>Eupenicillium sp</i>	R	17 \pm 1,2	R	9 \pm 0,6	10 \pm 0,0	15 \pm 1,2	12 \pm 0,6	R	16 \pm 1,2
<i>Fusarium sp2</i>	14 \pm 0,6	15 \pm 0,6	R	R	13 \pm 0,6	13 \pm 1,2	11 \pm 0,6	10 \pm 0,3	10 \pm 0,0
<i>Trichophyton sp1</i>	11 \pm 0,6	13 \pm 0,6	12 \pm 0,6	R	12 \pm 0,9	16 \pm 1,2	R	R	12 \pm 0,6
<i>Gliocladium sp1</i>	14 \pm 1,2	16 \pm 0,6	R	R	14 \pm 0,6	R	R	16 \pm 1,2	13 \pm 0,6

R= souche résistante.

A la différence des antibiotiques synthétiques, les extraits d'acétate d'éthyle des mycoendophytes testés présentent une bonne activité inhibitrice envers *E. faecalis*. Le diamètre d'inhibition le plus marquant dans cet ensemble est celui de *Penicillium notatum* contre *E. coli*, avec $31 \pm 1,2$ mm. Ce résultat dépasse celui trouvé par Zerroug [147], où toutes les zones d'inhibition enregistrées contre les souches microbiennes testées sont inférieures à 25 mm de diamètre. L'effet antibactérien de ce champignon endophyte est largement justifié en parallèle avec les recherches bibliographiques [86]. Chez les mycoendophytes isolés du pin d'Alep, *Penicillium* développe la plus grande activité contre les bactéries tests, il est le seul à avoir un effet nettement important sur *S. aureus* et *P. aeruginosa* multi-résistantes [388]. Cependant, les espèces fongiques *Exophiala sp.*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Acremonium sp2* et *Fusarium sp2* ont montré le spectre d'inhibition le plus large en inhibant 7 bactéries parmi les 9 testées. La plus faible inhibition notée pour cet essai antimicrobien des extraits d'acétate d'éthyle est celle de *Trichoderma sp.*, il inhibe la croissance seulement pour 3 bactéries parmi les 9 testées.

L'activité antimicrobienne des mycoendophytes extraits par le méthanol est présentée dans le tableau n°21.

Le test antimicrobien par les extraits méthanoliques est marqué par des faibles diamètres d'inhibition et plus de résistances bactériennes, où la meilleure valeur ne dépasse pas $22 \pm 1,2$ mm pour *Absidia sp1* contre *E. coli*. Les souches bactériennes *E. faecalis*, *B. subtilis* et *L. monocytogenes* résistent à tous les extraits méthanoliques.

Les extraits méthanoliques des mycoendophytes *Exophiala sp.*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Acremonium sp2* et *Penicillium sp2* sont totalement inutiles dans cette activité. Ils ne présentent aucune zone d'inhibition autour des disques appliqués. Il semble dans ce cas que *Absidia sp1* et *Fusarium sp2* sont les plus efficaces parmi l'ensemble des autres espèces fongiques, ils inhibent la croissance de 5 bactéries parmi les 9 testées.

E. coli, *S. aureus* et MRSA sont toujours les souches les plus sensibles à l'effet inhibiteur des extraits fongiques, par rapport au reste des bactéries.

Tableau n°21. Diamètres d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique des mycoendophytes testés (n=3, moyenne \pm erreur standard).

Extraits méthanoliques	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	MRSA
<i>Exophiala sp</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Aspergillus nidulans</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Aspergillus niger</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Absidia sp1</i>	22 \pm 1,2	15 \pm 1,2	14 \pm 0,6	R	R	12 \pm 0,6	R	R	17 \pm 1,2
<i>Trichoderma sp</i>	10 \pm 0,6	R	R	R	R	10 \pm 0,0	R	R	R
<i>Acremonium sp2</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Penicillium notatum</i>	15 \pm 1,2	18 \pm 0,6	R	R	R	R	R	R	11 \pm 0,0
<i>Penicillium sp2</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Eupenicillium sp</i>	R	15 \pm 1,2	R	R	R	14 \pm 0,6	R	R	16 \pm 0,9
<i>Fusarium sp2</i>	12 \pm 0,9	10 \pm 0,6	R	R	R	13 \pm 0,6	8 \pm 0,0	R	14 \pm 1,2
<i>Trichophyton sp1</i>	11 \pm 0,3	12 \pm 0,0	R	R	R	13 \pm 1,2	R	R	11 \pm 0,6
<i>Gliocladium sp1</i>	10 \pm 0,0	14 \pm 0,6	R	R	R	R	R	R	13 \pm 0,6

R= souche résistante.

Afin d'évaluer l'efficacité et le rendement de l'activité antimicrobienne des champignons endophytes associés aux feuilles de *L. feei* choisis dans l'extraction hydroalcoolique, une comparaison des diamètres d'inhibition entre les extraits d'acétate d'éthyle et les extraits méthanoliques est établie contre les antibiotiques de synthèse. Cette comparaison exprimée dans la figure n°60, permet de voir et d'évaluer d'une manière générale l'efficacité des extraits fongiques selon le solvant d'extraction utilisé.

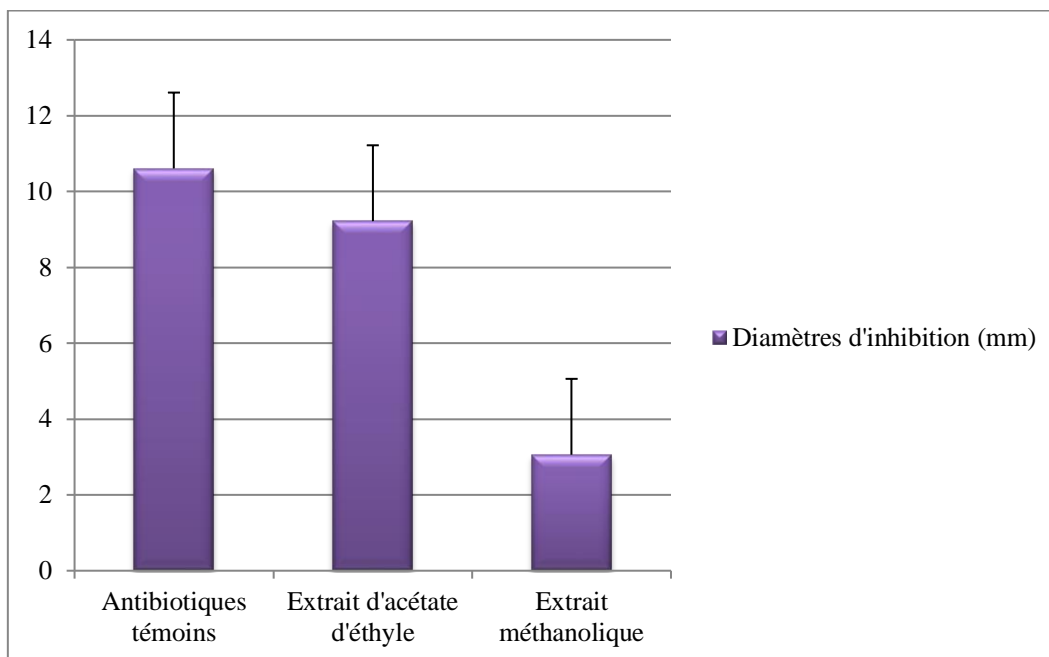


Figure n°60 : comparaison entre moyennes générales des diamètres d'inhibition des bactéries.

La figure montre que la moyenne générale des diamètres d'inhibition des extraits d'acétate d'éthyle ($9,22 \pm 0,4$ mm) est comparable à celle des antibiotiques utilisés comme témoins ($10,61 \pm 0,4$ mm), contrairement aux extraits méthanoliques qui ont marqué une faible moyenne d'inhibition avec $3,06 \pm 0,1$ mm. Il semble que l'extraction des métabolites actifs antibactériens chez les mycoendophytes est plus rentable en utilisant l'acétate d'éthyle. Nous avons conclu ainsi, que ces métabolites sont expulsés en grande majorité dans le milieu de culture (filtrat) et que des petites quantités sont retenues au niveau du mycélium et des spores fongiques qui sont extraits dans cette étude par le méthanol. En effet, Voelker et Altaba [391] précisent que quelques métabolites sont retenus dans le mycélium fongique, alors que les autres sont excrétés dans le milieu de culture. Il est possible dans ce cas, que la nature du solvant d'extraction utilisé et l'affinité qu'il possède envers les substances antimicrobiennes produites chez les mycètes sélectionnés, jouent un rôle très important dans l'extraction des métabolites bioactifs à effet antibactérien. Une autre hypothèse apparaît ; sur laquelle l'activité antibactérienne des extraits d'acétate d'éthyle est le résultat de plusieurs molécules à la fois. En effet, il se peut que les molécules extraites par l'acétate d'éthyle sont plus nombreuses par rapport au nombre des molécules extraites par le méthanol. Il peut y avoir une synergie entre ces molécules, ce qui donne un large moyen d'inhibition par rapport au nombre limité des molécules retenues dans l'extrait méthanolique. Il se peut notamment, que le peu de molécules extraites par le méthanol ont un effet meilleur à celles extraites par l'acétate d'éthyle, lorsque chaque

molécule est appliquée séparément. Donc, la nature de ces molécules doit être identifiée afin de pouvoir trancher quel est le meilleur solvant pour l'extraction des mycoendophytes.

Pour mieux étudier l'activité antimicrobienne des mycoendophytes et afin de bien comprendre la réaction bactérienne, des analyses de variance (anova) sont faites pour chaque bactérie et des comparaisons entre l'effet inhibiteur des extraits fongiques et les antibiotiques ont été établis séparément.

L'anova montre une différence hautement significative ($p=0,00$) entre les différentes moyennes d'inhibition de *E. coli* (Gram-). La moyenne d'inhibition par les antibiotiques ordinaires est nettement supérieure aux moyennes d'inhibition des extraits fongiques. Les extraits d'acétate d'éthyle présentent un effet inhibiteur presque comparable à celui des antibiotiques, contrairement aux extraits méthanoliques qui ont montré un effet largement inférieur aux autres (Figure n°61).

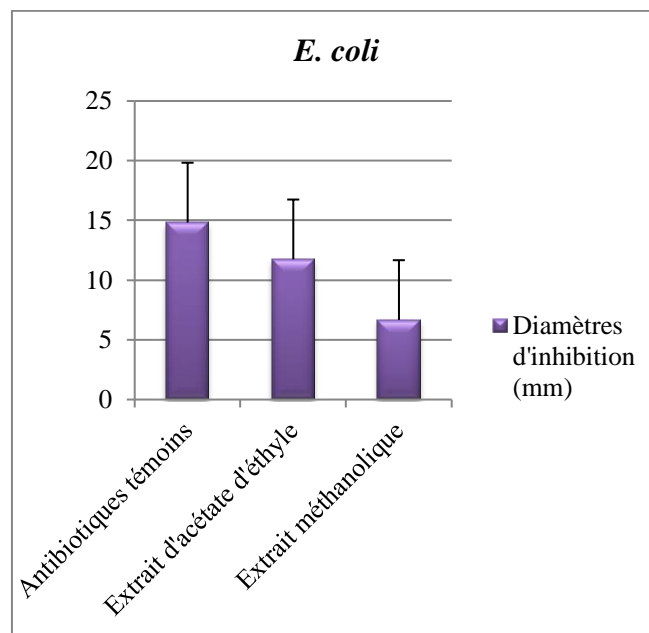


Figure n°61 : diamètres d'inhibition moyens de *E. coli*.

Les groupes homogènes établis par l'analyse de variance chez *E. coli* montrent l'individualisation de l'effet inhibiteur de *P. notatum* extrait par l'acétate d'éthyle, avec une moyenne (31 mm) plus large aux autres extraits et antibiotiques utilisés. Ils montrent aussi que l'extrait méthanolique d'*Absidia sp1* classé en groupe (G) possède un effet meilleur à ceux des antibiotiques synthétiques. Les autres diamètres moyens d'inhibition des extraits fongiques sont groupés dans un ordre décroissant (tableau n°22), dont le plus marquant est celui de l'extrait méthanolique de *P. notatum* (groupe DE).

Tableau n°22. Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez *E. coli*.

	Groupe	Moyenne
<i>Aspergillus niger</i> M	A	0,00
<i>Acremonium sp2</i> M	A	0,00
<i>Acremonium sp2</i> AC	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> M	A	0,00
Erythromycine	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> M	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> AC	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> M	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> M	B	10,00
Colistine	B	10,00
<i>Gliocladium sp1</i> M	B	10,00
<i>Aspergillus nidulans</i> AC	B	10,00
<i>Trichophyton sp1</i> M	BC	11,00
<i>Trichophyton sp1</i> AC	BC	11,00
<i>Penicillium sp2</i> AC	BC	11,00
<i>Eupenicillium sp</i> AC	BC	11,00
<i>Fusarium sp2</i> M	BCD	12,00
<i>Aspergillus niger</i> AC	BCD	12,00
<i>Exophiala sp</i> AC	BCD	13,00
<i>Absidia sp1</i> AC	CD	14,00
<i>Gliocladium sp1</i> AC	CD	14,00
<i>Fusarium sp2</i> AC	CD	14,00
<i>Penicillium notatum</i> M	DE	15,00
Céfotaxime	EF	18,00
Gentamicine	FG	19,00
Tétracycline	FG	21,00
Chloramphénicol	FG	21,00
<i>Absidia sp1</i> M	G	22,00
<i>Penicillium notatum</i> AC		31,00

AC=extraits d'acétate d'éthyle; M=extraits méthanoliques. (Variance moyenne utilisée: 0,84; Valeur seuil: 3,79).

Cette dernière souche (*P. notatum*) découverte pour la première fois par Alexandre Fleming en 1928 est connue par la production des pénicillines, des antibiotiques redoutables à spectre d'inhibition très large.

L'inhibition de la croissance de *S. aureus* (Gram+) par les différents extraits et antibiotiques est différente significativement ($p=0,00$). Les diamètres les plus élevés enregistrés à ce niveau sont ceux des antibiotiques synthétiques et les plus faibles sont ceux des extraits méthanoliques. Les extraits d'acétate d'éthyle ont donné un effet moyen (Figure n°62).

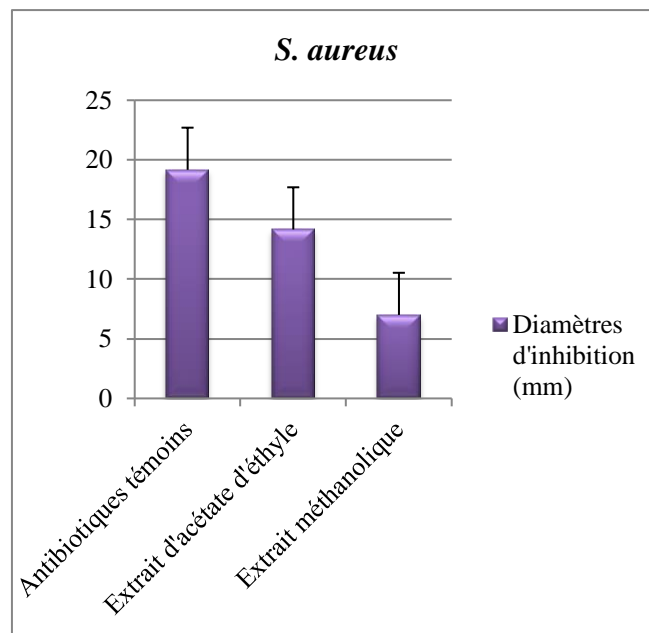


Figure n°62 : diamètres d'inhibition moyens de *S. aureus*.

Les groupes homogènes obtenus pour cette bactérie sont classés selon l'efficacité d'inhibition, les moyens les plus élevés sont ceux qui restent en dernier dans le tableau n°23.

L'extrait d'acétate d'éthyle de *P. notatum* est rangé dans l'avant dernier groupe (JK) avec l'antibiotique céfotaxime, qui ont marqué une moyenne d'inhibition de 25 mm. La tétracycline (groupe K) est le meilleur inhibiteur de *S. aureus*, avec un diamètre de 28 mm.

Tableau n°23. Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez *S. aureus*.

	Groupe	Moyenne
<i>Eupenicillium sp</i> M	A	0,00
Colistine	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> AC	A	0,00
<i>Acremonium sp2</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> M	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> AC	B	8,00
<i>Fusarium sp2</i> M	BC	10,00
<i>Trichophyton sp1</i> M	BCD	12,00
<i>Acremonium sp2</i> AC	BCD	12,00
<i>Trichophyton sp1</i> AC	CDE	13,00
<i>Exophiala sp</i> AC	CDE	13,00
<i>Gliocladium sp1</i> M	CDEF	14,00
<i>Absidia sp1</i> M	DEFG	15,00
<i>Trichoderma sp</i> M	DEFG	15,00
<i>Fusarium sp2</i> AC	DEFG	15,00
<i>Penicillium sp2</i> AC	DEFGH	16,00
<i>Gliocladium sp1</i> AC	DEFGH	16,00
<i>Absidia sp1</i> AC	DEFGH	16,00
<i>Trichoderma sp</i> AC	EFGHI	17,00
<i>Penicillium notatum</i> M	FGHI	18,00
<i>Aspergillus nidulans</i> AC	GHI	19,00
Gentamicine	HI	20,00
Erythromycine	IJ	21,00
Chloramphénicol	IJ	21,00
<i>Penicillium notatum</i> AC	JK	25,00
Céfotaxime	JK	25,00
Tétracycline	K	28,00

AC=extraits d'acétate d'éthyle; M=extraits méthanoliques. (Variance moyenne utilisée: 0,99; Valeur seuil: 4,12).

Chez *P. aeruginosa* (Gram-), tous les diamètres moyens d'inhibition sont en général faibles. Les extraits d'acétate d'éthyle ont montré des diamètres d'inhibition plus élevés par rapport aux antibiotiques et aux extraits méthanoliques ($p=0,00$). Ces derniers ont toujours le plus faible pouvoir inhibiteur (Figure n°63). Cette espèce bactérienne très résistante à un grand nombre de substances antibiotiques est notamment trouvée totalement résistante pour tous les extraits d'acétate d'éthyle des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* [147].

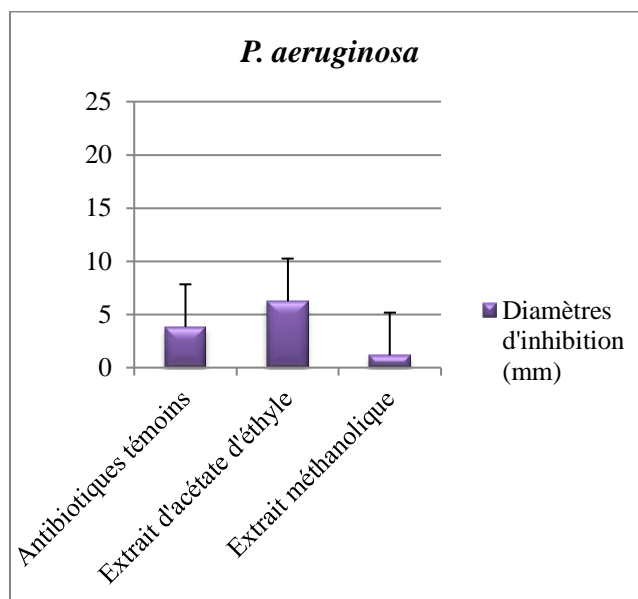


Figure n°63 : diamètres d'inhibition moyens de *P. aeruginosa*.

Les groupes homogènes des diamètres d'inhibition de cette bactérie sont rangés dans le tableau n°24.

Le tableau montre que la plupart des extraits fongiques et des antibiotiques sont classés dans le groupe A, avec une moyenne d'inhibition nulle. Cela se justifie par la virulence de cette souche bactérienne. De plus, *P. notatum* qui a montré un bon effet inhibiteur envers *E. coli* et *S. aureus* est totalement inefficace contre *P. aeruginosa*. Les métabolites produits par ce champignon sont donc inertes dans le cas de *P. aeruginosa*. Cette bactérie est connue dans la littérature par sa résistance vers toutes les classes de la famille des pénicillines [389]. Donc, l'effet de *Penicillium sp2* extrait par l'acétate d'éthyle, classé dans le groupe BCD déduit que les substances antibactériennes synthétisées par ce champignon sont de nature différente aux pénicillines existantes. Bien que l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Absidia sp1* (groupe E) montre un effet meilleur à celui d'*Absidia sp1* extrait par le méthanol (groupe DE), les deux extraits de ce champignons sont les meilleurs inhibiteurs de *P. aeruginosa*.

Tableau n°24. Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez *P. aeruginosa*.

	Groupe	Moyenne
Tétracycline	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> AC	A	0,00
<i>Acremonium sp2</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> M	A	0,00
Chloramphénicol	A	0,00
<i>Fusarium sp2</i> M	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> AC	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> M	A	0,00
<i>Fusarium sp2</i> AC	A	0,00
<i>Penicillium notatum</i> M	A	0,00
Erythromycine	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> AC	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> M	A	0,00
<i>Penicillium notatum</i> AC	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> AC	A	0,00
Céfotaxime	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> M	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> M	A	0,00
<i>Trichophyton sp1</i> M	A	0,00
Gentamicine	B	10,00
<i>Aspergillus niger</i> AC	BC	11,00
<i>Exophiala sp</i> AC	BC	11,00
<i>Trichophyton sp1</i> AC	BCD	12,00
<i>Penicillium sp2</i> AC	BCD	12,00
Colistine	CDE	13,00
<i>Acremonium sp2</i> AC	DE	14,00
<i>Absidia sp1</i> M	DE	14,00
<i>Absidia sp1</i> AC	E	15,00

AC=extraits d'acétate d'éthyle; M=extraits méthanoliques. (Variance moyenne utilisée: 0,32; Valeur seuil: 2,32).

Pour *E. faecalis* (Gram+), seuls les extraits d'acétate d'éthyle ont donné une activité inhibitrice. Cette souche résiste en même temps aux antibiotiques et aux extraits méthanoliques (Figure n°64). L'analyse de variance exprime une différence hautement significative ($p=0,00$). Ces résultats montrent que les extraits d'acétate d'éthyle renferment des molécules plus efficaces et plus redoutables sur la souche *E. faecalis*.

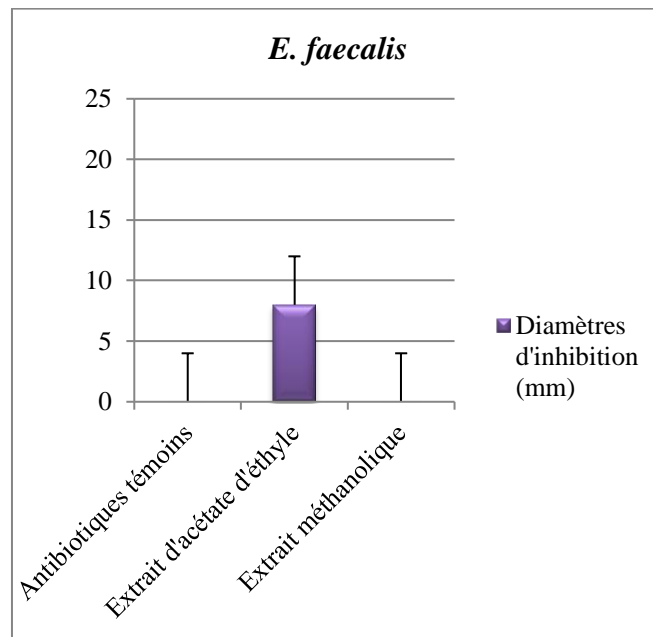


Figure n°64 : diamètres d'inhibition moyens de *E. faecalis*.

La comparaison multiple des moyennes d'inhibition chez *E. faecalis* a permis de grouper les diamètres des zones d'inhibition comme le montre le tableau n°25.

L'ensemble des antibiotiques synthétiques et la plupart des extraits fongiques sont rangés dans le groupe A (absence d'activité antibactérienne). Seulement 7 extraits d'acétate d'éthyle sont classés hors ce groupe, dont le rendement d'inhibition le plus élevé est observé pour *A. niger* avec un diamètre de 22 mm. Ce résultat est doublement supérieur à celui trouvé par Ouzid [216], lors d'une étude sur l'activité antibactérienne des mycoendophytes associés au *Peganum harmala*, où le genre *Aspergillus* montre notamment une activité contre *E. faecalis*, avec un diamètre de 10.66 mm.

Tableau n°25. Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez *E. faecalis*.

	Groupe	Moyenne
<i>Acremonium sp2</i> M	A	0,00
<i>Absidia sp1</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> M	A	0,00
<i>Penicillium notatum</i> M	A	0,00
Chloramphénicol	A	0,00
<i>Fusarium sp2</i> M	A	0,00
<i>Fusarium sp2</i> AC	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> M	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> AC	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> M	A	0,00
Erythromycine	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> AC	A	0,00
<i>Penicillium notatum</i> AC	A	0,00
<i>Trichophyton sp1</i> AC	A	0,00
Céfotaxime	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> M	A	0,00
Colistine	A	0,00
<i>Trichophyton sp1</i> M	A	0,00
Gentamicine	A	0,00
Tétracycline	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> AC	B	9,00
<i>Acremonium sp2</i> AC	BC	10,00
<i>Absidia sp1</i> AC	CD	12,00
<i>Aspergillus nidulans</i> AC	DE	14,00
<i>Eupenicillium sp</i> AC	DE	14,00
<i>Exophiala sp</i> AC	E	15,00
<i>Aspergillus niger</i> AC		22,00

AC=extraits d'acétate d'éthyle; M=extraits méthanoliques. (Variance moyenne utilisée: 0,38; Valeur seuil: 2,56).

L'activité antibactérienne chez *B. subtilis* (Gram+) a montré une différence hautement significative ($p=0,00$), entre les moyennes d'inhibition bactériennes en utilisant les antibiotiques synthétiques, les extraits d'acétate d'éthyle et les extraits méthanoliques. Ces derniers n'ont causé aucune inhibition de croissance sur cette souche, à l'inverse des extraits d'acétate d'éthyle qui montrent un effet modéré par rapport aux antibiotiques (Figure n°65).

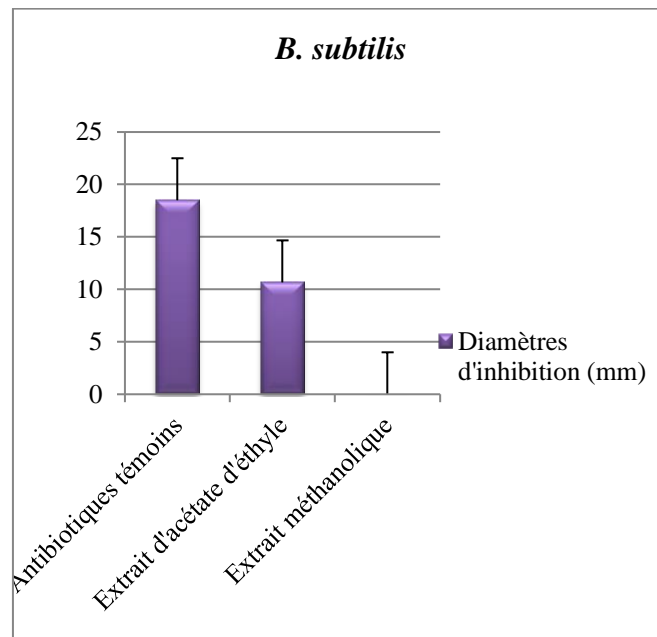


Figure n°65 : diamètres d'inhibition moyens de *B. subtilis*.

Le tableau n°26 présente les groupes homogènes obtenus par anova entre les différents diamètres d'inhibition chez *B. subtilis*.

L'extrait d'acétate d'éthyle de *Penicillium sp2* individualisé dans le groupe EF avec une moyenne de 18 mm est meilleur que ceux de *P. notatum* et céfotaxime (groupe DE). Ces deux derniers, autre fois trouvés dans le même groupe (JK) chez *S. aureus*, sont aussi comptabilisés dans le même groupe (A) pour *P. aeruginosa* et *E. faecalis*. Il se peut que *P. notatum* produise des antibiotiques semblables à céfotaxime (céphalosporine de 3^{ème} génération).

Tableau n°26. Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez *B. subtilis*.

	Groupe	Moyenne
<i>Absidia sp1</i> M	A	0,00
<i>Absidia sp1</i> AC	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> AC	A	0,00
<i>Acremonium sp2</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> M	A	0,00
<i>Trichophyton sp1</i> M	A	0,00
<i>Penicillium notatum</i> M	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> M	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> M	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> M	A	0,00
<i>Fusarium sp2</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> M	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> M	A	0,00
Colistine	B	10,00
<i>Trichoderma sp</i> AC	B	10,00
<i>Aspergillus nidulans</i> AC	B	10,00
<i>Aspergillus niger</i> AC	B	10,00
<i>Exophiala sp</i> AC	BC	11,00
<i>Trichophyton sp1</i> AC	BC	12,00
<i>Fusarium sp2</i> AC	BCD	13,00
<i>Gliocladium sp1</i> AC	CD	14,00
Chloramphénicol	CD	14,00
<i>Acremonium sp2</i> AC	CD	14,00
Céfotaxime	DE	16,00
<i>Penicillium notatum</i> AC	DE	16,00
<i>Penicillium sp2</i> AC	EF	18,00
Erythromycine	FG	20,00
Tétracycline	G	23,00
Gentamicine		28,00

AC=extraits d'acétate d'éthyle; M=extraits méthanoliques. (Variance moyenne utilisée: 0,93; Valeur seuil: 3,98).

La différence d'inhibition par les extraits fongiques et les antibiotiques de synthèse est absolument significative ($p=0,00$) chez *K. pneumoniae* (Gram-). Cette bactérie présente une petite sensibilité de croissance envers les extraits méthanoliques, à l'inverse des antibiotiques témoins qui ont montré la moyenne la plus élevée (Figure n°66).

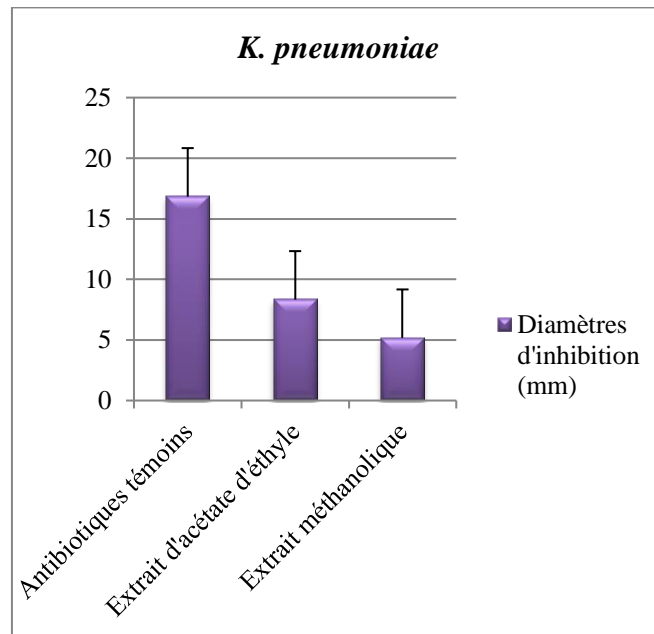


Figure n°66 : diamètres d'inhibition moyens de *K. pneumoniae*.

Les groupes homogènes établis pour cette bactérie consignés dans le tableau n°27 montrent l'individualisation des 4 antibiotiques dans les meilleurs groupes, respectivement : tétracycline (31 mm), céfotaxime (23 mm), gentamicine (20 mm) et chloramphénicol (17 mm). Le meilleur groupe des extraits fongiques est celui de l'acétate d'éthyle de *Trichophyton sp1* et d'*Eupenicillium sp* (CDE), avec une moyenne d'inhibition de 16 mm.

Tableau n°27. Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez *K. pneumoniae*.

	Groupe	Moyenne
<i>Acremonium sp2</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> AC	A	0,00
Erythromycine	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> AC	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> M	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> AC	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> AC	A	0,00
<i>Penicillium notatum</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> M	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> AC	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> M	B	10,00
Colistine	B	10,00
<i>Absidia sp1</i> M	BC	12,00
<i>Acremonium sp2</i> AC	BC	12,00
<i>Trichophyton sp1</i> M	BCD	13,00
<i>Fusarium sp2</i> M	BCD	13,00
<i>Fusarium sp2</i> AC	BCD	13,00
<i>Trichoderma sp</i> M	BCD	14,00
<i>Penicillium notatum</i> AC	BCD	14,00
<i>Absidia sp1</i> AC	BCD	14,00
<i>Trichoderma sp</i> AC	CD	15,00
<i>Trichophyton sp1</i> AC	CDE	16,00
<i>Eupenicillium sp</i> AC	CDE	16,00
Chloramphénicol	DE	17,00
Gentamicine	EF	20,00
Céfotaxime	F	23,00
Tétracycline		31,00

AC=extraits d'acétate d'éthyle; M=extraits méthanoliques. (Variance moyenne utilisée: 1,01; Valeur seuil: 4,15).

L'anova a révélée une différence hautement significative ($p=0,00$) entre les moyens des diamètres d'inhibition chez *S. typhi* (Gram-). Les faibles valeurs de diamètres moyens d'inhibition enregistrées pour l'ensemble des disques appliqués traduisent une mauvaise activité antibactérienne. Cette bactérie présente donc une résistance envers certains extraits fongiques et même contre les antibiotiques de synthèse (Figure n°67). Elle est connue dans la littérature pour sa résistance élevée [389].

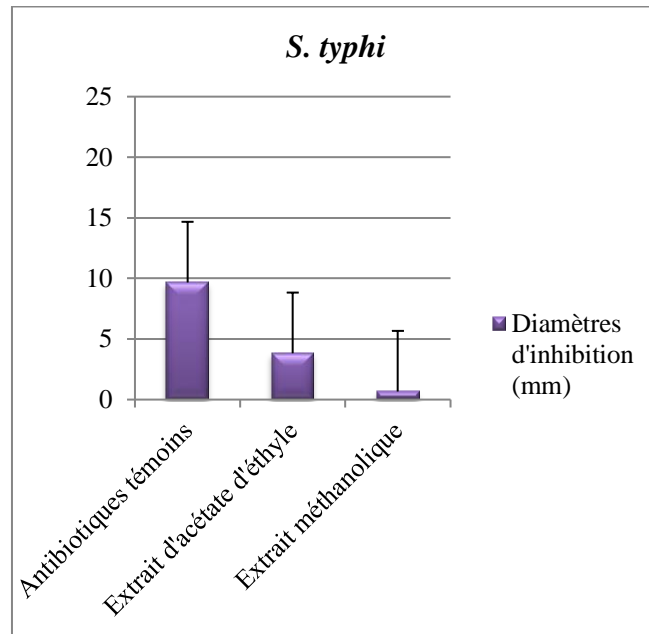


Figure n°67 : diamètres d'inhibition moyens de *S. typhi*.

L'ensemble des diamètres d'inhibition chez *S. typhi* sont groupés selon une comparaison multiple dans le tableau n°28.

Dans ce tableau, nous avons noté l'individualisation de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*A. niger* dans le groupe E avec la meilleure moyenne (14 mm), enregistrée au niveau des extraits fongiques. Les deux antibiotiques céfotaxime et chloramphénicol sont les plus performants (17 et 19 mm).

Tableau n°28. Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez *S. typhi*.

	Groupe	Moyenne
Tétracycline	A	0,00
<i>Absidia sp1</i> AC	A	0,00
<i>Absidia sp1</i> M	A	0,00
<i>Penicillium notatum</i> M	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> AC	A	0,00
<i>Acremonium sp2</i> AC	A	0,00
<i>Acremonium sp2</i> M	A	0,00
Erythromycine	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> M	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> AC	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> M	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> AC	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> M	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> M	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> AC	A	0,00
<i>Trichophyton sp1</i> AC	A	0,00
<i>Penicillium notatum</i> AC	A	0,00
<i>Trichophyton sp1</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> M	A	0,00
<i>Fusarium sp2</i> M	B	8,00
<i>Aspergillus nidulans</i> AC	BC	9,00
Colistine	BCD	10,00
<i>Fusarium sp2</i> AC	CD	11,00
Gentamicine	DE	12,00
<i>Trichoderma sp</i> AC	DE	12,00
<i>Aspergillus niger</i> AC	E	14,00
Céfotaxime	F	17,00
Chloramphénicol	F	19,00

AC=extraits d'acétate d'éthyle; M=extraits méthanoliques. (Variance moyenne utilisée: 0,29; Valeur seuil: 2,22).

L. monocytogenes (Gram+) est également moins sensible aux différents disques testés. La souche résiste totalement aux extraits méthanoliques. Les extraits d'acétate d'éthyle ont montré des diamètres d'inhibition comparables à ceux des antibiotiques témoins (Figure n°68). À ce niveau, l'anova indique une différence hautement significative entre les moyennes d'inhibition ($p=0,00$).

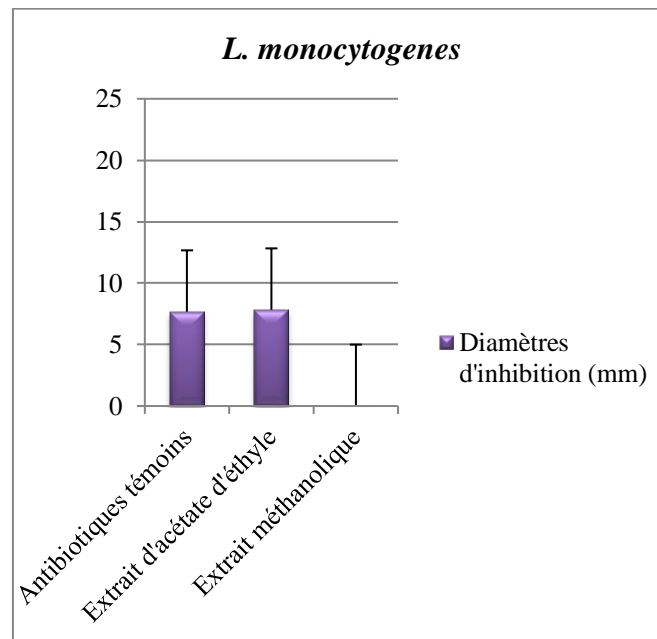


Figure n°68 : diamètres d'inhibition moyens de *L. monocytogenes*.

Les groupes homogènes de l'effet inhibiteur des extraits fongiques et des antibiotiques synthétiques appliqués sur *L. monocytogenes* sont donnés dans le tableau n°29.

P. notatum extrait par l'acétate d'éthyle, montre la plus large moyenne d'inhibition avec un diamètre de 24 mm, il est individualisé dans un groupe loin des autres extraits fongiques. Ce groupe est suivi par le chloramphénicol, qui présente une moyenne de 18 mm. La plupart des autres extraits fongiques sont classés dans le groupe A, où l'activité antibactérienne est nulle.

Tableau n°29. Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez *L. monocytogenes*.

	Groupe	Moyenne
<i>Absidia sp1</i> M	A	0,00
<i>Trichophyton sp1</i> AC	A	0,00
<i>Absidia sp1</i> AC	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> M	A	0,00
<i>Trichophyton sp1</i> M	A	0,00
<i>Acremonium sp2</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> M	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> AC	A	0,00
<i>Eupenicillium sp</i> M	A	0,00
<i>Penicillium notatum</i> M	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> AC	A	0,00
<i>Penicillium sp2</i> M	A	0,00
Erythromycine	A	0,00
<i>Exophiala sp</i> M	A	0,00
Colistine	A	0,00
Céfotaxime	A	0,00
<i>Trichoderma sp</i> AC	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> M	A	0,00
<i>Fusarium sp2</i> M	A	0,00
<i>Gliocladium sp1</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> AC	B	9,00
<i>Fusarium sp2</i> AC	BC	10,00
<i>Aspergillus niger</i> AC	CD	11,00
<i>Exophiala sp</i> AC	D	12,00
<i>Acremonium sp2</i> AC	D	12,00
Tétracycline	D	12,00
Gentamicine	E	16,00
<i>Gliocladium sp1</i> AC	E	16,00
Chloramphénicol	F	18,00
<i>Penicillium notatum</i> AC		24,00

AC=extraits d'acétate d'éthyle; M=extraits méthanoliques. (Variance moyenne utilisée: 0,21; Valeur seuil: 1,9).

La meilleure moyenne d'inhibition constatée au niveau de la bactérie MRSA est celle des extraits d'acétate d'éthyle, suivie par celle des extraits méthanoliques. Les disques d'antibiotiques synthétiques ont donné une mauvaise activité antimicrobienne avec la plus faible moyenne d'inhibition bactérienne (Figure n°69). Le test anova a révélé une différence nettement significative ($p=0,00$) entre les trois moyennes.

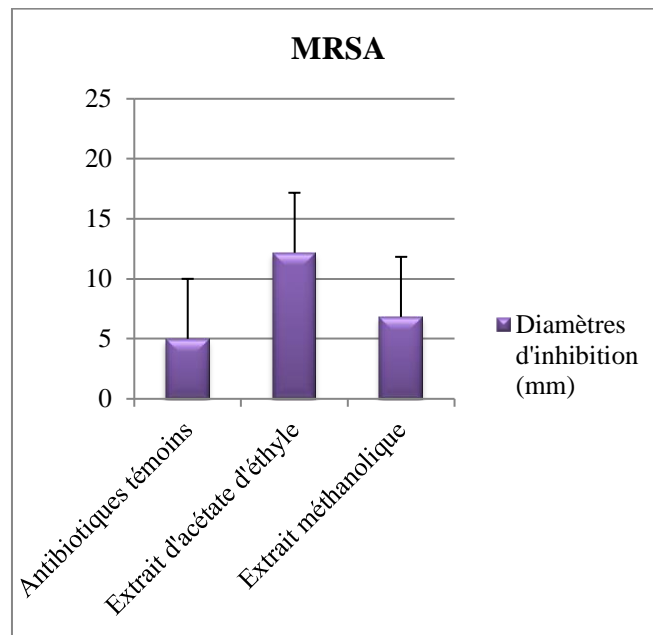


Figure n°69 : diamètres d'inhibition moyens de MRSA.

MRSA a exprimé une sensibilité d'inhibition différente envers l'ensemble des antibiotiques et des extraits méthanoliques testés. Ainsi, la comparaison globale de l'activité inhibitrice de ces produits est exposée dans le tableau n°30.

Le même constat de bonne activité antibactérienne pour *P. notatum* extrait par l'acétate d'éthyle est encore observé chez la souche MRSA, il affirme à nouveau son individualisation comme meilleur inhibiteur bactérien. *Absidia sp1* et *Trichoderma sp* montrent aussi de bonne activité inhibitrice sur cette bactérie, ils se situent dans les deux groupes FG et EFG avec des moyennes de 17 mm et 16 mm respectivement, après le chloramphénicol (groupe G) dont la moyenne est de 19 mm.

Tableau n°30. Groupes homogènes (comparaison multiple) des diamètres d'inhibition chez MRSA.

	Groupe	Moyenne
Tétracycline	A	0,00
Gentamicine	A	0,00
<i>Eupenicillium</i> sp AC	A	0,00
Céfotaxime	A	0,00
<i>Exophiala</i> sp M	A	0,00
<i>Eupenicillium</i> sp M	A	0,00
Erythromycine	A	0,00
<i>Acremonium</i> sp2 M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> M	A	0,00
<i>Penicillium</i> sp2 M	A	0,00
<i>Aspergillus nidulans</i> M	A	0,00
<i>Aspergillus niger</i> AC	A	0,00
<i>Fusarium</i> sp2 AC	B	10,00
Colistine	BC	11,00
<i>Trichophyton</i> sp1 M	BC	11,00
<i>Exophiala</i> sp AC	BC	11,00
<i>Penicillium notatum</i> M	BC	11,00
<i>Trichophyton</i> sp1 AC	BCD	12,00
<i>Gliocladium</i> sp1 M	BCDE	13,00
<i>Gliocladium</i> sp1 AC	BCDE	13,00
<i>Aspergillus nidulans</i> AC	BCDE	13,00
<i>Fusarium</i> sp2 M	CDEF	14,00
<i>Acremonium</i> sp2 AC	CDEF	14,00
<i>Penicillium</i> sp2 AC	DEF	15,00
<i>Trichoderma</i> sp AC	EFG	16,00
<i>Trichoderma</i> sp M	EFG	16,00
<i>Absidia</i> sp1 AC	EFG	16,00
<i>Absidia</i> sp1 M	FG	17,00
Chloramphénicol	G	19,00
<i>Penicillium notatum</i> AC		26,00

AC=extraits d'acétate d'éthyle; M=extraits méthanoliques. (Variance moyenne utilisée: 0,55; Valeur seuil: 3,05).

En comparant l'effet inhibiteur de cette souche hyper-résistante à celui de *S. aureus* (ATCC) étudiée auparavant, il apparaît que les extraits fongiques (acétate d'éthyle et méthanol) ont causé le même effet, avec des moyennes d'inhibition très proches, contrairement aux antibiotiques choisis comme témoin et qui ont montré une activité inhibitrice largement différente chez les deux bactéries. De ce fait et à partir de ces résultats, nous avons conclu que les mycoendophytes testés dans cette étude produisent des molécules efficaces et de nature différente des substances contenues dans les disques d'antibiotiques de synthèse, utilisés couramment pour le traitement de la plupart des infections bactériennes, dans la médecine humaine. Ces mycètes représentent donc une nouvelle source de produits antibactériens naturels et efficaces.

Selon l'appartenance des bactéries testées au Gram+ ou Gram-, l'effet inhibiteur des extraits fongiques est donné dans la figure n°70, en comparaison avec les antibiotiques synthétiques.

Nous constatons de la figure que pour les bactéries Gram+, l'acétate d'éthyle a donné une bonne activité, avec des extraits plus efficaces comparés aux antibiotiques synthétiques. Cette inhibition est largement supérieure aux extraits méthanoliques. Contrairement aux bactéries Gram-, dont le meilleur effet observé est celui des antibiotiques, suivi par les extraits d'acétate d'éthyle. Les extraits méthanoliques apparaissent avec le plus faible pouvoir inhibiteur chez les Gram-. Cette différence de l'activité antibactérienne chez les souches de Gram opposé peut être expliquée par la nature des substances fournies dans chaque produit utilisé. Les bactéries peuvent être intrinsèquement résistantes à un antibiotique, selon leur appartenance structurale et leur classification Gram. Les bactéries Gram- ont une membrane externe qui établit une barrière de perméabilité contre quelques substances antibiotiques. Parfois par manque de système de transport ou de cible pour les antibiotiques ou manque de récepteurs spécifiques, ces organismes peuvent donc s'échapper aux molécules particulières et montrer des résistances à l'égard de ces antibiotiques [392].

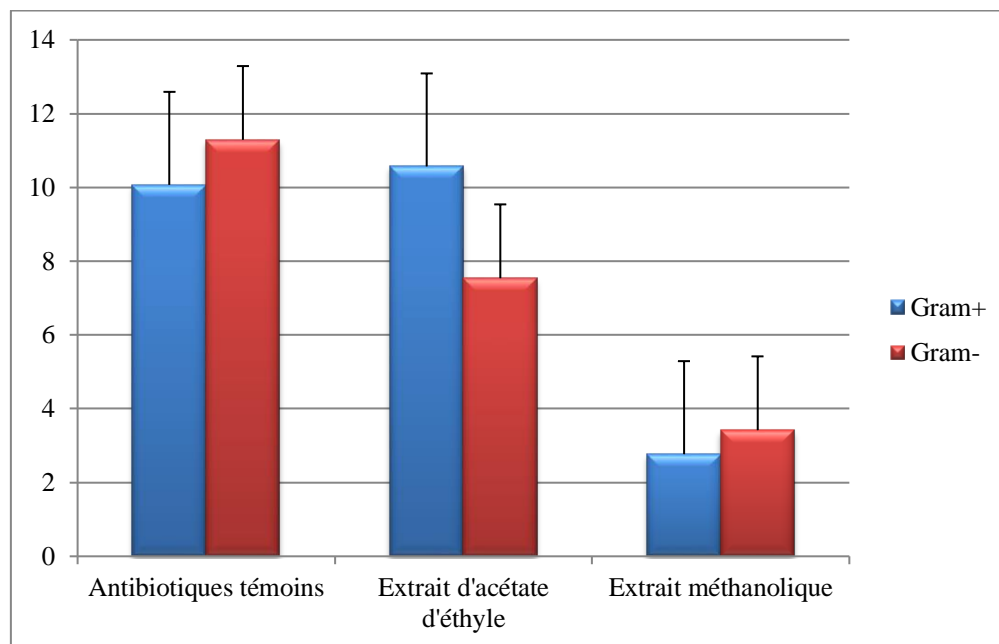


Figure n°70 : comparaison entre moyennes générales des diamètres d'inhibition des bactéries Gram+ et Gram-.

Les antibiotiques témoins comme les extraits méthanoliques inhibent les bactéries Gram- d'une manière plus efficace que les bactéries Gram+, à l'inverse des extraits d'acétate d'éthyle qui agissent mieux sur les Gram+. Ce dernier constat s'accorde parfaitement avec les résultats obtenus sur l'activité antimicrobienne des champignons endophytes isolés de *Retama raetam*, où les extraits d'acétate d'éthyle ont une tendance à inhiber les Gram+, d'une manière plus marquante par rapport aux bactéries Gram- [147].

Nous déduisons de cette comparaison, que les extraits d'acétate d'éthyle sont plus largement efficaces que les extraits méthanoliques et que les bactéries Gram+ ont une résistance élevée contre les métabolites extraits par le méthanol. D'une manière générale, nous concluons que l'utilisation d'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction des métabolites actifs chez les mycoendophytes sélectionnés, est plus rentable en matière d'activité antibactérienne, par rapport à l'utilisation du méthanol. Ce même constat est observé dans plusieurs études consacrées à l'extraction des métabolites secondaires chez les champignons endophytes [319, 393, 394, 395].

Concernant *Candida albicans*, les zones d'inhibition autour des disques d'antifongique synthétique ont été mesurées et les diamètres obtenus sont mentionnés dans le tableau n°31.

Tableau n°31. Diamètres d'inhibition (mm) d'antifongique témoin sur *Candida albicans*.

Concentration (mg/ml)	Fungizone (0,25)	Fungizone (0,5)	Fungizone (01)
Diamètre (mm)	8±0,3	9±0,6	11±0,9

Antifongique témoin = Fungizone (Amphotéricine B).

Nous pouvons voir de ce tableau que l'inhibition de la croissance chez *Candida albicans* est inversement proportionnelle à la concentration de l'Amphotéricine B. Les disques chargés avec 1 mg/ml de Fungizone présentent le diamètre moyen le plus élevé (11±0,9 mm). Cet antifongique est couramment utilisé dans le traitement des candidoses humaines.

L'activité antifongique des mycoendophytes associés au *L. feei* a été évaluée en mesurant les diamètres des zones claires autour des disques chargés d'extraits fongiques. Ces diamètres sont consignés dans le tableau n°32.

Tableau n°32. Diamètres d'inhibition (mm) des extraits fongiques sur *Candida albicans*.

Extraits	<i>Exophiala sp</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Absidia sp1</i>	<i>Trichoderma sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Acremonium sp2</i>	<i>Penicillium sp2</i>	<i>Eupenicillium sp</i>	<i>Fusarium sp2</i>	<i>Trichophyton sp1</i>	<i>Penicillium notatum</i>	<i>Gliocladium sp1</i>	moyenne
Acétate d'éthyle	17± 0,9	13± 0,6	10± 0,6	R	09± 0,3	15± 0,6	16± 0,6	13± 0,6	R	R	R	R	7,75± 0,6
Méthanol	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0,00

L'activité anticandidose présentée dans le tableau ci-dessus montre une efficacité de quelques extraits d'acétate d'éthyle. La meilleure est celle d'*Exophiala sp.*, avec un diamètre de 17 mm±0,9. Les diamètres constatés au niveau des extraits d'acétate d'éthyle pour *Penicillium sp2* (16±0,6 mm), *Acremonium sp2* (15±0,6 mm), *Aspergillus nidulans* (13±0,6 mm) et *Eupenicillium sp* (13±0,6 mm) sont nettement supérieurs aux diamètres enregistrés chez l'antifongique synthétique. Les mycoendophytes *Trichoderma sp*, *Fusarium sp2*, *Trichophyton sp1*, *Penicillium notatum* et *Gliocladium sp1* ne présentent aucun effet sur *C. albicans*. Ce résultat diffère de celui observé par Ladjal [388], qui a trouvé que *Fusarium sp* et *Trichoderma sp* ont un effet anticandidose plus marquant que celui d'*Acremonium sp* et *Aspergillus sp*. De plus, tous les extraits méthanoliques sont inefficaces contre cette souche fongique.

La figure n°71 montre que la moyenne d'inhibition chez *C. albicans* en utilisant les extraits d'acétate d'éthyle est presque comparable à celle d'antifongique témoin, à l'inverse des extraits méthanoliques qui ont montré des effets nuls pour cette activité biologique.

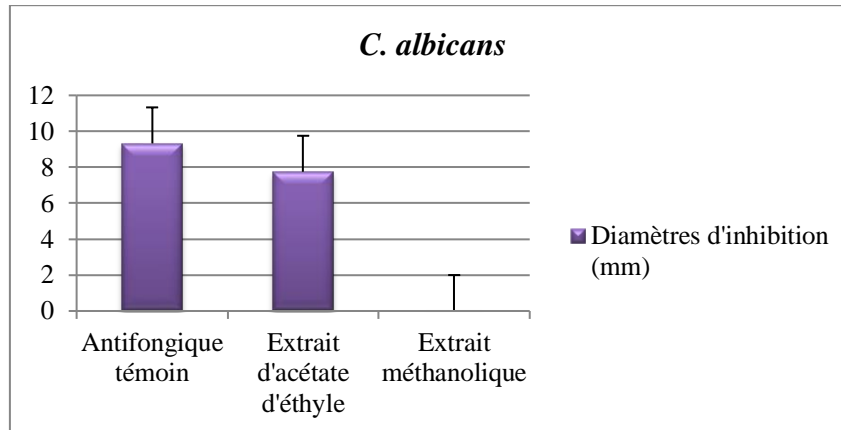


Figure n°71 : comparaison entre moyennes générales des diamètres d'inhibition de *C. albicans*.

4-4- Activité antimittotique

4-4-1- Test d'*Allium cepa*

Les observations microscopiques des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées ou non par les extraits fongiques ont permis de visualiser les différents stades du développement mitotique (Figure n°72). En outre, quelques aberrations et anomalies chromosomiques de nature clastogénique touchant la structure des chromosomes ont aussi été révélées. Ces aberrations n'ayant pas fait objet dans cette étude et ont été exclus du comptage.

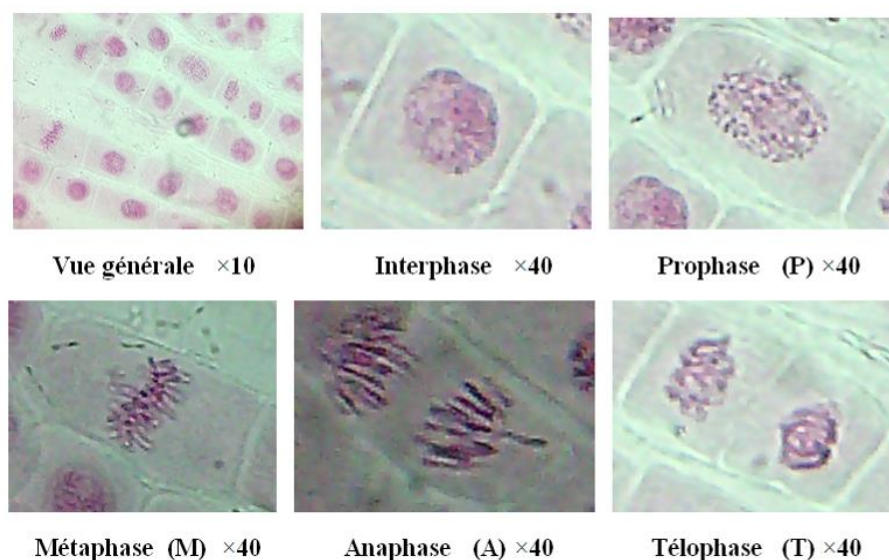


Figure n°72 : cellules méristématiques d'*Allium cepa* représentant les différentes phases de la mitose.

4-4-2- Indices des phases

Les pourcentages des différentes phases de la mitose calculés sur l'ensemble des cellules examinées sont rapportés dans le Tableau n°33.

Tableau n°33. Indices des phases des cellules méristématiques d'*Allium cepa*.

		Concentration (mg/ml)	Indice des phases (%)			
			P±ES	M±ES	A±ES	T±ES
Extrait d'acétate d'éthyle	<i>A. niger</i>	05	32,0 ±1,17	4,40 ±0,29	1,40 ±0,24	2,20 ±0,34
		10	29,2 ±0,96	2,90 ±0,62	1,00 ±0,35	2,60 ±0,33
	<i>A. nidulans</i>	05	27,0 ±0,74	3,70 ±0,68	2,50 ±0,63	2,60 ±0,37
		10	26,3 ±1,42	4,00 ±1,00	1,20 ±0,30	2,40 ±0,43
Extrait méthanolique	<i>A. niger</i>	05	25,7 ±0,86	5,20 ±0,83	2,40 ±0,40	2,70 ±0,37
		10	28,5 ±1,29	2,90 ±0,56	0,80 ±0,20	1,70 ±0,20
	<i>A. nidulans</i>	05	27,5 ±1,11	4,30 ±0,58	1,30 ±0,12	1,30 ±0,20
		10	25,6 ±0,79	5,00 ±1,15	1,30 ±0,71	2,10 ±0,50
Colchicine		0,5	7,00 ±1,65	27,3 ±1,27	0,30 ±0,12	2,90 ±0,51
		01	1,70 ±0,60	26,3 ±1,91	0,30 ±0,12	1,70 ±0,30
Témoin négatif		-	23,7 ±1,12	20,2 ±0,94	13,5 ±0,57	17,4 ±0,67

L'extrait d'acétate d'éthyle comme l'extrait méthanolique des deux espèces d'*Aspergillus* ont donné des effets comparables pour chaque phase de la mitose. Il est à noter que l'indice des phases le plus élevé dans cet ensemble est celui qui correspond à la prophase, contrairement aux autres stades de la division cellulaire, qui sont minoritairement présents. Cette élévation au niveau de la prophase est indépendante de la concentration de l'extrait fongique utilisé.

Les indices des phases des cellules méristématiques d'*Allium cepa* traitées par les deux concentrations de colchicine sont élevés pour la métaphase. Par contre, les autres phases sont moins observées.

Les pourcentages des 4 phases chez le témoin négatif sont relativement élevés par rapport à ceux des extraits fongiques et de la colchicine. Ces indices ne sont dominés par aucune phase de la mitose à la différence des cellules traitées.

La colchicine est un alcaloïde extrait des tiges souterraines du colchique ; *Colchicum autumnale* [364]. Elle est utilisée couramment dans le traitement de différentes tumeurs tissulaires. Son action se résume par blocage de la formation du fuseau mitotique [396]. En se fixant sur une molécule de la tubuline, elle empêche sa polymérisation en microtubules. L'absence ou l'insuffisance de ces dernières entraîne un blocage de la mitose, au stade de métaphase [372]. Cette approche confirme le résultat de l'indice des phases de la colchicine obtenu dans cette étude.

Le pourcentage élevé des indices des phases au niveau de la prophase chez l'ensemble des extraits fongiques testés indique la présence d'un empêchement de passage aux autres stades de la division cellulaire à ce niveau. Cette même action est enregistrée par l'extrait aqueux de *Solanum torvum*, plante de la famille des Solanacées [397]. Il semble que les composés présents dans ces extraits de *A. niger* et *A. nidulans* : endophyte foliaire de *Limoniastrum feei*, bloquent la division cellulaire avant la métaphase, ce qui diffère du mécanisme de blocage de la colchicine.

Différents agents naturels anticancéreux sont produits par les endophytes. Le taxol est un diterpénoïde capable de tuer les cellules tumorales, en améliorant l'assemblage des microtubules et en inhibant leur dépolymérisation en tubulines. Il est extrait de plusieurs endophytes ; *Taxomyces andreanae* [353], *Pestalotiopsis microspora* [355], *Alternaria alternata*, *Chaetomella raphigera*, *Monochaetia sp*, *Periconia sp* et *Pithomyces sp* [398]. Récemment, une équipe de recherche a mis au point la présence de lapachol chez *A. niger* ; mycoendophyte de *Tabebuia argentea* [384]. Le lapachol empêche la réplication de l'ADN cellulaire en interférant avec le groupe des enzymes topoisomérases, ce qui bloque la division cellulaire en G2/M cycle [399].

4-4-3- Indices mitotiques

Les différents indices mitotiques des cellules racinaires d'*Allium cepa* sont classés dans un ordre décroissant (Tableau n°34).

La lecture du tableau n°34 montre une diminution remarquable des indices mitotiques pour les cellules traitées par les deux extraits fongiques, comparativement à ceux calculés pour les cellules traitées avec de la colchicine. Nous pouvons constater aussi que ces indices sont légèrement moins élevés chez *A. nidulans* par rapport *A. niger*. Les cellules du témoin négatif ont l'indice mitotique le plus élevé (74,8%), tandis que la colchicine à 1 mg/ml apparaît avec le plus faible indice mitotique (30%).

Tableau n°34. Indices mitotiques des cellules méristématiques d'*Allium cepa* avec leurs groupes homogènes.

Extraits	Concentration (mg/ml)	Indice mitotique (%)	
Témoin négatif	-	74,8 ±0,64	
Acétate d'éthyle (<i>A.niger</i>)	05	40,0 ±1,27	B
Colchicine	0,5	37,5 ±2,27	B
Méthanol (<i>A.niger</i>)	05	35,9 ±0,97	AB
Acétate d'éthyle (<i>A.nidulans</i>)	05	35,8 ±0,84	AB
Acétate d'éthyle (<i>A.niger</i>)	10	35,7 ±1,77	AB
Méthanol (<i>A.nidulans</i>)	05	34,4 ±1,32	AB
Méthanol (<i>A.nidulans</i>)	10	34,0 ±1,68	AB
Méthanol (<i>A.niger</i>)	10	33,9 ±1,63	AB
Acétate d'éthyle (<i>A.nidulans</i>)	10	33,9 ±0,93	AB
Colchicine	01	30,0 ±1,15	A

L'anova indique une différence hautement significative ($p=0,00$) entre les différents indices mitotiques. 3 groupes homogènes apparaissent, loin du témoin négatif. Effectivement, nous pouvons voir l'individualisation de la colchicine à la concentration de 1 mg/ml dans le groupe A. La colchicine à 0,5 mg/ml et l'extrait d'acétate d'éthyle d'*A. niger* à 5 mg/ml ont donné des indices mitotiques comparables et sont classés dans le même groupe B. Les autres extraits fongiques possèdent un effet antimittotique situé entre les deux groupes A et B. Ces extraits sont rangés dans le groupe AB. Donc ce dernier se trouve entre les deux concentrations du témoin positif (colchicine).

La diminution constatée au niveau des différents indices mitotiques chez les cellules racinaires d'*Allium cepa* indique un effet mitodépresseur de tous les extraits fongiques testés. L'indice mitotique reste le meilleur paramètre d'estimation du taux de cellules en division [400]. Les extraits d'acétate d'éthyle comme les extraits méthanoliques ayant donné des pourcentages similaires et élevés des cellules arrêtées en mitose. Cette excellente activité antimittotique est comparable à celle de la colchicine. Les métabolites extraits par les deux solvants utilisés ont la même efficacité envers l'activité antimittotique.

Parmi les études menées sur l'activité antimittotique des mycoendophytes, nous pouvons citer celle de Channabasava et Melappa [384], qui a montré un indice mitotique de 22,5% d'un extrait méthanolique d'*A. niger* associé à *Tabebuia argentea* (Inde). Cet indice est sensiblement inférieur à celui trouvé dans notre étude (33,9%). En outre, l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Aspergillus* isolé de *Peganum harmala* a donné un indice de 43,80% [216]. Cette différence obtenue entre les trois études se justifie par la nature de la plante hôte et le type d'interaction établie avec les mycoendophytes partenaires. Ainsi, il est admis que la quantité et la qualité des métabolites secondaires produits par les endophytes sont influencées par l'habitat et l'environnement de la plante hôte [401]. Notamment, le type du solvant d'extraction utilisé influence le résultat obtenu. Dans ce cas, l'extraction par le méthanol révèle une activité meilleure à celle de l'acétate d'éthyle. L'interaction entre les mycoendophytes améliore le rendement de l'activité antimittotique comme le montre l'exemple d'interaction entre *Aspergillus* et *Penicillium* qui a diminué l'indice mitotique à 30,85%, *Aspergillus/Alternaria* (28,60%) et *Aspergillus/Cladosporium* (27,95%), au lieu 43,80% lorsqu'*Aspergillus* est seul [216], ceci est dû probablement à la synthèse simultanée de métabolites secondaires fongiques à effet antimittotique.

Par ailleurs, la comparaison des indices mitotiques des extraits fongiques avec ceux de plusieurs extraits de plantes médicinales : *Tetraclinis articulata* (92,4%), *Withania frutescens pauquy* (72,28%) [402] et *Solanum torvum* 42% [400], montre que les mycoendophytes possèdent une activité antimittotique plus prononcée.

5- Conclusion

Dans cette partie, les champignons endophytes isolés de *L. feei* qui ont donné de bons résultats au dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne ont été extraits par deux solvants organiques ; l'acétate d'éthyle et le méthanol. Le test de diffusion sur disques a démontré que tous les extraits fongiques d'acétate d'éthyle avaient une activité inhibitrice sur les souches microbiennes testées. L'effet antimicrobien de ces extraits est comparable à celui des antibiotiques témoins et parfois même meilleur. L'activité la plus prononcée est celle observée chez *Penicillium notatum*, à l'inverse des extraits méthanoliques qui ont présentés une faible activité antimicrobienne sur les microbes tests et parfois nulle, comme dans le cas des bactéries *E. faecalis*, *B. subtilis* et *L. monocytogenes*.

Les deux espèces *A. niger* et *A. nidulans* représentent un bon réservoir de molécules puissantes, ayant un pouvoir comparable à celui de la colchicine sur la division cellulaire. Ces mycoendophytes sont considérés comme une source prometteuse de produits naturels, à effet thérapeutique antimitotique. Il est souhaitable dans l'avenir d'identifier ces métabolites et d'investir leur effet antimitotique sur les cellules cancéreuses d'origine animale.

Nous avons conclu que les champignons endophytes sont d'excellentes sources de nouveaux produits naturels bioactifs, avec un potentiel d'exploitation dans une grande variété de domaines médicaux.

Synthèse et discussion générale

L. feei est une plante utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs troubles tels que : les affections du tractus gastro-intestinal [16, 18, 26, 27, 28] et les troubles des voies respiratoires [18, 28, 29]. Ces vertus sont attribuées essentiellement à la présence élevée de composés phénoliques et de flavonoïdes dans cette plante [34]. Elle procure diverses activités biologiques. C'est une espèce spontanée endémique du Sahara. Aucune étude n'a déjà été faite sur la mycoflore qui lui est associé. Une caractérisation de cette dernière permettrait d'expliquer ses propriétés médicinales, mais aussi l'adaptation de cette plante à l'aridité du milieu dans lequel elle vit.

Malgré les conditions climatiques très rudes, particulièrement inadéquates à la survie spontanées des êtres vivants dans la région étudiée (Oued Aghlal), *L. feei* (de Gir.) Batt. arrive à y subsister et proliférer par le développement de stratégies d'adaptations spécifiques, telles l'association aux mycoendophytes.

L. feei, objet de notre étude, a été échantillonné dans une région hyperaride caractérisée par un stress hydrique important, suite à de faibles précipitations annuelles, température élevée et donc une saison sèche très longue (12 mois). Nous avons pu mettre en évidence la présence de mycoendophytes, avec une moyenne d'infection de 73,22%. Toutes les feuilles prélevées renferment des mycoendophytes. Cette remarquable fréquence de colonisation renforce l'idée que pour la majorité des espèces végétales, il n'existe pas de feuille de plante qui ne soit pas colonisée par des microorganismes [137, 403] et que chaque plante des quelques 270.000 espèces de plantes existantes sur terre est l'hôte d'un ou plusieurs endophytes [52, 90, 235, 404]. Les plantes ne sont pas seulement une matière végétale, mais un assemblage complexe d'organismes [405].

L'ensemble des espèces fongiques recensées dans le présent travail a une répartition géographique cosmopolite ou ubiquiste. Elles ont été isolées éventuellement à plusieurs reprises chez différentes plantes dans le monde [162, 226, 406].

L'indice de Shannon a révélé une diversité élevée chez les mycoendophytes foliaires de *L. feei*. Ceci est dû à différentes conditions et facteurs que subissent les feuilles et les entourent. Les sujets de *L. feei* ont été échantillonnés pendant la période de pluie, ce qui favorise la dispersion des spores fongiques partout dans cette zone (Oued Aghlal) et augmente ainsi l'incidence d'infection par les mycoendophytes. Il est évident que la composition et la concentration des communautés microbiennes associées aux plantes hôtes changent selon

différents variables ; la saison peut influencer la diversité et la dynamique des communautés fongiques [140, 407], mais aussi les conditions environnementales tels les précipitations, les vents, la température, etc...[56, 141, 142]. Elle dépend aussi de l'habitat et la nature de la plante hôte [408]. Cette microflore fongique peut varier même au sein des plantes à travers des processus métaboliques spécifiques liées au génotype [409]. Soussi *et al.* [410] ont constaté que ces microorganismes sont capables de faire face aux conditions climatiques des régions arides et désertiques, en développant des stratégies convenables à l'adaptation de la plante hôte. Il est probable que les champignons de la phyllosphère, y compris les endophytes sont plus importants pour la vigueur de la plante hôte par rapport aux champignons souterrains [181, 405]. Ceci explique parfaitement le besoin symbiotique de cette espèce avec les mycoendophytes. Les différentes symbioses de *L. feei* sont obligatoires, vu les différents stress auxquels il est confronté.

Le nombre relativement important de taxons fongiques recensés pour *L. feei* dans la région étudiée reflète également un bon état phytosanitaire de cette plante, cela peut être dû à l'éloignement de ce site de toute action anthropique influençant la biodiversité des communautés fongiques. Todd [231] montre qu'il existe une corrélation entre le site et les fréquences de colonisation par des endophytes. Ceci pourra être attribué notamment au microclimat plus propice à la colonisation fongique [411].

La majorité des espèces recensées dans la présente étude est d'origine tellurique. La physiologie et le positionnement des feuilles de *L. feei* en rosette basale, près du sol et de taille restreinte ont contribué évidemment à la colonisation fongique de cette plante. Ces constats confirment ceux de Toofane et Dalymamode [136], qui ont montré que les feuilles les plus fortement colonisées se trouvent plus près du sol, où les conditions d'humidité élevées facilitent la pénétration et le passage des champignons à l'intérieur des tissus adjacents. En outre, la nature pérenne de cette espèce favorise également l'accumulation de plus de taxons endophytes avec le temps [412, 413].

D'autre part, il y a la stratégie d'échantillonnage qui influence à son tour la richesse de la communauté endophyte qui se développe au niveau des cultures microbiennes. Généralement, l'utilisation de petits morceaux de feuilles dévoile l'existence de plus de taxons que ceux des grandes tailles. Puisque la variation de feuille à feuille est considérable, plusieurs parties devraient être prélevées [204].

Une grande partie des isolats fongiques recensés dans cette étude appartient aux champignons dématiés, dont la coloration foncée est attribuée probablement à la présence de la mélanine, due à la nature écologique de cette région. En effet, Barrow et son équipe [414] ont précisé que la fréquence élevée des structures fongiques mélanisées chez les plantes de désert est due aux conditions climatiques variables et dures. Selon Mandyam et Jumpponen [169], les mycoendophytes mélanisés fournissent la protection de la plante hôte contre les températures extrêmes. Malgré le fait que les mécanismes ne soient pas bien définis, ils suggèrent que la présence constante de ces mycètes, en particulier dans les régions arides, indique qu'ils jouent un rôle important dans l'écologie et l'évolution de ces écosystèmes. Ces mycoendophytes foncés améliorent aussi la nutrition hydrique et minérale de la plante, ils la protègent notamment contre les herbivores par sécrétion des mycotoxines et des substances régulatrices de croissance en échange de carbone issu de la photosynthèse [153, 415].

Les interactions observées au niveau des cultures fongiques montrent l'existence de plusieurs comportements allant de l'ordre synergétique à l'antagonisme ou la compétition entre les mycètes recensés. Bien que, l'ensemble des isolats fongiques ont été isolés au sein de la même plante et parfois de la même feuille. Cela n'exclut pas le comportement antagoniste de ces champignons. Il est clair donc que le comportement nutritionnel des mycoendophytes n'est pas statique, mais change selon les conditions offertes et la quantité des nutriments fournie, soit au sein de l'hôte ou bien au niveau du milieu de culture. En effet, les espèces fongiques ont présenté une concurrence accrue contre les espèces opposées sur la nutrition offerte (PDA) dans les boîtes de cultures. Les mycoendophytes basculent du mutualisme à l'antagonisme en fonction des conditions environnementales et peuvent même devenir pathogènes de l'hôte selon les exigences de vie [63, 64]. Schulz et Boyle [112], précisent que la stabilité de l'interaction asymptomatique dépend de nombreux facteurs tels que le stress environnemental, la sénescence des hôtes, virulence de l'endophytes et de la réponse de défense de l'hôte.

A l'inverse du résultat trouvé entre les deux genres *Acremonium* et *Fusarium* qui ont formé une corrélation positive dans les feuilles de *L. feei*, Yu *et al.* [278] ont prouvé que l'espèce *Acremonium zeae* du maïs, montre une activité antifongique significative contre *Fusarium Verticillioides*. Cette discordance entre les deux résultats peut être justifiée par la différence au niveau spécifique de l'espèce fongique et/ou végétale, ou bien par la nature de l'interaction avec la plante hôte.

L'identification des mycoendophytes s'avère très compliqué au niveau phénotypique. La coloration, la forme et la taille des colonies changent selon les conditions qui entourent l'espèce. La composition du milieu de culture, la température d'incubation, l'interaction avec d'autres espèces (synergie, antagonisme ou compétition) et la durée d'incubation sont des facteurs influençant l'aspect des colonies fongiques (Figure n°73). Ces changements sont le résultat de la dynamique fongique, qui exhibe une vie très exigeante en matière de culture. Ce même constat a été observé par Kusari et son équipe [416]. Ils rajoutent que la variation des conditions de culture comme la composition des milieux, l'aération, la température, ou la forme du flacon de culture conduit même à la découverte de nouveaux produits naturels synthétisés par les diverses formes de champignons. Rakotoniriana *et al.* [162] rapportent que les résultats de tests de double culture indiquent clairement que les modes de distribution pourraient être le résultat de la concurrence ou d'autres interactions entre les champignons. Cela justifie le fait que la mycoflore au sein de la plante hôte n'est pas statique, mais change régulièrement selon les conditions environnantes.

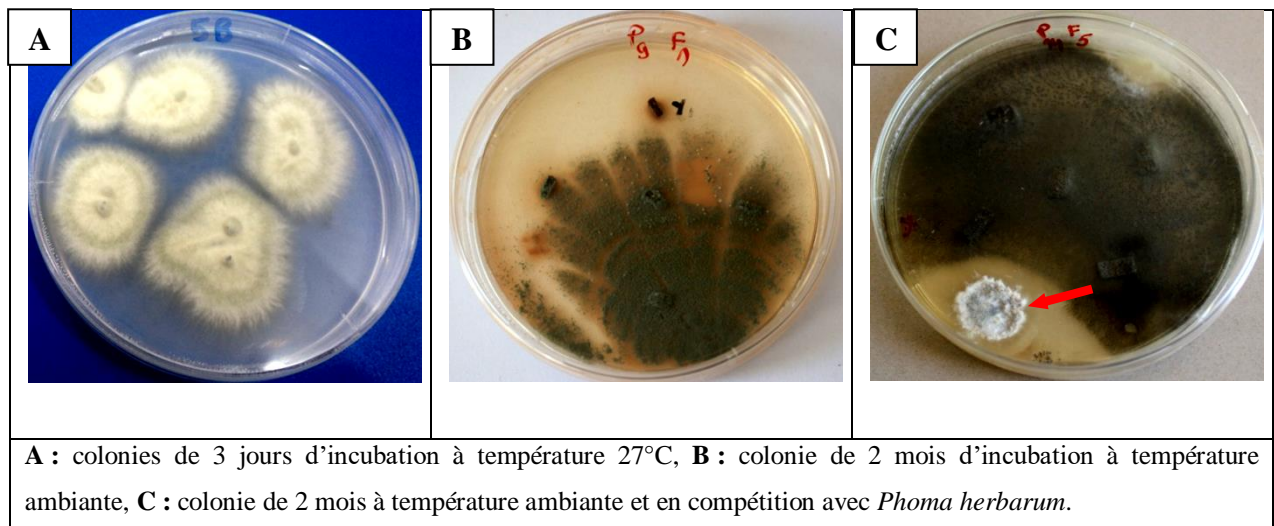


Figure n°73 : exemple sur les différents aspects de colonies d'*Aspergillus nidulans* selon les conditions de culture.

La plupart des mycoendophytes recensés dans cette étude appartient aux Deutéromycètes. Or, La présence à la fois des deux formes anamorphe et téléomorphe des mycoendophytes (*Aspergillus nidulans* et sa forme téléomorphe *Emericella nidulans*, *Penicillium sp* et *Eupenicillium sp*) qui représente les deux modes de reproduction sexuée et asexuée au niveau foliaire de *L. feii* reste inexplorée. Ceci est en accord avec des études antérieures montrant que les champignons endophytes isolés dans les régions tropicales étaient les plus souvent Deutéromycètes (anamorphes), et très rarement téléomorphes en culture [162]. Lehtonen *et al.*

[195] signalent que la plupart des mycoendophytes perdent leur capacité de reproduction sexuée au niveau des cultures, et la remise en forme du champignon est entièrement déterminée par l'aptitude de la plante hôte.

Il est plutôt rare qu'une plante soit colonisée par un seul type d'endophyte. En fait habituellement la présence de divers microorganismes est observée dans les tissus végétaux, et il est évident qu'un mycoendophyte interagit directement ou indirectement avec d'autres associés au sein de la plante. De nombreuses études récentes apportent des preuves convaincantes que les interactions microbiennes peuvent jouer un rôle majeur dans l'apparition de la production de métabolites chez les champignons. Ces rencontres peuvent impliquer des petites molécules de signalisation diffusibles qui peuvent déclencher autrement les voies de biosynthèse [417].

Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires, ils fournissent une impressionnante production d'une importance pharmaceutique. Comme les antibiotiques (les pénicillines, les céphalosporines, les cyclosporines et autres), qui sont largement prescrits comme des médicaments. Notamment, les mycotoxines qui sont des dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'Acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques. Les mycotoxines sont des moyens de défense pour les mycètes contre les organismes en concurrence dans le même environnement [418].

De nombreuses recherches ont prouvé que les mycoendophytes sont une nouvelle source potentielle de nouveaux produits naturels destinés à être exploités dans la médecine moderne, l'agriculture et l'industrie. Jusqu'à présent, un grand nombre de nouveaux produits naturels possédant des activités antimicrobiennes ont été isolés à partir d'endophytes [278]. les peptides Cyclo (Pro-Thr) et cyclo (Pro-Tyr) sont deux nouveaux constituants antibactériens produits par le bouillon de fermentation du champignon endophyte *Penicillium sp* [419].

Les mycoendophytes associés aux plantes médicinales utilisées traditionnellement pourraient être une source importante de métabolites fonctionnels [106]. L'activité antimicrobienne des champignons endophytes isolés de la plante médicinale *L. feei* a montré que les extraits d'acétate d'éthyle avaient un effet plus prononcé que celui des extraits méthanoliques, une différence qui s'explique par le fait que les deux solvants ont des polarités différentes, ce qui permet d'extraire des composés différents. Nous avons conclu ainsi, que les composants bioactifs n'ont pas été bien dissous ou en très petite quantité, donnant peu d'effet aux extraits méthanoliques et le plus probable est que ces métabolites bioactifs ont une polarité

qui permet une extraction par l'acétate d'éthyle [420]. L'acétate d'éthyle reste le meilleur solvant d'extraction métabolique pour les mycoendophytes [319, 393, 494, 395].

Une différence dans l'inhibition de la croissance des espèces microbiennes a été enregistrée pour les extraits fongiques utilisés. Cette différence suggère la sensibilité des différents microbes testés aux divers composants des métabolites secondaires bioactifs des mycoendophytes étudiés. Les extraits d'acétate d'éthyle ont démontré qu'ils avaient une plus forte activité sur les bactéries Gram+ par rapport aux bactéries Gram-, qui étaient moins sensibles. Ceci s'adapte aux résultats obtenus par Rdji *et al.* [421] ; Sutjaritvorakul *et al.* [422] et Zerroug [147]. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux groupes de microorganismes sont morphologiquement différents. Les bactéries Gram- possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharide portant les composants structurels lipopolysaccharides. Ceci rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries Gram+, lesquelles sont plus sensibles car ils ont seulement une couche de peptidoglycane extérieure, qui n'est pas une barrière de perméabilité effective [423].

Les mycoendophytes sont aussi capables de produire des composés efficaces contre les bactéries résistantes. Guanacastepene A (diterpénoides) est un exemple qui a démontré une activité prononcée contre les souches résistantes *S. aureus* et *E. faecalis*. Il est produit par un champignon endophyte non identifié isolé de *Daphnopsis americana* [424]. Han *et al.* [425] ont prouvé que deux phénols produits par *Penicillium sp* ont une activité contre la souche MRSA (*Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline). Les deux genres les plus dominants chez *L. feei* (*Aspergillus* et *Penicillium*) sont connus pour leur activité antimicrobienne, ils constituent les réservoirs les plus importants des antibiotiques efficaces contre un large spectre de microorganismes pathogène [86]. *Aspergillus* a déjà été isolé en tant qu'endophyte et a montré une activité contre plusieurs microorganismes pathogènes [390, 426]. Le genre *Penicillium* aussi a été isolé à partir de *Acrostichum aureum*, il a été une source de peptides, qui ont permis d'inhiber *S. aureus* et *C. albicans* [419], il a été aussi source de phénols inhibant *S. aureus* et isolé de *Cerbera manghas* [425]. L'espèce *Aspergillus nidulans* produit la Stérigmatocystine et l'Aflatoxine. *Penicillium chrysogenum* produit la pénicilline [427].

Dans une étude sur l'activité antimicrobienne des feuilles de *L. feei* de la même région (Béchar), parmi les six extraits utilisés, seul l'extrait méthanolique a donné un effet inhibiteur sur l'ensemble des microbes testés. *C. albicans* n'est affectée que par l'extrait méthanolique [31].

Cela s'oppose aux résultats obtenus dans notre étude en utilisant les extraits fongiques, où les extraits d'acétate d'éthyle ont présenté des effets plus larges à celui des extraits méthanoliques et même contre *C. albicans*. Ceci peut être expliqué par le fait que les métabolites produits par les mycoendophytes sont différents à ceux produits par la plante hôte. Ce même constat est enregistré par Glienke *et al.* [428], lors d'une étude sur l'activité antimicrobienne des champignons endophytes de plantes médicinales brésiliennes. Ces auteurs ont trouvé une nette différence entre les métabolites secondaires antimicrobiens produits par la plante hôte avec les produits fabriqués par les mycoendophytes étudiés. En outre, Chen *et al.* [272] rapporte que les champignons endophytes pourraient produire des substances plus actives que celles de leurs hôtes.

Les mycoendophytes sont considérés donc comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs [92, 170], produisant le plus grand nombre de métabolites secondaires par rapport aux autres catégories de microorganismes [100], ainsi qu'une grande diversité structurale comprenant des alcaloïdes, peptides, stéroïdes, terpénoïdes, quinones, composés aliphatiques, flavonoïdes etc... [429]. Ces substances naturelles produites par les champignons endophytes possèdent un large spectre d'activité biologique [100], comprenant des composés antibiotiques, antifongiques, agents anticancéreux et autres substances biologiquement actives [92, 404]. Des scientifiques ont aussi mis en évidence la sécrétion spécifique d'une gamme de petites molécules antibiotiques et d'enzymes qui dégradent une grande variété de microorganismes pathogènes. Parmi elles, les oxylipines, sont des composés dérivés de l'oxydation des acides gras polyinsaturés et responsables de la communication chez de nombreux êtres vivants. Si ces molécules ne sont pas directement impliquées dans l'inhibition de la croissance du phytopathogène, elles suggèrent l'existence d'un langage beaucoup plus complexe. Elles auraient donc un rôle de signal dans la régulation des cascades métaboliques, agissant comme un véritable langage moléculaire. L'inhibition de la production de mycotoxines par les oxylipines fongiques pourrait donc conférer un avantage écologique aux champignons endophytes, au bénéfice de la plante hôte, lors de leur compétition avec les phytopathogènes [430].

Le modèle expérimental d'*Allium cepa* est l'un des meilleurs systèmes d'évaluation de l'activité antimutogène *in vitro*. Ce test est validé par le Programme de l'Environnement des Nations Unies (UNEP) et le Programme International de la Sécurité Chimique (IPCS), il est utile pour toute étude préliminaire des substances anticancéreuses [431]. En outre, les cellules

végétales étant généralement plus grosses que les cellules animales et donc plus faciles à observer au microscope, ne soulevant pas de problèmes éthiques, facile à obtenir et peu coûteux. Ce bioessai date de 1938, avec les premiers travaux réalisés sur les cellules racinaires d'*Allium cepa* en étudiant l'effet antimittotique de la colchicine [402].

Les extraits des deux espèces d'*Aspergillus* ont présenté un effet antimittotique considérable sur les cellules végétales d'*Allium cepa*. Les indices de phases marqués au niveau des extraits utilisés montrent que le système de blocage de la division cellulaire est différent à celui de la colchicine (témoin synthétique), ce qui suggère que les métabolites issus des mycoendophytes sont de nature distincte de la colchicine, mais qui donnent le même effet avec des indices mitotiques comparables. Cela ouvre la possibilité d'avoir des substances naturelles remplaçant les produits synthétiques. Il est souhaitable donc d'investir prochainement dans la séparation et l'identification de ces molécules actives.

Conclusion générale et perspectives

Cette étude réalisée dans la région de Oued Aghlal à Béchar a porté sur les feuilles de *Limoniastrum feei*. Elles a été répartie en deux principales parties.

Dans la première partie qui consiste en un inventaire des champignons endophytes, nous avons pu mettre en évidence la présence de ces derniers au niveau foliaire de cette plante. La mise en culture a dévoilé une richesse considérable en divers taxons fongiques. Concernant la composition générale de la trame fongique inventoriée et identifiée, elle se trouve rangée principalement au phylum des Ascomycota, dont les genres les plus dominants sont *Penicillium* et *Aspergillus*, Ces deux genres connus pour leurs activités antimicrobiennes représentent ensemble 45,79% de la population fongique recensée. Plusieurs interactions de l'ordre de domination, d'antagonisme ou de synergie ont été observées. Ces relations caractérisent les différents groupes taxonomiques et reflètent la capacité de ces mycètes à réagir devant différentes situations et exigences de vie, par production de métabolites actifs. De part cette diversité remarquable, les feuilles de *L. feei* peuvent être considérées comme un véritable hotspot de biodiversité microbienne.

L'association symbiotique de *L. feei* avec ces mycoendophytes représente un système modèle dans l'écologie des régions sahariennes, très contraignante à la survie des êtres vivants. Cette association explique parfaitement le rôle promoteur de ces champignons au sein des plantes, par le maintien de la santé végétale et l'équilibre écologique au niveau de cette zone désertique.

En deuxième étape, nous avons investi dans le pouvoir producteur des métabolites secondaires chez les champignons endophytes recensés, afin de tester les activités antimicrobienne et antimitotique qui ont prouvé leur efficacité à ce niveau. Les extraits fongiques d'acétate d'éthyle ont montré un effet antimicrobien plus large et plus élevé par rapport aux extraits fongiques méthanoliques. Nous avons ainsi confirmé que le meilleur solvant pour l'extraction des mycoendophytes est l'acétate d'éthyle. Les extraits d'*Aspergillus nidulans* et d'*Aspergillus niger* ont donné des résultats très intéressants dans l'activité antimitotique. De ce fait, Nous avons conclu que les champignons endophytes sont d'excellentes sources de nouvelles substances naturelles bioactives, avec un potentiel d'exploitation dans une grande variété d'activités biologiques.

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

- identifier davantage de mycotaxons endophytes sur *L. feei*, et confirmer les données actuellement obtenues par d'autres méthodes tel que l'approche moléculaire ;
- purifier et identifier les métabolites secondaires produits par les champignons endophytes ;
- Comparer entre les métabolites secondaires produits par les champignons endophytes et la plante hôte ;
- élargir le nombre d'activités biologiques testées pour les extraits fongiques ;
- essayer de comprendre et d'expliquer le mécanisme naturel de l'infection fongique au niveau anatomique et physiologique de *L. feei* ;
- étudier l'interaction existant entre la plante et ces champignons et les avantages que peuvent offrir ces derniers à leur hôte ;
- il serait intéressant notamment d'évaluer les interactions endophyte-endophyte et d'étudier plus en détail la fonction métabolite secondaire dans ces environnements complexes.



Références bibliographiques

- [1] **Ibiri P.M. (2005)**. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale, EPFL. Lausanne (Suisse). In **Berreghioua A. (2016)**. Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud algérien : *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*. Thèse de doctorat. Université Abou bakr Belkaid, Tlemcen, Algérie. 257p.
- [2] **Benssaci O. (2006)**. Mycoflore endophyte du Cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Man.) dans le Massif de Bélezma (Aurès) : Etude Initiale. Mémoire de Magister. Université El-Hadj Lakhdar, Batna, Algérie. 62p.
- [3] **Bouhadjera K. (2005)**. Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Thèse de doctorat. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, Algérie. 149p.
- [4] **Dobignard A. et Chatelain C. (2013)**. Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord. Dicotyledoneae : Oleaceae - Zygophyllaceae. Ed : des Conservatoire et Jardin botanique, Genève. 5 : 122.
- [5] **Ozenda P. (2004)**. Flore et végétation du Sahara. CNRS, Paris. 624p.
- [6] **Msanda F., El Aboudi A. et Peltier J.P. (2002)**. Originalité de la flore et de la végétation de l'Anti-Atlas sud-occidental, Maroc. *Feddes Repert.* 113 : 603-615.
- [7] **Carroll G.C. (1988)**. Fungal endophytes in stems and leaves : from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology.* 69 : 2-9.
- [8] **Stone J.K., Polishook J.D. et White J.F. (2004)**. Endophytic fungi. *ResearchGate.* 241-270.
- [9] **Bérubé J. (2007)**. Les champignons endophytes : un potentiel insoupçonné. L'éclaircie. N° : 34.
- [10] **Rodriguez R.J., Henson J., Van Volkenburgh E., Hoy M., Wright L., Beckwith F., Kim Y.O. et Redman R.S. (2008)**. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *Ism Journ.* 2 (4) : 404-416.
- [11] **Azevedo J.L., Maccheroni J.R.W., Pereira J.O. et De Araujo W.L. (2000)**. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology.* 3 (1) : 40-65.
- [12] **Kogel K.H., Franken P. et Hucklhoven R. (2006)**. Endophyte or parasite-What decides ? *Current Opinion in Plant Biology.* 9 (4) : 358-363.
- [13] **Watson L. et Dallwitz M.J. (1992)**. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Version : 5th March 2018. delta-intkey.com/angio.
- [14] **Anonyme** (www.plantes-botanique.org).
- [15] **Henry N. et Le Houerou H. (2001)**. Biogeography of the arid steppeland north of the Sahara. *Journal of Arid Environments.* 48 : 103-128.
- [16] **Ziane L. (2016)**. Etude phytochimique et évaluation biologique des extraits organiques des différentes parties de *Limonastrium Feei* -Blombaginaceae- (Mlefet Khadem). Thèse de doctorat. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, Algérie. 118p.
- [17] **Ozenda P. (1958)**. Flore du sahara septentrional et central. p : 363-365.

- [18] **Rahmani S., Ziane L., Belboukhari N. et Cheriti A. (2012).** The Saharan medicinal plant *Limoniastrum feei*: ethnomedical survey and preliminary phytochemical screening of antibacterial extracts. *PhytoChem BioSub J.* 6 (2) : 83-87.
- [19] **Anonyme** (www.teline.fr).
- [20] **Chaabi M. (2008).** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines. *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Angeissus leiocarpus* Guill. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (de Gir.) Batt. (Plumbaginaceae). Mémoire de magister. Université Louis Pasteur, Strasbourg. 266p.
- [21] **Kaabeche M. (1990).** Les groupements végétaux de la région de Bou Saada (Algérie). Essai de synthèse sur la végétation steppique du Maghreb. Université de Paris-Sud, France. 94p.
- [22] **Guinet P. (1954).** Carte de la végétation de l'Algérie. Feuille de Béni Abbès au 1/20000. In **Bouallala M. (2013).** Etude floristique et nutritive spatio-temporelle des parcours camelins du sahara occidental algérien. Cas des régions de bechar et tindouf. Thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie. 123p.
- [23] **Quézel P. (1965).** La végétation du Sahara du Tchad à la Mauritanie. Ed : Masson. Paris. 333p.
- [24] **Chaabi M.B., Beghidjab N., Benayacheb S. et Lobsteina A. (2008).** Activity-Guided Isolation of Antioxidant Principles from *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. *Z. Naturforsch.* 63c : 801-807.
- [25] **Quézel P. et Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed : CNRS, Paris. p : 350-476.
- [26] **Cheriti A., Belboukhari N. et Hacini S. (2004).** Ethnopharmacological survey and phytochemical screening of some medicinal plants of Algerian Sahara. *Iranian J. Pharm. Res.* 2 : 51.
- [27] **Belboukhari N. et Cheriti A. (2009).** Analysis and Isolation of Saponins from *Limoniastrum feei* by LC-UV. *Chem. Nat. Comp.* 45 (5) : 756-758.
- [28] **Rahmani S., Belboukhari N., Sekkoum K. et Cheriti A. (2016).** Evaluate the anti inflammatory of the aqueous extract from leaves of *limoniastrum feei* (plumbaginacea). *Algerian journal of arid environment.* 6 (1) : 80-86.
- [29] **Cheriti A. (2000).** Plantes médicinales de la région de Béchar, Sud ouest Algérie (Ethnopharmacologie). Rapport CRSTRA, Algeria.
- [30] **Boudermine S., Malafronte N., Bghidja N., Benayech S., Esposito A., Velotto S. et Severino L. (2014).** Phytochemical investigation and antiproliferative activity of *Limoniastrum feei* (girard) batt. *PharmacologyOnline.* 3 (142) : 141-144.
- [31] **Belboukhari A. et Cheriti N. (2005).** Antimicrobial activity of aerial part crude extract from *Limoniastrum feei*. *Asian J. Plant Sci.* 4 : 496-498.
- [32] **El Hacı I.A., Didi A., Bekkara F.A. et Gherib M. (2009).** *In vitro* antioxidant activity and total phenolic contents in methanol crude extracts from the algerian medicinal plant *limoniastrum feei*. *Scientific Study & Research.* 4 : 329-335.

- [33] **El Haci I.A., Mazari W., Atik-Bekkara F., Hassani F. et Gherib M. (2017).** Assessment of the cytotoxic activity and the reduction power of *Limoniastrum feei* Girard (Batt.) : a medicinal plant from Algerian Sahara. *Orient Pharm Exp Med.* 17 : 143.
- [34] **Keffous F., Belboukhari N., Sekkoum K., Djeradi H., Cheriti A. et Aboul-Enein H.Y. (2016).** Determination of the antioxidant activity of *Limoniastrum feei* aqueous extract by chemical and electrochemical methods. *Cogent Chemistry.* 2 : 118-141.
- [35] **Belboukhari N. et Cheriti A. (2007).** Flavonoid of *limoniastrum feei*. *Research journal of phytochemistry.* 74-78.
- [36] **Allaoui A., Rahmani S., Belboukhari N., Cheikh N., Cheriti A. et Sekkoum K. (2015).** Isoflavone and flavone derivatives from aerial part of *Limoniastrum feei*. *Der Pharma Chemica.* 7 (8) : 17-20.
- [37] **Ziane L., Lazouni H.A., Moussaoui A., Hamidi N., Djellouli M. et Belabbes A. (2015).** Flavonoid from methanolic extract of *Limoniastrum Feei* (Girard) batt (Plumbaginaceae). *Asian J Pharm Clin Res.* 8 (2) : 218-219.
- [38] **Ammar O. (2017).** *In silico* pharmacodynamics, toxicity profile and biological activities of the Saharan medicinal plant *Limoniastrum feei*. *Braz. J. Pharm. Sci.* 53 (3) : e61.
- [39] **Brahmi H. (2015).** Contribution à l'étude des eaux souterraines au Sahara, exemple des eaux de la région de Kenadsa. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, Algérie. 105p.
- [40] **Anonyme** (www.pinterest.com).
- [41] **Chehma A. et Djebbar M.R. (2008).** Les espèces médicinales spontanées du Sahara septentrional algérien : distribution spatio-temporelle et étude ethnobotanique. *Revue Synthèse.* 17 : 36-45.
- [42] **Conrad G. et Roche A.R. (1965).** Etude stratigraphique et hydrogéologique de l'extrémité méridionale de la Hamada du Guir. *Bull. Soc. Géo. de France.* 7 : 695-712.
- [43] **Kaabeche M. (2005).** Plan de gestion du site de Taghit-Guir. Conservation de la biodiversité et gestion durable des ressources naturelles des sites de mergueb (M'sila), Oglet ed दौरa (Naama) et Taghit (Béchar). 224p. sur : docplayer.fr/79905593.
- [44] **Guinochet M. et Quézel P. (1954).** Reconnaissance phytosociologique autour du Grand Erg occidental. *Travaux de l'Institut de Recherche Saharienne.* 5 : 11-27.
- [45] **Ozenda P. (1991).** Flore et végétation du Sahara. Ed : CNRS, Paris. 662p.
- [46] **Benghanem A.N. (2009).** Etude écologique des formations à *Acacia tortilis ssp. raddiana* dans la région de Béni-Abbès (wilaya de Béchar). Mémoire de magister. USTHB, Algérie. 86p.
- [47] **Meddour R. (1994).** Contribution à l'étude phytosociologique de la Centro-orientale du parc National de Chréa. Essai d'interprétation synthétique des étages et des séries de végétation de l'Atlas blidéen. Mémoire de magistère. INA, El Harrach, Algérie. 330p.
- [48] **Bagnouls F. et Gaussen H. (1953).** Saison sèche et indice xérothermique. *Bull. Hist. Nat. Toulouse.* 88 : 143-239.

- [49] **Weidner S., Arnold W. et Stackebrandt E. Puhler A. (2000).** Phylogenetic analysis of bacterial communities associated with the leaves of the seegrass *Halophila stipulacea* by a culture independent small-subunit rRNA gene approach. *Microbiol. Ecol.* 39 : 22-31.
- [50] **Garbeva P., Overbeek L.S., Vuurde J.W. et Elsas J.D. (2001).** Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbil. Ecol.* 41 : 369.
- [51] **Redlin S.C. et Carris L.M. (1996).** Endophytic fungi Grasses and Woody plants: systematics, ecology and evolution. *APS Press. St. Paul* (Minnesota) USA. 223p.
- [52] **Arnold A.E., Maynard Z., Gilbert G.S., Coley P.D. et Kursar T.A. (2000).** Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol. Lett.* 3 : 267-274.
- [53] **Linares D.R.A. (2010).** Characterization of tomato root-endophytic fungi and analysis of their effects on plant development, on fruit yield and quality and on interaction with the pathogen *verticillium dahlia*. Thèse de doctorat. Université Potsdam. 202p.
- [54] **Bacon C.W. et White J.F. (2000).** Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. *Microbial Endophytes.* 237-261.
- [55] **Kharwar R.N., Gond S.K., Kumar A. et Mishra A. (2010).** A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaves of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. *World Journal of Biotechnology.* 26 : 1941-1948.
- [56] **Cordier T. (2012).** Structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et effet potentiel du changement climatique. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 1, France. 103p.
- [57] **Lindow S.E. et Brandl M.T. (2003).** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology.* 69 (4) : 1875-1883.
- [58] **Mansouri A. (2011).** Les champignons endophytes chez le blé dur (*Triticum durum*.Desf): Occurrence et rôle dans la tolérance au stress hydrique. Mémoire de magistère. Université El-Hadj Lakhdar Batna, Algérie. p : 3-117.
- [59] **Carroll G.C. (1986).** The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In **Fokkema N. J. et Van den Heuvel J.** Ed : Microbiology of the phyllosphere. Cambridge University Press. p 205-222.
- [60] **Dingle J. et Mcgee P.A. (2003).** Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *Tritici* in wheat. *Mycological Research.* 107 (3) : 310-316.
- [61] **Lv Y.L., Zhang F.S., Chen J., Cui J.L., Xing Y.M., Li X.d. et Guo S.X. (2010).** Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the alpine plant *Saussurea involucrata*. *Biol. Pharm. Bull.* 33 (8) : 1300-1306.
- [62] **Clay K., Marks S. et Cheplick G.P. (1993).** Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. *Ecology.* 74 : 1767-1777.

- [63] **Vesterlund S.R., Helander M., Faeth S.H., Hyvönen T. et Saikkonen K. (2011).** Environmental conditions and host plant origin override endophyte effects on invertebrate communities. *Fungal Diversity*. 47 : 109-118.
- [64] **Faeth S.H. et Sullivan T.J. (2003).** Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *Am Nat*. 16 : 310-325.
- [65] **Tabuc C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Université de Bucarest, Toulouse. 190p.
- [66] **Laberche J.C. (1999).** Biologie végétale. Dunod Paris. 2^{ème} édition. 280p.
- [67] **Lecellier A. (2013).** Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne. p : 16.
- [68] **Anonyme** (www.nammex.com/redefining-medicinal-mushrooms).
- [69] **Castegnaro M. et Pfohl-Leszkowicz A. (2002).** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. In : **Moll M. et Moll N. La sécurité alimentaire du consommateur.** Tec & doc, Lavoisier, Londres, Paris, New York. p : 127-179.
- [70] **Le Calvez T. (2009).** Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. Thèse de doctorat. Université de Rennes 1. 225p.
- [71] **Dufresne P. et Germain G.S. (2018).** Identification des champignons d'importance médicale. INSPQ. Laboratoire de santé publique Québec. 64p.
- [72] **James T.Y., Kauff F., Schoch C. et al. (2006).** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443 : 818-822.
- [73] **Blackwell M. (2011).** The fungi : 1, 2, 3 ... 5,1 millions species ? *American Journal of Botany*. 98 : 426-438.
- [74] **Purvis A. et Hector A. (2000).** Getting the measure of biodiversity. *Nature*. 405 : 212-219.
- [75] **Van Der Heijden M.G.A., Bardgett R.D. et Van Straalen N.M. (2008).** The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*. 11 : 296-310.
- [76] **Courty P.E., Buee M., Diedhiou A.G., Frey-Klett P., Le Tacon F., Rineau F., Turpault M.P., Uroz S. et Garbaye J. (2010).** The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry*. 42 : 679-698.
- [77] **Newton A.C., Fitt B.D.L., Atkins S.D., Walters D.R. et Daniell T.J. (2010).** Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology*. 18 : 365-373.
- [78] **Morris S.J. et Robertson G.P. (2005).** Linking function between scales of resolution. *The Fungal Community*. Ed : Taylor & Francis Group. p : 13-26.
- [79] **Raven P.H., Evert E. et Eichorn (2007).** Biologie végétale 2^{ème} édition. De Boeck et Larcier.

- [80] **Márquez L.M., Redman R.S., Rodriguez R.J. et Roossinck M.J. (2007).** A virus in a fungus in a plant : three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*. 315 : 513-515.
- [81] **Kirk P.M., Cannon P.F., Stalpers J.A. et Minter D.W. (2008).** Dictionary of the Fungi. *Littérature Mycobank*. Sur : <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey>.
- [82] **Lutzoni F., Kauff F., Cox C.J. et al. (2004).** Assembling the fungal tree of life: progress, classification and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*. 91 (10) : 1446-1480.
- [83] **Schübler A., Schwarzott D. et Walker C. (2001).** A new fungal phylum, the Glomeromycota : phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105 (12) : 1413-1421.
- [84] **Fitter A.H., Helgason T. et Hodge A. (2011).** Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Implications for sustainable agriculture. *Fungal biology reviews*. 25 : 68-72.
- [85] **Comacle P. (2013).** Apport de la PCR et du séquençage au diagnostic de sinusite fongique: à propos de 42 cas diagnostiqués au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de rennes. Université de Nantes, France. p : 31.
- [86] **Botton B., Breton A., Fevre M., Guy P.H., Iarpent J.P., Sanglier J.J., Vayssier V. et Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance Industrielle. Ed : *Masson*. p : 20-191.
- [87] **Sutton D.A., Fothergill A.W. et Rinaldi M.G. (1998).** Guide to clinically significant fungi. In Tabuc C. (2007).
- [88] **Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B. et Pegler D.N. (1995).** Dictionnaire of the fungi, 8^{ème} Ed. Oxon, UK, CAB International. 650p.
- [89] **Staniek A., Woerdenbag H.J. et Kayser O. (2008).** Endophytes exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal of Plant Interactions*. 3 : 75-98.
- [90] **Hyde K.D. et Soytong k. (2008).** The endophytic fungi dilemma. *Fungal diversity*. 33 : 163-173.
- [91] **Schulz B. et Boyle C. (2006).** What are Endophytes? *Soil Biology*. 9 : 1-13.
- [92] **Strobel G., Daisy B., Castillo U. et Harper J. (2004).** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67 : 257-268.
- [93] **Wilson R. (1997).** Endophytic fungi from four tree species in New Brunswick and a comparison of two methods of identification of *Leptostroma* isolates of *Pinus resinosa*: morphology and molecular probing. Thèse de doctorat. Université de New Brunswick, Canada. 131p.
- [94] **Moricca S. et Ragazzi A. (2008).** Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: A lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*. 98 : 380-386.
- [95] **Fernando D.A., Thiago G. et Ademir D. (2014).** Exploring interactions of plant microbiomes. *Sci Agric*. 71 (6) : 528-539.
- [96] **Petrini O. (1991).** Fungal endophytes of tree leaves. *Microbial Ecology of Leaves*. In Andrews J.H. et Hirano S.S. Ed : Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York. p. 179-197.

- [97] **Stone J.K., Bacon C.W. et White J.F. (2000).** An overview of endophytic microbes: endophytism defined. *Microbial Endophytes*. 3-29.
- [98] **Stoyke G. et Currah R.S. (1993).** Resynthesis in pure culture of a common subalpine fungus-roots associations using *Phialocephala fortinii* and *Menziesia ferruginea* (Ericaceae). *Arctic Alp Res*. 25 : 189-195.
- [99] **Sieber T.N. (2002).** Fungal root endophytes. *ResearchGate*. p : 887-917. Doi : 10.1201 / 9780203909423.ch49.
- [100] **Zhang H.W., Song Y.C. et Tan R.X. (2006).** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*. 23 : 753-771.
- [101] **Rodriguez R.J., White J.F., Arnold A.E. et Redman R.S. (2009).** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 182 : 314-330.
- [102] **Pimentel M.R., Molina G., Dionisio A.P., Marostica Junior M.R. et Pastore G.M. (2011).** The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int*. 11p. Doi : 10.4061/2011/576286.
- [103] **Wilson D. (1995).** Endophytes-the evolution of the term, a clarification of its use and definition. *Oikos*. 73 : 274-276.
- [104] **Arnold A.E., Maynard Z. et Gilbert G.S. (2001).** Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees : patterns of abundance and diversity. *Mycol Res*. 105 (12) : 1502-1507.
- [105] **Khan R. (2007).** Isolation, identification and cultivation of endophytic fungi from medicinal plants for the production and characterization of bioactive fungal metabolites. Thèse de doctorat. Université de Karachi, Pakistan. p : 59-270.
- [106] **Huang W.Y., Cai Y.Z., Hyde K.D., Corke H. et Sun M. (2008).** Biodiversity of endophytic fungi with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*. 33 : 61-75.
- [107] **Suryanarayanan T.S., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu M.B. et Gopalan V. (2012).** Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity*. 54 : 19-30.
- [108] **Lakshman H.C. et Kurandawad J.M. (2013).** Diversity of the endophytic fungi isolated from *Spilanthes acmella* L. a promising medicinal plant. *Int J Pharm Bio Sci*. 4b (2) : 1259-1266.
- [109] **Arnold A.E., Mejia L.C., Kylo D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N. et Herre E.A. (2003).** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100 (26): 15649-15654.
- [110] **Ghimire S.R., Charlton N.D., Bell J.D., Krishnamurthy Y.L. et Craven K.D. (2011).** Biodiversity of (*Panicum virgatum* L.) fungal endophyte communities inhabiting switch grass growing in the native tall grass prairie of northern Oklahoma. *Fungal Diversity*. 47 : 19-27.
- [111] **Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M. et Sullivan T.J. (1998).** Fungal Endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annu Rev Ecol Syst*. 29 : 319-343.
- [112] **Schulz B. et Boyle C. (2005).** The endophytic continuum. *Mycological Research*. 109 : 661-686.

- [113] **Rai M., Gade A., Rathod D., Ar Dar M. et Varma A. (2012).** Mycoendophytes in medicinal plants : Diversity and bioactivities. *Biosciences*. 4 (2) : 86-96.
- [114] **Rosenblueth M. et Martínez-Romero E. (2006).** Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant microbe interactions*. 19 (8) : 827-837.
- [115] **Faeth S.H., Bush L.P. et Sullivan T.J. (2002).** Peramine alkaloid variation in *Neotyphodium* infected Arizona fescue: effects of endophyte and host genotype and environment. *Journal of Chemical Ecology*. 28 (8) : 1511-1526.
- [116] **Addy H.D., Piercy M.M. et Currah R.S. (2005).** Microfungal endophytes in roots. *Can Jour of Bot*. 83 : 1-13.
- [117] **Tao G., Liu Z.Y., Hyde K.D., Lui X.Z. et Yu Z.N. (2008).** Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Diversity*. 33 : 101-122.
- [118] **Purahong W. et Hyde K.D. (2011).** Effects of fungal endophytes on grass and nongrass litter decomposition rates. *Fungal Diversity*. 47 : 1-7.
- [119] **Rodriguez R.J., Redman R.S. et Henson J.M. (2004).** The role of fungal symbionts in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. 9 : 261-272.
- [120] **Bischoff J.F. et White J.F. (2005).** Evolutionary development of the Clavicipitaceae. In **Dighton J., White J.F., Oudemans P.** ed : The fungal community: Its organization and role in the ecosystem. Boca Raton, FL, USA. Taylor & Francis. p : 505-518.
- [121] **Cheplick G.P. et Faeth S.H. (2009).** Ecology and evolution of the grass-endophyte symbiosis. *Oxford University Press*. Inc. New York. 252p.
- [122] **Arnold A.E. et Lutzoni F. (2007).** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*. 88 (3) : 541-549.
- [123] **González V. et Tello M.L. (2011).** The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*. 47 : 29-42.
- [124] **Albrechtsen B.R., Björkén L., Varad A., Hagner Å., Wedin M., Karlsson J. et Jansson S. (2010).** Endophytic fungi in European aspen (*Populus tremula*) leaves-diversity, detection, and a suggested correlation with herbivory resistance. *Fungal Diversity*. 41 : 17-28.
- [125] **Botella L. et Diez J.J. (2011).** Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*. 47 : 9-18.
- [126] **Li F.S., Kang S.Z. et Zhang J. (2004).** Interactive effects of elevated CO₂, nitrogen and drought on leaf area, stomatal conductance, and evapotranspiration of wheat. *Agricultural Water Management*. 67 : 221-233.
- [127] **Yang H., Shi G. et Dou Q.P. (2007).** The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from "Indian Winter Cherry". *Molecul Pharm*. 71 : 426-437.
- [128] **Kusari S., Lamshoft M., Zuhlke S. et Spiteller M. (2008).** An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J. Nat. Prod*. 71 : 159-162.

- [129] **Unterseher M., Reiher A., Finstermeier K., Otto P. et Morawetz W. (2007).** Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress*. 6 : 201-212.
- [130] **Gamboa M.A. et Bayman P. (2001).** Communities of endophytic fungi in leaf of tropical timber (*Guarea guidonia*) Meliaceae. *Biotropica*. 33 : 352-360.
- [131] **Petrini O., Stone J. et Carroll F.E. (1982).** Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. *Can. J. Bot.* 60 : 789-796.
- [132] **Lodge D.J., Fisher P.J. et Sutton B.C. (1996).** Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*. 88 (5) : 733-738.
- [133] **Joshee S., Paulus B.C., Park D. et Johnston P.R. (2009).** Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae. *Mycological Research*. 113 : 1003-1015.
- [134] **Hoff J.A., Klopfenstein N.B., McDonald G.I., Tonn J.R., Kim M.S., Zambino P.J., Hessburg P.F., Rogers J.D., Peever T.L. et Carris L.M. (2004a).** Fungal endophytes in woody roots of douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology*. 34 : 255-271.
- [135] **Gasser I., Cardinale M., Müller H., Heller S., Eberl L., Lindenkamp N., Kaddor C., Steinbüchel A. et Berg G. (2011).** Analysis of the endophytic life style and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. *Plant Soil*. 347 : 125-136.
- [136] **Toofanee S.B. et Dulymamode R. (2002).** Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. *Fungal Diversity*. 11 : 169-175.
- [137] **Suryanarayanan T.S. et Thennarasan S. (2004).** Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity*. 15 : 197-204.
- [138] **Zabalgogezcoa I. (2008).** Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6 : 138-146.
- [139] **Schardl C.L., Leuchtman A. et Spiering M.J. (2004).** Symbiosis of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*. 55 : 315-340.
- [140] **Collado J., Platas G., Gonzalez I. et Pelaez F. (1999).** Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol.* 144 : 525-532.
- [141] **Kinkel L.L. (1997).** Microbial population dynamics on leaves. *Ann Rev Phytopath.* 35 : 327-347.
- [142] **Talley S., Coley P. et Kursar T. (2002).** The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Ecology*. 2 : 7.
- [143] **Hoffman M.T. et Arnold A.E. (2008).** Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research*. 112 : 331-344.
- [144] **Suryanarayanan T.S., Murali T.S. et Venkatesan G. (2002).** Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany*. 80 : 818-826.
- [145] **Gonthier P., Gennaro M. et Nicolotti G. (2006).** Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity*. 21 : 69-80.

- [146] **Fujimura K.E., Egger K.N. et Henry G.H. (2008).** The effect of experimental warming on the root-associated fungal community of *Salix arctica*. *Int Society for Microbial Ecology J.* 2 : 105-114.
- [147] **Zerroug A. (2011).** Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk.). Mémoire de magistère. Université Ferhat Abbas-Setif, Algérie. p : 2-51.
- [148] **Bhatnagar A. et Bhatnagar M. (2005).** Microbial diversity in desert ecosystems. *Current Science.* 89 : 1-10.
- [149] **Saikkonen K., Wäli P., Helander M. et Faeth S.H. (2004).** Evolution of endophyte-plant symbiosis. *Trends in Plant Science.* 19 (6) : 275-280.
- [150] **Saikkonen K., Wali P.R. et Helander M. (2010).** Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PLoS One.* 5 (6) : e11395. Doi : 10.1371/journal.pone.0011395.
- [151] **Selosse M.A. et Schardl C.L. (2007).** Fungal endophytes of grass: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist.* 173 (3) : 452-458.
- [152] **Hardoim P., Overbeek L.V. et Elsas J.V. (2008).** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology.* 16 : 463-471.
- [153] **Faeth S.H. (2002).** Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos.* 98 : 25-36.
- [154] **Clay K. (1986).** Grass endophytes. In **Fokkema N. J. et Van Den Heuvel J.** Ed. *Microbiology of the phyllosphere*, Cambridge, UK: Cambridge University Press. p : 188-204.
- [155] **Faeth S.H. et Fagan W.F. (2002).** Fungal endophytes common host plant symbiosis but uncommon mutualisms. *Integrative And Comparative Biology.* 42 : 360-368.
- [156] **Andriamialiharisoa R.F. (2011).** Métabolites secondaires particuliers des feuilles de cinq populations de mascarocoffea et des endophytes des feuilles de *coffea sp A315*. Université d'Antananarivo. 62p.
- [157] **Saikkonen K., Helander M. et Faeth S.H. (2004a).** Fungal endophytes: hich- hikers of the green world. Edited By **Gillings M. et Holmes A. J.** Ed. *Plant microbiology.* Garland Science. p : 81-101.
- [158] **Akiyama K., Matsuzaki K. et Hayashi H. (2005).** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature.* 435 : 824-827.
- [159] **Deckert R.J., Melville L. et Peterson R.L. (2001).** Structural features of a *Lophoderminium* endophytes during the cryptic life-cycle in the foliage of *Pinus strobes*. *Mycol Res.*105 : 991-997.
- [160] **Redman R.S., Sheehan K.B., Stout R.G., Rodriguez R.J. et Henson J.M. (2002).** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science.* 298 (5598) : 1581. Doi : 10.1126/science.1078055.
- [161] **Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Hüchelhoven R., Neumann C., Wettstein D.V., Franken P. et Kogel K.H. (2005).** The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS.* 102 (38) : 13386-13391.

- [162] **Rakotoniriana E.F., Munaut F., Decock C., Randriamampionona D., Andriamboloniaina M., Rakotomalala T., Rakotonirina E.J., Rabemanantsoa C., Cheuk K., Ratsimamanga S.U., Mahillon J., El-Jaziri M., Quetin-Leclercq J. et Corbisier A.M. (2008).** Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93 (1-2) : 27-36.
- [163] **Ellouz O. (2011).** Diversité des champignons endophytes mycorhiziens et de classe II chez le pois chiche, et influence du génotype de la plante. Thèse de doctorat. Université de Montréal. 113p.
- [164] **Hamilton C.E., Gundel P.E., Helander M. et Saikkonen K. (2012).** Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Diversity*. 54 : 1-10.
- [165] **Gundel P.E., Omacini M., Sadras V.O. et Ghersa C.M. (2010).** The interplay between the effectiveness of the grass-endophyte mutualism and the genetic variability of the host plant. *Blackwell Publishing Ltd*. 3 : 538-546.
- [166] **Webber J. (1981).** A natural control of *Dutch elm disease*. *Nature*. 292 : 449-451.
- [167] **Shahollari B., Vadassery J., Varma A. et Oelmüller R. (2007).** Aleucine-rich respert protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus *Piriformospora indica* in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 50 (1) : 1-13.
- [168] **Lyons P.C., Evans J.J. et Bacon C.W. (1990).** Effects of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* on nitrogen accumulation in tall fescue. *Plant Physiol*. 92 : 726-732.
- [169] **Mandyam K. et Jumpponen A. (2005).** Seeking the elusive function of the rootcolonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*. 53 : 173-189.
- [170] **Tan R.X. et Zou W.X. (2001).** Endophytic: a rich source of functional metabolite. *Natural Product Reports*. 18 : 448-459.
- [171] **Li H.Y., Wei D.Q., Shen M. et Zhou Z.P. (2012).** Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity*. 54 : 11-18.
- [172] **Bier J. (1995).** Thesis : Relationship between transmission mode and mutualism in the grass-endophyte. Indiana University. Bloomington.
- [173] **Schardl C.L. et Phillips T.D. (1997).** Protective grass endophyte : Where are they from and where are going ? *Plant Disease*. 81 : 430-437.
- [174] **Richardson M.D., Chapman G.S., Hoveland C.S. et Bacon C.W. (1992).** Sugar alcohols in endophyte-infected tall fescue under drought. *Crop Science*. 32 : 1060-1061. **In Mansouri A. (2011).**
- [175] **Malinowski D.P., Brauer D.K. et Belesky D.P. (1999).** The endophyte *Neotyphodium coenophialum* affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 183 : 53-60.
- [176] **Gundel P.E., Maseda P.H., Vila-Aiub M.M., Ghersa C.M. et Benech-Arnold R. (2006).** Effects of *Neotyphodium* fungi on *Lolium multiflorum* seed germination in relation to water availability. *Annals of Botany*. 97 : 571-577.

- [177] **Malinowski D.P. et Belesky D.P. (2000).** Adaptations of endophyte-infected coolseason grasses to environmental stresses : mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*. 40 : 923-940.
- [178] **Bertrand S. (2009).** Les sidérophores de *Scedosporium apiospermum*, identification, synthèse et applications. Thèse de doctorat. Université d'Angers. 179p.
- [179] **Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Dai Y. et Wang X. (2009).** Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology*. 59 : 584-592.
- [180] **Arnold A.E. (2003).** Fungal endophyte limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceeding of the National Academy of Science*. 100 (26) : 15649-15654.
- [181] **Herre E.A., Mejia L.C., Kylo D.A., Rojas E., Maynard Z., Butler A. et Van Bael S.A. (2007).** Ecological implication of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes mycorrhizae. *Ecology*. 88 (3) : 550-558.
- [182] **Aly A.H., Debbab A., Kjer J. et Proksch P. (2010).** Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity*. 41 : 1-16.
- [183] **El-Tarabily K.A. et Sivasithamparam K. (2006).** Potential of yeast as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*. 47 : 25-35.
- [184] **Faeth S.H. et Hammon K.E. (1997).** Fungal endophytes in oak trees; long term patterns of abundance and associations with leaf miners. *Ecology*. 78 : 810-819.
- [185] **Clay K. et Schardl C. (2002).** Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*. 160 : S99-S127.
- [186] **Finkes L.K., Cady A.B., Mulroy J.C., Clay K. et Rudgers J.A. (2006).** Plant-fungus mutualism affects composition in successional fields. *Ecology Letter*. 9 : 347-356.
- [187] **Bacon C.W., Porter J.K., Robbins J.D. et Luttrell E.S. (1977).** *Epichloë typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology*. 34 (5) : 576-581.
- [188] **Read J.C. et Camp B.J. (1986).** The effect of the fungul endophyte *Acremonium coenophialum* in tall fescue on animal performance, toxicity, and stand maintenance. *Agronomy Journal*. 78 : 848-850.
- [189] **Roberts C. et Andrae J. (2004).** Tall fescue toxicosis and management. *Online Crop Management*. Doi : 10 : 1094/ CM-2004-0427-01-MG.
- [190] **Roberts C.A., Benedict H.R., Hill N.S., Kjallenbach R.L. et Rottinghaus G.E. (2005).** Determination of ergot alkaloid content in tall fescue by nearinfrared spectroscopy. *Crop Science*. 45 : 778-783.
- [191] **Spiering M.J., Moon C.D., Wilkinson H.H. et Schardl C.L. (2005).** Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics*. 169 : 1403-1414.
- [192] **Prestidje R.A. et Gallagher R.T. (1988).** Endophyte confers resistance to ryegrass : Argentine stem weevil larval studies. *Ecological Entomology*. 13 : 429-435.

- [193] Miles C.O., Di Menna M.E., Jacobs S.W., Garthwaite I., Lane G.A., Prestidge R.A., Marshall S.L., Wilkinson H.H., Schardl C.L., Ball O.J. et Latch G.C. (1998). Endophytic fungi in indigenous Australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Appl and Environ Microbiol.* 64 : 601-606.
- [194] Calhoun L.A., Findrly J.A., Miller J.D. et Whitney N.J. (1992). Metabolites toxic to spuce budworm from balsam fir needle endophyte. *Mycological Research.* 96 : 281-286.
- [195] Lehtonen P., Helander M. et Saikkonen K. (2005). Are endophyte-mediated effects on herbivores conditional on soil nutrients? *Oecologia.* 142 : 38-45.
- [196] Daisy B.H., Strobel G.A., Castillo U., Ezra D., Sears J., Weaver D.K.J. et Runyon J. (2002). Napthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophyte fungus. *Microbiology.* 148 : 3737-3741.
- [197] Clay K. et Holah J. (1999). Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science.* 285 : 1742-1744.
- [198] Mitchell C.P., Millar C.S. et Minter D.W. (1978). Studies on decomposition of Scot's pine needles. *Tr. of British Mycological Society.* 71 : 343-348.
- [199] Osono T. (2006). Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Can J Microbiol.* 52 : 701-716.
- [200] Bradley D.J., Gilbert G.S. et Martiny J.B.H. (2008). Pathogens promote plant diversity through a compensatory response. *Ecology Letters.* 11 : 461-469.
- [201] Campbell C.K., Johnson E.M., Philpot C.M. et Warnock D.W. (1996). Identification of pathogenic fungi. *Public Health Laboratory Service.* 35 (1) : 76-77.
- [202] Badillet G., De Briève C. et Guého E. (1987). Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II. Ed : VARIA, Paris.
- [203] De Hoog G.S. et Guarro J. (1995). Atlas of clinical fungi, Centraalbureauvoor Schimmel cultures, Baarn, Pays-Bas.
- [204] Bayman P. (2007). Fungal Endophytes in the Environment. In Kubicek C.P. et Druzhinina I. S. Environmental and Microbial Relationships, 2^{ème} Ed : The Mycota IV Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p : 213-224.
- [205] Helander M.L., Sieber T.N., Petrini O. et Neuvonen S. (1994). Endophytic fungi in Scot's pine needles: spatial variation and consequences of simulated acid rain. *Can J of Bot.* 72 : 1108-1113.
- [206] Deckert R.J. (2000). Structural and ecological aspects of the relationship of phyllosphere fungi with their host *Pinus strobus* L. Thèse de doctorat. University of Guelph, Canada. 172 p.
- [207] Ganley R.J. et Newcombe G. (2006). Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research.* 110 : 318-327.
- [208] Zareb A. (2014). Contribution à l'étude des mycoendophytes foliaires du pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) de dayate Aiat (Timzerth, Laghouat, Algérie). Mémoire de magister. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Algérie. p : 41-77.

- [209] **Suryanarayanan T.S., Venkatesan G. et Murali T.S. (2003).** Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Current Science*. 85 (4) : 489-493.
- [210] **Kiffer E. et Morelet M. (1997).** Les deutéromycètes; classification et clés d'identification générique. Ed : INRA, Paris. 306p.
- [211] **Fisher P.J. et Petrini O. (1987).** Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticola*: a preliminary study. *Mycological Research*. 89 : 246-249.
- [212] **Ludwig J.A.y. et Reynolds J.F. (1988).** Statistical ecology: a primer on methods and computing. John Wiley and Sons. Nueva York, USA.
- [213] **Bernardi-Wenzel J., García A., Filho C.J.R., Prioli A.J. et Pamphile J.A. (2010).** Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biol Res*. 43 : 375-384.
- [214] **El-Nagerabi S.A.F., Elshafie A.E. et Alkhanjari S.S. (2013).** Endophytic fungi associated with *Ziziphus* species and new records from mountainous area of Oman. *Biodiversitas*. 14 (1) : 10-16.
- [215] **Benfoddil O. (2015).** Inventaire des champignons endophytes des feuilles de *Pistacia atlantica* Desf. De dayat El Gouffa (Laghouat, Algérie). Mémoire de magistère. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Algérie. 171p.
- [216] **Ouzid Y. (2018).** Activités biologiques et diversité en mycoendophytes des feuilles de *Peganum harmala* L. de la region de Laghouat (Algérie). Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie. 121p.
- [217] **Kuldán G. et Bacon C. (2008).** Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*. 46 : 57-71.
- [218] **Almut R. (2011).** Leaf-inhabiting endophytic fungi in the canopy of the leipzig flood plain forest. Thèse de doctorat. Université de Leipzig, Allemagne. 127p.
- [219] **Cabral D., Stone J.K. et Carroll G.C. (1993).** The internal mycoflora of *Juncus* ssp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. *Mycological Research*. 97 : 367-376.
- [220] **Durán E.L., Ploper L.D., Ramallo G.C., Piccolo-Grandi R.A., Giancoli A.C.H. et Azevedo J.L. (2005).** The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. *Rev can de bot*. 83 (4) : 350-355.
- [221] **Sanchez-Azofeifa A., Oki Y., Wilson-Fernandes G., Aaron-Ball R. et Gamon J. (2012).** Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. *Trees*. 26 : 291-299.
- [222] **García A., Rhoden S.A., Rubin-Filho C.J., Nakamura C.V. et Pamphile J.A. (2012).** Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. *Biol Res*. 45 : 139-148.
- [223] **Hata K., Atari R. et Sone K. (2002).** Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. *Mycoscience*. 43 : 369-373.
- [224] **Frohlich J., Hyde K.D. et Petrini O. (2000).** Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*. 104 : 1202-1212.

- [225] **Brown K.B., Hyde K.D. et Guest D.I. (1998).** Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Divers.* 1 : 27-58.
- [226] **Harzallah D., Benssaci O.A. et Bouharati S. (2009).** endophytic mycoflora of atlas cedar (*Cedrus atlantica* man.) in Belezma massif (Aures, Algeria). AFPP - 9ème conférence internationale sur les maladies des plantes tours - 8 et 9 décembre 2009. p : 159-167.
- [227] **Khan R., Shahzad S., Choudhary M.I., Khan S.A. et Ahmad A. (2010).** Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pakistan Journal of Botany.* 42 : 1281-1287.
- [228] **Gong L.J. et Guo S.X. (2009).** Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology.* 8 : 731-736.
- [229] **Göre M.E. et Bucak C. (2007).** Geographical and seasonal influence on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. *Forest Pathol.* 37 : 281-288.
- [230] **Fitt B.D.L., McCartney H.A. et Walkate P.J. (1989).** The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annual Review of Phytopathology.* 27 : 241-270.
- [231] **Todd D. (1988).** The effects of host genotype, growth rate, and needle age on the distribution of a mutualistic, endophytic fungus in Douglas-fir plantations. *Canadian J of Forest Research.* 18 : 601-605.
- [232] **Kumaresan V. et Suryanarayanan T.S. (2002).** Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research.* 105 : 1388-1391.
- [233] **Jumpponen A. et Jones K.L. (2009).** Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytol.* 184 : 438-448.
- [234] **Kembel S.W. et Mueller R.C. (2014).** Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities. *Botany.* 92 (4) : 303-311.
- [235] **Rivera-Orduña F.N., Sanchez R.A.S., Bustamante Z.R.F., Rodriguez J.N.G. et Cotera L.B.F. (2011).** Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity.* 47 : 65-74.
- [236] **Buee M., Reich M., Murat C., Morin E., Nilsson R.H., Uroz S. et Martin F. (2009).** 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist.* 184 : 449-456.
- [237] **Nosanchuk J.D. et Casadevall A. (2006).** Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 50 : 3519-3528.
- [238] **Bell A.A. et Wheeler M.H. (1986).** Biosynthesis and functions of melanins. *Annu Rev Phytopathol.* 24 : 411-451.
- [239] **Butler J.M., Day A.W., Henson J.M. et Money N.P. (2001).** Pathogenic properties of fungal melanins. *Mycologia.* 93 : 1-8.
- [240] **Shikha T. (2017).** Study of phylloplane mycoflora of some selected medicinal plants. *Int J of Appl Biol and Pharm Tech.* 8 (2) : 1-7.
- [241] **Chalfoun S.M. et Batista L.R. (2003).** Fungos associados a frutos egrãos de café *Aspergillus & Penicillium*. *Brasília EMBRAPA.* 69p.

- [242] **Barbosa R.N., Bezerra J.D.P., Costa P.M.O. et al. (2016).** *Aspergillus* and *Penicillium* (Eurotiales: Trichocomaceae) in soils of the Brazilian tropical dry forest: diversity in an area of environmental preservation. *Int J Trop Biol.* 64 (1) : 45-53.
- [243] **Petit P., Lucas E.M.F., Abreu L.M., Pfenning L.H. et Takahashi J.A. (2009).** Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology.* 12 : 1-9.
- [244] **Mohanta J., Tayung K. et Mohapatra U. (2008).** Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology.* 5 : 2p.
- [245] **Ilyas M., Kanti A., Jamal Y., Hertina et Agusta A. (2009).** Biodiversity of endophytic fungi associated with *Uncaria gambier* roxb. (Rubiaceae) from West Sumatra. *Biodiversitas.* 10 : 23-28.
- [246] **Abdel-Motaal F.F., Nassar M.S.M., El-Zayat S.A., El-Sayed M.A. et Ito S.O. (2010).** Antifungal activity of endophytic fungi isolated from egyptian Henbane (*Hyoscyamus muticus*). *Pak J Bot.* 42 (4) : 2883-2894.
- [247] **Nagaraja T.G. et Devkar P.G. (2010).** Seasonal occurrence of endophytic mycoflora of inner bark of medicinal plant *Acacia catechu* willd. *The Bioscan.* 5 : 243-245.
- [248] **Shankar N.B. et Shashikala J. (2010).** Diversity and structure of fungal endophytes in some climbers and grass species of Malnad region, Western Ghats, Southern India. *Mycosphere.* 1 : 265-274.
- [249] **De Cal A., Pascual S. et Melgarejo P. (1995).** Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Pathol.* 44 : 909-914.
- [250] **Larena I. et Melgarejo P. (1993).** The lytic enzymatic complex of *Penicillium purpurogenum* and its effects on *Monilinia laxa*. *Mycological Research.* 97 : 105-110.
- [251] **Yuan Z.L., Chen Y.C. et Ma X.J. (2011).** Symbiotic fungi in roots of *Artemisia annua* with special reference to endophytic colonizers, Plant Biosystems. *Offi J of the Soc Bota Italiana.* 145 (2) : 495-502.
- [252] **Davis R.A., Longden J., Avery V.M. et Healy P.C. (2008).** The isolation, structure determination and cytotoxicity of the new fungal metabolite, trichodermamide C. *Bioorg Med Chem Let.* 18 : 2836-2839.
- [253] **Lubertozzia D. et Keasling J.D. (2009).** Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression . *Biotechnology Advances.* 27 : 53-75.
- [254] **Morin O. (1994).** *Aspergillus* et aspergilloses: biologie. Ed : Techniques Encyl Med Chir. (Elsevier, Paris). *Maladies infectieuses.* 8-600-A-10.
- [255] **Papavizas G.C. (1985).** *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann Rev Phytopathol.* 23 : 23-54.
- [256] **Baruch S., Suha J.H., Stephen N. et Gerda D., (1996).** *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Springer-Science+Business Media. B.V. 481 : 4597-3.
- [257] **Euveh G.A. et Ogbebor N.O. (2008).** Use of phylloplane fungi as biocontrol agent against *Collectotrichum* leaf disease of rubber (*Hevea brasiliensis*). *African J Biotechnol.* 7 (15) : 2569-2572.

- [258] **Nur A. (2013 a).** Diversity of endophytic fungi from root of Maize var. Pulut (waxy corn local variety of South Sulawesi, Indonesia). *Int J of Curr Microbiol and App Sci.* 2 (8) : 148-154.
- [259] **Nur A. (2014).** The use of fungal endophytes *Gliocladium spp.* in different concentration to control of root-knot nematode *Meloidogyne spp.* *Academic Research International.* 5 (2) : 91-95.
- [260] **Harris A.R. et Lumsden R.D. (1997).** Interactions of *Gliocladium virens* with *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* in non-sterile potting medium. *Biocontrol Sci Technol.* 7 : 37-47.
- [261] **Crous P.W., Braun U., Schubert K. et Groenewald J.Z. (2007).** Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology.* 58 : 33-56.
- [262] **Dugan F.M., Schubert K. et Braun U. (2004).** Check-list of *Cladosporium* names. *Schlechtendalia.* 11 : 1-103.
- [263] **Saithong P., Panthavee W., Stonsaovapak S. et Congfa L. (2010).** Isolation and primary identification of endophytic fungi from *Cephalotaxus mannii* trees. *Maejo Int J of Sci and Tech.* 4 : 446-453.
- [264] **El-Morsy E.M. (2000).** Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. *Fungal Diversity.* 5 : 43-54.
- [265] **Laib D. (2014).** Etude de l'activité insecticide du champignon endophyte *Cladosporium sp.* isolé du Laurier rose *Nerium oleander L.* (Apocynaceae, Gentianales) sur la bruche des haricots *Acanthoscelides obtectus Say* (Coleoptera, Bruchidae). *Nature & Technologie.* 10 : 3-44.
- [266] **Aveskamp M.M., De Gruyter J. et Crous P.W. (2008).** Biology and developments in the systematics of *phoma*, a complex genus of major significance. *Fungal Diversity.* 31 : 1-18.
- [267] **Pandey A.K., Reddy M.S. et Suryanarayanan T.S. (2003).** ITS-RFLP and TTS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. *Mycological Research.* 107 : 439-444.
- [268] **Murali T.S., Suryanarayanan T.S. et Geeta R. (2006).** Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. *Can J Microbiol.* 52 : 673-680.
- [269] **Sieber T.J. (2007).** Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews.* 21 : 75-89.
- [270] **Rajagopal R., Kalavathy S. et Kokila S. (2010).** Diversity of fungal endophytes in few medicinal herbs of southern India. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences.* 1 : 415-418.
- [271] **Strobel G., Singh S.K., Riyaz-Ul-Hassan S., Mitchell A.M., Geary B. et Sears J. (2011).** An endophytic/pathogenic *Phoma sp.* from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential FEMS. *Microbiol Lett.* 320 : 87-94.
- [272] **Chen J., Wang H. et Guo S.X. (2012).** Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza.* 22 : 297-307.
- [273] **Hoffman A.M., Mayer S.G., Strobel G.A., Hess W.M., Sovocool G.W., Grange A.H. et al. (2008).** Purification, identification and activity of phomodione, a furan dione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochemistry.* 69 : 1049-1056.

- [274] Rocha R., Eleutério Da Luz D., Engels C., Pileggi S.A.V., Jaccoud Filho D.S., Matiello R.R. et Pileggi M. (2009). Selection on endophytic fungi from confrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). *Braz J Microbiol.* 40 (1) : 73-78.
- [275] Jariwal B. et Desai B. (2018). Isolation and identification of endophytic fungi from various medicinal plants. *BMR Microbiology.* 4.
- [276] D'halewyn et Chevalier (2016). *Acremonium spp.* INSPQ. Centre d'expertise et de référence en santé publique sur : www.inspq.qc.ca.
- [277] Wicklow D.T., Roth S., Deyrup S.T. et Gloer J.B. (2005). A protective endophyte of maize : *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research.* 109 : 610-618.
- [278] Yu D., Toda Y., Kuwada K., Cruz A.F. et Ishii T. (2009). Effect of volatile compounds in shoots and leaves of bahiagrass, *Vulpia myuros* and *Vulpia megalura* on the growth of several kinds of soil-borne plant pathogens and beneficial microorganisms. *Japanese Society of Agricultural Technology Management.* 16 : 29-35.
- [279] Munchan C., Kurata O., Wada S., Hatai K., Sano A., Kamei K. et Nakaoka N. (2009). *Exophiala xenobiotica* Infection in Cultured Striped Jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider), in Japan. *Journal of Fish Diseases.* 32 (10) : 893-900.
- [280] Zhang C.L., Zheng B.Q., Lao J.P., Mao L.J., Chen S.Y., Kubieek C.P. et Lin F.C. (2008). Clavatul and patulin formation as the antagonistic principle of *Aspergillus clavatonanicus*, an endophytic fungus of *Taxus maieri*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78 : 833-840.
- [281] Li T., Liu M.J., Zhang X.T., Zhang H.B., Sha T. et Zhao Z.W. (2011). Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a Dark Septate Endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of The Total Environment.* 409 (6) : 1069-1074.
- [282] Diao Y.H., Li T. et Zhao Z.W. (2013). Zinc accumulation characteristics of two *Exophiala* strains and their antioxidant response to Zn^{2+} stress. *Journal of Environmental Protection.* 4 : 12-19.
- [283] Bills G.F. (1996). Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. *Endophytic fungi in grasses and woody plants.* (ed : S.C. Erdlin, L.M. Carris). APS Press, USA. p : 31-65.
- [284] Aly A.H., Edrada-Ebel R., Indriani I.D. et al. (2008a). Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria sp.* and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J Nat Prod.* 71 : 972-980.
- [285] Kjer J., Wray V., Edrada-Ebel R., Ebel R., Pretsch A., Lin W. et Proksch P. (2009). Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria sp.* isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. *J Nat Prod.* 72 : 2053-2057.
- [286] Hoffmann K., Discher S. et VOIGT K. (2007). Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia spp.* form a coherent group, Mycocladiaceae fam. nov. *Mycological Research.* 111 : 1169-1183.

- [287] **Benny G.L., Humber R.A. et Morton J.B. (2001).** Zygomycota: zygomycetes. In **McLaughlin D.J., McLaughlin E.G. et Lemke P.A.** Ed : The Mycota. Part A. Systematics and Evolution. Vol VII. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. p : 113-146.
- [288] **Aapola U., Viitala K., Potila H., Savonen E.M., Huhtala A., Sarjala T. et Uusitalo H. (2011).** Endophytic fungus *Phialophora lignicola* extract efficiently protects ATPE-19 cells against oxidative stress. *Investigative ophthalmology and visual science*. 52 : 5656.
- [289] **Nalli Y.K., Mirza D.N., Wani Z.A. et Wadhwa B. (2015).** Phialomustin A-D, new antimicrobial and cytotoxic metabolites from an endophytic fungus, *Phialophora musteca*. *RSC Advances*. 5 : 95307-95312.
- [290] **Walsh J.L., Laurence M.H., Liew E.C.Y. et al. (2010).** *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. *Fungal Diversity*. 44 : 149-159.
- [291] **Boyle C., Götz M., Dammann-Tugend U. et Schulz B. (2001).** Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. *Symbiosis*. 31 : 259-281.
- [292] **Deckert R.J. et Peterson R.L. (2000).** Distribution of foliar fungal endophytes of *Pinus strobus* between and within host trees. *Canadian Journal of Forest Research*. 30 : 1436-1442.
- [293] **Paul N.C., Deng J.X., Lee J.H. et Yu S.H. (2013).** New Records of Endophytic *Paecilomyces inflatus* and *Bionectria ochroleuca* from Chili Pepper Plants in Korea. *Mycobiology*. 41 (1) : 18-24.
- [294] **Zhu Z.X. et Zhuang W.Y. (2015).** *Trichoderma (Hypocrea)* species with green ascospores from China. *Persoonia*. 34 : 113-129.
- [295] **Mishra R.C., Singh R., Singh H.B. et al. (2000).** *In situ* efficacy of *Trichoderma harzianum* as mycoparasite on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Tropical Agriculture*. 77 : 205-206.
- [296] **Cheng F., Li W., Zhou Y., Shen J., Wu Z., Liu G., Lee P.W., Tang Y. et Admet S.A.R. (2012).** A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J Chem Inf Model*. 52 (11) : 3099-3105.
- [297] **Gromovich T.I., Gukasian V.M., Golovanova T.I. et al. (1998).** *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. as a factor enhancing tomato plants' resistance to the root rotting pathogens. *Mikologiya i Fitopatologiya*. 32 : 73-78.
- [298] **Hanada R.E., Jorge-Souza T.D., Pomella A.W.V. et al. (2008).** *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycological Research*. 112 : 1335-1343.
- [299] **Nsereko V.L., Beauchemin K.A., Morgavi D.P. et al. (2002).** Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Canadian Journal of Microbiology*. 48 : 14-20.
- [300] **Degenkolb T., Döhren H.V., Nielsen K.F. et al. (2008).** Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity*. 5 : 671-680.

- [301] **Sawant I.S. (2014).** *Trichoderma*- foliar pathogen interactions. *The Open Mycology Journal*. 8 : (Suppl-1, M3) : 58-70.
- [302] **Chen L.Z., Chen J.M., Zheng X.S., Zhang J.F. et Yu X.P. (2007).** Identification and antifungal activity of the metabolite of endophytic fungi isolated from *Ll ex cornuta*. *Chinese Journal of Pesticide Science*. 9 (2) : 143-148.
- [303] **Rasmussen H.N. (1994).** The roles of fungi in orchid life history. In **Pridgeon A.** ed : Proc. 14th WOC, Glasgow. Her Majesty's Stationary Office, London. p : 130-137.
- [304] **De Hoog G.S., Guarro J., Gené J. et Figueras M.J. (2000).** Atlas of clinical fungi. 2^a edición. Utrecht & Reus, Centraalbureau voor Schimmelcultures. Universitat Rovira i Virgili.
- [305] **Martini M., Musetti R., Grisan S., Polizzotto R., Borselli S., Pavan F. et Osler R. (2009).** DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Dis*. 93 : 993-998.
- [306] **Tran H.B.Q., McRae J.M., Lynch F. et Palombo E.A. (2010).** Identification and bioactive properties of endophytic fungi isolated from phyllodes of *Acacia* species. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Ed : Méndez-Vilas A. p : 377-382.
- [307] **Arzanlou M. et Khodaei S. (2012).** *Bipolaris spicifera* isolates with unusual conidial germination pattern on sunflower from Iran. *Plant Pathology & Quarantine*. 2 (1) : 64-68.
- [308] **Zalar P., Gostinčar C., De Hoog G.S., Uršič V., Sudhadham M. et Gunde-Cimerman N. (2008).** Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol*. 61 : 21-38.
- [309] **Felice D.V.D., Solfrizzo M., De Curtis F., Lima G., Visconti A. et Castoria R. (2008).** Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology*. 98 : 1261-1270.
- [310] **Velmurugan R., Ramesh V., Meenatchi A., Bagyalakshmi. et Rajendran A. (2017).** Endophytic Mycodiversity of Sacred Tree-*Couroupita guianensis* Aubl. *Studies in Fungi*. 2 (1) : 119-129.
- [311] **Sandoval-Denis M., Gené J., Sutton D.A., Cano-Lira J.F., De Hoog G.S., Decock C.A., Wiederhold N.P. et Guarro J. (2016).** Redefining *Microascus*, *Scopulariopsis* and allied genera. *Persoonia*. 36 : 1-36.
- [312] **Lacap D.C., Hyde K.D. et Liew E.C.Y. (2003).** An evaluation of the fungal morphotype concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*. 12 : 53-66.
- [313] **Rajagopal K. et Suryanarayanan T.S. (2000).** Isolation of endophytic fungi from leaves of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Current Science*. 78 : 1375-1377.
- [314] **Suryanarayanan T.S., Kumaresan V. et Johnson J.A. (1998).** Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Canadian Journal of Microbiology*. 44 : 1003-1006.
- [315] **Selim K.A., El-Beih A.A., El-Rahman T.M. et El-Diwany A.I. (2012).** Biology of Endophytic Fungi. *Curr Res in Env & App Mycology*. 2 (1) : 31-82.
- [316] **Santos R.M.G., Rodrigues F.O.E., Rocha W.C. et Teixeira M.F.S. (2003).** Endophytic fungi from *Melia azedarach*. *World J Microbiol Biotechn*. 19 : 767-770.

- [317] **Abdullah S.K., Al-Khesraji T.O. et Al-Edany T.Y. (1986).** Soil mycoflora of the southern desert of Iraq. *Sydowia*. 39 : 8-11.
- [318] **Samaniego-Gaxiola J.A. et Chew-Madinaveitia Y. (2007).** Diversidad de géneros de hongos en suelo en tres campos con diferentes condiciones agrícolas en la Laguma, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78 : 383-390.
- [319] **Kettering M., Sterner O. et Anke T. (2004).** Antibiotics in the Chemical Communication of Fungi. *Z. Naturforsch.* 59c : 816-823.
- [320] **Vivas N., De Gaulejac N.S.C., Doneche B. et Glories Y. (1997).** Incidence de séchage naturel de *Quercus petraea* Liebl. et *Quercus robur*. Sur la diversité de la flore fongique en place et sur quelques aspects de son écologie. *J Sci Tech.* 3 : 17-25.
- [321] **Chun E., Han C.K., Yoon J.H., Sim T.B., Kim Y.K. et Lee K.Y. (2005).** Novel inhibitors targeted to methionine aminopeptidase 2 (MetAP2) strongly inhibit the growth of cancers in xenografted nude model. *International Journal of Cancer*. 114 : 124-130.
- [322] **Fabiana A.C., Mônica C.P.M., Daiani M.D.S., Marcelo Â.C. et Luis R.B. (2013).** biodiversity of filamentous fungi in coffee beans grown in an organic and conventional system. *Coffee Science*. 8 (2) : 122-129.
- [323] **Samson R.A., Visagie C.M., Houbraken J. et al. (2014).** Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78 : 141-173.
- [324] **Kulling-Gradinger C.M., Szakacs G. et Kubicek C.P. (2002).** Phylogenetic and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*. 155 : 1-9.
- [325] **Rosa L.H., Tabanca N., Techen N., Pan Z., Wedge D.E. et Moraes R.M. (2012).** Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smilax glabra* maintained *in vitro* as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. *Can J Microbiol.* 58 : 1202-1211.
- [326] **Eisenhauer N. (2012).** Aboveground-belowground interactions as source of complementary effect in biodiversity experiments. *Plant Soil*. 35 (1) : 1-22.
- [327] **Pawłowska J., Wilk M., Śliwińska-Wyrzychowska A., Mętrak M. et Wrzosek M. (2014).** The diversity of endophytic fungi in the above-ground tissue of two *Lycopodium* species in Poland. *Symbiosis*. 63 : 87-97.
- [328] **Stone J.K. (1987).** Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglasfir. *Canadian Journal of Botany*. 65 : 2614-2621.
- [329] **International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan. (2012).** Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 : http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- [330] **Larsen T.O., Smedsgaard J., Nielsen K.F., Hansen M.E. et Frisvad J.C. (2005).** Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports*. 22 : 672-695.
- [331] **Baker D., Mocek U. et Garr C. (2000).** Natural products vs. combinatorials: A case study. *Biodiversity*. p : 66-72.

- [332] **Sebastianes F.L.S., Cabedo N., Aouad N.E., Valente A.M.M.P., Lacava P.T., Azevedo J.L., Pizzirani-Kleiner A.A. et Cortes D. (2012).** 3-Hydroxypropionic acid as an antibacteria agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. *Curr Microbiol*. Doi : 10.1007/s002834-012-0206-4.
- [333] **Cragg G.M. et Newman D.J. (2005).** Biodiversity : A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*. 77 (1) : 7-24.
- [334] **Kliebenstein D.J. (2004).** Secondary metabolites and plant/ environment interaction : a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses; plant. *Cell & Environment*. 27 (6) : 675-684.
- [335] **Williams D.H., Stone M.N.J., Hauck P.S. et Rahaman S.K.J. (1989).** Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesis ? *Journal of Natural Products*. 53 (6) : 1189-1208.
- [336] **Bérdy J. (2005).** Bioactive microbial metabolites: A personal view. *The J of Antibiotics*. 58 : 1-26.
- [337] **Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Natha. Paris. 128p.
- [338] **Yu J. et Keller N. (2005).** Regulation of secondary metabolites in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 43 : 437-458.
- [339] **Arnold L.D. (1986).** Regulation of secondary metabolites in fungi. *Pur App Chem*. 58 (2) : 219-226.
- [340] **Garraway M.O. et Evans R.C. (1984).** Secondary metabolites. In : fungal nutrition and physiology. *John Wiley & Sons New York*. p : 336-366.
- [341] **Keller N.P. et Woobok J. (2005).** Aglobal regulatory secondary metabolite bio synthesis in fungi. Ed : Warfe.
- [342] **Demain A. et Fang A. (2000).** The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 69 : 1-39.
- [343] **Calvo A.M., Wilson R.A., Bock J.W. et Keller N.P. (2002).** Relationship between secondary metabolites and fungal development. *Microbiol Mol Bio Rev*. 66 : 447-459.
- [344] **Turner W.B. (1976).** Polyketides and related metabolites. The filamentous fungi. In **Smith J.E. et Berry D.R.** Ed : New York. 2 : 445-4474.
- [345] **Zhang Y., Brock M. et Keller N.P. (2004).** Connection of propionyl-CoA metabolism to polyketide biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 168 : 785-794.
- [346] **Strobel G.A., Miller R.V., Martinez-miller C., Condrón M.M., Teplow D.B. et Hess W.M. (1999).** Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* f. *quercina*. *Microbiology*. 145 : 1919-1956.
- [347] **Ramos H.P., Braun G.H., Pupo M.T. et Said S. (2010).** Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc., and *Papulaspora immersa*. *Braz Arch Biol Technol*. 53 (3) : 629-632.
- [348] **Pastre R., Marinho A.M.R., Rodrigues-Filho E., Souza A.Q.L. et Odair Pereira J. (2007).** Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarache* *Murraya paniculata*. *Quim Nova*. 30 : 1867-1871.

- [349] **Larpant J.P. et Larpant-Gourguand M. (1996).** Mémento Technique de microbiologie, 2^{ème} Ed. Technique et Documentation. Lavoisier. In Zerroug A. (2011).
- [350] **Li J.Y. et Strobel G.A. (2001).** Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*. 57 : 261-265.
- [351] **Silva G., Tales H., Trevisan H., Bolzani V., Young M.C.M., Pfenning L., Egerlin M., Haddad R., Costa-Neto C. et Araujo A. (2005).** New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 16 (6) : 1463-1466.
- [352] **Brady S.F. et Clardy J. (2000).** CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products*. 63 : 1447-1448.
- [353] **Stierle A., Strobel G.A. et Stierle D. (1993).** Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 260 : 214-216.
- [354] **Miller W.R. (2002).** Regulatory subunits of PKA and breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 968 : 37-48.
- [355] **Li J.Y., Strobel G.A., Sidhu R., Hess W.M. et Ford E.J. (1996).** Endophytic Taxol producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*. 142 : 22-26.
- [356] **Strobel G.A., Hess W.M. et Li J.Y. (1997).** *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany*. 45 : 1073-1082.
- [357] **Li J.Y., Sidhu R.S., Ford E., Hess W.M. et Strobel G.A. (1998).** The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia sp.* from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20 : 259-264.
- [358] **Wang X.Q., Tank D.C. et Sang T. (2000).** Phylogeny and divergence times in Pinaceae ; evidence from genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 17 (5) : 773-781.
- [359] **Strobel G.A., Ford E., Worapong J., Harper J.K., Arif A.M., Grant D., Fung P.C.W. et Chan K. (2002).** *Pestalotiopsis microspora* isolates and compounds derived there from. *Phytochemistry*. 60 : 179-183.
- [360] **Kumaran R.S., Muthumary J. et Hur B.K. (2008).** Production of taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus sp.* *Engineering in Life Sciences*. 8 : 438-446.
- [361] **Gangadevi V. et Muthumary J. (2008).** Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24 : 717-724.
- [362] **Pandi M., Manikandan R. et Muthumary J. (2010).** Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague dawley rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 64 : 53.
- [363] **Lee J.C., Strobel G.A., Lobkovsky E. et Clardy J. (1996).** Torreyanic acid : Aselective cytotoxic quinine dimmer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *Journal of Organic Chemistry*. 61 (10) : 3232-3233.

- [364] **Fasla B. (2009).** Evaluation du potentiel antimittotique et génotoxique de plantes médicinales et analyse phytochimique. Université d'Oran Es-sénia, Algérie. p : 42-64.
- [365] **Monassier L. (2012).** Les anticancéreux. Chapitre 22 Chimiothérapie Anticancéreuse Pharmacologie DCEM3 Strasbourg. 30p.
- [366] **Berthet J. (2006).** Dictionnaire de biologie. Ed : De Boeck université. 1046p.
- [367] **Epsie M., Extra J.M., Cottu P.H., Cuvier C., Marty M. et Schorderet M. (1998).** Médicaments anticancéreux. 69 : 917-945.
- [368] **Follézou J.Y. et Pouillart P. (1980).** Précis de chimiothérapie anticancéreuse. Ed : Doin, Paris. p : 44-83.
- [369] **Gorin N.C., Philip T. et Symann M. (1996).** Manuel pratique d'héματο-cancérologie et de chimiothérapie. Ed : Frison-Roche, Paris. p : 13-20.
- [370] **Maillet M. (1977).** Abrégé de cytologie. Ed : Masson, Paris. p : 12-14.
- [371] **Maussang G. (2005).** Rapport ENS. www.eleves.ens.fr/home/maussang/index.html.
- [372] **Garrett R.H. et Grisham C.M. (2000).** Biochimie. Ed : De boeck université. p : 1950-1962.
- [373] **Hartwell J.L. (1982).** Plants used against cancer. Quarterman, Lawrence, M.A. *In Cragg et al. 2005.*
- [374] **Bergnes G., Brejc K. et Belmont L. (2005).** Mitotic kinesins : prospects for antimittotic drug discovery. *Curr Top Med Chem.* 5 (2) : 127-145.
- [375] **Marcus A., Peters U., Thomas S.L., Garrett S., Zelnak A., Kapoor T.M. et Giannakakou P. (2005).** Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in taxol resistant and sensitive cancer cells. *J. Biol. Chem.* 280 (12) : 11569-11577.
- [376] **Stearns M. et Tew K. (1985).** Antimicrotubule effects of estramustine, an antiprostatic tumor drug. *Cancer Res.* 45 (8) : 3891-3897.
- [377] **Meijer L., Kunockaert M. et Damiens E. (2001).** Prévention, par un inhibiteur de kinases cycline-dépendantes, de l'alopecie induite par la chimiothérapie. *Bulletin de Cancer.* 88 (4) : 347-350.
- [378] **Bennett J.E. (2001).** Antifungal agents. *In Goodman et Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* Hardman J.G., Limbird L.E., Gilman A.G. Mc Graw-Hill companies, Inc. Chapter 49. p : 1295-1312.
- [379] **Devaraju R. et Satish S. (2011).** Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian Journal of Experimental Sciences.* 2 : 75-79.
- [380] **Shweta S., Khadabadi S. et Ganesh T.G. (2012).** *In vitro* antimittotic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanol extract of *Revia hypocrateriformis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* S503-S506.
- [381] **Glinska S., Bartezak M., Oleksiak S., Wolska A., Gabara B., Posmyk M. et Janas K. (2007).** Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa*. Roots treated with heavy metals. *Ecotoxicology and environmental safety.* 68 : 343-350.

- [382] Ikeda K., Pant B., Mishiro A., Ozawa K., Masujina T. et Sugiyana M. (2000). A convenient method for the evaluation of anti-tumor agents affecting the cell cycle. *Journal of bioscience and bioengineering*. 90 (5) : 574-576.
- [383] Subhadradevi V., Khairunissa K., Asokkumar K., Umamaheswari M., Sivashanmugam A. et Jagannath P. (2011). Induction of apoptosis and cytotoxic activities of *Apium graveolens* Linn. using *in vitro* models. *Middle-East J Sci Res*. 9 : 90-94.
- [384] Channabasava. et Melappa G. (2014). First report of anticancer agent, lapachol producing endophyte, *Aspergillus niger* of *Tabebuia argentea* and its *in vitro* cytotoxicity assays. *Bangladesh J Pharmacol*. 9 : 129-139.
- [385] Arivudainambi U.S., Ezhil A.K.K., Kotamraju S., Karunakaran C. et Aajendran A. (2014). Antibacterial effect of an extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* and its cytotoxic activity on MCF-7 and MDA MB-231 tumour cell lines. *Biological Lett*. 51 (1) : 7-17.
- [386] Nuangmek W., McKenzie E.H.C. et Lumyong S. (2008). Endophytic fungi from wild banana (*Musa acuminata* Colla) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*. *Research Journal of Microbiology*. 3 : 368-374.
- [387] Ting A.S.Y., Mah S.W. et Tee C.S. (2009). Prevalence of Endophytes Antagonistic Towards *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Cubense* Race 4 in Various Plants. *Am -Eurasian J Sustain Agric*. 3 : 399-406.
- [388] Ladjal S. (2012). Activité antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de la région de M'sila. Université de Sétif, Algérie. p : 44-45.
- [389] Rahal K., Aggoune N., Ammari H., Assaous F., Benamrouche N., Benslimani A., Mohammedi D., Ouar M. et Tali-Maamar H. (2013). Les antibiotiques. Office des Publications Universitaires. Algérie. Ed : 5453. 165p.
- [390] Madki M.A., Manzoor A.S., Powar P.V. et Patil K.S. (2010). Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. *Int Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2 : 848-858.
- [391] Voelker F. et Altaba S. (2001). Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*. 147 : 2447-2459.
- [392] Huang F., Buschman L.L., Higgins R.A. et McGaughey W.H. (1999). Inheritance resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science*. 284 : 965-970.
- [393] Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N. (2005). Activité antifongique d'une souche d'actinomadura d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de mycologie médicale*. 15 : 211-219.
- [394] Gogoi D.K., Mazumder S., Saikia R. et Bora T.C. (2008). Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea spp.* NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. In North-Est India. *Journal de mycologie médicale*. 18 : 1-9.

- [395] **Qin J.C., Zhang Y.M., Gao J.M., Bai M.S., Yang S.X., Laatsch H. et Zhang A.L. (2009).** Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum* endophytic fungus isolates from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 19 : 1572-1574.
- [396] **Verdier-Pinard P., Lansiaux A. et Bailly C. (2001).** Combretastatin A4 phosphate. *Bulletin du cancer*. 88 (3) : 235-239.
- [397] **Thenmozhi A. et Mahadeva Rao U.S. (2011).** Evaluation of antimitotic activity of *Solanum torvum* using *Allium cepa* root meristamatic cells and anticancer activity using MCF-7- human mammary gland breast adenocarcinoma cell lines. *Drug Invention Today*. 3 (12) : 290-296.
- [398] **Visalakchi S. et Muthumary J. (2010).** Taxol (anticancer drug) producing endophytic fungi: An overview. *Int J Pharma Bio Sci*. 1 : 1-9.
- [399] **Wuerzberger S.M., Pink J.J., Planch S.M., Byers K.L., Bornmann W.G. et Boothman D.A. (1998).** Induction of apoptosis in MCF-7: WS8 breast cancer cells by / β -lapachone1. *Cancer research*. 58: 1876-1885.
- [400] **Marcano L., Carruyo I., Fernandez Y., Montriel X. et Torrealba Z. (2006).** Determination of vanadium accumulation in onion root cells (*Allium cepa* L.) and its correlation with toxicity. *biocell*. 30 (2) : 259-267.
- [401] **Schulz B., Draeger S., Dela Cruz T.E., Rheinheimer J., Siems K., Loesgen S., Bitzer J., Schloerke O., Zeeck A., Kock I., Hussain H., Dai J. et Krohn K. (2008).** Screening strategies for obtaining novel, biologically active, fungal secondary metabolites from marine habitats. *Botanica Marina*. 51 : 219-234.
- [402] **Levan A. (1938).** The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*. 24 : 471-486.
- [403] **Krings M., Taylor T.N., Galtier J. et Dotzler N. (2010).** Microproblematic endophytes and epiphytes of fern pinnules from the Upper Pennsylvanian of France. *Geobios*. 43 : 503-510.
- [404] **Strobel G.A. et Daisy B. (2003).** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67 : 491-502.
- [405] **Porrás-Alfaro A. et Bayman P. (2011).** Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol*. 49 : 291-315.
- [406] **Cannon P.F. et Simmons C.M. (2002).** Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia*. 94 (2) : 210-220.
- [407] **Jumpponen A. et Jones K.L. (2010).** Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytol*. 186 : 496-513.
- [408] **Rubini M.R., Silva-Ribeiro R.T., Pomella A.W.V., Maki C.S., Araujo W.L., Santos D.R.D. et Azevedo J.L. (2005).** Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci*. 1 : 24-33.
- [409] **Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P. et Putten W.H. (2013).** Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 11 : 789-799.

- [410] **Soussi A., Ferjani R., Marasco R., Guesmi A., Cherif H., Rolli E., Mapelli F., Ouzari H.I., Daffonchio D. et Cherif A. (2015).** Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant and Soil*. 4 : 55-14.
- [411] **Marié Criel W., Swart W.J. et Crous P.W. (2000).** Foliar endophytes and their interactions with host plants, with specific reference to the *Gymnospermae*. *Botanical research*. 33 : 34p.
- [412] **Wang Y. et Guo L.D. (2007).** A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. *Can J Bot*. 85 : 911-917.
- [413] **Sun X., Guo L.D. et Hyde K.D. (2011).** Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity*. 47 : 85-95.
- [414] **Barrow J.R., Lucero M.E., Vera I.R. et Havstad K.M. (2008).** Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress ? *Communicat & Integrat Biology*. 1 (1) : 69-73.
- [415] **Barrow J.R. (2003).** Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*. 13 : 239-247.
- [416] **Kursari S., Hertweck C. et Spiteller M. (2012).** Chemical ecology of endophytic fungi : origins of secondary metabolites. *Chemistry et Biology*. 19.
- [417] **Scherlach K. et Hertweck C. (2009).** Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org Biomol Chem*. 7 : 1753-1760.
- [418] **Adams M.R. et Moss M.O. (2002).** Toxingenic fungi in "food microbiology" RSC, UK. 282-301.
- [419] **Cui H.B., Mei W.L., Miao C.D., Lin H.P., Hong K. et Dai H.F. (2008).** Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium sp.*0935030 of mangrove plant *Acrostichum aureum*. *Chinese Journal of Antibiotics*. 33 : 407-410.
- [420] **Ogundare A.O., Adetuyi F.C. et Akinyosoye F.A. (2006).** Antimicrobial activities of *Vernonia tenoreana*. *African Journal of Biotechnology*. 5 : 1663-1668.
- [421] **Rdji M., Sumiati A., Rachmayani R. et Elya B. (2011).** Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangostana* and their antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*. 10 : 103-107.
- [422] **Sutjaritvorakul T., Whalley A.J.S., Sihanonth P. et Roengsumran S. (2011).** Antimicrobial activity from endophytic fungi isolated from plant leaves in Dipterocarpaceae forest at Viengsa district Nan province, Thailand. *Journal of Agricultural Technology*. 7 : 115-121.
- [423] **Kumara C.G., Mongollaa P., Josepha J., Nageswara Y.V.D. et Kamal A. (2010).** Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India . *Journal of Medical Mycology*. 20 : 283-289.
- [424] **Brady S.F., Bondi S.M. et Clardy J. (2001).** The guanacastepenes: a highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. *J of the American Chem Soci*. 123 : 9900-9901.
- [425] **Han Z., Mei W.L., Cui H.B., Zeng Y.B., Lin H.P. et Hong K. (2008).** Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium sp.* of mangrove plant *Cerbera manghas*. *Chemical Journal of Chinese Universities*. 29 : 749-752.

- [426] **Maria G.L., Sridhar K.R. et Raviraja N.S. (2005).** Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*. 1 : 67-80.
- [427] **Feng G.H. et Leonard T.J. (1998).** Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl Environ Microbiol*. 64 : 2275-2277.
- [428] **Glienke C., Tonial F., Gomes-Figueiredo J., Savi D., Vicente V.A., Sales Maia B.H.L.N. et Possiede Y.M. (2012).** Antimicrobial activity of endophytes from brazilian medicinal plants. *Antimicrobial Agents*. p : 239-254.
- [429] **Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P. et Qin L. (2010).** Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microb Res*. 165 (6) : 437-449.
- [430] **Combès A., Ndoye I., Bance C., Bruzard J., Djedjat C., Dupont J., Nay B. et Prado S. (2012).** Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS One*. In **Zareb A. (2014)**.
- [431] **Kuras M., Nowakowska J., Sliwinska E., Pilarski R., Ilasz R., Tykarska T., Zobel A. et Gulewicz K. (2006).** Changes in chromosome structure, Mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J. Ethnopharmacol*. 107 (2) : 211-221.

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales.
ADA	Adénosine désaminase.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
ANOVA	Analysis of variance (analyse de la variance).
ARN	Acide ribonucléique.
ATCC	American Type Culture Collection.
ATP	Adénosine triphosphate.
CDK	kinases Cyclines Dépendantes.
DES	Dark Septate Endophytes (endophytes foncés à septation).
DMSO	Diméthyle de sulfoxyde.
DO	Densité Optique.
ES	Erreur Standard.
FC	Fréquence de Colonisation.
GN	Gélose Nutritive.
H'	Indice de diversité fongique.
H ₂ O ₂	Eau Oxygénée.
Ha	Hectare.
HA	Habitat Adapté.
HCl	Acide Chlorhydrique.
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl Co-enzymeA.
HNA	Habitat Non Adapté.
IM	Indice Mitotique.
IP	Indice des Phases.
IPCS	Programme International de la Sécurité Chimique.
IPP	Isopenténylpyrophosphate.
KOH	Hydroxyde de potassium.
MEB	Microscope Electronique à Balayage.
MF	Mc Farland standard.
MH	Mueller Hinton.
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthicilline.
MS	Mycélium Stérile.

NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide.
NaOCl	Eau de javel.
OA	Oatmeal Agar.
OMS	Organisation Mondiale de la Santé.
ONM	Office National de Météorologie.
PDA	Potato Dextrose Agar.
PDB	Potato Dextrose Broth.
pH	Potentiel d'Hydrogène.
PRO	Pourcentage Relatif d'Occurrence.
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise.
SNI	Souches Non Identifiées.
UMP	Uridine Monophosphate Pyrophosphorylase.
UNEP	Programme de l'Environnement des Nations Unies.
U V	Ultra Violet.



Annexes

Appendice 01 : données climatiques de Béchar

Tableau n°35. Moyennes des précipitations mensuelles moyennes dans la région de Béchar durant la période (1995 – 2017).

Année	Jan	Fév	Mar	Avl	Mai	Jin	Jlt	Aot	Sep	Oct	Nov	Déc	Cumul	Source :
1995	0	3	17	13	0	1	0	4	2	19	0	24	83	ONM Béchar
1996	23	38	53	13	0	40	4	0	0	0	0	21	192	
1997	16	0	7	38	3	0	0	4	4	4	0	0	76	
1998	10	9	1	0	0	10	0	0	0	5	0	9	44	
1999	11	10	8	0	0	0	0	16	58	7	0	0	110	
2000	0	0	0	0	32	5	1	6	1	7	0	4	56	
2001	0	0	0	0	1	0	0	3	2	6	0	4	16	
2002	0	3	5	10	1	0	0	1	1	1	16	0	38	
2003	0	12	2	0	1	1	0	8	9	30	13	0	76	
2004	0	2	2	6	7	1	2	4	3	1	13	29	70	
2005	0	1	6	0	3	29	0	2	21	2	17	0	81	infocimat
2006	47	3	1	8	28	2	0	0	30	23	15	5	162	
2007	4	5	0	26	0	0	3	11	5	19	0	22	95	
2008	0	22	3	0	6	0	2	4	16	63	10	9	135	
2009	52	15	55	7	0	8	2	1	14	1	4	7	166	Historique-météo
2010	6	22	4	8	15	0	7	23	15	6	1	1	108	
2011	12	3	12	10	32	23	3	4	13	12	12	2	138	
2012	2	3	16	8	3	11	7	15	8	28	14	1	116	
2013	1	1	18	4	1	5	16	12	11	7	2	2	80	
2014	12	2	2	2	26	6	6	12	62	13	104	1	248	
2015	4	19	11	17	3	2	9	18	25	30	4	0	142	
2016	0	2	1	1	3	3	5	13	28	10	16	52	134	
2017	4	0	2	21	6	11	2	7	0	0	1	29	83	
Moyen	9	8	10	8	7	7	3	7	14	13	11	10	106	

Tableau n°36. Moyennes des températures mensuelles maximales dans la région de Béchar durant la période (1995 – 2017).

Année	Jan	Fév	Mar	Avl	Mai	Jin	Jlt	Aot	Sep	Oct	Nov	Déc	moyen	Source :
1995	17	21	21	23	33	35	40	39	34	26	23	17	27	ONM Béchar
1996	18	16	21	26	30	34	39	40	33	28	22	17	27	
1997	16	21	23	24	31	37	41	37	33	28	23	18	28	
1998	18	19	23	27	29	36	41	40	36	27	24	16	28	
1999	16	17	22	29	35	39	42	41	36	30	21	17	29	
2000	15	22	25	28	31	37	42	39	35	26	23	19	29	
2001	18	20	27	29	32	40	42	40	36	32	22	18	30	
2002	17	22	24	26	32	38	41	39	35	29	22	19	29	
2003	17	18	23	27	33	38	41	38	35	28	20	17	28	
2004	18	20	23	27	28	37	40	40	34	30	19	15	28	
2005	15	15	24	29	35	37	41	40	34	29	20	15	28	infoclimat
2006	13	17	25	29	33	37	41	40	32	30	22	15	28	
2007	18	21	22	25	30	38	41	39	36	28	22	16	28	
2008	17	19	23	28	31	37	41	40	34	23	17	15	27	
2009	14	18	22	24	32	37	41	40	31	29	23	19	28	Historique-météo
2010	18	21	24	29	31	36	41	40	34	26	21	18	28	
2011	17	18	20	28	30	34	39	38	35	25	19	15	27	
2012	14	13	20	24	32	38	40	39	33	27	20	16	26	
2013	16	16	22	26	30	35	39	38	33	31	20	14	27	
2014	16	18	21	29	33	35	41	40	35	29	20	15	28	
2015	15	16	22	30	35	36	40	40	35	29	22	17	28	
2016	18	20	23	30	32	38	41	39	35	30	20	15	28	
2017	14	20	24	29	35	38	41	40	34	27	21	14	28	
Moyen	16	19	23	27	32	37	41	39	34	28	21	16	28	

Tableau n°37. Moyennes des températures mensuelles minimales dans la région de Béchar durant la période (1995 – 2017).

Année	Jan	Fév	Mar	Avl	Mai	Jin	Jlt	Aot	Sep	Oct	Nov	Déc	moyen	Source :
1995	2	6	9	12	20	22	25	27	20	15	10	7	15	ONM Béchar
1996	7	6	11	14	18	23	26	27	20	14	8	5	15	
1997	6	7	10	14	19	23	27	25	23	17	10	5	16	
1998	5	7	9	14	17	24	28	27	23	14	9	2	15	
1999	4	4	10	15	20	25	29	28	22	18	8	2	15	
2000	1	5	10	14	18	24	28	26	21	13	10	5	15	
2001	4	5	13	15	18	26	29	27	24	18	9	5	16	
2002	3	5	10	14	19	26	27	27	22	16	10	7	16	
2003	3	6	11	14	20	26	28	26	22	18	9	5	16	
2004	4	7	10	15	16	24	28	27	22	19	8	5	15	
2005	2	3	12	16	22	24	28	27	22	17	11	4	16	
2006	4	7	11	17	21	23	29	27	21	17	11	5	16	
2007	4	9	9	13	18	23	27	27	24	17	9	4	15	
2008	4	8	11	15	19	24	29	27	22	15	8	4	16	
2009	6	9	13	15	22	28	32	30	23	20	13	10	18	Historique-météo
2010	8	12	14	20	21	25	31	30	26	19	13	9	19	
2011	8	8	11	19	23	28	31	31	28	19	13	9	19	
2012	6	6	13	17	25	31	33	32	27	22	15	9	20	
2013	8	9	15	19	22	27	32	31	28	25	14	8	20	
2014	9	11	14	22	27	29	34	34	29	23	16	9	21	
2015	8	10	15	23	27	30	34	34	29	24	16	11	22	
2016	11	12	15	22	26	31	35	34	30	24	15	10	22	
2017	7	13	16	22	28	32	35	35	28	22	15	9	22	
Moyen	5	8	12	17	21	26	30	29	24	19	11	6	17	

Tableau n°38. Moyennes des températures mensuelles moyennes dans la région de Béchar durant la période (1995 – 2017).

Année	Jan	Fév	Mar	Avl	Mai	Jin	Jlt	Aot	Sep	Oct	Nov	Déc	moyen	Source :
1995	9	13	15	17	27	29	33	33	27	21	17	12	21	ONM Béchar
1996	12	11	16	20	24	28	32	33	27	21	15	11	21	
1997	11	14	16	19	25	30	34	31	28	22	16	12	22	
1998	11	13	16	21	23	30	35	33	29	20	16	9	21	
1999	10	11	16	22	27	32	36	34	29	24	14	10	22	
2000	8	13	17	21	25	31	35	33	28	19	16	12	22	
2001	11	12	20	22	25	33	35	34	30	25	15	12	23	
2002	10	13	17	20	26	32	34	33	29	23	16	13	22	
2003	10	12	17	21	26	32	35	32	28	23	15	11	22	
2004	11	13	17	21	22	30	34	34	28	25	13	10	22	
2005	8	9	18	23	28	31	35	34	28	23	16	10	22	
2006	8	12	18	23	27	30	34	34	27	24	16	10	22	
2007	11	15	15	19	24	30	34	33	30	22	16	10	22	
2008	11	13	17	21	25	31	35	34	28	19	13	9	21	
2009	10	13	18	20	27	32	36	35	27	25	18	14	23	Historique-météo
2010	13	16	19	24	26	31	36	35	30	23	17	14	24	
2011	12	13	16	23	26	31	35	35	32	22	16	12	23	
2012	10	10	17	20	28	34	37	35	30	24	17	12	23	
2013	12	13	19	23	26	31	36	34	30	28	17	11	23	
2014	13	15	18	25	30	32	37	37	32	26	18	12	25	
2015	12	13	19	27	31	33	37	37	32	26	19	14	25	
2016	14	16	19	26	29	34	38	36	32	27	18	13	25	
2017	11	16	20	25	32	35	38	38	31	25	18	12	25	
Moyen	11	13	17	22	26	31	35	34	29	23	16	12	23	

Appendice 02 : compositions des milieux de cultures utilisés**Oatmeal Agar (OA)**

Grain de l'avoine	10 g
Agar	15 g
Eau distillée.	1000 ml

Potato dextrose broth (PDB)

Pomme de terre épluchées et coupées.....	200 g
Glucose.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Nutrient agar (NA)

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	5 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH = 7,2

Mueller Hinton Agar (MH)

Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300 g
Hydrolysate de caséine.....	17,5 g
Amidon de maïs.....	1,5 g
Agar.....	13 g
Eau distillée.....	1000 ml

Sabouraud dextrose agar (SDA) + chloramphénicol

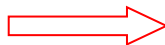
Dextrose.....	40 g
Peptone chapoteau.....	10 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
Chloramphénicol.....	0,5%

pH = 5.6

Appendice 03 : quelques photos de l'étude expérimentale



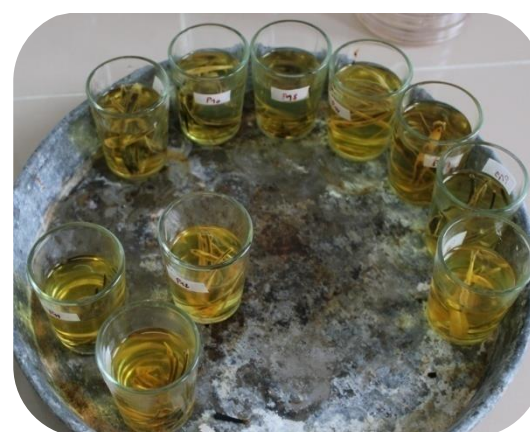
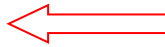
Mise en herbier des
feuilles de *L. feei*



Verres de thé contenant
10 feuilles sèches de
chaque sujet *L. feei*



Coloration au bleu Trypan
des feuilles de *L. feei*



Décoloration des
feuilles de *L. feei*

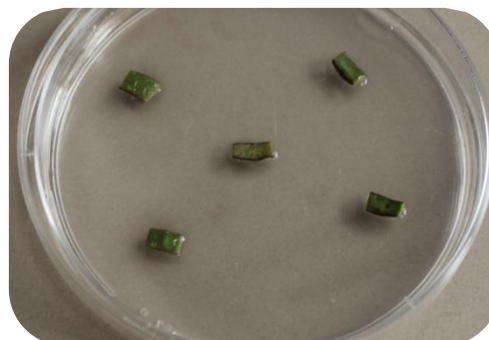
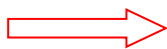


Montage entre lames et lamelles
avec gélatine glycérinée des
feuilles colorées de *L. feei*

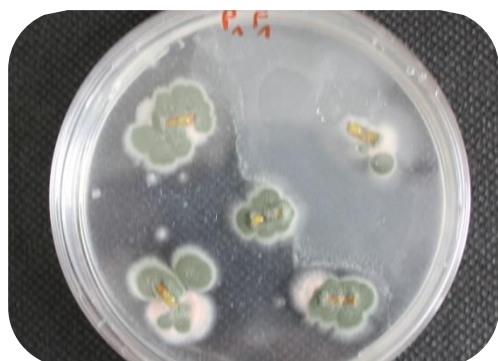
Figure n°74 : coloration au bleu Trypan des feuilles de *L. feei*.



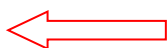
Effervescence des feuilles sous HCl



Fragments de feuilles sur PDA



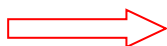
Emergence des isolats fongiques



Incubation à température ambiante



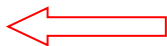
Incubation des isolats fongiques à 27°C



Prélèvement des disques de 6 mm



Conservation de l'extrait fongique à 4°C



Fermentation fongique sur PDB

Figure n°75 : stérilisation des feuilles, culture, fermentation et extraction des mycoendophytes.

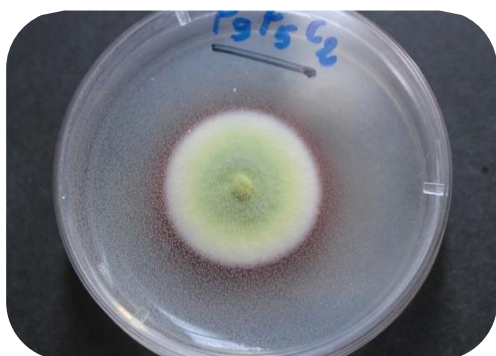


Figure n°76 : mycoendophytes isolés secrétant des substances colorantes sur PDA.

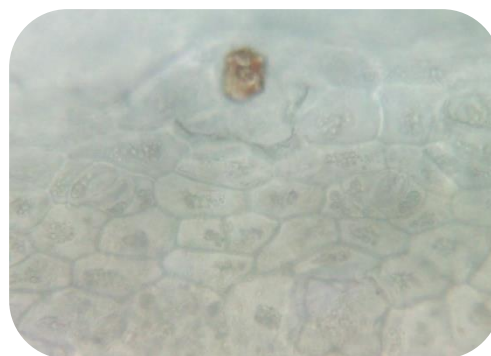


Figure n°77 : observations microscopiques de quelques champignons épiphytes chez *L. feei*.

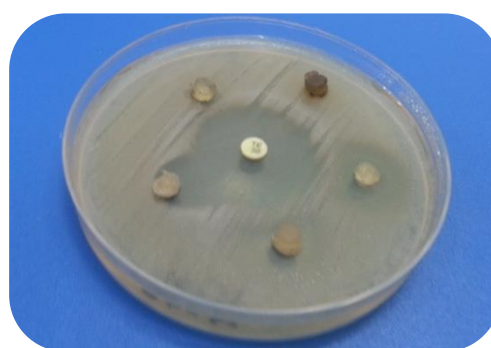


Figure n°78 : développement d'une galle (cécidie) chez un fragment de feuille de *L. feei* sur milieu PDA.

Figure n°79 : formation d'un bouchon de champagne (synergie) entre tétracycline et *Penicillium sp2* contre *S. aureus*.

Appendice 04 : pourcentage de colonisation fongique chez *L. feei*.

Tableau n°39. Fréquences de colonisation (FC%) des mycoendophytes par boîte de culture (feuille) dans les 23 sujets de *L. feei*.

FC %	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	moyen
Sujet 01	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sujet 02	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sujet 03	100	80	100	100	80	100	100	100	100	100	96
Sujet 04	100	100	80	100	80	100	100	100	100	80	94
Sujet 05	100	100	100	60	100	100	80	60	80	20	80
Sujet 06	100	100	100	100	60	40	100	60	0	100	76
Sujet 07	20	0	60	40	0	20	80	80	80	80	46
Sujet 08	60	80	60	40	0	0	100	20	60	80	50
Sujet 09	40	80	60	0	60	0	60	0	60	20	38
Sujet 10	60	40	60	0	0	80	0	0	100	60	40
Sujet 11	80	100	80	80	60	100	0	80	40	60	68
Sujet 12	80	60	40	80	80	60	100	100	80	60	74
Sujet 13	100	80	20	40	0	60	100	0	80	60	54
Sujet 14	20	60	40	100	100	0	60	100	100	40	62
Sujet 15	60	60	20	100	0	80	100	60	100	0	58
Sujet 16	80	100	100	100	100	60	60	20	0	0	62
Sujet 17	80	40	100	0	40	80	60	60	100	100	66
Sujet 18	80	100	100	100	80	100	100	40	100	80	88
Sujet 19	80	100	100	80	100	100	60	100	100	80	90
Sujet 20	80	100	100	60	60	100	80	80	100	80	84
Sujet 21	80	100	100	100	80	60	80	100	80	40	82
Sujet 22	100	100	80	100	100	100	100	80	60	100	92
Sujet 23	80	60	100	100	100	80	80	100	40	100	84
moyenne	77,39	80,00	78,26	73,04	64,35	70,43	78,26	66,96	76,52	66,96	73,22

Appendice 05 : analyses statistiques (anova)

Feuille de calcul statistique (anova) des fréquences de colonisation fongique (FC%) chez *L. feei*.

<i>Tableau d'analyse de variance</i>					
	ddl	SC	CM	F	Proba
sujets	22,00	81579,13	3708,14	5,00	0,00
Var.résiduelle	207,00	153440,00	741,26		
Total	229,00	235019,13			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
73,22		27,23		37,19	

Feuille de calcul statistique (anova) des indices de diversité fongique (H') chez *L. feei*.

<i>Tableau d'analyse de variance</i>					
	ddl	SC	CM	F	Proba
sujets	22,00	4,72	0,21	1,19	0,26
Var.résiduelle	207,00	37,32	0,18		
Total	229,00	42,04			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
0,57		0,42		74,24	

Feuille de calcul statistique (anova) globale des indices mitotiques (extraits fongiques, colchicine et témoin négatif).

<i>Tableau d'analyse de variance</i>					
	ddl	SC	CM	F	Proba
sujets	10,00	7469,68	746,97	76,58	0,00
Var.résiduelle	44,00	429,20	9,75		
Total	54,00	7898,88			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
38,72		3,12		8,07	

Feuille de calcul statistique (anova) des indices mitotiques (extraits fongiques et colchicine).

<i>Tableau d'analyse de variance</i>					
	ddl	SC	CM	F	Proba
sujets	1,00	7,22	7,22	0,49	0,50
Var.résiduelle	8,00	117,80	14,73		
Total	9,00	125,03			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
36,65		3,84		10,47	

Feuille de calcul statistique (anova) des indices mitotiques (extraits fongiques et témoin négatif).

<i>Tableau d'analyse de variance</i>					
	ddl	SC	CM	F	Proba
sujets	1,00	3802,50	3802,50	1346,02	0,00
Var.résiduelle	8,00	22,60	2,83		
Total	9,00	3825,10			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
55,30		1,68		3,04	

Feuille de calcul statistique (anova) des indices mitotiques (colchicine et témoin négatif).

<i>Tableau d'analyse de variance</i>					
	ddl	SC	CM	F	Proba
sujets	1,00	3478,23	3478,23	248,89	0,00
Var.résiduelle	8,00	111,80	13,98		
Total	9,00	3590,03			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
56,15		3,74		6,66	

Feuille de calcul statistique (anova) des diamètres d'inhibition (extraits d'acétate d'éthyle, extraits méthanoliques et antibiotiques synthétiques) chez *E. coli*.

Tableau d'analyse de variance					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujets	29,00	5888,00	203,03	160,29	0,00
Var.résiduelle	60,00	76,00	1,27		
Total	89,00	5964,00			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
10,33		1,13		10,89	

Feuille de calcul statistique (anova) des diamètres d'inhibition (extraits d'acétate d'éthyle, extraits méthanoliques et antibiotiques synthétiques) chez *S. aureus*.

Tableau d'analyse de variance					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujets	29,00	6540,90	225,55	151,21	0,00
Var.résiduelle	60,00	89,50	1,49		
Total	89,00	6630,40			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
12,30		1,22		9,93	

Feuille de calcul statistique (anova) des diamètres d'inhibition (extraits d'acétate d'éthyle, extraits méthanoliques et antibiotiques synthétiques) chez *P. aeruginosa*.

Tableau d'analyse de variance					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujets	29,00	2993,60	103,23	217,32	0,00
Var.résiduelle	60,00	28,50	0,48		
Total	89,00	3022,10			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
3,73		0,69		18,46	

Feuille de calcul statistique (anova) des diamètres d'inhibition (extraits d'acétate d'éthyle, extraits méthanoliques et antibiotiques synthétiques) chez *E. faecalis*.

Tableau d'analyse de variance					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujets	29,00	3356,40	115,74	201,28	0,00
Var.résiduelle	60,00	34,50	0,58		
Total	89,00	3390,90			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
3,20		0,76		23,70	

Feuille de calcul statistique (anova) des diamètres d'inhibition (extraits d'acétate d'éthyle, extraits méthanoliques et antibiotiques synthétiques) chez *B. subtilis*.

Tableau d'analyse de variance					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujets	29,00	6200,90	213,82	153,65	0,00
Var.résiduelle	60,00	83,50	1,39		
Total	89,00	6284,40			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
7,97		1,18		14,81	

Feuille de calcul statistique (anova) des diamètres d'inhibition (extraits d'acétate d'éthyle, extraits méthanoliques et antibiotiques synthétiques) chez *K. pneumoniae*.

Tableau d'analyse de variance					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujets	29,00	6580,10	226,90	149,60	0,00
Var.résiduelle	60,00	91,00	1,52		
Total	89,00	6671,10			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
8,77		1,23		14,05	

Feuille de calcul statistique (anova) des diamètres d'inhibition (extraits d'acétate d'éthyle, extraits méthanoliques et antibiotiques synthétiques) chez *S. typhi*.

Tableau d'analyse de variance					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujets	29,00	3245,60	111,92	258,27	0,00
Var.résiduelle	60,00	26,00	0,43		
Total	89,00	3271,60			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
3,73		0,66		17,63	

Feuille de calcul statistique (anova) des diamètres d'inhibition (extraits d'acétate d'éthyle, extraits méthanoliques et antibiotiques synthétiques) chez *L. monocytogenes*.

Tableau d'analyse de variance					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujets	29,00	4478,00	154,41	487,62	0,00
Var.résiduelle	60,00	19,00	0,32		
Total	89,00	4497,00			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
4,67		0,56		12,06	

Feuille de calcul statistique (anova) des diamètres d'inhibition (extraits d'acétate d'éthyle, extraits méthanoliques et antibiotiques synthétiques) chez MRSA.

Tableau d'analyse de variance					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujets	29,00	5181,60	178,68	217,54	0,00
Var.résiduelle	60,00	49,28	0,82		
Total	89,00	5230,88			
Moy.générale		E.T.R		C.V en %	
8,60		0,91		10,54	