

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE DE BLIDA 01

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

Projet de fin d'études en vue de l'obtention
Du diplôme de master académique en sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Phytoprotection durable

**ETUDE DE POTENTIALITÉS INSECTICIDE ET
ANTIFONGIQUE DE SOUCHES FONGIQUES ISOLES DES
Citrus.**

Présenté par : M^{lle}. HAMEL AMIRA NOUR ELHOUDA

Devant le jury composé de :

M^{me}. BERRAF. A	M.C.A	U.S.D. Blida	Président
M^{me}. ALLAL-BENFEKIH. L	Professeur	U.S.D. Blida	Promotrice
M^{me}. AMMAD. F	M.C.B	U.S.D. Blida	Co- Promotrice
M^{me}. OUTTAR. F	M.C.B	U.S.D. Blida	Examinatrice

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2015/2016

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À la mémoire de mon frère Lamine et de mon grand-père Lakhdar, qui nous ont quitté, mais ils restent toujours aux fond de nos cœurs et esprits.

À mes chères parents en témoignage de l'amour, du respect et de ma profonde et éternelle gratitude que je leurs porte et ma reconnaissance pour leur soutien et leur encouragement que m'ont prodigués tout au long de ma vie.

À ma chère grande mère qui a toujours prier le bon dieu pour moi

À mon frère Omar et mes sœurs

À toute ma famille.

À tous mes amis.

Amira Nour El-Houda

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie le bon Dieu de nous avoir donné la santé, la patience et les moyens, à fin que nous puissions accomplir ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude, mes sincères remerciements, ma reconnaissance et mes respects à ma promotrice Madame L. BENFEKIH , Professeur au département des Biotechnologies de Blida et également à Madame F. AMMAD . d'avoir accepté d'encadrer ce modeste travail ainsi que pour leurs précieux conseils et encouragement pendant toute la période de ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont tout d'abord à Madame A.BERRAF. Maitre de conférences A, pour l'honneur qu'Elle me fait de présider mon jury, et également à Madame F. OUTTAR F. pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier Madame MOUMEN pour sa grande contribution dans la réalisation de cette étude.

Je remercie M^{lle} Djemai Amina et Walid pour leurs qualités humaines, leur patience ; leurs aides et disponibilité pendant l'expérimentation.

Je remercie ma tante Fadila et son Marie Mustapha pour leurs accueil et patience.

Je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude

Amira

Sommaire

Dédicaces	
Remerciements	
Résumés	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Généralités sur les Champignons endophytes.....	3
I- Définition	3
II- Importance	3
III. L'interaction Plante –Endophyte	4
IV. Classification des champignons endophytes :.....	5
V. Reproduction Et Transmission	6
VI. Spécificité des endophytes.....	8
VII. Rôles et Applications	8
1- Phytostimulation	9
2- Production de pigments	9
3- Production des enzymes	9
4- Activité antimicrobienne	10
5- Source de bioactifs et de nouveaux composés	10
6- Agents de biocontrôle.....	11
7- Bioremédiation.....	11
8- Production de composés organiques volatils et leur Avantages	11
VIII. Contraintes liées aux Endophytes	11
Chapitre II : Généralités sur la Lutte Biologique	13
I. Définition	13
II. Les utilisations de la lutte biologique	14
III. Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique	14

III.1. Antibiose	14
III.2. Parasitisme	15
III.3. Compétition	15
III.4. Stimulation de la croissance végétale	15
IV. L'Entomopathogénéicité	15
V. Les organismes antifongiques	16
VI. Contraintes liées à lutte biologique	17
VII. Généralités sur l'agent de biocontrôle <i>Trichoderma</i>	17
VII.1. Description générale	18
VII.2. Méthodes d'application.....	18
Chapitre III : Matériel et Méthodes	19
III.1. Objectifs de l'étude	19
III.2. Isolement et identification des champignons endophytes d'agrumes..	19
III.2.1. Sélection du matériel végétal	19
III.2.2. Technique d'isolement	20
III.2.3. Identification des champignons endophytes.....	21
III.3. Etude des potentialités bio-contrôleuses d'un isolat endophyte choisi..	21
III.3.1. Matériel biologique.....	21
III.3.1.1. Isolats fongiques.....	21
III.3.1.2. Insectes ravageurs	22
III.3.2. Techniques de détermination des potentialités biologiques recherchées.....	25
III.3.2.1 Test insecticide	25
III.3.2.1.1. Préparation des suspensions sporales	25
III.3.2.1.2. Bioessais	27
❖ Sur le puceron du peuplier	27
❖ Sur le charançon du riz	28
❖ Sur <i>Fusarium sp</i> et <i>Rhizopus sp</i>	29
III.3.2.3. Paramètres étudiés	30
a- Pourcentage de colonisation par les endophytes.....	30
b- Calcul du pourcentage de mortalité	30
c- Pourcentage d'inhibition.....	30

III.4. Exploitation des données.....	31
Chapitre IV : Résultats et Discussion	32
IV.1. Isolement et purification des champignons endophytes	32
IV.1.1. Inventaire des champignons endophytes isolés	32
IV.1.2. Taux de colonisation.....	32
IV.2. Test d'inhibition	40
IV.1.4. Test insecticide	42
IV.1.4.1. Effet sur la mortalité aphidienne	42
IV.1.4. 2. Effet sur la mortalité dans la population des charançons	43
Discussion générale.....	44
Conclusion Générale	50
Références Bibliographiques	

ETUDE DE POTENTIALITÉS INSECTICIDE ET ANTIFONGIQUE DE SOUCHES FONGIQUES ISOLES DES CITRUS.

Résumé :

Ce présent travail porte sur l'étude de l'activité insecticide d'un champignon endophyte (*Trichoderma sp.*) isolé de *Citrus*, contre le puceron du peuplier (*Chaitaphorus leucomelas*) et le charançon de riz (*Sitophilus orzae*). Ainsi que son activité antifongique vis à vis l'agent pathogène *Fusarium sp.* et l'agent contaminant *Rhizopus sp.* L'activité insecticide a été évaluée par le taux de mortalité enregistré à différentes concentrations, alors que l'activité antifongique est évaluée par le test d'inhibition en utilisant la méthode de confrontation directe. Les endophytes obtenus après isolement sont : *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.*, *Ulocladium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Rhizopus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Botrytis sp.*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* et *Botryosphaeria sp.* Le taux de colonisation global enregistré est de 77.93%. Le test insecticide a montré un résultat significatif à la concentration de 2.68×10^9 spores/ml chez les charançons par contre aucune efficacité n'a été enregistrée sur les aphides. D'autre part aucune inhibition n'a été relevée à l'égard de *Rhizopus sp.*, tandis qu'un taux d'inhibition de 81.90% est enregistré vis-à-vis *Fusarium sp.* Nous notons aussi que le développement de *Rhizopus sp.*, était ralenti à 60% par rapport au témoin durant les premières 48h d'incubation.

Mots clés : Lutte biologique, Endophyte, *Citrus*, *Trichoderma*, Insecticide, Antifongique.

STUDY OF OPPORTUNITIES AND ANTIFUNGAL OF FUNGAL STRAINS ISOLATED FROM CITRUS.

Summary:

The present work focuses on the study of the insecticidal activity of an endophytic fungus (*Trichoderma sp.*) isolated from three species of Citrus, against aphids poplar (*Chaitaphorus leucomela*) and the weevil rice (*Sitophilus orzae*). As well as its antifungal activity against the pathogen agent *Fusarium sp.* and the contaminant agent *Rhizopus sp.* The insecticidal activity was evaluated by the recorded mortality at different concentrations, while the antifungal activity was evaluated by the test inhibition using the direct comparison method. Endophytes obtained after isolation are: *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.*, *Ulocladium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Rhizopus sp.*, *Cladosporium sp.*, *botrytis sp.*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* and *Botryosphaeria sp.* The rate recorded overall settlement is 77.93%. The insecticide test showed a significant concentration result of 2.68×10^9 spores / ml. against weevils but no efficacy has been recorded on aphids. On the other part no inhibition was found towards *Rhizopus sp.*, while an inhibition rate of 81.90% is recorded screw *Fusarium sp.* We also note that the development of *Rhizopus sp.* was slowed 60% relative to the witness during the first 48h of incubation.

Keywords: Biological control, Endophyte, Citrus, Trichoderma, Insecticide, Antifungal.

دراسة فرصة معالجة الحشرات و الفطريات بواسطة نشاط الفطر الداخلي للنبات المستخرج من الحمضيات

ملخص

خلال هذا العمل قمنا بدراسة نشاط الفطر الداخلي للنبات *Trichoderma sp.* المستخرج من الحمضيات ضد حشرة *Chaitaphorus leucomelas* ال من و سوسة الارز *Sitophylus oryzae* ولفطيات *Rhizopus sp.* , معدل التسوية الشاملة مسجل 77.93% وأظهر. واختبار المبيدات الحشرية تركيز 2.68 جراثيم / X109 *Fusarium sp.* ضد السوس التي يتم تسجيلها على المن أي فعالية. من ناحية أخرى لم يعثر على تثبيط فيما يتعلق بالفطر *Rhizopus sp.* في حين أن معدل تثبيط 81.90% سجلت وجها لوجه *Fusarium sp.* ونلاحظ أيضا أن تطوير فطر س، تباطأ بنسبة 60% مقارنة بالمجموعة الضابطة خلال 48 ساعة الأولى من الحضانة.

كلمات البحث: المكافحة البيولوجية، الفطر الداخلي للنبات ، الحمضيات، الترايكوديرما، ضدالحشرات، .

Liste des figures :

Figure 01 : l'équilibre des antagonismes entre la virulence des endophytes et la défense des plantes en colonisation asymptomatique.

Figure 02 : Modes de transmission du champignon endophyte systémique *Neotyphodium (anamorphe Epichloe)* sur son hôte *Festuca arundinacea*.

Figure 03 : Vergers choisis pour les prélèvements des échantillons végétaux (1^{er} verger à Boufarik, 2^{eme} verger à Halouya, Soumâa).

Figure 04 : Procédure d'isolement des champignons endophytes.

Figure 05 : aspect microscopique des isolats *Fusarium sp* et *Rhizopus sp.* testés.

Figure 06 : Puceron du peuplier.

Figure 07 : Charançon du riz .

Figure 08 : Procédure de préparation des suspensions sporales .

Figure 09 : Plants du peuplier ayant servi au test insecticide par *Trichoderma* sur *Chaitaphorus leucomelas* .

Figure 10 : Test d'effet insecticide de *Trichoderma* sur *Sitophilus oryzae*.

Figure 11: Test d'antagonisme par *Trichoderma*.

Figure 12 : Mycélium et spores de quelques isolats.

Figure 13 : Mycélium et spores de quelques isolats

Figure 14 : Mycélium et spores de quelques isolats.

Figure 15 : **a.b.c** : Chlamydospores de l'isolat *Trichoderma sp.*

d.e.f.g.h : Mycélium et spores de l'isolat *Trichoderma sp.*

Figure 16 : **a et b.c.d.e.f** : Mycélium et spores de quelques isolats.

Figure 17 : Taux global de colonisation par les champignons endophytes chez chaque espèce d'agrumes.

Figure 18 : Taux de colonisation par les champignons endophytes au niveau de chaque organe de prélèvement chez les trois espèces de citrus.

Figure 19 : Taux d'inhibition comparé de deux champignons phytoparasites par l'isolat fongique endophyte *Trichoderma sp.*

Figure 20 : Résultat de test d'inhibition après 02 jours pour *Fusarium sp.* et 10 jours pour *Rhizopus sp.*

Figure 21 : Taux d'inhibition comparés de *Fusarium sp.* et *Rhizopus sp.* sous l'effet de l'isolat fongique endophyte *Trichoderma sp.*

Figure 22 : Résultats du modèle linéaire global sur l'effet de l'isolat fongique *Trichoderma sp.* sur les populations du puceron *Chaitaphorus leucomelas*.

Figure 23 : Résultats du modèle linéaire global sur l'effet de l'isolat fongique *Trichoderma sp.* sur les populations du charançon, *Sitophilus oryzae*

Liste des tableaux

Tableau 01 : Inventaire des champignons endophytes par espèce de citrus hôte.

Tableau 02: Analyse de la variance du RC selon l'espèce végétale et l'organe végétal de prélèvement.

Tableau 03 : Résultats de l'analyse de la variance du taux d'inhibition comparé de *Fusarium sp* et *Rhizopus sp* sous l'effet de l'isolat fongique endophyte *Trichoderma sp*.

Tableau 04 : Analyse de la variance de la mortalité des pucerons en fonction de la dose de traitement et du temps.

Tableau 05 : Analyse de la variance de la mortalité des charançons en fonction de la dose de traitement et du temps.

INTRODUCTION

En raison de leurs effets secondaires indésirables sur l'environnement et la santé humaine, l'utilisation des pesticides conventionnels a été largement critiquée ces dernières années.

Afin de développer des alternatives aux méthodes chimiques, des microorganismes de diverses natures, sont étudiés et prospectés pour leurs potentialités bio-contrôleuses à l'égard des bioagresseurs des cultures. Parmi ces microorganismes, les champignons.

Les champignons sont un groupe d'organismes ayant une grande biodiversité. Ils sont le deuxième groupe après les insectes et les éléments clés des écosystèmes à travers le monde. Ils sont présents dans la plupart des parties de plantes, notamment les feuilles, où le tissu est apparemment en bonne santé. Ils peuvent être endophytes, épiphytes ou des agents pathogènes latents. Les champignons endophytes sont le groupe inexploré d'organismes qui a d'énormes potentialités (Selvi et Balagengatharathilagam, 2014).

Au cours des deux dernières décennies, il y a eu un intérêt croissant pour les endophytes et leurs origines, leur biodiversité, les interactions endophytes-hôtes, leur rôle dans l'écologie et la caractérisation de leurs métabolites secondaires, (Tran et *al.*, 2010). Les endophytes sont considérés actuellement comme un des groupes biologiques les plus importants en matière de protection des plantes, il agissent contre un bon nombre de ravageurs et pathogènes (Vega et *al.*, 2009). Différents travaux ont déclaré ce groupe intéressant par sa grande présence dans les différents types de plantes, néanmoins les champignons endophytes des *Citrus* sont peu étudiés (Douanla-Meli et *al.*, 2013).

L'agrumiculture est l'un des secteurs agricoles les plus exploités en Algérie, notamment dans la région de la Mitidja.

Le développement de ces arbres pérennes sous climat méditerranéen est discontinu, en période hivernale l'arbre cesse toute croissance visible et entre en état de dormance. Ces plantes connaissent trois principales poussées végétatives, parmi lesquelles la poussée de printemps. Cette dernière démarre dès que les températures se maintiennent au-dessus de 13°C (Jacquemond et *al.*, 2013).

La recherche des champignons endophytes chez les agrumes apparait importante pour le développement de nouvelles méthodes écologiques pour la protection de végétaux.

Le but de ce travail est de contribuer à la compréhension de l'interaction plante-endophyte, et de chercher de nouvelles perspectives sur le potentiel insecticide et antifongique de (des) champignon (s) endophyte (s) isolé (s) des plantes d'agrumes.

Notre expérimentation s'est déroulée en deux étapes :

- ✓ La première étape a concerné l'isolement et l'identification des champignons endophytes présents en association avec les agrumes.
- ✓ La seconde étape est consacrée pour la recherche des potentialités, insecticide et antifongique, des isolats endophyte obtenus vis-à-vis deux insectes ravageurs et deux agents fongiques; un pathogène et l'autre contaminant.

CHAPITRE I : Généralités sur les Champignons Endophytes

I- Définition :

Le mot endophyte a été utilisé la première fois par De Barry en 1866, pour décrire tous les organismes qui colonisent les tissus internes des végétaux (Tejesvi et Pirttilä, 2011). Actuellement ce terme d'origine grec, est utilisé différemment et d'une façon plus vaste que sa définition littérale (Schulz et Boyle, 2005).

Beaucoup a été écrit sur ce groupe et plusieurs définitions leur ont été attribuées, mais la plus utilisée est celle de Petrini (1991) : « Tous les organismes vivants dans les organes végétaux qui, à un moment dans leur vie, peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommage apparent à l'hôte. » (Hyde et Soyong, 2008).

Quelques autres définitions :

- Tout organisme qui vit à l'intérieur d'une plante, y compris les organismes aussi divers que les champignons mycorhiziens et les guis (Clay, 1990).
- Champignon isolé à partir de tissus de plantes asymptomatiques (Larran et *al.*, 2002).
- Organismes détectés à tout moment dans un tissu végétal asymptomatique, incluant les microorganismes avec différent types de cycle biologique (Schulz et Boyle, 2005).
- Les endophytes, sont des microorganismes colonisant les tissus végétaux sains, ils restent pendant au moins un cycle de leur vie sans causer de dommages à la plante hôte grâce à une relation symbiotique (García et *al.*, 2012).

II. Importance :

Les champignons endophytes sont assez fréquents dans la nature, leur importance écologique a été bien étudiée, mais reste incomplètement compris (Douanla-Meli et *al.*, 2013). Les avantages liés à ces organismes sont divers ; Certains d'entre eux se sont révélés avoir des effets néfastes contre les insectes, les nématodes et les pathogènes des plantes (Vega et *al.*, 2009), d'autres peuvent

produire les mêmes métabolites que ceux de la plante hôte. Cela offre la possibilité d'obtenir des métabolites intéressants pour la bioproduction d'espèces végétales protégées ou en voie de disparition (Redko et *al.*, 2006). De plus, un retard de la sénescence des aiguilles et une diminution de leur palatabilité pour les insectes est marquée chez les conifères (Carroll, 1988).

Des espèces de champignons endophytes sont fréquemment signalées comme agents pathogènes sur la même ou différente hôte. Ils peuvent être pathogènes dans une phase de latence de leur cycle de vie. Donc, caractérisant les communautés endophytes fongiques et leurs interactions est une action cruciale pour comprendre les maladies fongiques de la plante hôte et elle est l'une des conditions préalables pour une meilleure gestion pratique (Douanla-Meli et *al.*, 2013)

III. L'interaction Plante –Endophyte :

Les endophytes représentent un continuum d'associations variables : mutualisme, commensalisme, pathogénicité latente et exploitation. Les interactions sont souvent modifiées, selon les caractères génétiques des deux partenaires, leur stade de développement et l'état nutritionnel, ainsi que les facteurs environnementaux (Schulz et Boyle, 2005).

Sous certaines conditions, notamment le stress de la plante hôte, certains endophytes peuvent produire des symptômes de maladie (Romero et *al.*, 2001) Les bases génétiques des différents modes de symbiose restent mal compris, le fait qu'une mutation à un seul locus génétique peut changer la description biologique fondamentale d'un isolat, d'un agent pathogène à un endophyte non pathogène (Freeman et Rodrigue, 1993).

Le pouvoir pathogène des endophytes a été rapporté par plusieurs auteurs. Botella et Diez (2011), ont confirmé le stade endophyte de plusieurs agents pathogènes responsables du dépérissement du *Pinus halepensis* en Espagne.

L'équilibre des Antagonismes :

Schulz et Boyle (2005), ont proposé l'hypothèse de « L'équilibre des antagonismes » afin de mieux connaître ces champignons et de comprendre comment ils parviennent à exister et à se développer au sein de leur hôte sans causer de symptômes visibles de maladie (**Figure 01**).

La colonisation asymptomatique observée en cas d'endophytisme, n'est qu'un équilibre des antagonistes entre l'hôte et l'endophyte.

Les endophytes ainsi que les pathogènes possèdent un grand nombre de mêmes facteurs de virulence : les endophytes produisent des exoenzymes nécessaires pour infecter et coloniser l'hôte, bien que seulement certains de ces endophytes sont des agents pathogènes latents. La majorité peuvent produire aussi des phytotoxines. L'hôte peut répondre avec les mêmes réactions de défense que celles contre un agent pathogène, avec des métabolites préformés et de la défense induite.

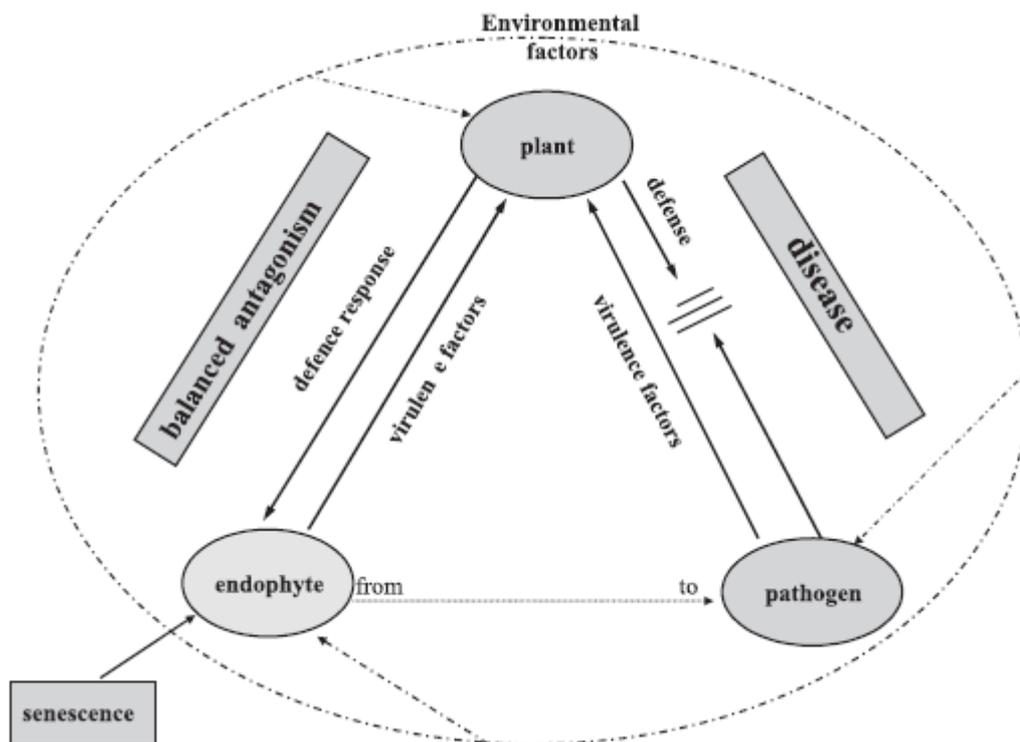


Figure 01 : l'équilibre des antagonismes entre la virulence des endophytes et la défense des plantes en colonisation asymptomatique. (Schulz et Boyle, 2005)

IV. Classification des champignons endophytes :

Sur le plan écologique, les champignons endophytes se composent de 3 groupes de base : les champignons mycorhiziens, les endophytes des herbacées et les endophytes des non herbacées (Shulz et Boyle, 2005).

Cependant, certains auteurs distinguent les endophytes des mycorhizes. Les mycorhizes se distinguent par la présence d'une interface limitée pour les hyphes, l'absence de la synchronisation entre le développement des plantes et le développement des champignons, l'absence d'intérêt pour les plantes lors du transfert des éléments nutritifs (Brundrett, 2004), et par leur colonisation et leur développement dans les racines des plantes et dans la rhizosphère au même temps, contrairement aux endophytes qui résident entièrement dans les tissus végétaux et peuvent se développer dans les racines, les tiges et / ou des feuilles (Stone et *al.*, 2004 in Rodriguez et *al.*, 2009).

En se basant sur la phylogénie, la taxonomie, les plantes hôtes et les fonctions écologiques, deux grands groupes de champignons endophytes ont été reconnus : les endophytes clavicipitacés (C-endophytes), qui infectent certaines herbacées (graminées) ; et les endophytes non clavicipitacés (NC-endophytes), qui peuvent être récupérés à partir de tissus asymptomatiques de plantes non vasculaires, les fougères et alliés, les conifères et les angiospermes (Rodriguez et *al.*, 2009).

Les champignons endophytes appartiennent généralement aux ascomycètes et aux deutéromycètes. Que des ascomycètes ont isolé du *Pinus halpensis* (Botella & Diez, 2011), de la plante médicinale *Indigofera suffruticosa* (Santos et *al.*, 2015) ainsi que de *Lycium chinense* (Paul et *al.*, 2014). Bharathidasan et Panneerselvam (2011) ont trouvé que la quasi-totalité des champignons endophytes isolés de *Avicennia marina*, sont des deutéromycètes, exception faite pour un seul isolat appartenant aux ascomycètes.

V. Reproduction et Transmission :

La colonisation des plantes par des champignons endophytes survient généralement à partir du milieu environnant en tout moment après la germination. Cependant, certains champignons endophytes sont transmis verticalement, à savoir par l'intermédiaire de graines. Ces champignons sont généralement asexués et utilisent les hyphes pour coloniser la plante hôte des racines aux semences et dans certains cas de la graine vers la racine de retour à la graine; leur cycle de vie dépend presque entièrement de la plante hôte, et sont souvent mutualistes. Cependant, les endophytes transmis horizontalement sont des

sexuels et utilisent les spores pour la dissémination (Hallmann et Sikora, 2010). A l'exception des herbes (graminées), la plupart des endophytes semblent être transmis horizontalement, à l'extérieur des tissus de la plante hôte et par des spores (Carroll, 1988).

De toute évidence, le mode de transmission des endophyte seul ne dicte pas le résultat de symbioses, mais il se pourrait bien qu'il influe sur les avantages de conditionnement physique conférés par endophytes, la longévité des associations symbiotiques, et la vulnérabilité des hôtes à endophytes non mutualistes (Rodriguez et *al.*, 2009).

Le mutualisme a été décrit chez les endophytes par leurs différents modes de transmission. Carroll (1988) a distingué deux (02) types de mutualisme : le mutualisme constitutif et le mutualisme inductible. Le mutualisme constitutif est l'association la plus fidèle, généralement avec les plantes herbacées. Les endophytes colonisent les ovules de l'hôte et se propagent par les semences. La biomasse fongique, dans ce cas, est importante. Pour le mutualisme inductible, les endophytes ne sont pas associés aux semences, ils colonisent uniquement les parties végétatives et se disséminent par l'air ou dans l'eau.

Les facteurs influençant la transmission chez les endophytes sont peu rapportés. Mais, l'effet du climat sur le taux d'infection des plantes hôtes a été suggéré par ce dernier auteur comme conséquence de son fort pouvoir d'influer la germination des spores.

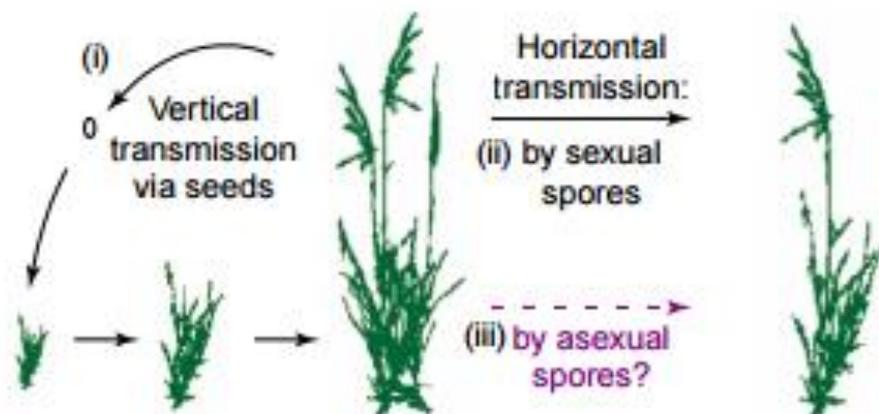


Figure 01 : Modes de transmission du champignon endophyte systemique *Neotyphodium* (anamorpha *Epichloe*) sur son hôte *Festuca arundinacea* (Saikkonen et *al.*, 2004).

VI. Spécificité des Endophytes :

Peu d'études ont mis en évidence la spécificité chez les champignons néophytes. Cependant, les communautés fongiques endophytes en général, ont montré la spécificité d'hôte unique au niveau des espèces végétales, mais cette spécificité pourrait être influencé par les conditions environnementales ; Comme ils peuvent coloniser plusieurs espèces hôtes du même famille taxonomique dans le même site géographique .Toute fois il est important de connaître cette spécificité afin de comprendre la co-évolution des champignons et des plantes hôtes (Cohen, 2004).

L'association des endophytes qui colonisent un hôte particulier varie à la fois avec l'habitat et l'hôte (Shulz et Boyle, 2005). Une différence de colonisation peut être observée entre les tissus végétatifs (Salgado et *al.*, 2007), les organes, les sites (conditions géographiques et climatiques) (Botella et Díez, 2011), et même les habitats où la plante s'est développée (Salgado et *al.*, 2007, Cuzzi et *al.*, 2012). Cependant, pour la spécificité environnementale, certains endophytes ont montré une adaptation à des habitats très spécifiques (Shulz et Boyle, 2005).

Cosoveanu et *al.*, (2014), ont enregistré chez la vigne une relation hôte-endophyte spécifique chez 75% des espèces endophytes isolés pour chaque cépage. Chez les eucalyptus, une spécificité tissulaire a été détecté, *Aureobasidium sp.*, *Hormonema sp.*, *Leptostroma sp.*, *Plectophomella sp.* *Pleurophomella sp.* et *Phomopsis sp.* sont apparemment limitées aux tissus foliaires, tandis que d'autres endophytes semblent coloniser tous les tissus sans discrimination (Fisher et *al.*, 1993).

En outre, nous notons que la variation par rapport à l'aire de répartition de la plante hôte reste mal connue, vu que la plupart des études écologiques sur les endophytes menées à ce jour ont porté sur les hôtes recueillies au sein de leur gamme de croissance naturelle (Fisher et *al.*, 1993).

VII- Rôles et Applications :

Les endophytes tirent trois prestations de base de la plante hôte : l'alimentation, l'eau, et la protection physique contre les adversités biotiques et abiotiques. En retour, la plante hôte peut être protégé par les endophytes qui peuvent produire des métabolites secondaires, par exemple alcaloïdes, des

antibiotiques ou des toxines (Schulz et *al.*, 1999) contre les insectes ou d'autres agents pathogènes au lieu de causer des dommages (Romero et *al.*, 2001).

Souvent les métabolites produits par les champignons endophytes peuvent être neutres ou antagonistes à l'hôte et certains métabolites sont d'une grande importance pour l'industrie de la pharmacologie.

1- Phytostimulation : les champignons endophytes fournissent souvent une suite d'avantages notamment l'augmentation de croissance (Jia et *al.*, 2015) et les plantes associés aux endophytes se développent plus rapidement que celles non associées (Selvi et Balagengatharathilagam, 2014) . La capacité de *Cladosporium* à produire de la gibbérilline et de favoriser la croissance a été mise en évidence la première fois par Hamayun et *al.* (2009) sur des plants de riz et de soja. *Néotyphodium coenophialum*, champignon endophyte de Fétuque, aide son hôte à la survie et à la récupération d'un déficit en eau. Il agit en partie en induisant une accumulation rapide des solutés après le stress hydrique (Spyreas et *al.*, 2001)

2- Production de pigments : Certaines espèces de *Talaromyces* sécrètent de grandes quantités de pigments rouges. La littérature a lié ce caractère à des espèces telles que *Talaromyces purpurogenus*, *T. albobiverticillius*, *T. marneffeii* et *T. minioluteus* souvent sous les noms antérieurs *Penicillium*. Les isolats identifiés comme *T. purpurogenus* ont été signalés comme étant très intéressants pour l'industrie et ils peuvent produire des enzymes extracellulaires et des pigments rouges (Frisvad et *al.*, 2013).

Une souche de *Penicillium purpurogenum* isolée des rameaux de *Ginkgo biloba* L, a été en mesure de produire des pigments rouges solubles abondants qui pourraient être utilisés comme colorant alimentaire naturel (Liu et *al.*).

Un pigment isolé du champignon endophyte *Monodictys castaneae* a été étudié pour son pouvoir d'inhibition de quelques bactéries pathogènes humains *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* et *Vibrio cholerae*. Le pigment a été révélé plus efficace que l'antibiotique commercial streptomycine (Visalakchi et Muthumary, 2009).

3- Production des enzymes : une richesse importante de champignons endophytes dans *Opuntia ficus-indica* a été enregistré, et la majorité des isolats présentait un potentiel prometteur pour le déploiement dans les processus biotechnologiques impliquant la production de pectinases, des cellulases, des

xylanases et des protéases. Tous les isolats analysés étaient xylanase positif, et la majorité était proteases. l'activité pectinolytique était présente chez *Aspergillus japonicus* et *Penicillium glandicola* alors que *Xylaria sp.* était la plus importante pour l'activité cellulase (Bezerra et al., 2012).

4- Activité antimicrobienne : La plupart des endophytes isolés à partir de plantes sont connus pour leur activité antimicrobienne. Ils aident à contrôler des microorganismes pathogènes chez les plantes et / ou des animaux (Nair et Padmavathy, 2014).

Les extraits méthanoliques et aqueux de *Fusarium chlamydosporum*, un champignons endophytes isolés à partir de *Tylophora indica* a montré une activité antibactérienne contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux médicaments (Chaturvedi et al., 2014). *Alternaria tenuissima*, *Colletotrichum truncatum*, isolés des feuilles et des tiges de la plante médicinale *Tylophora indica* se sont révélés être actifs à la fois contre *Sclerotium Sclerotinia* et *Fusarium oxysporum* (Kumar et al., 2011).

5- Source de bioactifs et de nouveaux composés : Un nombre croissant de preuves suggère que les micro-organismes associés aux plantes, en particulier, bactéries et les champignons endophytes et de rhizosphère, représentent une ressource énorme et largement inexploité de produits naturels avec des structures chimiques qui ont été optimisés par l'évolution de la connaissance biologique et écologique. Une large gamme de petites molécules bioactives naturellement produits a été rencontrée dans ces micro-organismes. Plus de 230 métabolites ont été isolés et caractérisés à partir de plus de 70 souches microbiennes associés aux végétaux au cours des quatre dernières années (Gunatilaka, 2006).

Dans les plantes, les substances bioactives sont produites sous forme de métabolites secondaires (Selvi et Balagengatharathilagam 2014, Mishra et al., 2014). les endophytes sont capables de synthétiser ces composés, utilisés par les plantes pour la défense contre les agents pathogènes et qui peuvent être utilisés pour la découverte de nouveaux médicaments (anticancer, antibiotique, immunosuppression).

Des études récentes ont rapportés des centaines de produits naturels, y compris les alcaloïdes, les terpènes, les flavonoïdes et des stéroïdes, à partir d'endophytes (Nair et Padmavathy, 2014).

Taxol est un composé bioactif anticancer, dont les recherches ont attribué beaucoup d'attention. Ce bioactif peut être extrait de plantes notamment les arbres de *Taxus*, comme il peut être obtenu de champignons endophytes (Pandey et al., 2014) tel que *Colletotrichum gloeosporioides* isolé des feuilles de la plante médicinale *Justicia gendarussa* (Gangadevi et Muthumary, 2008).

6- Agents de biocontrôle : les micro-organismes endophytes sont considérés comme un agent de lutte biologique efficace, alternative à la lutte chimique (Nair et Padmavathy, 2014), contre les insectes et les agents pathogènes (Romero et al., 2001).

L'activité nematicide du champignon endophyte *Fusarium oxysporum* était approuvé *in vitro* contre *Radopholus similis*, l'un des importants agresseurs du bananier (*Musa sp.*), qui provoque de graves nécroses racinaires (Athman et al., 2006). Chez les agrumes, *Nodulosporium* est utilisé comme biofumigant contre *Penicillium expansum* et *penicillium digitatum* agents de pourriture des fruits (Suwannarach et al., 2013). Chez les graminées, les endophytes systémiques agissent principalement à travers l'action de mycotoxines, telles que des alcaloïdes, qui protègent la plante hôte des herbivores (Faeth, 2002).

7- Bioremédiation : La bioremédiation est une méthode d'élimination des déchets et des polluants par des processus biologique et grâce à la diversité des métabolites microbiens. Plusieurs organismes ont démontré la capacité de dégrader efficacement le Polymère Polyester Polyuréthane (PUR). Ce pouvoir est mis en évidence chez *Pestalotiopsis microspora* champignon isolé de plantes ligneuses (Russell et al., 2011).

8- Production de composés organiques volatils et leurs Avantages : certains champignons endophytes sont des producteurs de Composés Volatils Organiques (COV). Ces composés peuvent avoir un effet antimicrobien contre des agents pathogènes. En plus ils élargissent la potentialité d'application des champignons endophytes, un COV produit par *Hypoxyton sp.*, est utilisé comme additif de carburant.

IV. Contraintes liées aux Endophytes :

Comme les plantes semblent détecter les endophytes et les agents pathogènes par un ensemble similaire de gènes, les endophytes ont la possibilité

de contourner ou de supprimer les mécanismes de défense des plantes destinés à protéger la plante contre les bioagresseurs (Hallmann et Sikora, 2010).

Ainsi, l'utilisation des endophytes non pathogènes mutants, issus des isolats pathogènes, comme agents de lutte biologique pour élaborer des stratégies de gestion des ravageurs écologiquement sûrs peut avoir un impact considérable sur les pratiques agricoles futures (Freeman et Rodrigue, 1993).

Chapitre II : Généralités sur la Lutte Biologique

La prise de conscience des effets secondaires de l'utilisation des pesticides sur l'environnement et la santé humaine est actuellement à l'origine d'une révolution verte. Cette révolution tend à se répandre moins de pesticides et généralement à utiliser des produits plus sélectifs et moins polluants (Siegwart et *al.*, 2015).

I. Définition :

Plusieurs définitions ont été attribuée à la lutte biologique, les plus couramment rencontrées sont :

« Utilisations des organismes ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisible aux productions végétales ». Cette définition est intéressante et assez complète puisqu'il est envisagé non seulement l'utilisation des organismes vivants mais aussi leurs produits. Par contre elle n'envisage que la protection des productions végétales.

« Utilisation des organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs ». Cette définition est plus restrictive mais a le mérite d'introduire la notion de prévention

La définition de la lutte biologique adopté par OILB-SROP (Organisation Internationale de lutte Biologique est la suivante : « Utilisation d'organismes vivants, appelés auxiliaires, ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou les dommages causés par des organismes nuisibles » (Suty, 2010).

Bio contrôle et lutte biologique sont parfois utilisés comme des synonymes car les deux font appel à des auxiliaires naturels pour combattre un bioagresseur. Cependant certains chercheurs les distinguent et trouvent que contrairement au biocontrôle, la lutte biologique n'inclut pas l'utilisation des phéromones de synthèse ou de substances naturelles d'origine minérale.

De son côté, le biocontrôle n'intègre pas les vertébrés considérés comme un outil pour la lutte biologique (Anonyme, 2016)

II. Les utilisations de la lutte biologique :

La lutte biologique est un domaine en croissance rapide qui rassemble des scientifiques de nombreux horizons disciplinaires, écologistes, entomologistes, des scientifiques de mauvaises herbes, des phytopathologistes, des pathologistes d'insectes et de microbiologistes tous aborder le sujet sous des angles différents, et ont en partie développé vocabulaires spécialisés. Les principales utilisations des agents de lutte biologique sont:

1- Le contrôle biologique des parasites invertébrés en utilisant les prédateurs, parasitoïdes et agents pathogènes ;

2- La lutte biologique contre les mauvaises herbes à l'aide des herbivores et des agents pathogènes ;

3- Le contrôle biologique des agents pathogènes des plantes en utilisant des micro-organismes antagonistes et induction de la résistance chez les plantes.

De plus, l'exploration de la lutte biologique a commencé maintenant en science vétérinaire et dans la recherche et la pratique de la médecine humaine (Eilenberg et al., 2001).

III. Mécanismes d'action d'un agent de lutte biologique :

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition (pour éléments nutritifs, l'oxygène, l'espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. :

III.1. Antibiose :

L'antagonisme dans ce cas s'exerce par l'intermédiaire de substance toxiques produites par un organisme et libérées dans le milieu ambiant, et qui peuvent inhiber le développement d'un autre microorganisme (Alabouvette et Davet, 1985).

Trichoderma peut inhiber le pathogène par la production des antibiotiques (Kleifeled et Chet, 1992) qui peut être associée à la production des enzymes (Yededia et al., 2000).

III.2. Parasitisme :

Le mycoparasitisme est la forme de parasitisme qui existe entre les champignons (Dommergues et Mangenot, 1970). D'après Mangenot et Diem (1979) cette action peut être mécanique et/ou biochimique.

Trichoderma est très connu comme mycoparasite qui peut se développer à travers les hyphes de certains champignons (Harman, 1996).

Le parasitisme est éventuellement rencontré chez les champignons entomopathogènes tel que *Beauveria sp.*

Le mode d'infection des microchampignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes qui sont l'adhésion, la germination, la différenciation et la pénétration.

III.3. Compétition :

La compétition peut être nutritive ou spatiale. La compétition nutritive entre microorganisme est probablement le mécanisme le plus général en lutte biologique (Thrane et al., 2000). Elle se manifeste chaque fois où un élément indispensable à leur développement est présent en quantité limitée (Baker et Cook, 1974).

III.4. Stimulation de la croissance végétale :

Certains agents antagoniste tel que *Trichoderma* peuvent favoriser directement d'une part la croissance végétale ce qui permet d'améliorer le rendement, plus le contrôle direct de la maladie ; et stimuler d'autre part les mécanismes de défense chez la plante (Meera et al., 1995).

IV. L'Entomopathogénécité :

Le plus grand pourcentage de perte (70%) de plantes est attribué aux insectes cependant, le recours aux pesticides chimiques a entraîné des problèmes, y compris les risques pour la sécurité alimentaire , la contamination de l'environnement, les épidémies de ravageurs secondaires, la résistance aux insecticides et de la diminution de la biodiversité.

Par conséquent, un besoin urgent se dévoile pour le développement de nouvelles avenues de lutte biologique, par la mise en œuvre de méthodes écologiques telles que les entomopathogènes.

Dans la recherche de La lutte contre les insectes ravageurs, en particulier par leurs ennemis naturels comprenant les parasitoïdes, les prédateurs et les agents pathogènes, les agents de biocontrôle fongiques sont prometteurs parce qu'ils agissent par contact et ne nécessitent pas une ingestion, ils peuvent être produit en masse très facilement et sont très spécifiques à l'hôte (Vijayabharathi et *al.* , 2014).

Les champignons constituent le groupe le plus important d'organismes entomopathogènes avec plus de 500 espèces reconnus comme parasite d'insectes. La plupart des groupes taxonomiques contiennent des genres entomopathogènes, comme *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Entomophthora*, *Neozygites*, pour ne citer que quelques-uns (Yubak Dhoj G et *al.*, 2004)

V. Les organismes antifongiques :

Les champignons pathogènes se retrouvent dans tous les taxons. Leurs hôtes sont parfois des animaux, mais c'est au sein des végétaux, dont tous les taxons peuvent être parasités, que leur incidence économique est plus importante (Lepoivre, 2003). De ce fait, la recherche des méthodes de lutte efficaces tout en respectant l'environnement pour les combattre est primordiale.

Les microbes sont un trésor boîte qui contiennent des antibiotiques. De nouvelle arène avec les produits isolés à partir de microbes bénéfiques a été introduit pour la protection des cultures. Les virus, les bactéries et les champignons peuvent agir comme agents de lutte biologique contre champignons phytopathogènes (Vijayabharathi et *al.* , 2014).

La lutte biologique contre les pourritures des fruits en utilisant des microorganismes antagonistes s'est déjà révélée comme une alternative aux fongicides de synthèse. En effet, des résultats très encourageants ont été rapportés sur plusieurs types de fruits tels que les agrumes, les pêches, les fraises les pommes et les poires (Taqaarort et *al.*, 2008).

VI. Contraintes liées à lutte biologique :

Selon Le Ru (1989), l'application d'une procédure de lutte biologique peut être limitée par certaines contraintes, à savoir :

Les contraintes scientifiques :

-Nécessité de poursuivre sur plusieurs années des études de bioécologie et de systématique avant d'introduire de nouveaux auxiliaires.

- Nécessité de mettre au point des techniques de production de masse des auxiliaires..

- Nécessité de publier les résultats des recherches.

Les contraintes techniques :

- Nécessité de former des personnes responsables de la vulgarisation.

- Nécessité d'informer les cultivateurs.

Les contraintes économiques :

- Les pullulations spectaculaires d'un ravageur, si elles se traduisent par des pertes de rendements trop importantes, nécessitent une intervention rapide.

VII. Généralités sur l'agent de biocontrôle *Trichoderma* :

Les espèces de *Trichoderma* sont généralement considérées comme des organismes du sol qui colonisent les racines des plantes. Toute fois des études récentes montrent que ces espèces sont également capables de coloniser les tissus de la partie aérienne des plantes (Bailey et *al.*, 2009).

Depuis le travail de Weindling et Fawcette sur l'utilisation des souches de *Trichoderma* pour le contrôle de *Rhizoctonia solani*, agent de fente de semis des Citrus, l'isolement et l'identification de ces champignons antagonistes ont pris l'attention de plusieurs chercheurs. Aujourd'hui on y convaincu que ces champignons facilement isolés et à développement volontaire sont des agents intéressant pour leur large échelle d'application (Ben Hamou et Chet, 1996).

VII.1. Description générale :

Le genre *Trichoderma* est un Moniliale, classe des Hyphomycetes et de la famille des Moniliaceae. Bien que la forme sexuée de la majorité des espèces de *Trichoderma* n'est pas connue, les seules formes téléomorphes connues se rattachent au genre *Hypocrea* de la classe des Ascomycetes (Leutchman et *al.*1996).

Les membres de ce genre produisent sur un milieu de culture des colonies blanchâtres, jaunâtres ou verdâtres. Les conidiophores hyalin dressés et très ramifiés portent des phialides solitaires ou groupés mais non verticillés. Les conidies unicellulaires hyalines et ovoïdes, sont groupées en tête de l'extrémité de chaque phialide. Selon Rifaï (1969), ces champignons sont connus par leur croissance rapide. Cet auteur a distingué 9 espèces de *Trichoderma* en se basant sur les morphologiques. En 2003, Mac Cray a distingué plus d'une trentaine d'espèces.

L'activité antagoniste et les propriétés physiques varient d'une espèce à une autre (Thrane et *al.*, 2000).

VI.2. Méthodes d'application :

Plusieurs méthodes d'application de ces champignons antagonistes ont été développés avec le but d'augmenter la prolifération et l'établissement de l'agent. En générale les méthodes appliquées sont :

- Traitement du sol : ces champignons peuvent être additionné au sol en suspension ou en inoculat solide.
- Traitement de semences : c'est une technique très utilisée pour les antagonistes microbiens.
- Traitement aérien : plusieurs exemples réussis pour l'application de *Trichoderma* sur les parties aériennes des plantes étaient cités (Papavizas, 1985).

Chapitre III : Matériel et Méthodes

III.1. Objectifs de l'étude :

L'objectif de cette étude est de rechercher quelques avantages que des champignons endophytes isolés à partir des feuilles d'agrumes peuvent nous fournir comme agents de biocontrôle.

Pour cette raison deux parties sont discriminées :

- La première partie consiste à l'isolement et l'identification des champignons endophytes.
- La deuxième partie est consacrée aux tests d'antagonisme et d'insecticide de l'un des isolats de champignons identifiés.

III.2. Isolement et identification des champignons endophytes d'agrumes

III.2.1. Sélection du matériel végétal :

Afin de procéder à l'isolement de champignons endophytes, des échantillons de feuilles et tiges adultes et d'apparence saine, d'arbres de *Citrus* sont collectés au niveau de deux vergers d'agrumes (Figure 03) situés dans deux communes à vocation agrumicoles, Boufarik et Soumâa dans la wilaya Blida.

Le premier verger est un verger d'oranger (*Citrus sinensis*) situé à Boufarik, âgé de 14 ans et bien entretenu. Les arbres sont traités par un insecticide suite à l'apparition d'un début d'attaque par la mineuse des agrumes *Phyllocnistis citrella*.

Le second verger est un verger de mandarinier (*Citrus reticulata*) situé à Soumâa, planté en 1956, et abandonné depuis 3 ans d'environ. Nous avons constaté la présence de cochenilles sur quelques feuilles et tiges.

Une ligne d'arbres de bigaradier (*Citrus aurantium*) existante à l'entrée de ce second verger, a fait partie de notre échantillon pour élargir nos collectes.

L'échantillonnage a été effectué le 13 Avril 2016. Des feuilles âgées et des tiges d'apparence saine sont collectées au hasard du centre des vergers.

Les feuilles et les rameaux collectés sont mis dans des sachets en papier pour être acheminés au laboratoire. Ils ont été soit utilisés le jour même de leur prélèvement

soit conservés au frais à 5°C pour être utilisés dans les 48 heures qui suivent les prélèvements.



Figure 03 : Vergers choisis pour les prélèvements des échantillons végétaux (1^{er} verger à Boufarik, 2^{ème} verger à Halouya, Soumâa) (Originale, 2016).

III.2.2. Technique d'isolement

Pour procéder à l'isolement des champignons endophytes à partir des échantillons déjà collectés, nous avons suivi la méthode préconisée par Shutsrirung et *al.*, (2013).

Les échantillons sont lavés à l'eau de robinet avant leur stérilisation. Après ce lavage, les feuilles sont coupées en pièces de 1x1cm et les tiges en segments de 1cm de longueur.

Les pièces sont immergées dans une solution d'Hypochlorite de sodium (NaOCl à 1%) pendant 1mn, puis dans une solution d'Ethanol à 70% pendant 5mn, suivi d'un rinçage successives à l'eau distillée stérile, séchés entre deux feuilles de papier filtre stérile et déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar).

La troisième étape a consisté à placer les échantillons dans des boîtes de pétri contenant du milieu PDA . à pH=6,5-7 (Johnston et Booth C. 1983), à raison de cinq (05) fragments végétaux par boîte. Le milieu de culture préparé auparavant est enrichi par un antibiotique pour empêcher le développement des bactéries.

Deux tests témoins ont été réalisés afin de s'assurer de l'efficacité de notre technique de stérilisation des surfaces d'organes végétaux ; et par conséquent, de l'absence d'épiphytes dans notre cortège fongique isolé. Le premier témoin consiste au passage de l'échantillon végétal stérilisé sur le milieu de culture ; Le deuxième témoin est réalisé par ensemencement de l'eau du cinquième et dernier rinçage (Sun et Guo, 2012).

Le développement des champignons dans les boîtes des témoins est contrôlé après 2 semaines d'incubation (Douanla-Meli et al., 2013). (Figure 04)

L'ensemble des boîtes est hermétiquement fermé puis incubé à $28C^{\circ} \pm 2$.

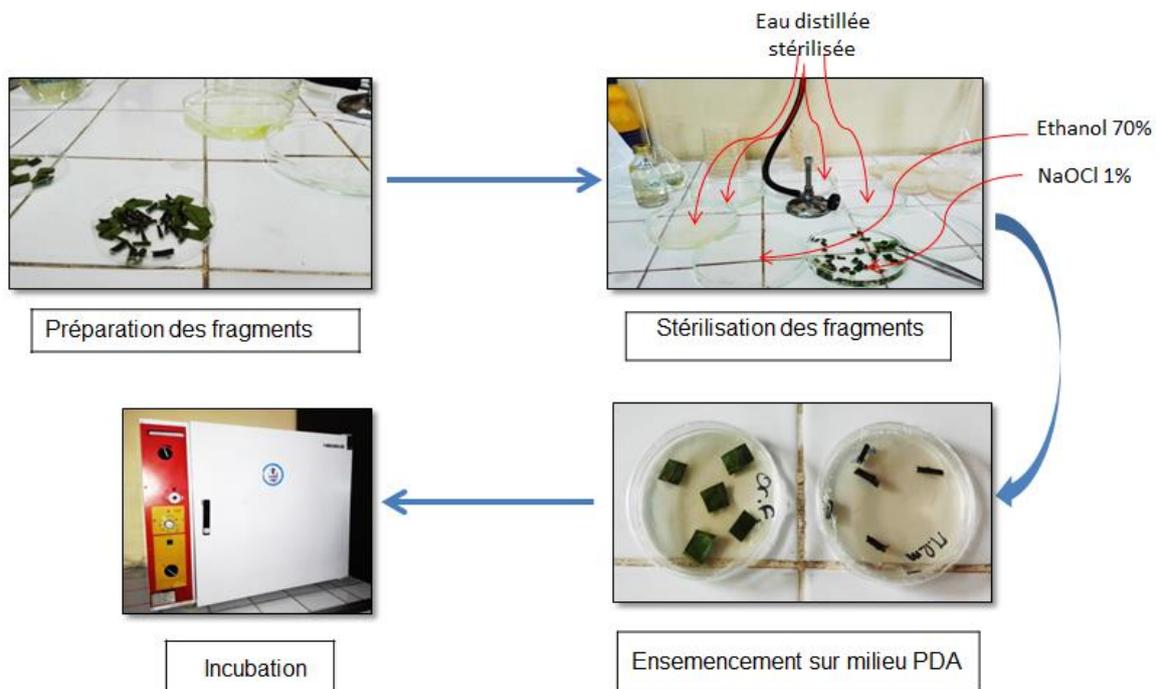


Figure 04 : Procédure d'isolement des champignons endophytes (Originale, 2016).

Après 10 jours d'incubation et l'apparition des premiers mycélium, une série de repiquages a été réalisée afin de purifier les champignons endophytes. Les colonies fongiques qui étaient distinctes les unes des autres selon les observations macroscopiques ont été purifiées.

III.2.3. Identification des champignons endophytes

L'identification des isolats est basée sur leurs aspects macroscopiques et microscopiques.

a) Aspect macroscopique : L'étude des colonies se base en général sur la forme, la taille, la texture et la couleur de celles-ci.

b) Aspect microscopique : L'identification microscopique d'un champignon prend en considération les caractères suivants :

- La forme du mycélium, la présence ou l'absence de cloisons, ainsi que la couleur et le mode de ramification.
- La forme et la taille des spores.

Deux guides ont été utilisés pour nous aider à l'identification il s'agit de: « Pictorial guide for the Identification of Mold Fungi on Sorghum Grain » de Navi et al. et le « Simplified Fungi Identification Key » de Williams-Woodward.

III.3. Etude des potentialités bio-contrôleuses d'un isolat endophyte choisi :

Cette partie sera consacrée à la mise en évidence d'une part, du pouvoir antagoniste de l'un des champignons endophytes isolés durant la première partie de notre expérimentation, contre deux champignons d'importance agricole; et de leur pouvoir insecticide à l'égard de deux insectes nuisibles l'un sur le peuplier et l'autre sur les denrées stockées, d'autre part.

III.3.1. Matériel biologique :

III.3.1.1. Isolats fongiques :

Nous avons choisi un isolat endophyte obtenu de feuille d'orange pour poursuivre la réalisation de la deuxième partie de notre travail. Les caractéristiques morphologiques ont permis de classer cet isolat parmi le groupe de *Trichoderma*. Ce choix se justifie par l'importance de ce taxon dans le biocontrôle notamment contre les organismes phytopathogènes.

Deux autres isolats fongiques proviennent de la collection fongique réalisée par Docteur MOUMENE. du Laboratoire des plantes médicinales au Département des Biotechnologies. Ces isolats ont été préparés pour le test d'antagonisme : il s'agit de *Fusarium sp.* et de *Rhizopus sp.* (Figure 05.)

Fusarium est un genre de champignons imparfaits (deutéromycètes).

Les formes parfaites (téléomorphes) de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des Ascomycètes (ordre des Hypocréales, famille des Nectriacées, genres *Gibberella*, *Calonectria*, et *Nectria*). Pour plusieurs espèces de *Fusarium*, le stade parfait demeure inconnu (Anonyme, 2016).

Position systématique des *Rhizopus*

Rhizopus est un genre de moisissures communes qui se développent sous forme de filaments dans les sols, sur les fruits et les végétaux en décomposition, il appartient à la famille des mucoraceae, ordre des mucorales classes des Zygomycetes



Figure 05 : Espèces fongiques testées
a: *Fusarium sp.* b: *Rhizopus sp.*

III.31.2. Insectes ravageurs :

L'activité insecticide de l'isolat endophyte *Trichoderma* est recherchée pour deux insectes bioagresseurs, étant donné leur disponibilité durant notre expérimentation. Il s'agit du puceron du peuplier et du charançon du riz.

Le puceron du peuplier (*Chaitaphorus leucomelas* L.) (Figure 06) : Ce puceron est présent sur des arbustes de peuplier au niveau de la faculté SNV- Université de Blida.

Cet hémiptère est connu par son pouvoir à attaquer toutes les parties de la plante rapidement et de sa grande reproduction parthénogénèse. Ces dégâts sont divers. Plus ceux d'ordre esthétique, il affaiblie la plante et transmet les virus lors de ses piqûres.



Figure 06 : Puceron du peuplier (Originale, 2016).

Le Charançon du riz (*Sitophilus oryzae* L.) (Figure 07): les individus de charançons traités au cours de ce travail font partie d'une population obtenue à partir d'un élevage de masse dans des bocaux contenant des grains de blé. L'élevage a été fait au niveau du laboratoire de zoologie de notre département durant la réalisation des études antérieures.

Sitophilus oryzae est un coléoptère ravageur de céréales stockées telles que le riz, le blé, l'orge et le maïs. L'alimentation vorace de grains entiers par cet insecte provoque une perte de poids des grains, la croissance fongique, et la perte de qualité qui se traduit par des niveaux accrus d'acides gras libres (Paliwalt et *al.*, 2004).



Figure 07 : Charançon du riz (Anonyme, 2016).

III.3.2. Techniques de détermination des potentialités biologiques recherchées :**III.3.2.1 Test insecticide :****III.3.2.1.1. Préparation des suspensions sporales****Préparation de la suspension mère :**

A partir d'une culture bien sporulée, les colonies sont grattées et introduites par la suite dans un Erlen Meyer contenant 100 ml d'eau distillée stérilisée (**Figure 08**).

Pour homogénéiser la suspension, nous avons procédé à une agitation pendant 20 minutes puis la filtration de la suspension à travers un papier filtre. La concentration du filtrat récupéré (solution mère) est évaluée à l'aide de la cellule de Malassez.

Pour accomplir le comptage, il faut :

- Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer la lamelle ;
- Déposer la lamelle sur les rebords, celle-ci doit adhérer par un "effet ventouse" ;
- Placer la pointe d'une pipette Pasteur, contenant de la suspension, près de la lamelle et délivrer par capillarité le liquide en évitant tout débordement vers les rigoles ;
- Laisser sédimenter les spores sur le quadrillage avant de commencer le comptage.

La concentration est calculée comme suit :

$$\begin{aligned} [\text{Suspension}] &= \text{la moyenne des spores dans 10 rectangles} \times 10^2 \text{ spore/mm}^3 \\ &= \text{la moyenne des spores dans 10 rectangles} \times 10^5 \text{ spore/ml.} \end{aligned}$$

Préparation des doses :

A partir de la solution mère préparée précédemment, d'autres dilutions sont établies en vue de réaliser les différents traitements biologiques.

Les dilutions sont préparées suivant la formule :

$$C1 V1 = C2 V2$$

C1 : La concentration de la solution mère, **C2** : La concentration recherchée, **V1** : Volume prélevé de la solution mère , **V2** : Volume de la solution diluée.

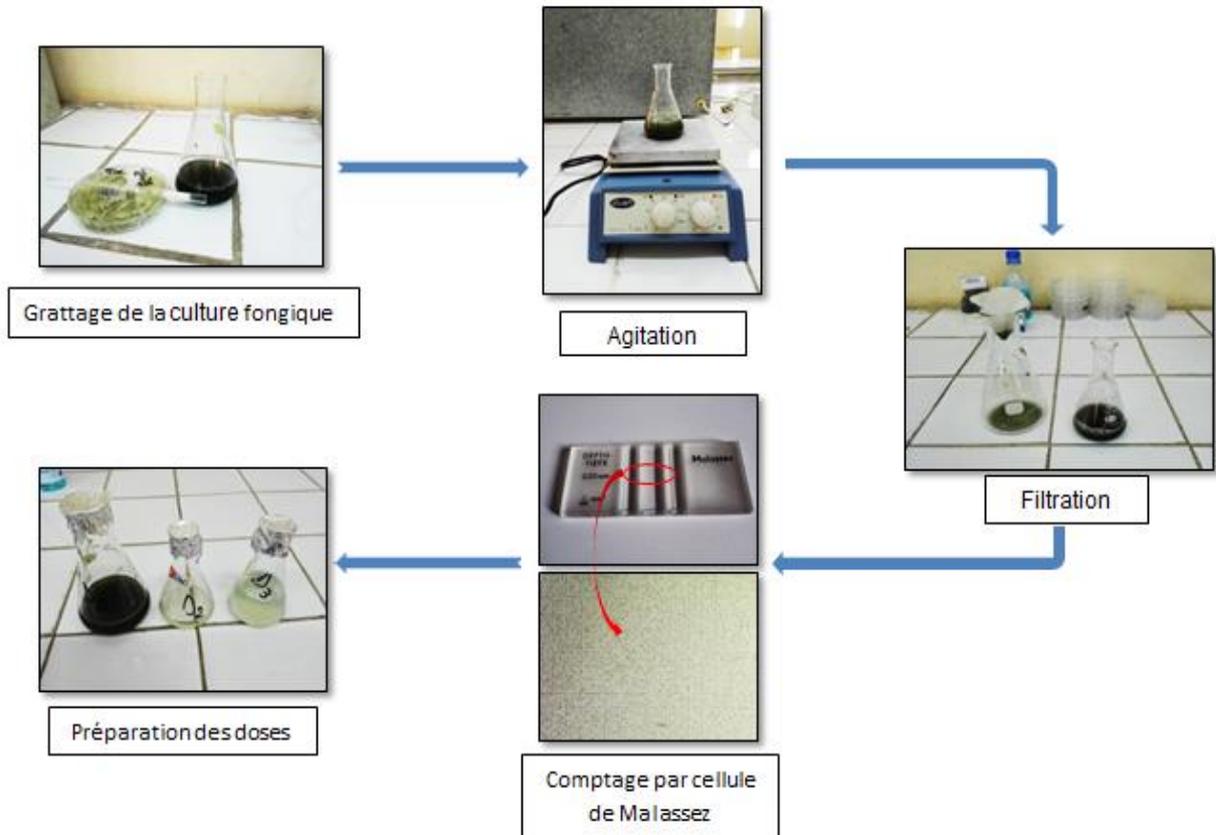


Figure 08 : Procédure de préparation des suspensions sporales (Originale,2016).

III.3.2.1.2. Bioessais :

❖ Sur le puceron du peuplier :

Afin de tester le potentiel insecticide vis-à-vis de *Chaitaphorus leucomelas*, l'isolat de *Trichoderma sp.* est appliqué par pulvérisation de la suspension sporale à l'aide d'un pulvérisateur manuel, sur les feuilles d'un peuplier présentant une importante infestation par le puceron cible. (Figure 09)

Le traitement est appliqué en trois concentrations : D1= 1.57×10^7 spores/ml, D2= 1.57×10^6 spores/ml et D3= 7.85×10^5 spores/ml , chacune d'elles étant répétée trois fois. Une tige de peuplier contenant plus de 7 niveaux de feuilles est considérée pour une répétition et pulvérisée par 10 ml de la suspension sporale du *Trichoderma*. Les témoins sont pulvérisés par de l'eau distillée stérilisée.



Figure 09 : Plants du peuplier ayant servi au test insecticide par *Trichoderma* sur *Chaitaphorus leucomelas* .

La mortalité est suivie durant une période entre 48 heures et 10 jours après le traitement, en observant à l'aide d'une Loupe binoculaire des échantillons foliaires traités et témoins prélevés aléatoirement.

❖ Sur le charançon du riz :

Pour évaluer le potentiel insecticide de *Trichoderma* contre *Sitophilus oryzae*, nous avons adopté la méthode de traitement préconisée par Fréchette (2009). L'inoculation d'après cet auteur, est réalisée par contact direct par trempage des insectes dans une suspension sporale avec les doses D1= 4.32×10^7 et D2= 2.68×10^9 spores/ml. Les insectes du groupe témoin sont immergés dans de l'eau distillée stérilisée. Les charançons sont ensuite transférés dans des boîtes de pétri comportant quelques graines de blé, à raison de 20 individus par boîte. Chaque traitement est répété en trois (03) fois. Les différentes boîtes de traitement sont placées à une température ambiante à l'obscurité,(**Figure 10**).

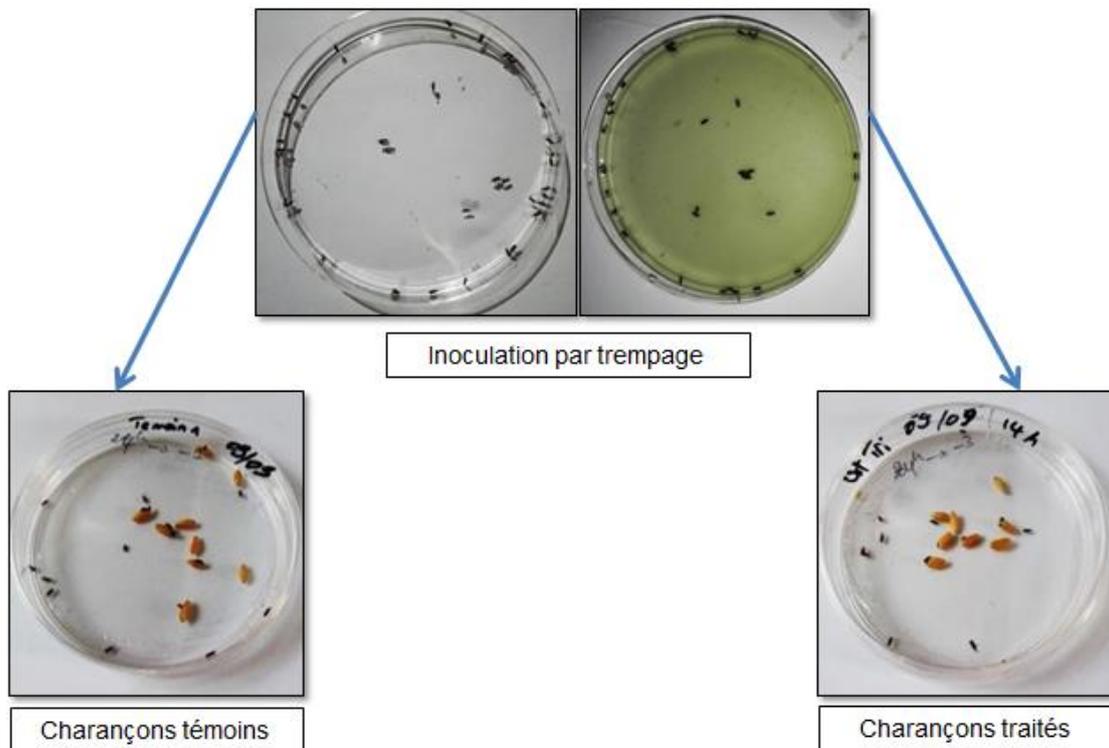


Figure 10 : Test d'effet insecticide de *Trichoderma* sur *Sitophilus oryzae*

❖ Sur *Fusarium sp* et *Rhizopus sp*

Un test d'antagonisme a été réalisé contre les deux isolats fongiques cibles précédemment cités.

La méthode préconisée pour ce test est celle «des cultures opposées » aussi nommée « la confrontation directe ». Elle repose sur le principe de mettre l'antagoniste et le pathogène en contact direct dans une même boîte de pétri contenant un milieu de culture approprié.

A l'aide d'une pipette Pasteur, les explants fongiques sont prélevés de cultures mycéliennes préparées auparavant et sont mis simultanément en co-culture. L'explant du pathogène est déposé au centre de la boîte contenant un milieu PDA. Deux explants de l'antagoniste sont posés sur la même ligne que le pathogène et à 1.5cm de la périphérie de la boîte.

Le témoin est représenté par une culture du pathogène seule réalisée dans les mêmes conditions.

Pour chaque isolat traité (*Fusarium sp.* et *Rhizopus sp*) l'essai de confrontation est répété trois (03) fois et le témoin en deux (02) répétitions.

Les boîtes de pétri sont fermées hermétiquement et incubées à température ambiante. **(Figure 11)**

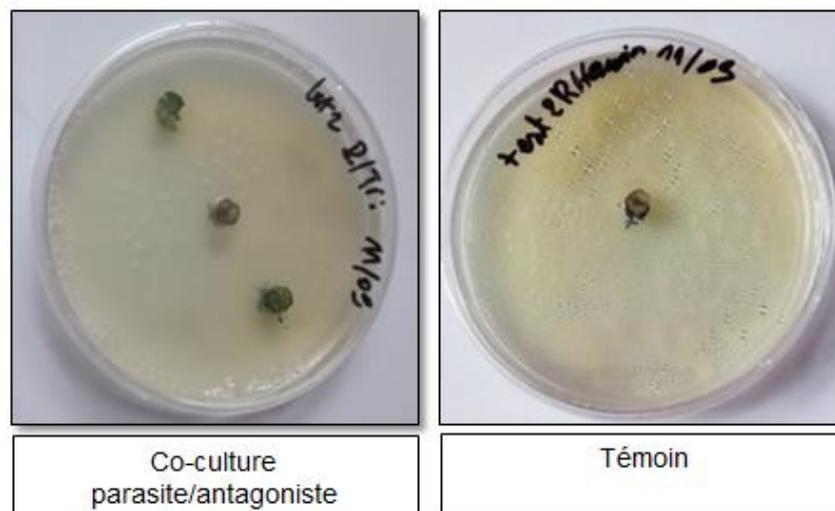


Figure 11: Test d'antagonisme par *Trichoderma*

III.3.2.13. Paramètres étudiés :**a- Pourcentage de colonisation par les endophytes**

Nous avons considéré le taux de colonisation par les endophytes au niveau de chaque espèce de citrus étudiée. Le taux de colonisation (CR), exprimé en pourcentage (%) est calculé après 2 mois d'incubation, selon la formule suivante (Cuzzi et *al.*, 2012) :

$$\text{CR} = (\text{Ni} / \text{Nt}) \times 100$$

Ni : nombre de segments avec un ou plusieurs isolats ;

Nt : total des segments échantillonnés.

b- Calcul du pourcentage de mortalité :

Nous avons évalué la mortalité durant la période s'étalant entre 48h et 10 jours, concernant l'étude de l'effet de *Trichoderma* sur les populations de *C. leucomelas* et de 24h à 72h, pour les individus de *S. oryzae*. Dans chaque cas, on dénombre les individus morts et vivants selon la formule :

$$\% \text{ mortalité} = (\text{nb de morts} / \text{nb total}) \times 100$$

Si le pourcentage de mortalité chez les témoins est compris entre 5% et 20% après exposition au traitement, la mortalité doit être corrigée en utilisant la formule d'Abbott (1925) (Ndomo et *al.*, 2009) :

$$\text{Mc} = (\text{Mo} - \text{Mt} / 100 - \text{Mt}) \times 100$$

Où : Mt est la mortalité chez le témoin et Mo est la mortalités chez les individus traités.

Le test est considéré valide si le pourcentage de mortalité chez les témoins est inférieur à 5% ou compris entre 5% et 20% après 72h.

c- Pourcentage d'inhibition

Le taux d'inhibition des champignons cibles est calculé en utilisant la formule édictée par Kumar et *al.*, (2011)

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(R-r)/R] \times 100$$

R : Rayon du témoin ;

r : rayon de la croissance mycélienne de pathogène en co-culture.

La notation du diamètre des colonies traitées est réalisée à deux reprises, la première quand les deux colonies se rapproche (après 48 heures d'incubation), la deuxième lorsque les filaments mycéliens atteignent la périphérie de la boîte dans les lots témoins.

III.4. Exploitation des données

Après calcul des moyennes des trois répétitions pour chaque interaction (concentration , agent fongique , insecte), des analyses statistiques ont été effectués en utilisant le SYSTAT vers. 7, SPSS 1997. Afin de tester les interactions entre les facteurs nous avons déterminé la variance à l'aide de GLM (General Linear Model). Les différences ont été considérées significatives à $P < 0.05$.

Chapitre IV : Résultats et Discussion

IV.1. Isolement et purification des champignons endophytes :

Après incubation, nous avons pu identifier certains isolats de champignons endophytes colonisateurs des échantillons d'agrumes collectés à la mi-avril. L'identification nous a été faite sur la base des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques.

IV.1.1. Inventaire des champignons endophytes isolés:

Un total de 18 isolats de champignons endophytes appartenant à 10 genres différents et six isolats non identifiés ont été obtenus à partir des feuilles et tiges des trois espèces de citrus étudiées, (Figures 12, 13, 14).

Nous avons enregistré la présence d'*Alternaria sp* et d'*Ulocladium sp.* chez les trois espèces de *Citrus*, *C. sinensis*, *C. reticulata* et *C. aurantium*. Des isolats de *Colletotrichum sp.*, *Rhizoctonia sp.* et *Trichoderma sp* ont été retrouvés chez l'oranger et le mandarinier. En revanche, *Geotrichum sp.* et *Nigrospora sp.* sont présents seulement chez l'oranger et le mandarinier, respectivement. Par ailleurs, les isolats de *Cladosporium sp.*, *Botrytis sp*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* *Botryosphaeria sp* et *Penicillium sp.* ont été identifiés uniquement pour le bigaradier (Tableau 01).

IV.1.2. Taux de colonisation :

Après deux mois d'incubation, et après constatation de l'arrêt d'apparition de nouvelles souches sur les milieux de culture, nous avons procédé au calcul du taux de colonisation des échantillons.

Le taux de colonisation chez les espèces d'agrumes étudiés varie entre 46% et 100%. En moyenne le taux le plus élevé est enregistré chez *Citrus sinensis* (90%) alors que le plus faible a été enregistré chez *Citrus aurantium* (70%) (**Figure 17**)

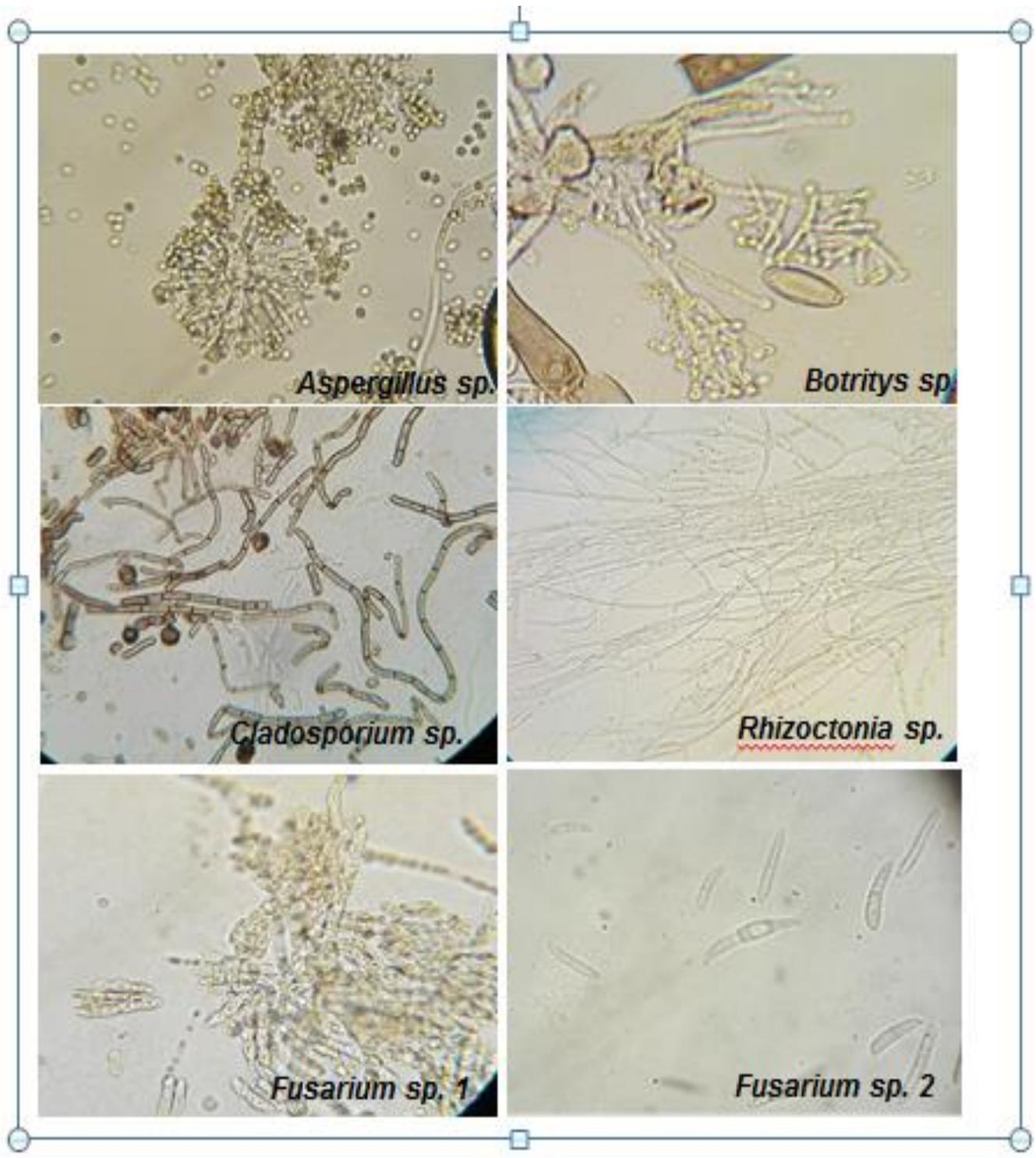


Figure 12 : Mycélium et spores de quelques isolats (Originale, 2016)
G: 40X10

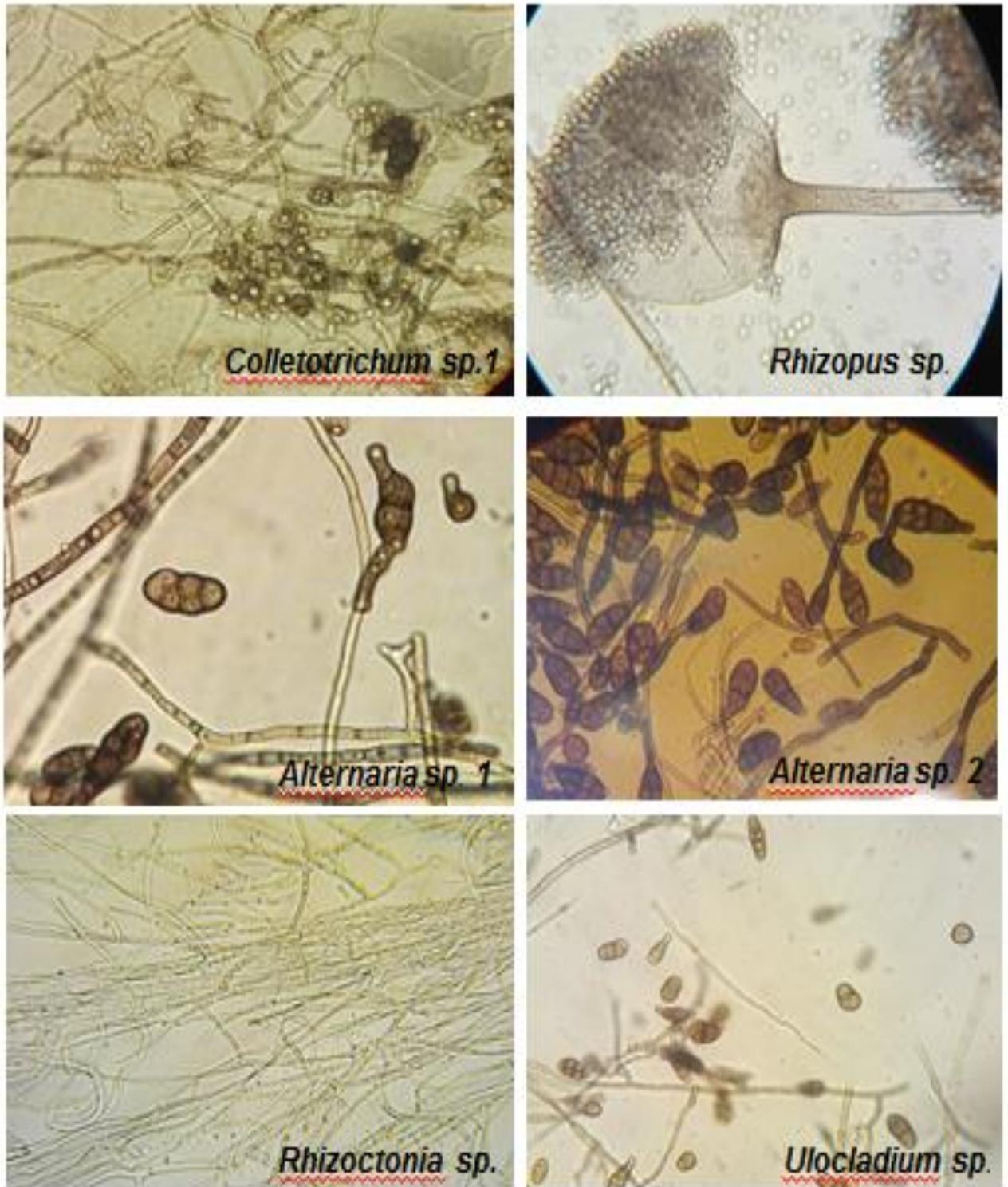


Figure 13 : Mycélium et spores de quelques isolats (Originale, 2016)
G: 40X10

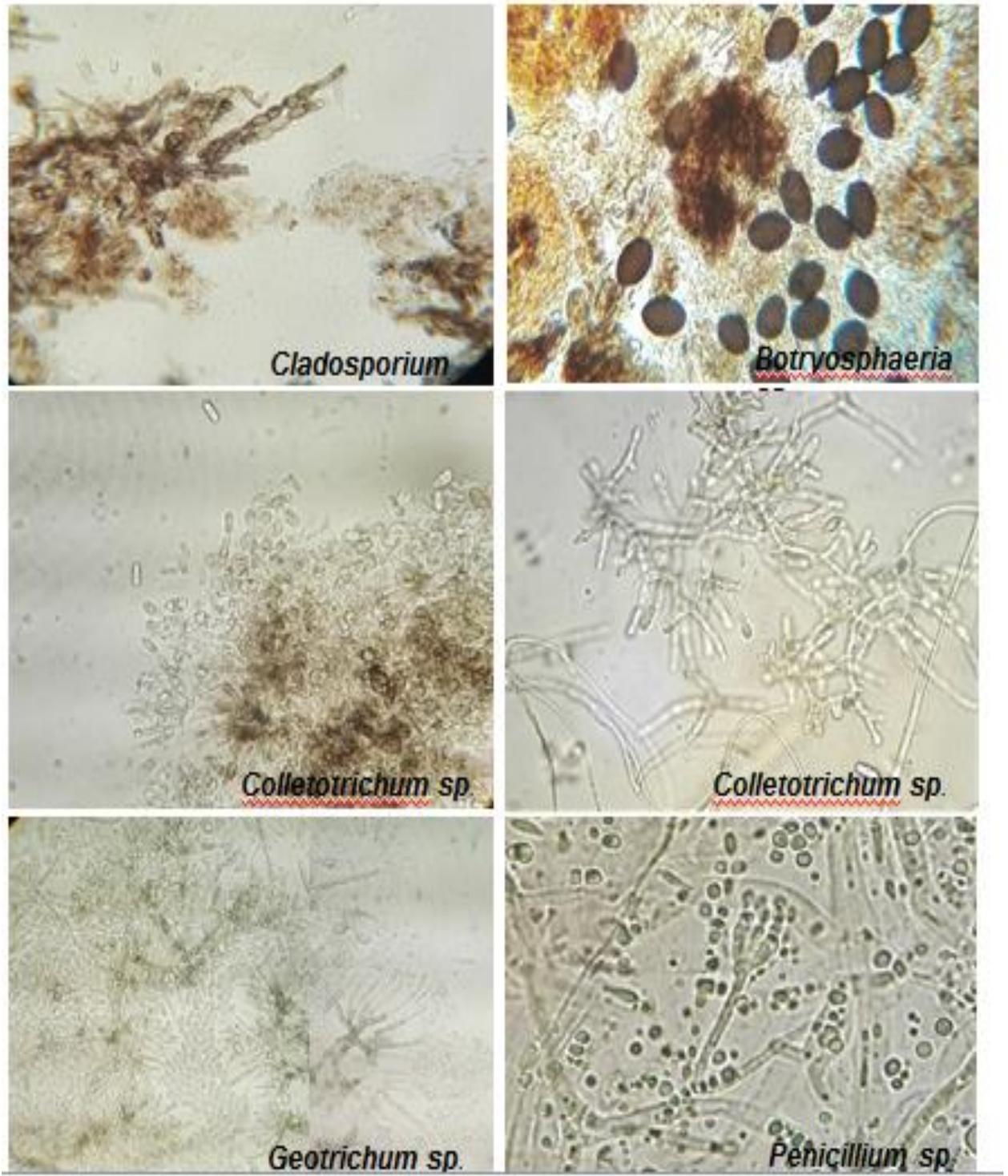


Figure 14 : Mycélium et spores de quelques isolats (Originale, 2016)
G: 40X10

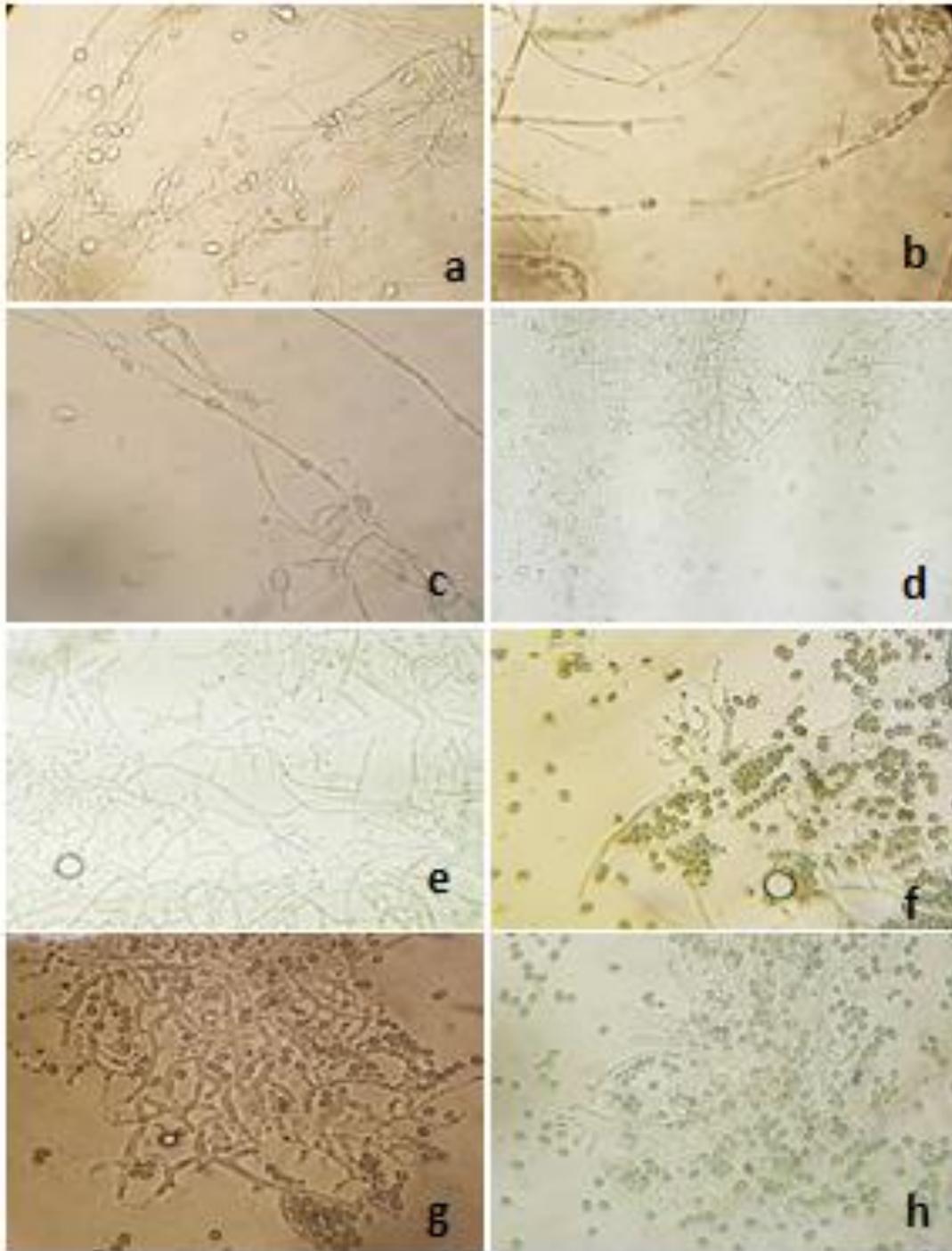


Figure 15 : a.b.c :chlamydospores de l' isolats *Trichoderma* sp.
d.e.f.g.h : Mycélium et spores de l'isolats *Trichoderma* sp.
(Originale, 2016, G: 40X10)

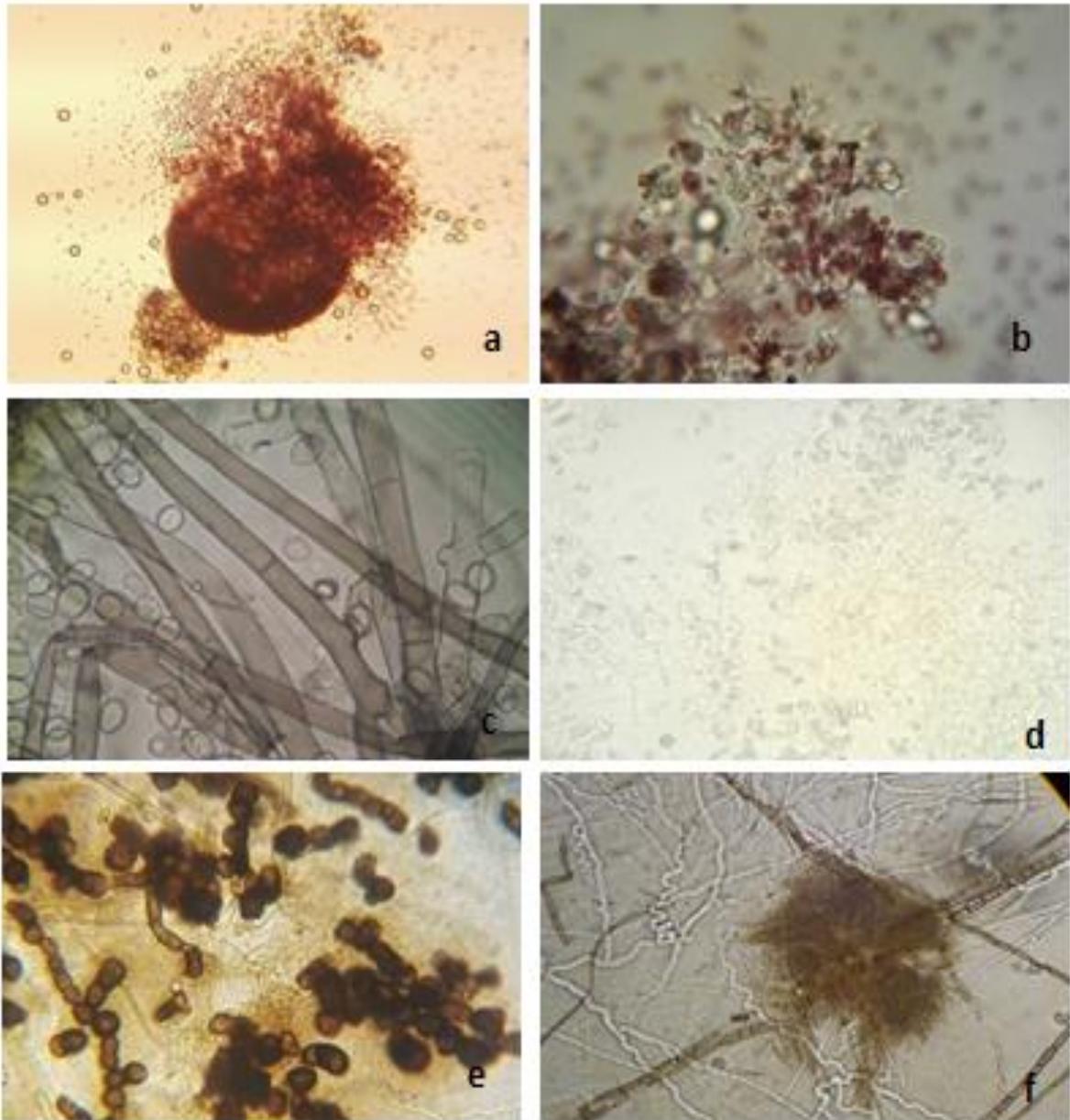


Figure 16 : (a et b).c.d.e.f : Mycélium et spores de quelques isolats.
(Originale, 2016, G: 40X10)

Tableau 01 : Inventaire des champignons endophytes par espèce de citrus hôte.

Plante hôte	Isolat fongique endophyte
Oranger <i>C.sinensis</i>	<i>Alternaria sp.</i>
	<i>Trichoderma sp.</i>
	<i>Colletotrichum sp.</i>
	<i>Geotrichum sp.</i>
	<i>Ulocladium sp.</i>
	<i>Botryosphaeria sp</i>
	Non identifié
Bigaradier <i>C. aurantium</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
	<i>Botrytis sp.</i>
	<i>Rizopus sp.</i>
	<i>Aspergillus sp.</i>
	<i>Fusarium sp.</i>
	<i>Penicillium sp.</i>
	<i>Ulocladium sp.</i>
	<i>Alternaria sp.</i>
Mandarinier <i>C. reticulata</i>	<i>Colletotrichum sp.</i>
	<i>Alternaria sp.</i>
	<i>Trichoderma sp.</i>
	<i>Rhizoctonia sp.</i>
	<i>Ulocladium sp.</i>
	Non identifié

L'analyse de la variance a révélé des différences non significatives du taux de colonisation que ce soit entre les espèces hôte ou entre les compartiments des organes végétaux (tiges et feuilles) échantillonnés. (**Tableau 2**)

Tableau 02: Analyse de la variance du RC selon l'espèce végétale et l'organe végétal de prélèvement.

Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
compartiment	10,185	2	5,093	0,006	0,994
Espèce de citrus	506,481	2	253,241	0,306	0,757
Erreur	2 478,704	3	826,235		

Test significatif si $P < 5\%$.

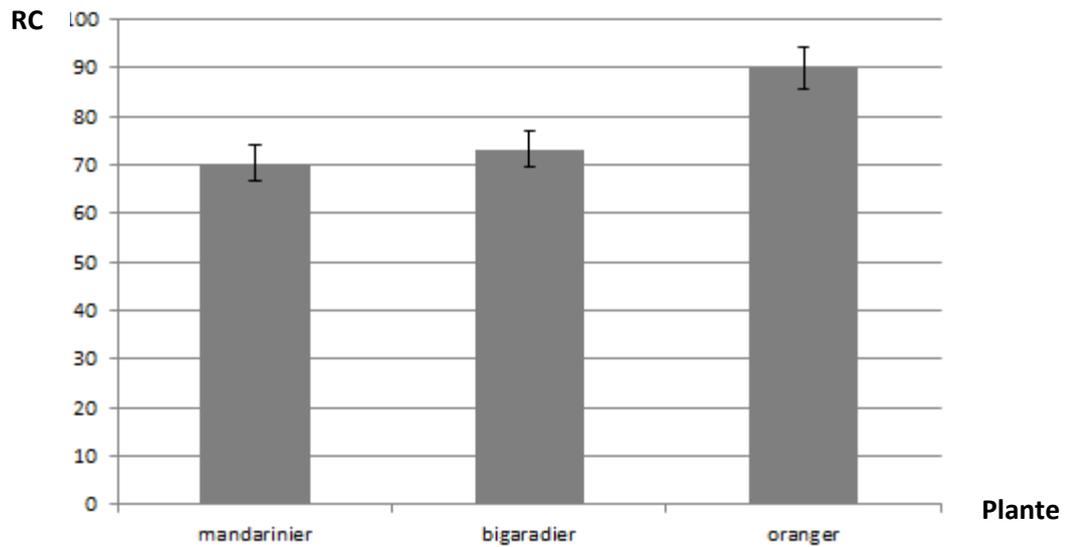


Figure 17 : Taux global de colonisation par les champignons endophytes chez chaque espèce d'agrumes.

Pour la variation de la colonisation entre les organes végétatifs, les taux les plus élevés sont enregistrés chez les feuilles de mandarinier par un RC= 100% et les tiges molles d'oranger RC= 93,33%, alors que le taux le plus faible est de 46,67% noté chez les feuille de bigaradier **Figure 18**

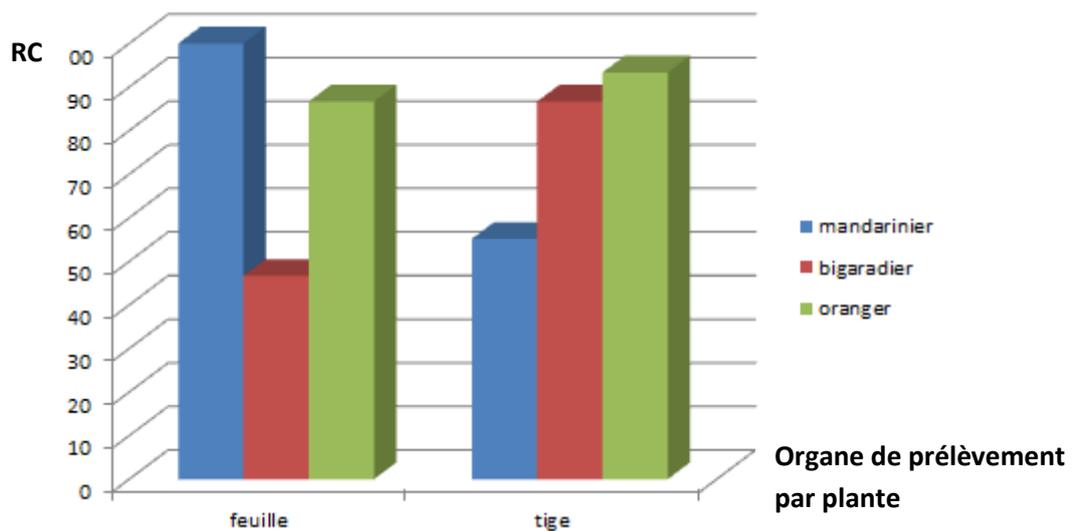


Figure 18 : Taux de colonisation par les champignons endophytes au niveau de chaque organe de prélèvement chez les trois espèces de citrus.

IV.2. Test d'inhibition :

La mise en confrontation directe du *Trichoderma* avec les isolats de *Fusarium sp.* et de *Rhizopus sp.* a montré une réaction positive notamment à l'égard de *Fusarium sp.* Cependant, l'effet inhibiteur observé évolue dans le temps et il varie entre le ralentissement et l'arrêt de la croissance mycélienne.

La croissance du *Rhizopus sp.* est ralentie. Après 48h d'incubation, un taux d'inhibition de l'ordre de 60% est observé. Alors qu'après une semaine, le mycélium de l'agent contaminant s'est propagé sur toute la surface du milieu de culture, mais à faible densité par rapport au témoin et en interférence avec *Trichoderma sp.* (**Figure 19, 21**).

Par contre, l'arrêt du développement de *Fusarium sp.* qui montre une nette activité antagoniste de *Trichoderma* est clairement constaté ainsi que la zone d'inhibition qui sépare les deux isolats (Figure 20). Le taux d'inhibition a augmenté de 46.35% lors de la première lecture à 81.90% après plus d'une semaine d'incubation.

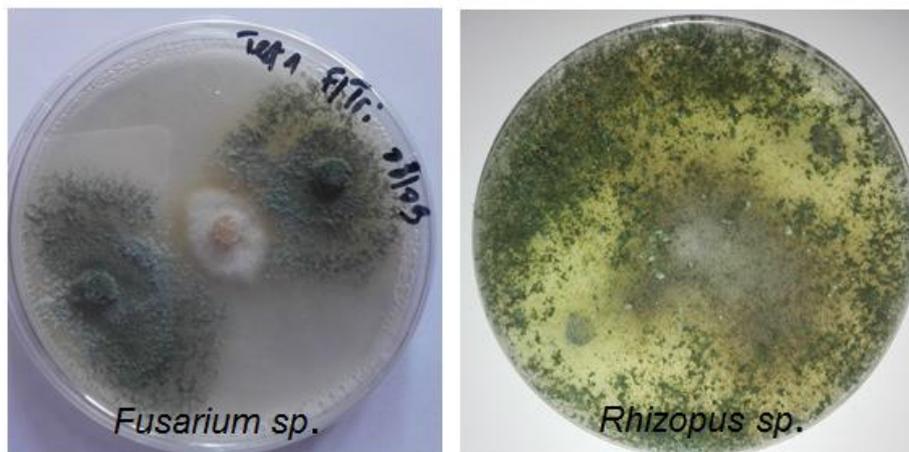


Figure 20 : Résultat de test d'inhibition après 02 jours pour *Fusarium sp.* et 10 jours pour *Rhizopus sp.*

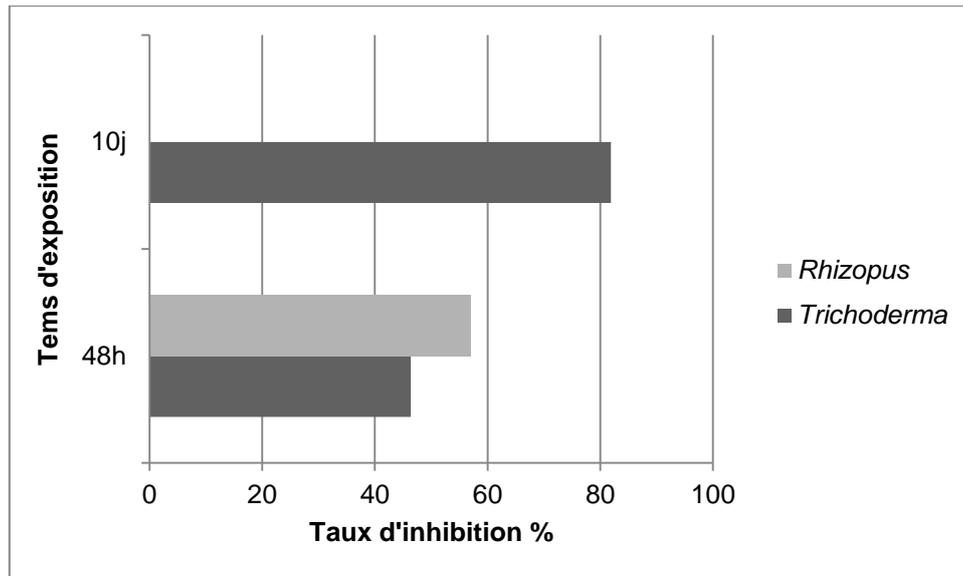


Figure 19 : Taux d'inhibition comparé de deux champignons phytoparasites par l'isolat fongique endophyte *Trichoderma sp.*

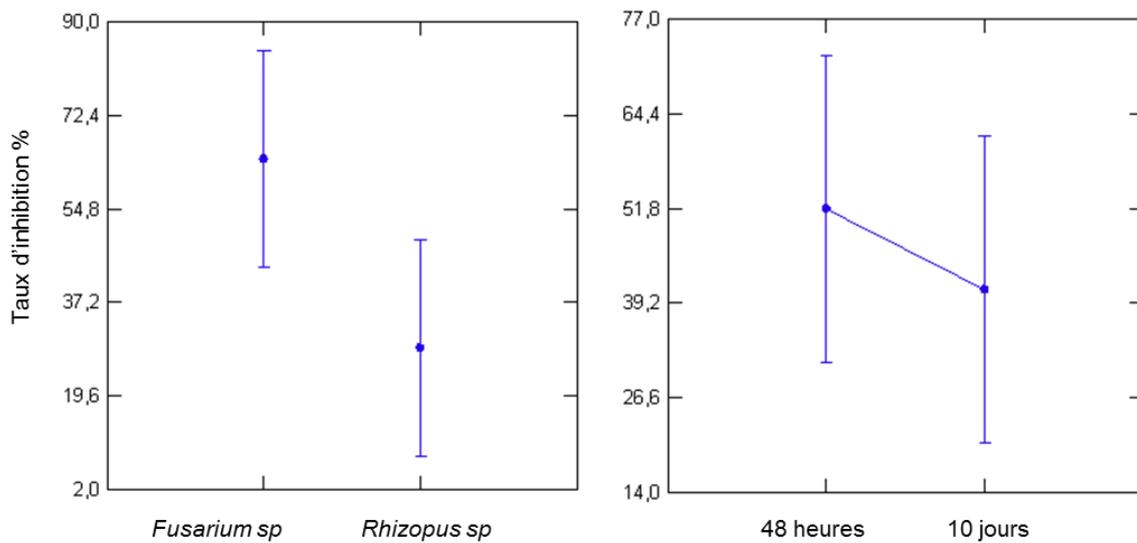


Figure 21 : Taux d'inhibition comparés de *Fusarium sp* et *Rhizopus sp* sous l'effet de l'isolat fongique endophyte *Trichoderma sp.*

L'analyse statistique a montré une différence significative entre le taux d'inhibition enregistré chez *Fusarium sp* et celui enregistré contre *Rhizopus sp*. et elle est non significative dans le temps (Tableau 03)

Tableau 03 : Résultats de l'analyse de la variance du taux d'inhibition comparé de *Fusarium sp* et *Rhizopus sp* sous l'effet de l'isolat fongique endophyte *Trichoderma sp*.

Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
Cible fongique	5 065,525	1	5 065,525	7,072	0,02
Temps d'exposition	463,218	1	463,218	0,647	0,436
Erreur	9 312,120	13	716,317		

Test significatif si P<5%.

IV.1.4. Test insecticide :

IV.1.4.1. Effet sur la mortalité aphidienne :

Le traitement fongique *in situ* sur les populations du puceron *Chaitophorus leucomelas* a été suivi pendant une période de 10 jours. A 48 heures après le traitement, nous avons enregistré un taux de mortalité extrêmement faible (0 à 2 individus morts/répétition). Pour cela, nous avons jugé nécessaire de laisser un intervalle de temps de quelques jours pour réévaluer la mortalité.

Après 10 jours de suivi, la mortalité observée est aussi négligeable que celle de la première lecture (Figure 22).L'analyse de la variance a montré une différence non significative de la mortalité entre les différents traitements, et durant toute la période d'exposition. (Tableau 04.et Figure 22).

Tableau 04 : Analyse de la variance de la mortalité des puceron en fonction de la dose de traitement et du temps.

Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
Doses	4,125	3	1,375	0,423	0,739
Temps	1,042	1	1,042	0,321	0,579
Dose*Temps	2,458	3	0,819	0,252	0,859
Erreur	52,000	16	3,250		

Test significatif si P<5%.

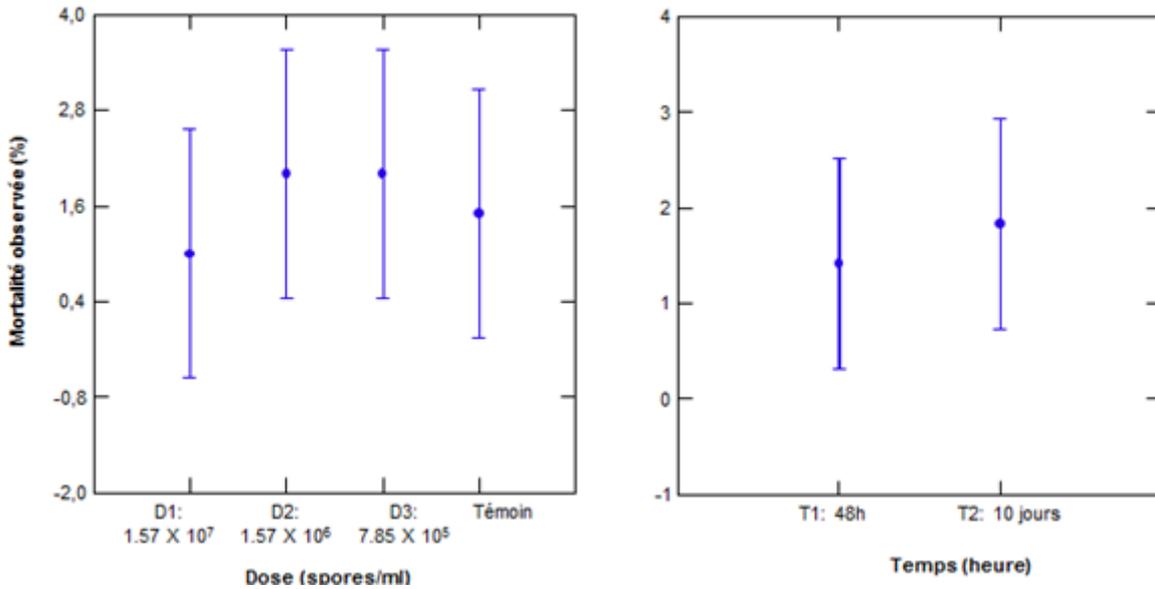


Figure 22 : Résultats du modèle linéaire global sur l'effet de l'isolat fongique *Trichoderma sp* sur les populations Du puceron *Chaitophorus leucomelas*.

IV.1.4. 2. Effet sur la mortalité dans la population des charançons :

Durant le traitement des individus de *Sitophilus oryzae* par les suspensions sporales de l'isolat endophyte *Trichoderma sp* à différentes concentrations, nous avons procédé au calcul de la mortalité corrigée après 24h, 48h et 72h du traitement. Nous avons remarqué une certaine sensibilité de ces insectes qui se traduit par une mortalité et une mobilité moins rapide que chez les lots témoins (Figure 23)

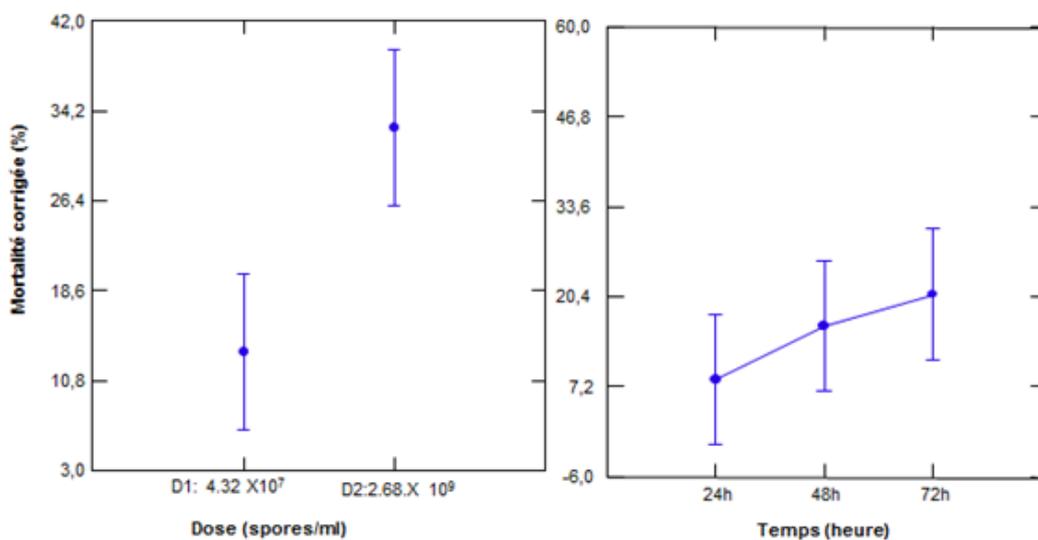


Figure 23 : Résultats du modèle linéaire global sur l'effet de l'isolat fongique *Trichoderma sp* sur les populations du charançon, *Sitophilus oryzae*

Il ressort de ces résultats que les taux de mortalité corrigée pour la seconde dose de traitement D2 ($2.68 \cdot 10^9$ spores/ml) sont supérieurs à ceux constatés avec la D1 ($4.32 \cdot 10^7$ spores/ml) En outre, nous avons remarqué une augmentation de la mortalité corrigée durant les 3 jours d'observation.

L'analyse de la variance a montré des différences significatives entre les effets des doses des suspensions sporales testées ($p= 0.03$ $p<5\%$ tab....) et un effet hautement significatif après 72 heures ($p=0.008$), (Tableau 05).

Tableau 05 : Analyse de la variance de la mortalité des charançon en fonction de la dose de traitement et du temps.

Analysis of Variance					
Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
Dose	189,411	1	189,411	5,549	0,034
Temps	474,430	2	237,215	6,949	0,008
Error	477,885	14	34,135		

Test significatif si $P<5\%$.

Discussion générale :

Ce travail a été réalisé à fin de contribuer à l'étude des champignons endophytes des agrumes et à la détermination des avantages que ces microorganismes peuvent nous apporter en qualité d'agents de biocontrôle.

Un isolat de *Trichoderma sp.* obtenu de feuilles de *Citrus sinensis* a été testé pour une possible activité biologique insecticide et antagoniste contre un modèle de champignons phytoparasites : *Fusarium sp* et *Rhizopus sp.* En effet, les recherches ont montré que les micro-organismes endophytes isolés à partir de tissus végétaux à surface désinfectée présentent un potentiel comme agents de lutte biologique contre les phytopathogènes et les insectes (Lacava et al., 2004).

Des microorganismes endophytes ont été détectés dans toutes les plantes étudiées (Arnold, 2003).Cependant, les endophytes d'agrumes restent peu étudiés, malgré que leur colonisation par des actinomycètes (Kandpal, 2012), des bactéries (Araújo et al., 2001, Lacava et al., 2009) et des champignons est bien démontrée.

Nos échantillons ont présenté en général, une colonisation moyenne de 77,93%, ce qui est en accord avec les résultats de Arnold (2003) et Duran et *al.*, (2005), Ces auteurs rapportent des taux de colonisation de 81% sur *Citrus reticulata* et de 72,3 % sur *Citrus limon*, respectivement.

Nos résultats indiquent que chaque compartiment prélevé de la plante peut être utilisé pour isoler les champignons endophytes. Toutefois, c'est au niveau des feuilles généralement, où les champignons endophytes sont énormément rencontrés. (Ebrahimi et *al.*, 2010) ont enregistré un taux de 62,5% de champignons isolés des feuilles sur l'ensemble des endophytes isolés de tous les compartiments de la plante.

Notre inventaire a mis en évidence la présence de: *Alternaria sp.*, *Trichoderma sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Geotrichum sp.*, *Ulocladium sp.*, *Rhizoctonia*, *Cladosporium sp.*, *Botrytis sp.*, *Rizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* et *Botryosphaeria sp.* Certains de ces champignons ont été déjà identifiés chez les *Citrus* tel que *Alternaria sp.* (Akhtar et *al.*, 2013). Il est même très fréquent de rencontrer *Colletotrichum sp.* avec une grande dominance chez les agrumes (Cosoveanu et *al.*, 2014 ; Arnold et Herre, 2003 ; García et *al.*, 2012 ; Douanla-Meli et *al.*, 2013) ainsi que *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, (Nair et Padmavathy , 2014 ; Glienke et *al.*, 2011) Les autres isolats rencontrés dans les organes végétaux prélevés ont pu être également isolés à partir d'autres plantes. *Aspergillus sp.* a été isolé de la plupart des plantes médicinales (Selvi et Balagengatharathilagam, 2014) ainsi que de la patate douce (Shaaban et *al.*, 2013), *Ulocladium sp.* d'arbres du pin (Qadri et *al.*, 2013), *Geotrichum sp.* et *Trichoderma* de thé de Java (Shobana et *al.*, 2011), *Botrytis sp.* et *Rhizopus sp.* du basilic sacré (Chowdhary et Kaushik, 2015) et *Botryosphaeria sp.* du pin et de l'eucalyptus (Smith et *al.*, 1996) et du *Citrus aurantium* (Min-Yuan et *al.*, 2012).

L'étude de l'effet insecticide de *Trichoderma sp.* sur le puceron du peuplier *Chaitaphorus leucomelas* a donné un résultat négatif. La population des pucerons, n'a présenté aucun symptôme de sensibilité au traitement réalisé pendant des 10 jours de suivi.

Sachant que les endophytes sont très connus par leurs productions de molécules bioactives qui ont une large gamme d'utilisation (Khan, 2007), ce résultat obtenu

peut être dû à une non activité insecticide de cet isolat de *Trichoderma sp.* sur le puceron du peuplier, à des conditions environnementales non favorables au développement et sporulation de cet isolat appliqué, ou encore au choix de la méthode de traitement.

Des champignons entomopathogènes sont utilisés comme agents de lutte microbienne, y compris *Beauveria*, *Metarhizium* and *Paecilomyces*. Ceux-ci sont le plus souvent utilisés contre les insectes nuisibles foliaires où l'humidité est relativement élevée. Plusieurs champignons ont été étudiés comme insecticides microbiens potentiels. *Beauveria bassiana* peut affecter une grande variété d'arthropodes. Cependant, les conditions environnementales, en particulier la température et l'humidité sont des facteurs importants effectuant le succès des traitements fongiques, en particulier lors de l'utilisation des préparations de spores fongiques (Sarwar, 2015).

Néanmoins, des souches fongiques appartenant aux genres *Trichoderma*, *Fusarium*, *Paecilomyces* et ont été testés in vitro dans le but d'étudier leurs effets contre le puceron *Schizaphis graminum* l'un des principaux ravageurs des cultures de céréales dans le monde entier. Les traitements biologiques ont été effectués en utilisant une formulation solide obtenue à partir de cultures de champignons cultivés sur le riz. La présence de métabolites secondaires toxiques (fumonisines B1 et beauvericine) produites par ces champignons a également été étudiée. Certaines souches appartenant aux genres *Fusarium* et *Trichoderma* ont contrôlé de manière significative les populations de *S. graminum*. certaines souches de *Fusarium*, ont un niveau élevé de production de fumonisines dans la culture et une forte activité insecticide (> 60%) dans les 10 minutes après l'application (Ganassi et al., 2001).

T. citrinoviride produit des métabolites de structurellement apparentés aux alcools, se sont avérés fonctionner comme des molécules qui peuvent modifier les préférences d'alimentation du puceron *Rhopalosiphum padi*. (Ganassi et al., 2016). Les pucerons sont souvent affectés négativement par les endophytes mais répondent positivement aux mycorhizes, et les mâcheurs de feuilles sont généralement affectés négativement par les deux types de champignons (Hartley et Gange, 2009).

Abdul-Wahid et Elbanna (2012), ont déterminé la pathogénicité des deux suspensions sporales et de métabolites de deux champignons *T. harzianum* et *Fusarium solani* sur les blattes. Les suspensions sporales ont été appliquées soit en tant qu'additif alimentaire soit en pulvérisation. Bien que les deux champignons ont montré un effet insecticide sur les cafards, mais *F. solani* a révélé un taux de mortalité plus élevé que *T. harzianum*.

Les deux techniques d'application ont été efficaces, mais la pulvérisation a montré un taux de mortalité relativement élevé que l'incorporation de spores comme un additif aliment. En comparant les métabolites fongiques avec les spores fongiques, les métabolites étaient plus efficaces que les spores fongiques.

Nos résultats montrent ainsi que les charançons traités ont manifesté une certaine sensibilité vis-à-vis à cet isolat de *Trichoderma sp.*, qui évolue dans le temps.

La plupart des rapports sur les effets des endophytes sur les insectes herbivores se sont concentrées sur les herbes colonisées par les champignons endophytes clavicipitales, présents chez la plupart des graminées, dans le *Poaceae*, *Juncaceae* et *Cyperaceae* (Clay, 1989). Leurs effets négatifs sur ces insectes ont été généralement attribués à la production de métabolites fongiques (Bush et al., 1997; Clay et Schardl, 2002).

Hartley et Gange (2009), ont examinés comment les champignons qui forment des associations symbiotiques avec les plantes interagissent avec des insectes herbivores attaquant les mêmes plantes. Ils ont trouvés que les endophytes et les mycorhizes ont des répercussions importantes sur les herbivores avec lesquels ils sont en contact relativement intime, mais des effets plus faibles sur ceux dont ils sont séparés spatialement et que les insectes généraliste sont généralement affectés négativement par la présence d'endophytes et mycorhizes, alors que les insectes spécialisés peuvent souvent bénéficier.

Le deuxième test biologique que nous avons réalisé met clairement en évidence l'effet antagoniste de *Trichoderma sp.* contre *Fusarium sp.* cette activité peut être attribué à la synthèse de métabolites secondaires.

Plusieurs champignons endophytes notamment ceux provenant de plantes médicinales ont approuvé leur pouvoir de synthétiser des métabolites

antimicrobiens bénéfiques pour la lutte biologique. Les métabolites bruts de *Cladosporium sp.*, ont fait preuve d'une activité antimicrobienne significative contre des agents pathogènes testés. Analyse phytochimique a révélé la présence de saponines, des composés phénoliques, des anthraquinones, des stéroïdes, des glycosides cardiaques et des tanins dans *Cladosporium sp.* (Selvi et Balagengatharathilagam, 2014). Ainsi, Un nouvel antibiotique, Phomol, a été identifié à partir de *Phomopsis sp.* endophyte de plantes médicinales *Erythrina crista-galli* (Weber et al., 2004).

Ebrahimi et al. (2010), a enregistré une activité considérable contre au moins un des champignons indicateurs (*Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* et *Alternaria sp.*) de 8 champignons endophytes isolés de ce type de plante, alors qu'aucun n'a montré une activité antibactérienne contre *E. coli*.

Parmi les endophytes d'agrume, *Lasmenia sp.* Champignon endophyte de *Citrus medica* a approuvé une activité antimicrobienne contre le champignon pathogène *Monilinia fructicola* (Min-Yuan et al., 2012).

Plusieurs isolat endophytes de cacaotier parmi lesquels 7 isolats de *Trichoderma* ont été testés *in vitro* pour leur capacité à produire des métabolites inhibiteurs et à parasiter *Moniliophthora roreri*, agent pathogène de leur plante hôte. Les cinq méthodes d'inoculation utilisées étaient : l'inoculation des graines en germination sur des plaques d'agar ; plaque inoculation suivie par la plantation dans un sol stérile; la plantation de semences stériles dans le sol pré-inoculée; ; l'inoculation des plantules apparues à la surface du sol; et l'inoculation des plantules apparues entre les cotylédons et la tige. Tous les isolats étudiés étaient capables de coloniser *Theobroma cacao* mais des isolats de *T.harzianum* , *T. hamatum* et *T. asperellum* ont été les plus efficaces pour les méthodes d'inoculation. La plupart des isolats étudiés ont été en mesure d'établir une relation endophyte avec le cacao. Cette caractéristique pourrait conduire au développement de nouvelles stratégies de lutte biologique pour le contrôle des maladies (Bailey et al., 2008) . De même, de l'évaluation de l'activité de lutte biologique d'un isolat endophyte de *Trichoderma* contre *Phytophthora capsici* du piment, a été montré que la maladie était retardée par le mécanisme de la résistance induite (Bea et al., 2011). De plus, l'association de ce champignon avec

les racines des plantes peut améliorer l'absorption des éléments nutritifs des plantes (Contreras-Cornejo et al., 2016).

L'activité antifongique contre *Fusarium sp.* d'une souche endophyte de *Trichoderma* isolé de plante de café a été découvert contre l'agent de tracheomycosis, maladie du flétrissement vasculaire de la même plante (Mulaw et al., 2013).

Sur *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* et *Colletotrichum lindemuthianum* un composé bioactif isolé à partir des extraits de culture de *Trichoderma Brevicompactum*, endophyte de l'ail a une activité inhibitrice marquée (Shentu et al., 2014).

L'activité insecticide de *Trichoderma*, a été mise en évidence pour des souches antagonistes. Deux souches de *Trichoderma harzianum*, utilisé pour le contrôle biologique des champignons pathogènes des plantes ont été étudiées pour la production de sérine-protéase, la chitinase. Les deux souches ont produit de la sérine-protéase et de la chitinase. Les deux souches ont également produit peptaïbols actives contre les champignons.

Les peptaïbols ont montré un potentiel insecticide lorsqu'ils sont administrés à des larves de Ténébrion ou lorsqu'ils sont appliqués sur la cuticule conjointement avec la sérine-protéase. Cette étude suggère que les facteurs de virulence impliqués dans la lutte biologique sont les mêmes que ceux pour la pathogénicité des insectes. Cela peut affecter l'utilisation de *Trichoderma sp.* pour biocontrôle comme il peut y avoir des effets sur les espèces d'insectes non-cibles. (Shakeri et Foster, 2007) Fréquemment, les métabolites produits par des champignons endophytes peuvent être neutres ou antagoniste à l'hôte, et certains métabolites sont d'une grande importance pour l'industrie (Cuzzi et al., 2012). La présence de *Trichoderma sp.* Dans nos *Citrus* pourrait expliquer la faible quantité ou l'absence de maladies au niveau des vergers, car il peut agir comme un naturel antagoniste des agents pathogènes.

Conclusion Générale :

L'étude entreprise dans le présent travail nous a permis en premier lieu de constater une diversité de champignons endophytes isolées de trois espèces de citrus à savoir, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* et *Citrus aurantium*.

En préconisant la méthode de stérilisation de la surface végétale et ensemencement dans un milieu de culture favorable pour le développement des champignons, nous avons pu recenser 19 isolats fongiques.

Les endophytes obtenus après isolement sont : *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.*, *Ulocladium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Rhizopus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Botrytis sp.*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* et *Botryosphaeria sp.* Le taux de colonisation global enregistré est de 77.93%.

Un isolat endophyte qui est *Trichoderma sp.* a été choisi pour la recherche des potentialités qu'un champignon endophyte peut posséder en qualité d'agent de biocontrôle, plus particulièrement l'effet insecticide et l'effet antifongique.

Les méthodes adoptées pour le teste insecticide sont la pulvérisation pour les puceron du peuplier et le trempage pour les charançons. Les deux méthodes sont basées sur le principe de mettre l'agent biologique et l'insecte cible en contact direct tout en utilisant des suspensions sporales. De même le test antagoniste est réalisé par la méthode de confrontation directe entre l'agent de biocontrôle et le champignon parasite.

Les résultats montrent que l'isolat endophyte *Trichoderma sp.* possède une activité antifongique importante contre *Fusarium sp.* avec un taux d'inhibition de 81.90% ainsi qu'une activité insecticide remarquable contre les charançons de riz (*Sitophilus oryzae*). Un taux de mortalité de l'ordre de 40% , est enregistré après quelques jours de leur traitement avec une suspension sporale d'une concentration de 2.68×10^9 spores/ml. Ce résultat mérite d'être plus profondément étudié.

Cette étude n'est qu'une préliminaire, et ouvre de futures perspectives notamment pour :

- Etudier d'une manière plus approfondie dans un but d'identification moléculaire des isolats obtenus et de détermination des espèces ;
- Tester cet isolat contre les d'autres bioagresseur notamment ceux qui attaquent les citrus et les nématodes endoparasite le fait que ces microorganismes colonisent la même niche écologique ;
- Rechercher le mode d'action et les métabolites secondaires de l'isolat *Trichoderma sp.* pour pouvoir délimiter le groupe de ravageurs à étudier et ;
- Rechercher les potentialités biologiques chez les autres isolats identifiés.

Références bibliographiques

- **ABDUL-WAHID O. A et ELBANNA M. S., 2012.** Evaluation of the insecticidal activity of *Fusarium solani* and *Trichoderma harzianum* against cockroaches; *Periplaneta Americana* and *Quercus rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelial compatibility. *European Journal of Plant Pathology* 110: 713–721.
- **AKHTAR N., ANJUM T. et JABEEN R., 2013.** Isolation and Identification of Storage Fungi from Citrus Sampled from Major Growing areas of Punjab, Pakistan, *Int. J. Agric. Biol., Vol. 15, No. 6, pp.* 1283–1288.
- **ARAUJO W.L., MACCHERONI Jr W.,, AGUILAR-VILDOSO C.I., BARROSO P.A.V., SARIDAKIS O. et AZEVEDO J.L., 2001.** Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* Vol.47, pp. 1-7.
- **ARNOLD E. et HERRE E. A., 2003** Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae), *Mycologia*, 95(3), 2003, pp. 388–398.
- **ATHMAN S.Y., DUBOIS T.,VILJOEN A., LABUSCHAGNE N., COYNE D., RAGAMA P., GOLD S. and B NIERE B., 2006.** In vitro antagonism of endophytic *Fusarium oxysporum* isolates against the burrowing nematode *Radopholus similis* *Nematology*, Vol. 8(4),pp. 627-636.
- **BAE H., ROBERTS D. P., HYOUN-SUB L., STREM M. D. SOO-CHUL P., CHOONG-MIN R., MELNICK R. L et BAILEY B.A.,2011.** Endophytic *Trichoderma* Isolates from Tropical Environments Delay Disease Onset and Induce Resistance Against *Phytophthora capsici* in Hot Pepper Using Multiple Mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* Vol. 24, No. 3, pp. 336–351.
- **BAILEY B.A., STREM M. D. et WOOD D., 2009.** *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes, *Mycological Research* 113, pp.1365-1376.
- **BEZERRA J.D.P., SANTOS M. G. S. ET SVEDESE LM. ET LIMA D. M. M, 2012.** Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. [World Journal of Microbiology and Biotechnology](http://www.wjmicr.com/11274) [file:///journal/11274](http://www.wjmicr.com/11274), Volume 28, [Issue 5](http://www.wjmicr.com/11274), pp 1989–1995.
- **BHARATHIDASAN B. et PANNEERSELVAM A., 2011.** Isolation and identification of endophytic fungi from *Avicennia marina* in Ramanathapuram District, Karankadu, Tamilnadu, India. *Euro. J. Exp. Bio.* 1(3):31-36
- **BOTELLA L. et DIEZ J.J., 2011.** Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity* 47:9–18.
- **BRUNDRETT. M. C., 2004.** Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* ,79, pp. 473–495.
- **BUSH P. L., HEATHER H., WILKINSON, AND SCHARDI C., 1997.** Bioprotective Alkaloids of Grass-Funga Endophyte Symbioses. *Plant Physiol.* 114: 1-7.

- **CARROLL G. C et CARROLL F. E.,1978.** Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *CAN. J. BOT.* VOL. 56. pp.3034-3043.
- **CARROLL G., 1988.** Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69(1), pp.2-9.
- **CHATURVEDI P., GAJBHIYE G., ROY S., DUDHALE R,ET ABHAY M., 2014.** Determination of Kaempferol in extracts of *Fusarium chlamydosporum*, an endophytic fungi of *Tylophora indica* (Asclepeadaceae) and its anti-microbial activity. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)* Volume 9, Issue 1 Ver. V (Feb. 2014), pp. 51-55 www.iosrjournals.org
- **CHOWDHARY K., KAUSHIK N., 2015.** Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum* Linn. *PLoS ONE* 10(11): e0141444. doi:10.1371/journal.pone.0141444, pp. 1-25.
- **CLAY K. et SCHARDL C.,2002.** Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. *Am. Nat.* . Vol. 160, pp.99–127.
- **CLAY K., 1989.** Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as biocontrol agents. *Mycol. Res.* 92 (I): 1-12.
- **CLAY K., 1990.** Fungal Endophytes of grasses. *Annu.Rev. Ecol. Syst.* 21: 275-297.
- **COHEN S.D., 2004.** Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelial compatibility. *European Journal of Plant Pathology* 110: 713–721.
- **CONTRERAS-CORNEJO H. A.,MACÍAS-RODRÍGUEZ L., EK DEL-VAL et LARSEN J., 2016.** Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 92, No.4, pp.1-17.
- **COSOVEANU A., GIMENEZ-MARIÑO C., CABRERA Y., HERNANDEZ G. et CABRERA R., 2014.** Endophytic fungi from grapevine cultivars in Canary Islands and their activity against phytopatogenic fungi. *Intl. J. Agri. Crop Sci.* Vol., 7 (15), 1497-1503.
- **CUZZI C., LINK S., VILANI A., SARTORI C, ET ONOFRE S. B., 2012.** Endophytic fungi of the “vassourinha” (*Baccharis dracunculifolia* D. C. - Asteraceae). *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 135-139. DOI: 10.1080/12538078.2008.10516106.
- **DOUANLA-MELIA C., LANGER E., TALONTSI MOUAFO F., 2013.** Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of *Citrus limon*. *Fungal Ecology* 6: 212-222.
- **DURÁN E.L.,PLOPER L.D., RAMALLO J.C.,GRANDI R.A.P., GIANCOLI A.C.H. ET AZEVEDO J.L., 2005.** The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina , *Can. J. Bot.* 83: 350–355.
- **EBRAHIMI A., ASGHARIAN S. et HABIBIAN S.,2010.** Antimicrobial Activities of Isolated Endophytes from Some Iranian Native Medicinal Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Summer* 6(3): 217-222.
- **EILENBERG J., HAJEK A. ET LOMER C., 2001.** Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387–400.

- **FAETH S., 2002.** Are endophytic fungi defensive plant mutualists?. *OIKOS* 98: 25–36.
- **FISHER P. J., PETRINI O. ET SUTTON B.C., 1993.** A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus nitens* in Australia and England. *Sydowia* 45(2): 338-345.
- **FRECHETTE B., 2009** développement d'un outil de lutte biologique basé sur l'utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* contre le charançon de la prune, *conotrachelus nenuphar*, et évaluation de son impact sur les ravageurs et entomophages présents dans les vergers. Rapport final, Centre de Recherche Agroalimentaire de Mairabel, 38p.
- **FREEMAN S. ET RODRIGUE RUSTY J., 1993.** Genetic Conversion of a Fungal Plant Pathogen to a Nonpathogenic, Endophytic Mutualist. *Science, New Series*, Vol. 260, No. 5104 (Apr. 2, 1993), pp. 75-78.
- **FRISVAD JC, YILMAZ N, THRANE U, RASMUSSEN KB, HOUBRAKEN J, ET SAMSON R.A., 2013.** *Talaromyces atrovirens*, a New Species Efficiently Producing Industrially Relevant Red Pigments. *PLoS ONE* 8(12): e84102. doi:10.1371/journal.pone.0084102.
- **GANASSI S., MORETTI A., STORNELLI C., FRATELLO B. & PAGLIAI A.M., 2001.** Effect of *Fusarium*, *Paecilomyces* and *Trichoderma* formulations against aphid *Schizaphis graminum*. *Mycopathologia* 151, 131-138pp. (résumé).
- **GANASSI S., SABATINI M. A., GRAZIOSO P., DE CRISTOFARO A., FIORENTINI F., EVIDENTE A et ALTOMARE C., 2016.** Long Chain Alcohols Produced by *Trichoderma citrinoviride* Have Phagodeterrent Activity against the Bird Cherry-Oat Aphid *Rhopalosiphum padi*. *Front. Microbiol.* 7:297. doi: 10.3389/fmicb.2016.00297 1-13 pp.
- **GANGADEVI V. et MUTHUMARY J, 2008.** Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycologia Balcanica* 5: 1–4.
- GARCIA A., RHODEN S .A., RUBIN FILHO J.C., NAKAMURA C., 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.
- **GLIENKE C., PEREIRA O.L., STRINGARI D., FABRIS J., KAVA-CORDEIRO V., GALLI-TERASAWA L., CUNNINGTON J., SHIVAS R.G., GROENEWALD J.Z., CROUS P.W., 2011.** Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot, *Persoonia* – Volume 26, pp.47– 56.
- **GUNATILAKA .A..L., 2006.** Natural Products from Plant-associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their occurrence. *J Nat Prod.* , 69(3): 509–526.
- **HALLMANN J, SIKORA RA , 2010.** Endophytic fungi. In: Davies KG, *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*, p.227.

- **HAMAYUN M., KHAN A.S., KHAN A.L., AHMED N., TANG D., KANG S., NA C., SHON E., HWANG Y., SHIN D., LEE B., KIM J. ET LEE I., 2009.** Cladosporium sphaerospermum as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of Glycine max (L.) Merr. *World J Microbiol Biotechnol* 25:627–632.
- **HARTLEY E et GANGE A.C., 2009.** Impacts of Plant Symbiotic Fungi on Insect Herbivores: Mutualism in a Multitrophic Context. *Annu. Rev. Entomol.* 54, pp.323-342. ento.annualreviews.org. doi: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090614
<http://www.springerplus.com/content/2/1/8>, pp. 1-14.
- **HYDE K.D et SOYTONG K., 2008.** The Fungal endophyte dilemma. *Fungal diversity* 33: 163-172.
- **JACQUEMOND C., CURCK F. et HEUZET M., 2013.** Les Clementiniers et autres petits agrumes. Ed. Quae, 368p.
- **JIA, T., SHYMANOVICH T.,GAO Y. et FAETH S.H., 2015.** Plant population and genotype effects override the effects of *Epichloë* endophyte species on growth and drought stress response of *Achnatherum robustum* plants in two natural grass populations. *Journal of Plant Ecology*, pp. 1–9, www.jpe.oxfordjournals.org.
- **KANDPAL K.C., JAIN D. A., KUMAR U., TRIPATHI R., et KUMAR T. S., 2012.** Isolation and screening of endophytic actinomycetes producing antibacterial compound from *Citrus aurantifolia* Fruit, *European Journal of Experimental Biology*, 2012, 2 (5):1733-1737.
- **KHAN R.,2007** Isolation, identification and cultivation of endophytic Fungi from Medicinal plants for the production and characterization of bioactive Fungal Metabolies. A thesis submitted ti the university of Karachi for the ddegree of doctor of philosophy, Department of microbiology, university of Karachi, Pakistan, 246p.
- **KUMAR S.,KAUSHIK N.,EDRADA-EBEL R., EBEL R. et PROKSCH P.2011.** isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophya indica*. *World J.Microbiol Biotechnol* 27, pp.571-577.
- **LACAVA P.T., ARAUJO W.L., MARCON J., MACCHERONI W.JR et AZEVEDO J.L., 2004.** Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*,causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology* 39, pp.55-59.
- **LARRAN S., ROLLAN C., BRUNO ÁNGELES H., ALIPPI H.E., URRUTIA M.I., 2002.** Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* Vol. 17 (1), pp. 173-178.
- **LE RU B., 1989.** Lutte Biologique Contre Les Ravageurs, Conférences de l'OROSTOM, Ministère des enseignements secondaire et supérieur chargé de la recherche scientifique – republique populaire du Congo, Brazzavilla, 23 novembre 1989.
- **LIU J., CHEN S. et GONG H.,** Study on Endophytic fungi producing Orange Pigment isolated from Ginkgo Biloba L. <http://www.paper.edu.cn>. 9p. *Microb. Biochem Technol.* S8: 004. doi:10.4172/1948-5948.S8-004.

- **MIN-YUAN H., WEN-CHUAN C., HUNG-CHANG H., WEN-HSIA C., et WEN-HSIN C., 2012.** Identification of Endophytic Fungi of Medicinal Herbs of Lauraceae and Rutaceae with Antimicrobial Property. *Taiwania*, 57(3), pp. 229-241.
- **MISHRA Y, SINGH A., BATRA A. ET SHARMA M.M., 2014.** Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review. *J.*
- **MULAW T.B., DRUZHININA I.S., KUBICEK C. P AND ATANASOVA L., 2013.** Novel Endophytic *Trichoderma* spp. Isolated from Healthy *Coffea arabica* Roots are Capable of Controlling Coffee Tracheomycosis. *Diversity* 5, pp. 750-766; doi:10.3390/d5040750.
- **NAIR D.N. ET PADMAVATHY S., 2014.** Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *The Scientific World Journal* Volume 2014, Article ID 250693, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/250693>.
- **PANDEY K.P., SINGH S., YADAV R.S., KUMAR S.A., ET KUMAR S.C.M., 2014.** Fungal Endophytes: Promising Tools for Pharmaceutical Science. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 25(2), Article No. 25, pp.128-138.
- **Paul N., Burm Lee H., Lee J., Lee, Seop Shin K., Ryu T.H., Kwon H.R., Kuk Kim Y., Nam YounY. et Hun Yu S., 2014.** Endophytic Fungi from *Lycium chinense* Mill and Characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum*. *Int. J. Mol. Sci.* 15, pp.15272-15286.
- **QADRI M., JOHRI S., A SHAH B., KHAJURIA A., SIDIQT., LATTOO S.K., ABDIN M.Z., UL-HASSAN S.R ., 2013.** Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus*,
- **REDKO F., CLAVIN M., WEBER D. ANKE T. et MARTINO. V., 2006.** Search for active metabolites of *Erythrina crista-galli* and its endophyte *Phomopsis* sp. *Molecular Medicinal Chemistry*, vol 10 May-Augus1, pp. 24-26.
- **RODRIGUEZ R.J., WHITE JR J. F., ARNOLD A. E. ET REDMAN R.S., 2009.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330.
- **ROMERO, A., CARRION, G. AND RICO-GRAY, V. , 2001.** Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). *Fungal Diversity* 7: 81-87.
- **RUSSELL J., HUANG J. ANAND P., KUCERA K., SANDOVAL A.G. DANTZLER W., 2011.** Biodegradation of Polyester Polyurethane by Endophytic Fungi. *Applied And Environmental Microbiology*, pp. 6076–6084.
- **SAIKKONEN K., WALI P., HELANDER M. ET FAETH S.H., 2004.** Evolution of endophyte–plant symbioses Evolution of endophyte–plant symbioses. *TRENDS in Plant Science* Vol.9 No.6, pp. 275-280.
- **SALGADO S.C., CEPERO M.C., EMILIO R. ET RESTREPO S., 2007.** Histological analyses of the fungal endophytes in *Rosa hybrida*. *Rev Iberoam Micol* 24: 323-324.
- **SANTOS I.P.D., EZERRAJ.D.P, SOUZA- MOTTA C.M., MARILENE DA SILVA CAVALCANTI M.S ET LIMA L.M., 2015.** Endophytic mycobiota from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae): The relationship between seasonal change in Atlantic Coastal Forest and tropical dry forest (Caatinga), Brazil. *Afr. J. Microbiol. Res.* vol.9(18), pp.1227-1235.

- **SARWAR M., 2015.** Microbial Insecticides- An Ecofriendly Effective Line of Attack for Insect Pests Management, International Journal of Engineering and Advanced Research Technology (IJEART)
- **SCHULZ B. et BOYLE C., 2005.,** The endophytic continuum. Mycol Res 109, pp. 661–687.
- **SCHULZ B., RÖMMERT A., DAMMANN U., AUST H. et STRACK D., 1999.** The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. Mycological research, 103 : 1275-1283.
- **SELVI K. B. et BALAGENGATHARATHILAGAM P., 2014.** Isolation and screening of endophytic fungi from medicinal plants of virudhunagar district for antimicrobial activity, I.J.S.N., VOL.5 (1) :147-155.
- **SHAABAN M., HAMDY N., AMAL Z. H. et ASKER M.S.,2013.** BIOACTIVE SECONDARY METABOLITES FROM ENDOPHYTIC ASPERGILLUS FUMIGATUS: STRUCTURAL ELUCIDATION AND BIOACTIVITY STUDIES. Rev. Latinoamer. Quím. 41/1, pp. 50-60.
- **SHAKERI J., FOSTER H A., 2007.** Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. <https://www.researchgate.net/publication/223012634>. pp. 1-9.
- **SHENTU X., ZHAN X., MA Z., YU X., ZHANG C., 2014.** Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. Brazilian Journal of Microbiology 45, 1, pp. 248-254.
- **SHOBANA, G., RATHER R.A & KATHIRAVAN G., 2011.** SEASONAL RECURRENCE OF ENDOPHYTIC FUNGI OF *Orthosiphon spiralis*. I.J.S.N., VOL. 2(4), pp. 723-726.
- **SHUTSRIRUNG A., CHROMKAEW Y., PATHOM-AREE W., HOONLUCHANON S. et BOONKERD N., 2013.** Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity, Soil Science and Plant Nutrition 59,pp.322–330
- **SIEGWART M.,GRAILLOT B., LOPEZ C.B., BESSE S., BARDIN M., NICIT P.C. et LOPEZ-FERBER M., 2015.** Resistance to bio-Insecticides or how to enhance their sustainability: a review. Frontiers in Plant Science , Volume 6,Article 381, pp.1-19.
- **SMITH H.,WINGFIELD M.J., CROUS P.W., COUTINHO T.A ., 1996.** *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *pinus* spp.and *Eucalyptus* spp.in South Africa. S.Afr.J.Bot. 62(2), pp. 86-88.
- **SPYREAS G., GIBSON D.J. ET MIDDLETON B.A., 2001.** Effects of Endophyte Infection in Tall Fescue (*Festuca Arundinacea: Poaceae*) on Community Diversity. Int. J. Plant Sci. 162(6):1237–1245.
- **SUN X. ET GUO L., 2012.** Endophytic fungal diversity: review of traditional
- **SUTY L., 2010.** La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques. Ed. Quae, p 321.
- **SUWANNARACH N., KUMLA J., BUSSABAN B., MATSUI K., 2013.** Biofumigation with the endophytic *Nodulisporium* sp. CMU-UP34 Tto control postharvest decay of citrus fruit.Crop production 45 :63-70.

- **TAQARORT N., BOUZERDA L. , BOUBAKER H. , AIT BEN AOUMAR A. ET BOUDYACH E., 2008.** Lutte biologique contre la pourriture verte des agrumes en post-récolte par l'utilisation de levures antagonistes, *Acta Botanica Gallica*, 155:2, 235-244,
- **TEJESVI M .V. et PIRTTILÄ A. M., 2011.** Endophytic fungi as a source of novel bioactive compound. <https://www.researchgate.net/publication/234095369>, pp.218-225.
- **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. *Current research, Technology and Education Topics in applied Microbiology*, A.Mendez.vilas (Ed): 377-382.
- **VEGA F. E., GOETTEL M.S., BLACKWELL M., CHANDLER D., JACKSON M A., S. KELLERF, M KOIKE, Nguya K., MANIANIA, A. MONZÓNi., OWNLEY B. H., J.K. PELLk., RANGELI D. E.N., ROY H.E., 2009.** Fungal entomopathogens: new insights on their ecology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>. 40p.
- **VIJAYABHARATHI R., KUMARI B.R. et GOPALAKRISHNAN S., 2014.** Microbial agants against *Helicoverpa armigera*: where are and where do we need to go?. *African Journal of Biotechnology*, vol.13(18), pp.1835-1844.
- **VISALAKCHI S. ET. MUTHUMARY J. , 2009.** Antimicrobial activity of the new endophytic *Monodictyscastaneae* SVJM139 pigment and its optimization. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 3(9), pp. 550-556. Volume-1, Issue-2,pp. 4-9.
- **WEBER D., STERNER O., ANKE T., GORZALCZANCY S., MARTINO V. et ACEVEDO C., 2004 .**Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina crista-galli* . *The journal of antibiotics* VOL. 57 NO. 9, pp.559 -563.

Introduction

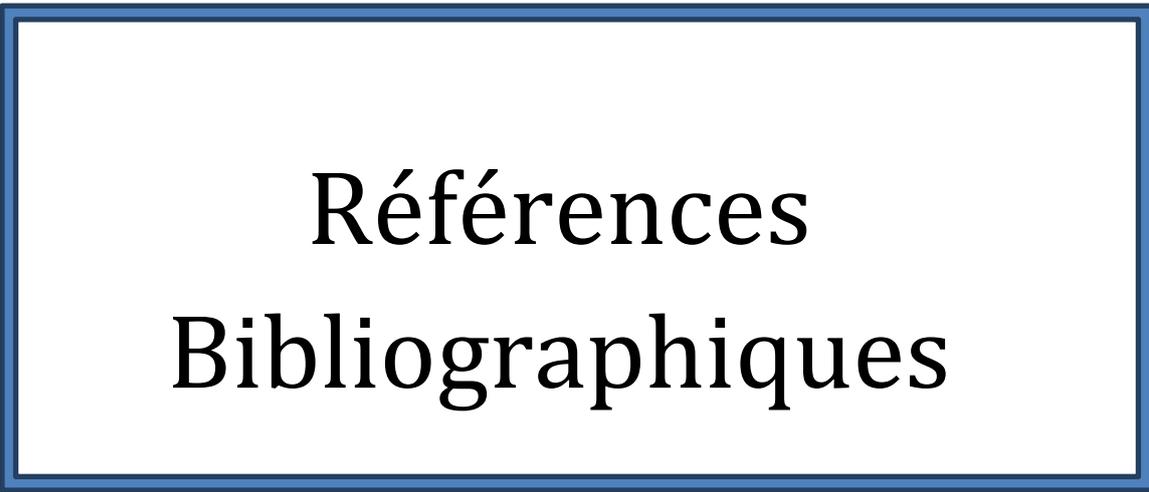
Synthèse Bibliographique

Partie Expérimentale

Matériel
Et
Méthodes

Résultats & Discussion

Conclusion



Références
Bibliographiques