

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme MASTER

Domaine : science de la nature et de la vie

Filière : sciences biologiques

Option : biochimie appliquée

THEME

**ISOLEMENT ET IDENTIFICATION SOMMAIRE DE QUELQUES
CHAMPIGNONS ENDOPHYTES DE DEUX PLANTES :**
Haloxylon scoparium et Astragalus armatus

Présenté par :

GUERGAB Hayat et MOUATTAH Amina Nour El-Houda

Soutenu Le 15/09/2020 devant les membres jury :

M^{me} EL-HOUTI Fatiha	Présidente	MCA
M^{me} TAKHI Djalila	Examinatrice	MAA
Mr BOUBRIMA Youcef	Encadreur	MAA
M^{elle} RENANE Zohra	Co-encadreur	Doctorante

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019/2020

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes parents qui sont les êtres les plus chers de ma vie.

Mes frères et sœurs ont été pour moi d'une grande aide morale. Qu'ils trouvent ici mes remerciements les plus sincères.

À mes nièces,

À Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation,

À ma partenaire Nour, et mes amies : Nadia, Manel et Fatima

Heureusement que vous êtes avec moi...

Guergab Hayat

Dédicace

Je dédie ce travail :

À mes parents qui n'ont cessé de m'encourager tout au long de ce travail.

À mes frères pour leur soutien moral : Aziz, Anas, Hicham et Ahmed.

À toute ma grande famille.

À Ma collègue Hayat avec qui j'ai partagé tant de moments de joie et de
peine.

À mes amies : Hana, Amani, Aya et Mounira .

À tous ceux qui m'ont aidé à mener à terme le présent travail.

Mouattah Amina Nour El-Houda

Remerciement

De prime abord, nous tenons à remercier **ALLAH**, le tout puissant, pour nous avoir aidés à mener à terme notre travail.

Nous sincères remerciement vont à **Mr. BOUBRIMA YOUCEF** qui a proposé et accepté de nous diriger dans ce travail. Nous sommes très reconnaissantes envers lui pour sa disponibilité sans faille.

Un grand Merci à notre co-encadreur **Mme RENANE ZOHRA** qui a mis à notre disposition le matériel nécessaire pour la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont, également à **Mme EL-HOUITI FATIHA et Mme TAKHI DJALILA**, qui a accepté, volontiers, de présider et d'examiner ce travail.

Mmes AMEUR DJAMILA et BOUBRIMA ARIDJ n'ont ménagé aucun effort et ont été à notre côté dans des moments difficiles et nous ont prodigué toutes les informations nécessaires afin de réaliser notre travail.

Encore une fois merci pour vos conseils, ainsi vos qualités relationnelles et humaines.

Sans oublier le personnel du laboratoire pédagogique du département de biologie université Ammar thledji de Laghouat pour leur soutien et leur disponibilité.

Résumé :

Les champignons endophytes sont des micro-organismes qui font partie du microbiome végétal et qui sont considérés comme une source écologique avec un avenir prometteur grâce à la production de métabolites biologiquement actives.

Le présent travail a pour but d'analyser deux espèces végétales aux usages ethnobotaniques *Holoxylon scoparium* et *Astragalus armatus* pour la présence de champignons endophytes dans leurs habitats naturels. Sur la base de caractères morphologiques et microscopiques des isolats, les résultats obtenus montrent la présence des genres et espèces suivants : les *Alternaria spp* et les *Alternaria alternata*, les *Aspergillus spp* et *Aspergillus terreus*, les *Cladosporium spp*. D'après la littérature, chaque une de ces symbiotes présente des activités antibactérienne et antifongiques et présente aussi une source de multiples enzymes.

Les mots clés : *Astragalus armatus*, *Holoxylon scoparium*, champignon endophyte, Activités biologiques

Abstract:

Endophytic fungi are part of plant microbiome that are considered as ecological source for the production of biologically active metabolites.

The work aims to analyze two ethnobotanical plant *Holoxylon scoparium* and *Astragalus armatus* for the presence of endophytic fungi from their natural habitats. Based on morphological and microscopic characters, the results obtained show the presence of the following genera and species: *Alternaria spp* and *Alternaria alternata*, *Aspergillus spp* and *Aspergillus terreus*, *Cladosporium spp*. According to the literature, each of these species shows biological activity and present source of various enzymes.

Keywords: *Astragalus armatus*, *Holoxylon scoparium*. endophytic fungus, biological activity.

الملخص:

يهدف العمل الحالي الى تحليل نوعين من النباتات الطبية الرمث و القندال *Astragalus armatus*, *Holoxylon scoparium*

و ذلك لاحتوائها على الفطريات الداخلية في محيطها البيئي.

و بالاعتماد على مجموعة من الخصائص المجهرية و الظاهرية للمجموعات المستخلصة توصلنا الى النتائج الآتية:

Alternaria spp و *Alternaria alternata*, و *Aspergillus spp*, *Aspergillus terreus* و *Cladosporium spp*

حيث أن كل نوع من هاته الفطريات له خصائص بيولوجية متعددة كمضاد بكتيري و مضاد فطري و كذا كونه مصدرا لاستخراج العديد من الانزيمات.

الكلمات المفتاحية:

Holoxylon scoparium, *Astragalus armatus*, الفطريات الداخلية, الخصائص البيولوجية.

Table des matières

Liste des abréviations	i
Liste des tableaux	ii
Liste des figures et des photos	iii
Glossaire	iv
I. Introduction	1
II. Synthèse bibliographique sur les champignons endophytes.....	2
1. Généralités sur les champignons endophytes	2
A. Définition	2
B. Classification.....	2
C. Mode de croissance des champignons endophytes	5
D. Relation champignon endophyte-plante	5
E. Leur rôle dans le stress biotique et abiotique	7
F. Activités biologiques des champignons endophytes	10
III. La partie pratique.....	13
1. Isolement et identification macro et microscopique des champignons endophytes	13
2. Résultats	16
3. Discussion	31
IV. Conclusion	35
Références bibliographiques.....	36
Annexe	42

Liste des abréviations

ATB	Antibiotique
ATF_q	Antifongique
IC₅₀(CI₅₀)	Concentration Inhibitrice 50
GYP	Extrait de Glucose –levure-Péptone.
MEA	Milieu d'Extrait de Malt
MIC (CMI)	Concentration Minimal Inhibitrice
PDA	la gélose Dextrosé à la Pomme de terre.
XBM	Milieu Bouillon de Xylane

Liste des tableaux

Tableau 1 : classification des champignons endophytes	4
Tableau 2: Quelques enzymes extrait des champignons endophytes et leur interet	11
Tableau 3: Les espèces isolées d' <i>Haloxylon</i> et <i>Astragalus</i> cultivé dans milieu PDA	17
Tableau 4: Les métabolites isolées à partir <i>Alternaria</i>	32
Tableau 5: Les milieux de culture pour l'extraction d'enzymes	43
Tableau 6: Les caractères microscopiques de <i>Cladosporium</i>	44
Tableau 7: Les caractéristiques microscopiques d' <i>Aspergillus</i>	45
Tableau 8: Les caractères microscopiques des espèces d' <i>Alternaria</i>	47

Liste des figures et des photos

Figure 1: Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes.....	5
Figure 2: types de mycorhizes.....	7
Figure 3: Protocole d'isolement et de purification des champignons endophytes	14

Glossaire

- **Antimycosique**^{*} : c'est-à-dire contre mycose, synonyme d'antifongique.
- **Dermatose**^{*} : signifie les maladies du peau.
- **Dorsalgie**^{*} : douleur au dos.
- **Effet allélopathique**^{*} : c'est un phénomène biologique par laquelle la plante influence la croissance de l'autre espèce voisine via la production des métabolites secondaires afin de dominer dans l'espace.
- **Hyphe**^{*} : un filament végétatif contient plusieurs noyaux qui peuvent être divisé par une barrière (cloison, on dit hyphe sépté) ou non divisé (hyphe siphonné).
- **Mycélium**^{*} : c'est un ensemble des hyphes.
- **Pousse**^{*} : c'est la partie aérienne de la plante, une jeune tige développée à partir d'un rameau ou bourgeron.
- **Propagule**^{*} : organe de dissémination (propagation) et de reproduction d'une plante.
- **Rhizome**^{*} : tige souterraine.

A decorative graphic featuring a large, bold black number '1' inside a red-to-purple gradient circle. A wavy line in shades of red and purple loops around the circle. Below the '1' is the word 'Introduction' in a black serif font. At the bottom of the graphic is a smaller red-to-purple gradient circle containing a white star.

1

Introduction

I. Introduction

Les endophytes sont des microorganismes qui colonisent les tissus internes de la plante en passant au moins une partie de leur vie à l'intérieur de l'hôte mais sans provoquer de symptômes de maladie (**Petrini., 1992**). Presque toutes les plantes des écosystèmes naturels semblent être symbiotiques avec les endophytes fongiques (**Rodriguez et al., 2009**).

Afin de maintenir une symbiose stable, les endophytes produisent plusieurs composés qui favorisent la croissance des plantes et les aident à mieux s'adapter à l'environnement en conférant une tolérance au stress abiotique et biotique, en augmentant la biomasse et en diminuant la consommation d'eau, ou en diminuant la forme physique en allocation des ressources (**Das et Varma., 2009; Ren et Gao., 2011; Hubbard et al., 2012; Nair et Padmavathy., 2014; kouadria., 2019**).

En outre de leurs diversité et caractéristiques, il a également été rapporté que les champignons endophytes possèdent des métabolites secondaires bioactives potentiellement intéressants qui peuvent être utiles pour la production de produits pharmaceutiques (**Tan et Zou., 2001; Strobel et al., 2004; Maheshwari., 2006; Khan et al., 2014; Sénéquier et Canard., 2016; Manganyi., 2018; Kaaniche et al., 2019**). L'intérêt biologique de ces champignons a été exploité comme source de composés antimicrobiens, antioxydantes, anticancéreux, insecticides, et autres.

Les endophytes présentent aussi une source de divers enzymes extracellulaires (exemple: xylanase, amylase, cellulase, lipase, pectinase, tyrosinase, et autres) qui trouvent son application dans plusieurs domaines à savoir l'agriculture, le textile, les boissons et le secteur de santé humaine (**Rashmi et al., 2019**).

Le présent mémoire a donc été menée pour élucider la présence de champignons endophytes dans deux plantes *Haloxylon scoparium* et *Astragalus armatus* de la région de Laghouat, afin d'identifier les isolats fongiques.

A decorative graphic consisting of a circular path with a red-to-purple gradient. A large black number '2' is positioned on the path. A small red circle with a white star is also on the path. The text 'La recherche bibliographique' is centered within the path.

2

*La recherche
bibliographique*

II. Synthèse bibliographique sur les champignons endophytes

1. Généralités sur les champignons endophytes

A. Définition:

Les champignons ou encore appelé mycètes ou fungi, sont des eucaryotes dépourvus de chlorophylle hétérotrophe assurent leur nutrition via l'absorption. Ils se distinguent en trois embranchements : *Gymnomycota*, *Mastigomycota*, *Amastigomycota* (**Bouchet et al., 1999**).

En 1866, Bary définit le terme endophyte comme toute infection asymptomatique d'une plante par un microorganisme. L'étymologie de ce mot provient du grec ancien : endo « dans », phyton « végétal », littéralement « à l'intérieur d'un végétal » (**Sénéquier et Canard., 2016**).

La définition la plus couramment utilisée pour décrire les champignons endophytes est celle de **Petrini (1991)**, qui définit les endophytes comme étant tous les microorganismes vivant de façon intra et/ou intercellulaire dans les organes végétaux internes à un certain moment de leur vie et peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causées des signes pathologiques apparents (**Chetia et al., 2019; Kouadria., 2019**).

Ils vivent en forme de mycélium* avec la plante produisant des métabolites secondaires dans certaines conditions environnementales (**Priyanka et al., 2019**) qui ont un effet favorable à la plante.

B. Classification:

D'après **Sénéquier et Canard (2016)**, les champignons endophytes sont classés en quatre classes selon la localisation, la famille, et le mode de transmission de l'endophyte, comme le montre le **tableau (1)** dont on distingue deux grandes familles : les *clavicipitaceae* (les *Ascomycota*) et les *non-clavicipitaceae* (les *Ascomycota* et *Basidomycota*...)

➤ Les *clavicipitaceae* :

Sont des *Ascomycota* de la position phylogénétique suivante :

Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomyceta; Pezizomycotina; Leotiomyceta; Sordariomyceta ; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales ; *Clavicipitaceae*.

La recherche bibliographique

Elle ne présente qu'une seule classe (classe1) caractérisé par un spectre étroite d'hôte restreint aux plantes herbacées des familles : *Poaceae*, *Junaceae*, *Cypraceae*. Ces champignons colonisent extensivement la partie aérienne de la plante ainsi le rhizome mais ne colonisent jamais les racines avec une biodiversité basse au niveau de plante, ils suivent une transmission verticale et horizontale pour se propagé, on distingue quatre espèce à savoir: *Balansia*, *Ephelis*, *Epichloë* et *Neotyphodium* (les genres *Balansia* et *Ephelis* sont peu documenté).

Ces endophytes confèrent aux plantes la tolérance à sécheresse et augmentent la croissance.

➤ Les *non-clavicipitaceae* :

Sont des *Ascomycota* avec les *Basidomycota*, Comprend trois classes sont les suivant :

○ Classes 2

Sont issue de Dikarya et constitue majoritairement des *Ascomycota*(*Pezizomycotina*) mais on trouve aussi des *Basidomycota* (*Agaricomycotina*, *Pucciniomycotina*).

Le mode d'endophytisme de ces champignons est caractérisé par un large spectre d'hôte qu'elles peuvent colonisent de façon extensive, atteint presque la totalité des parties de plante (pousse, rhizome, racine) principalement les tissus intercellulaire avec une biodiversité basse.

Souvent se propage via la transmission verticale comme peut aussi avoir une transmission horizontale.

La plante bénéficie de cette association par l'acquisition de la tolérance à la sécheresse ainsi aux pH, température et salinité.

○ Classe 3

Sont issue de Dikarya et contient majoritairement des *Ascomycota*(*Pezizomycotina*) comme on trouve aussi des *Basidomycota*.

Le spectre de l'hôte est très large, ils atteignent la partie aérienne de la plante de façon très localisée (pousse), ainsi la biodiversité des individus aux seins d'hôte est élevée.

La recherche bibliographique

Elles suivent strictement la voie de transmission horizontale en conférant aux plantes certains bénéfices : la tolérance à la sécheresse et l'amélioration de croissance.

o Classe 4

La position phylogénétique n'est pas clairement établie, elle appartient d'*Ascomycota* (*Pezizomycotina*).

Les individus de cette classe présentent un spectre large d'hôte bien qu'on les retrouve dans les arbustes ou arbres, en particulier les espèces de conifères, colonisent uniquement les racines d'une manière extensive et se propage seulement avec une transmission horizontale.

L'hôte gagne certain critères grâce à l'association avec les membres de cette classe tel que : l'amélioration de la tolérance aux sécheresses et l'augmentation de croissance.

Tableau 1 : classification des champignons endophytes (Sénéquier et Canard., 2016).

Critères	<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Non clavicipitaceae</i>		
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Spectre d'hôte	Limité	Vaste	Vaste	Vaste
Tissu colonisé	Pousse* et rhizome*	Pousse, rhizome racine	Pousse	Racine
Colonisation dans la plante	Extensive	Extensive	Limité	Extensive
Biodiversité des champignons au niveau de plante	Basse	Basse	Elevé	inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Vertical et horizontal	Horizontal	Horizontal
Avantage sur la forme de plante	NHA	NHA et HA	NHA	NHA

Habitat non adapté (NHA: Non habitat adapted) les avantages tels que la tolérance à la sécheresse et l'augmentation de la croissance sont dues aux mycoendophytes indépendamment de l'habitat d'origine.

Hapitat adapté (HA: Habitat adapted) dépend de l'habitat, les avantages pour la plante résultent de la nature et la spécificité de l'habitat tel que le pH, la température, la salinité.

C. Mode de croissance des champignons endophytes:

Selon les auteurs **Sénéquier et Canard (2016)** et **Aouarib et Lemsara (2016)**, les endophytes peuvent croître d'une manière intra et/ou intercellulaire des tissus internes de la plante hôte (**figure1**) suivant deux voies principales:

- ✓ **Croissance végétative des hyphes** : elle se passe par la traverse de l'hyphes* dans une graine ou propagule* d'hôte ensuite transmis de la plante infectée vers la descendance; les *Clavicipitaceae* possèdent généralement une transmission verticale par les graines.
- ✓ **Croissance par le biais des spores** : c'est une transmission horizontale (nouvel hôte) dont les spores infectent les plantes via la dispersion aéroportée ou par les insectes ; après germination l'hyphes pénètre l'hôte via les stomates ou à travers l'épiderme.

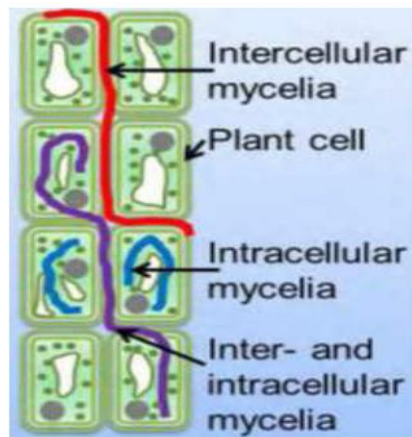


Figure 1: Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes (**Sénéquier et Canard., 2016; Aouarib et Lemsara., 2016**).

D. Relation champignon endophyte-plante:

Afin d'établir une association avec succès entre la plante et le champignon, ce dernier doit surmonter quelques barrières de défense installées par la plante elle-même.

Cette association varie d'antagonisme à mutualisme, en fonction, de l'hôte, du champignon et des facteurs d'habitat (**Zeriguine et Belyadi., 2019; Priyanka et al., 2019**).

Ce champignon endophyte peut atteindre plusieurs tissus (feuille, racine, tige). D'après **Khirschner (2018)** on peut citer :

- Des champignons superficielles (ectophyte) : croissance exclusivement externe.

-Des champignons parasites-plante (ectoendophyte): la pénétration de champignon à l'intérieur de tissu provoque des maladies.

-Des champignons endophytes : croissance à l'intérieur de tissu sans causer des pathologies.

En outre les champignons endophytes se subdivisent en trois catégories selon le mode d'association avec la plante (**Khirschner., 2018; Zeriguine et Belyadi., 2019**):

- Des endophytes saprophytes: ils s'accroissent à l'intérieur de tissu asymptotiquement; une fois la plante morte, ces derniers débutent leur sporulation et développement.
- Des endophytes pathogènes latent (parasite): ce mode s'exprime lorsque la plante se trouve dans un stress écologique qui sera le déclencheur du stade de pathogénicité.
- Des endophytes mutualistes: ces organismes forment une association de mutualisme qui permet aux deux symbiotes de gagner certains bénéfices.

La relation de mutualisme, généralement, c'est la symbiose entre deux symbiotes en développant des associations mycorhiziennes (au niveau des racines) dont ils participent à la nutrition et la résistance aux stress biotique et abiotique de la plante et reçoivent les produits de la photosynthèse pour leur nourriture. On distingue deux grands types de ce genre d'association (**figure2**) (**Sénéquier et Canard., 2016**) :

- ✓ **La symbiose ectomycorhizienne** : elle est caractérisée par la formation du réseau Hartig qui est un réseau hyphal qui sert à l'échange entre la surface racinaire de la plante et champignons qui restent extracellulaire.
- ✓ **La symbiose endomycorhizienne** : elle est caractérisée par la formation des arbuscules qui servent de surface d'échange entre les deux symbiotes et aussi aux vésicules de stockage fongique (cette structure ne se trouve pas chez tous les endomycorhizienne).

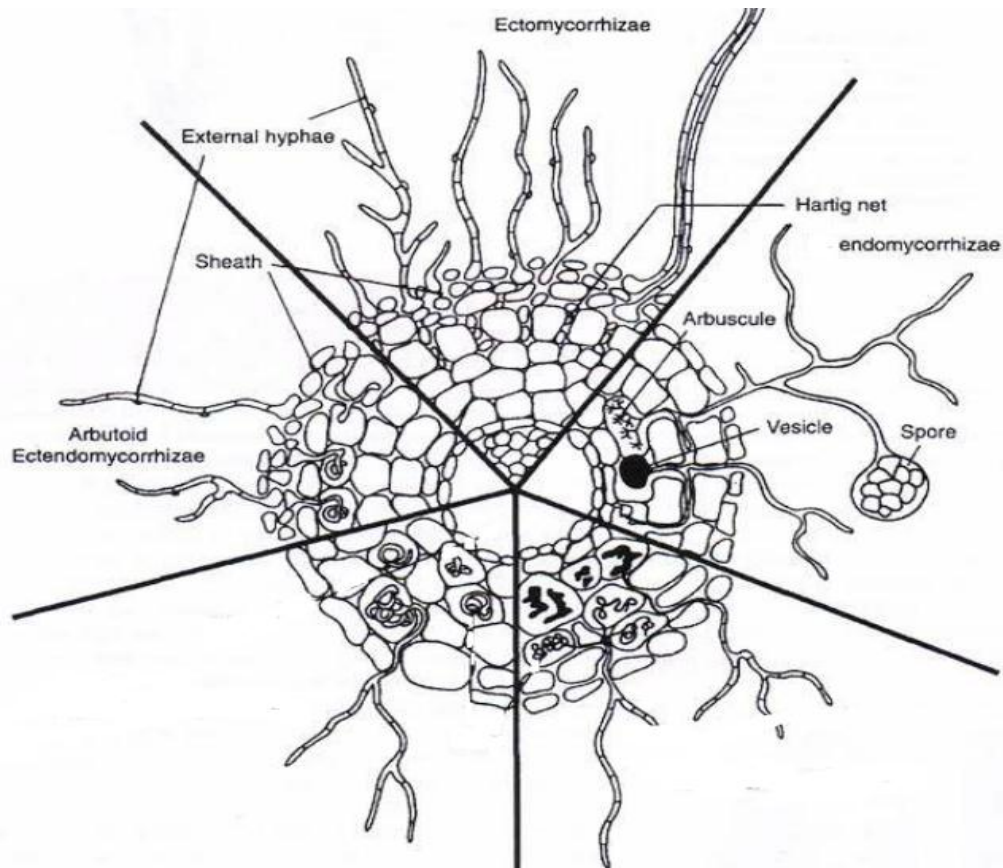


Figure 2: types de mycorhizes (Sénéquier et Canard., 2016).

De plus, on distingue une relation d'endophytisme, c'est-à-dire la colonisation des structures internes de façon asymptotique avec un échange bénéfique réciproque. Elle est différenciée de la symbiose car sont des interactions non durables (Sénéquier et Canard., 2016).

E. Leur rôle dans le stress biotique et abiotique :

▪ **Dans le stress biotique :**

Les herbivores, les pathogènes et les parasites affectent la forme physique de la plante en provoquant la défoliation de cette dernière, de plus, l'effet allélopathique exprimé par les autres espèces voisines, ce qui pousse la plante de suivre une stratégie de défense (Chetia et al., 2019), suivie d'un renforcement ajouté par le champignon, tel que :

✓ La défense contre les herbivores :

Des recherches sur les endophytes concluent que la relation plante-endophyte confère aux plantes une protection contre les herbivores alors celles qui ne sont pas colonisées par ces

derniers perdent cette protection par exemple, *Epichloë festucae* var. *lolii*, endophyte de *Lolium perenne* produit des alcaloïdes : peramine, ergovaline et lolitrem B. La peramine est un alcaloïde toxique pour les invertébrés hors les deux autres sont des neurotoxines pour les vertébrés (Philippe., 2016; Chetia et al., 2019).

✓ Contre l'effet allélopathique* :

L'endophyte produit des composées bioactives à effet antimicrobien insecticide et cytotoxique afin d'améliorer leur dominance avec l'hôte, tel que, l'association de *Lolium rundina* et l'endophyte *Neotyphodium coenophialum* peuvent abîmer la croissance des semis indigène (Amérique du nord) par la libération des alcaloïdes toxiques afin de dominer dans l'espace à savoir : *Acer saccharinum*, *Populus deltoides*, *Platanus occidentalis* (Chetia et al., 2019; Orr et al., 2005; Redgers et Orr., 2009).

✓ Contre les parasites et les pathogènes :

Les champignons endophytes expriment un taux inhibiteur élevé à la colonisation néfaste de la plante ce qui lui donne une résistance aux pathogènes suivant trois principaux mécanismes (Ouzid., 2018) :

Le 1^{er} mécanisme : la compétition entre l'endophyte et le pathogène sur les ressources qui finissent par la réduction d'effet pathogénique.

Le 2^{ème} mécanisme: la production des phytoalexines et/ou des composés biocides par la plante sous influence d'endophyte ou ce champignon produit des composées à effet antimicrobien.

Le 3^{ème} mécanisme: induction de signalisation de défense de l'hôte par l'endophyte qui permet d'améliorer leur résistance.

- **Dans le stress abiotique** : L'immobilité de la plante lui présente un obstacle car elle ne peut changer d'habitat. Si les conditions de survie deviendront défavorables, la plante soit elle s'adapte ou succombe devant la sécheresse, la salinité, la température et métaux lourds. Ainsi, c'est leur association avec les champignons qui va améliorer son potentiel de survie.

✓ La tolérance contre le stress de sécheresse :

Aux conditions extrêmes de manque d'eau et l'élévation de température, la plante trouve une difficulté d'adaptation. Celles qui sont colonisées par les endophytes ont une chance de survivre parce qu'elles permettent l'augmentation de la longueur des racines et la diminution de leur diamètre afin de faciliter et d'améliorer l'absorption des minéraux et d'eau. Elles peuvent aussi s'adapter par l'ajustement osmotique où l'endophyte secrète des sucres alcoolisés, tel que, le mannitol et l'arabitol pour protéger les enzymes et la membrane d'hôte au dessèchement. De plus, les plantes de grande fétuque infectées produisent le loline qui est un alcaloïde osmo-régulateur. Aussi le volume cellulaire est affecté où leur paroi deviendra moins rigide et leur capacité d'absorption deviendra grande par conséquence la plante infectée a été renforcé contre la sécheresse (**Chetia et al., 2019**).

✓ La salinité :

La principale solution pour que la plante puisse s'adapter au stress salin est sa relation mutualiste-symbiotique avec les champignons endophytes qui améliore sa résistance (**Bagheri et al., 2013**).

Ce stress provoque un déséquilibre ionique et osmotique de la cellule végétal (**Khan et al., 2011**) et la toxicité des ions de sodium sera le déclencheur de formation des dérivés réactifs d'oxygène (**Khan et al., 2012**). Ceci nécessite la neutralisation de ces dérivés réalisée par un groupe enzymatique sous l'influence d'endophyte (**Latef et Chaoxing., 2011**) à savoir : la catalase (CAT) et superoxide dismutases (SOD) (**Chetia et al., 2019**), ascorbate peroxidase (APX) (**Latef et Chaoxing., 2011**), peroxidase (POD) (**Hajiboland et al., 2010**) glutathione reductases (GR), dehydroascorbate reductases (DHAR) et mono-dehydroascorbate reductases (MDHAR) (**Lata et al., 2018**).

✓ Les métaux lourds

Les métaux lourds peuvent avoir des effets délétères sur plusieurs réactions biochimiques et physiques dans la plante telles que: la photosynthèse, la respiration, métabolisme protéique et autres. L'endophyte secrète des enzymes à activité antioxydante afin de lutter contre le stress généré par ces métaux (**Lata., 2018**).

Certains auteurs comme **Languereau-Leman., (2002)** expliquent que les endophytes contribuent à la régulation de la teneur en métaux lourds par l'intermédiaire des hyphes et des structures de réserves: vésicules et microsclérotés.

F. Activités biologiques des champignons endophytes

Une gamme de produits naturels a été extraite à partir des endophytes ayant des activités biologiques diverses ont été reportées : activités anticancéreuses, antioxydantes, antifongiques, antibactériennes, antivirales, insecticides, antidiabétiques et immunosuppresseurs (**Benfouddile., 2015**).

Ces endophytes symbiotiques développent la capacité de mimer les métabolites de la plante hôte via la biosynthèse des métabolites à travers trois principales voies : voie polypeptides, voie shikimate, voie mévalonate (**Parasuraman et al., 2019**).

Ainsi sont des meilleurs candidats pour la production des enzymes par rapport aux autres sources, mais leur exploitation reste encore minime dans les domaines biotechnologique, pharmaceutique, alimentaire, industriel et le bien être humain (**Rashmi et al., 2019**).

Le **tableau 2** ci-dessous est une synthèse inspirée de plusieurs références, tel que : **Bouchet et al., 1999; Amirita et al., 2012; Kalim et Nazish., 2016; Rashmi et al., 2019.** qui décrit quelques enzymes extraits d'endophytes et leur intérêt d'application dans différents domaines.

Tableau 2: Quelques enzymes extrait des champignons endophytes et leur interet

ENZYME	SUBSTRAT	INTERET D'ENZYME	CHAMPIGNON PRODUCTEUR	REFERENCE
Amylase	Amidon, Glycogène Dextrine	- décolle l'amidon attaché aux textiles. -sert à produire différent qualité du papier. -un meilleur détergent.	- <i>Xylariales.</i> - <i>Colletotrichum carssipes</i> - <i>Cladosporium cladosporioides</i> - <i>Aspergillus niger.</i> - <i>Aspergillus oryzae</i>	• Bouchet <i>et al.</i> , 1999 • Amirita <i>et al.</i> , 2012 • Rashmi <i>et al.</i> , 2019
Lipase	Lipides	-serve comme un détergent. -intervient dans la synthèse des arômes. -détergent doux sur le cuir.	- <i>Curvularia vermiformis</i>	• Amirita <i>et al.</i> , 2012. • Rashmi <i>et al.</i> , 2019.
Cellulase	Cellulose	-serve comme une pierre du lavage du jeans. -économiser l'énergie utilisée pour produire le papier. - augmente le rendement de jus aussi leur gout. - cellulase alcalin débarrasse les taches trouvées dans l'inter-fibre du vêtement.	- <i>Curvularia vermiformis</i> - <i>Cladosporium cladosporioides</i>	• Amirita <i>et al.</i> , 2012. • Rashmi <i>et al.</i> , 2019

La recherche bibliographique

Pectinase	Pectine	<ul style="list-style-type: none">- dégrade la pectine trouvé dans les feuilles de thé ainsi accélère la fermentation.- un agent anti mousse	<ul style="list-style-type: none">-<i>Rhizopus</i>-<i>Aspergellus</i>-<i>Penicillium</i>-<i>Botrytis</i>	<ul style="list-style-type: none">• Bouchet <i>et al.</i>, 1999• Rashmi <i>et al.</i>, 2019
Xylanase	Xylane	<ul style="list-style-type: none">- il est recommandé pour le pré-blanchiment du papier.- utilisé dans le prétraitement de fibre de textile.- permet à obtenir une bonne qualité de farine.- il participe aussi dans la séparation d'amidon et gluten.- améliore la qualité de jus	<ul style="list-style-type: none">-<i>Aspergillus flavus</i>-<i>Aspergillus niger</i>	<ul style="list-style-type: none">• Kalim Nazish., 2016• Rashmi <i>et al.</i>, 2019

3

*La partie
pratique*



III. La partie pratique

1. Isolement et identification macro et microscopique des champignons endophytes

Les échantillons des deux plantes *Haloxylon scoparium* et *Astragalus armatus* ont été prélevés en octobre 2019 sur un site dans la région El-kheneg-Laghouat.

Afin d'assurer un bon isolement des champignons endophytes, plusieurs pieds sains ont été choisis et les échantillons ont été préservés dans des sacs en carton à l'abri de la lumière et dans une température ambiante, en attendant d'être utilisés.

a) L'isolement et purification:

Les parties étudiées des plantes (tiges et fleurs) ont été rincées à l'eau du robinet pendant une dizaine de minutes pour débarrasser les impuretés et les débris de la surface, ensuite ils ont été immergés dans de l'Hypochlorite de sodium NaClO pendant 5 minutes, puis dans le chlorure de mercure (HgCl₂) 0.1% pendant 1 minutes ; ils sont ensuite rincés trois fois avec l'eau distillée stérile pendant 1 minute et sont séchés sur du papier absorbant stérile.

Après sont coupés en fragments de quelques millimètres et placés aseptiquement dans des boîtes de pétri sur milieu PDA stérile (**figure 3**). Après l'isolement vient l'étape de la purification des isolats qui se résume en cinq repiquages successifs sur milieu PDA stérile.

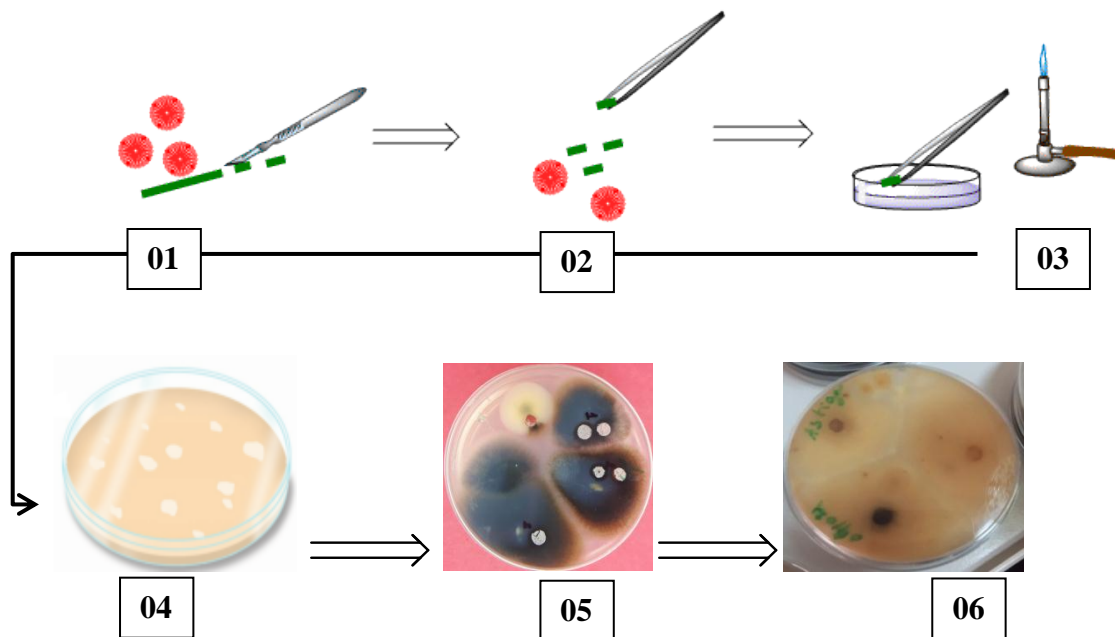


Figure 3: Protocole d'isolement et de purification des champignons endophytes

01: la désinfection du matériel végétal avec NaClO et HgCl_2 puis on les découpés en morceaux de quelques millimètres. **02+03 :** mise en culture des morceaux de tiges, rameaux et des fleurs sur un milieu PDA. **04:** Après un temps variant de 18j à 34j les champignons endophytes poussent. **05:** faire des trous avec le bout d'une pipette pasteur pour chaque développement mycélien. **06:** repiquage des cylindres sur un nouveau milieu PDA pour l'obtention de culture pure.

b) Identification des champignons endophytes :

L'un des aspects les plus important d'identification des organismes sont les caractères morphologiques et microscopiques de l'espèce et c'est le cas aussi pour les champignons (**Bessadat., 2013**); ces critères sont établis pour leur reconnaissance (**Champion., 1997**). Lorsque ces critères sont insuffisants, on fait appeler à des techniques physiologiques et biochimiques afin de confirmer la présence de telle espèce ou telle espèce (**Bessadat., 2013**).

• Identification macroscopique

L'identification macroscopique a été faite à l'œil nu, en se basant essentiellement sur les caractéristiques des cultures telles que l'aspect général de la surface de la colonie, sa texture et sa pigmentation (**Kouadria., 2019**).

- **Identification microscopique**

L'identification microscopique de champignon est basée sur certains nombre des critères à savoir : la morphologie des hyphes et le conidiophore, la forme et le regroupement des conidies et le types des organes de fructification (**Kouadria., 2019**).

Pour cela on fait un montage frais de lame et lamelle de notre échantillon à tester en ajoutant le bleu de méthylène ou bien la gélatine glycéinée (**voir annexe**).

La détermination de l'espèce est réalisé sur la base de certains critères clés selon la littérature disponible (**Champion., 1997; Watanabe., 2010; Mouria et al., 2012; Ogórek et al., 2012; Bessadat., 2013; Gonu et al., 2015; Kidd et al., 2016; Alshaili et al., 2017; Rachmania et al., 2018**).

A decorative graphic featuring a large, bold number '4' inside a red-to-purple gradient circle. A red-to-purple gradient swirl starts from the top right of the circle and loops around the text. Below the text, a smaller red-to-purple gradient circle contains a white star, with a similar swirl starting from its bottom left and looping back towards the main graphic.

4

*Résultats et
discussion*

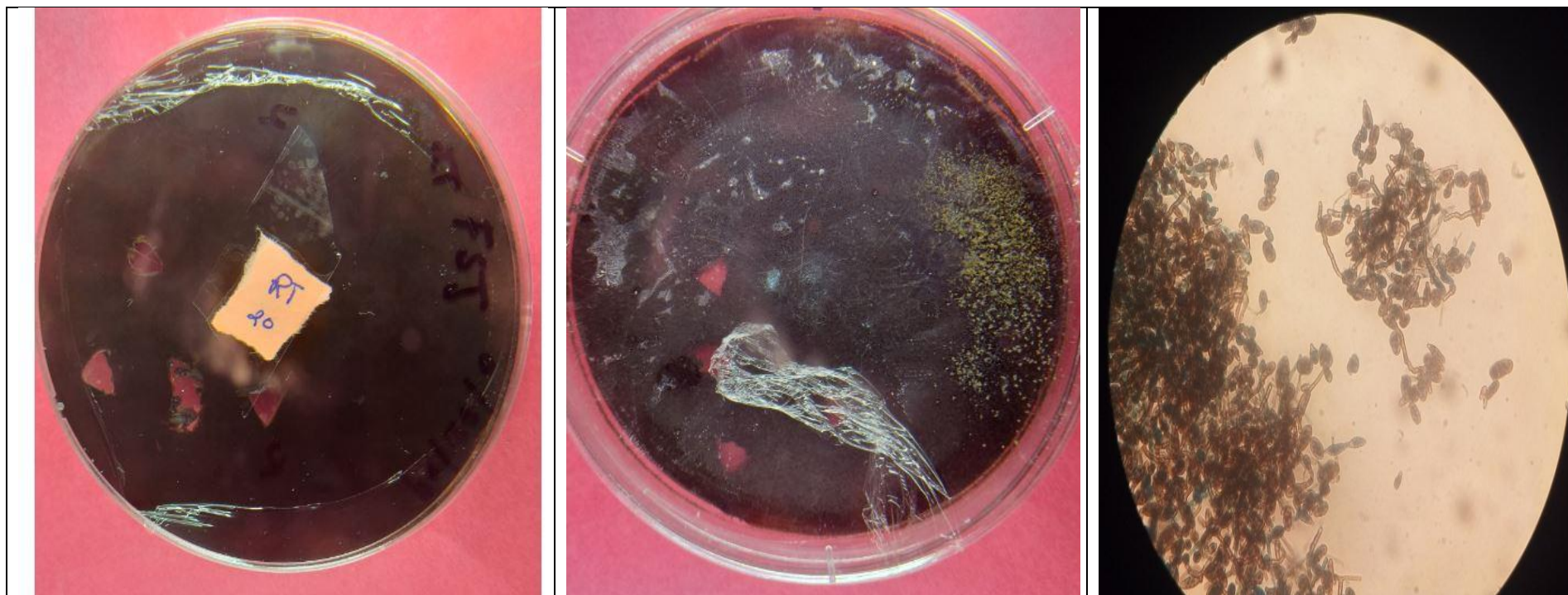
2. Résultats

1. Les Champignons endophytes identifiés

Après isolement d'une collection de 14 isolats, en se basant sur l'aspect des colonies et les critères microscopiques, 3 groupes phénotypiques ont été distingués à savoir : les *Alternaria*, les *Cladosporium*, les *Aspergillus*.

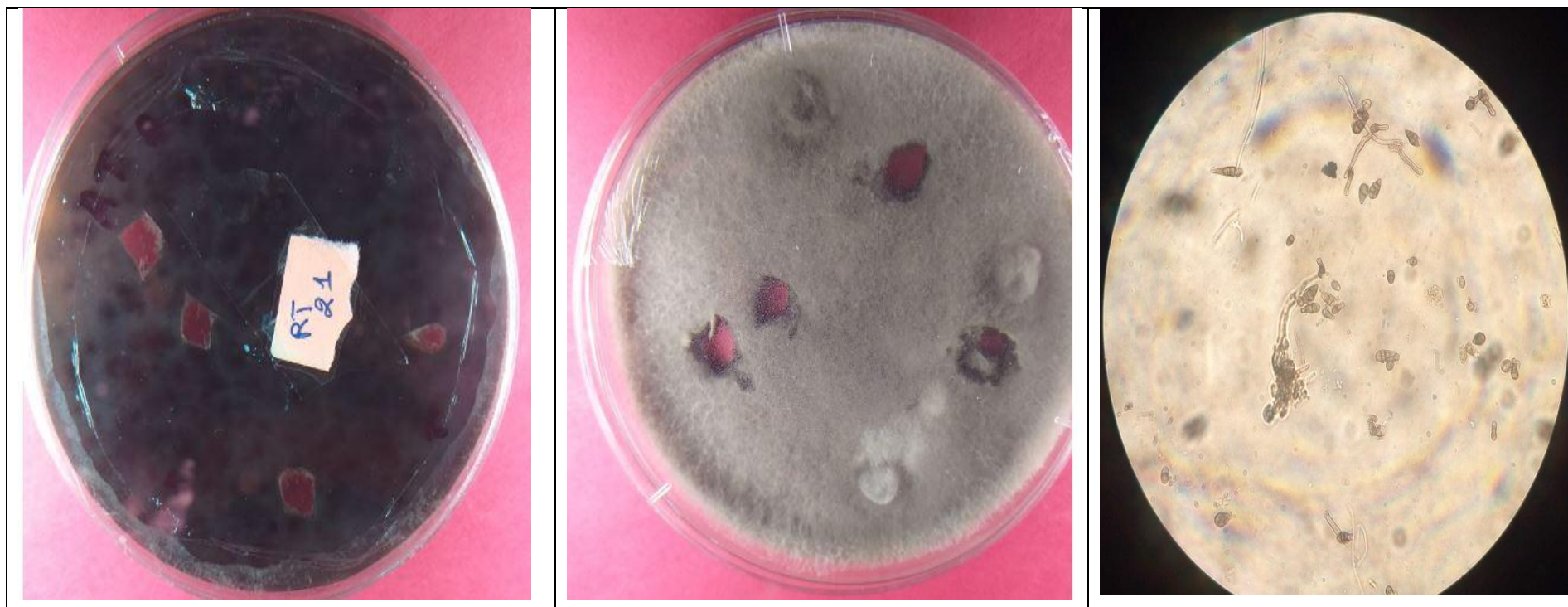
L'étude morphologique est basée sur des observations macroscopique et microscopiques de l'ensemble des champignons, portant sur les caractères cultureux (aspects du mycélium aérien, pigmentation du thalle et du mycélium sur milieu PDA), ainsi que sur les caractéristiques des spores.

Tableau 3: Les espèces isolées d'Haloxylon et Astragalus cultivé dans milieu PDA



Alternaria suspecté d'être *Alternaria alternata* de culture de 30J d'*Haloxylon* (texture laineuse plane de couleur noir de verso (gauche) et recto (centre) Noir blanc avec image microscopique (droite) du GX100-huile à émulsion- présente un hyphe septé et un conidiophore simple et des conidies Pluricellulaires se regroupent en amas)

(Champion., 1997; Watanabe., 2010; Bessadat., 2013; Kidd *et al.*, 2016; Alshaili *et al.*, 2017)

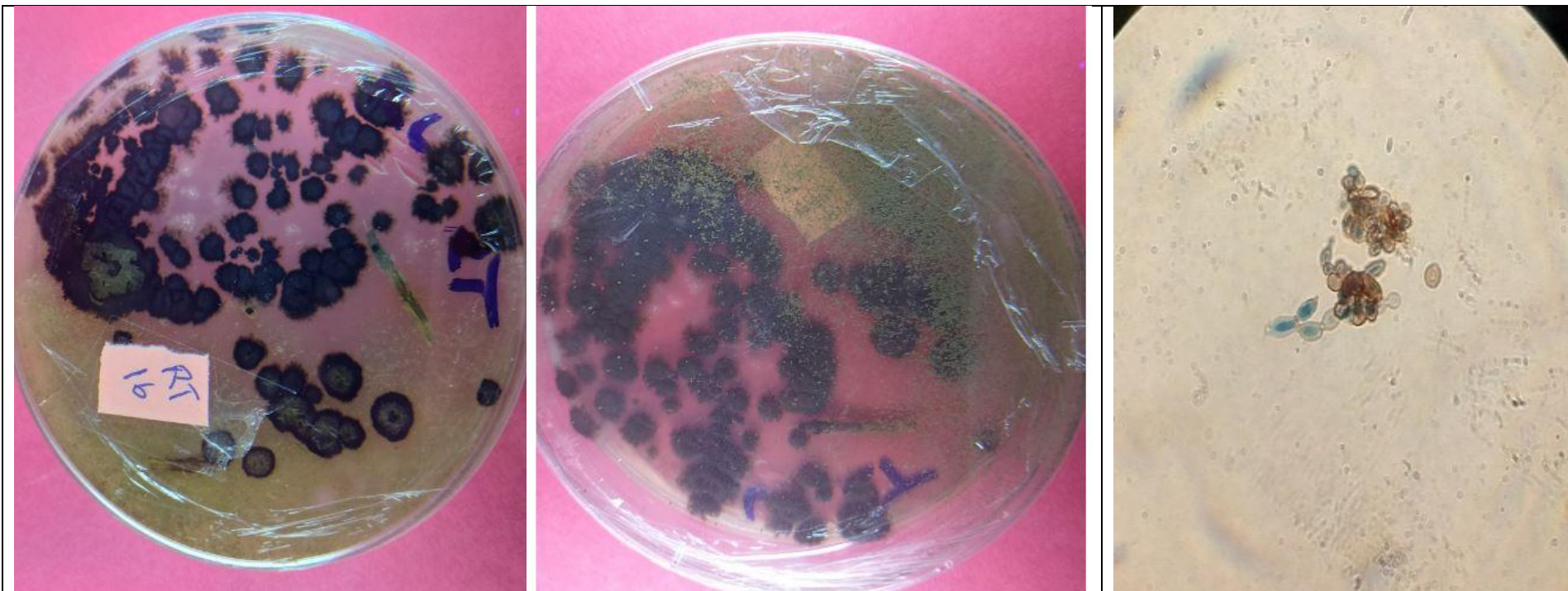


Alternaria spp7 de culture de 30J d'*Haloxylon* (texture laineuse plane de couleur noir de verso (gauche) et recto (centre) vert blanc avec image microscopique (droite) du GX40 présente un hyphe septé et un conidiophore simple et des conidies Pluricellulaires en solitaires)
(Champion., 1997; Watanabe., 2010; Bessadat., 2013; Kidd *et al.*, 2016; Alsohaili *et al.*, 2017)

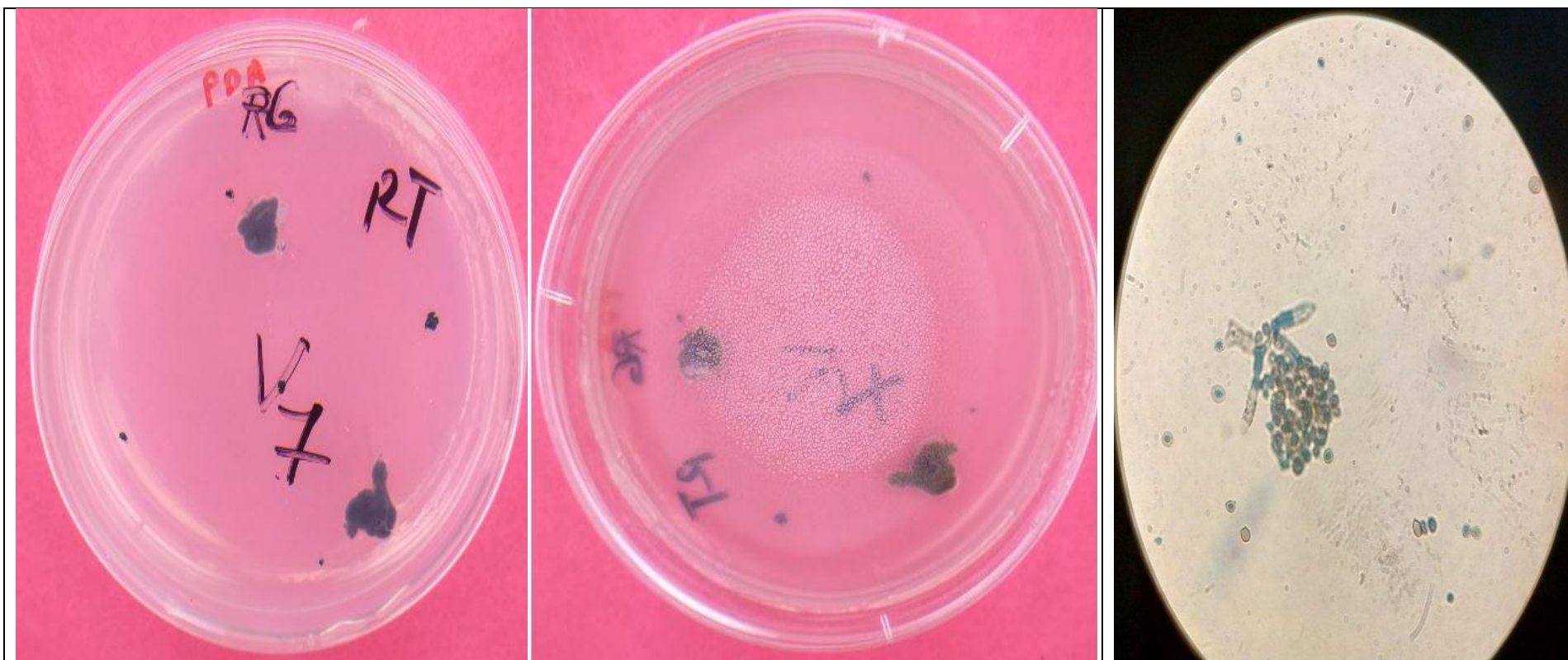


Aspergillus suspecté d'être *Aspergillus terreus* de culture de 34J d'*Astragalus* (texture poudreuse surelevé de couleur marron foncé de verso (gauche) et recto (centre) vert marron avec image microscopique (droite) du GX100-huile à émerssion- présente un condiophore simple hyaline et des conidies Unicellulaires en amas)

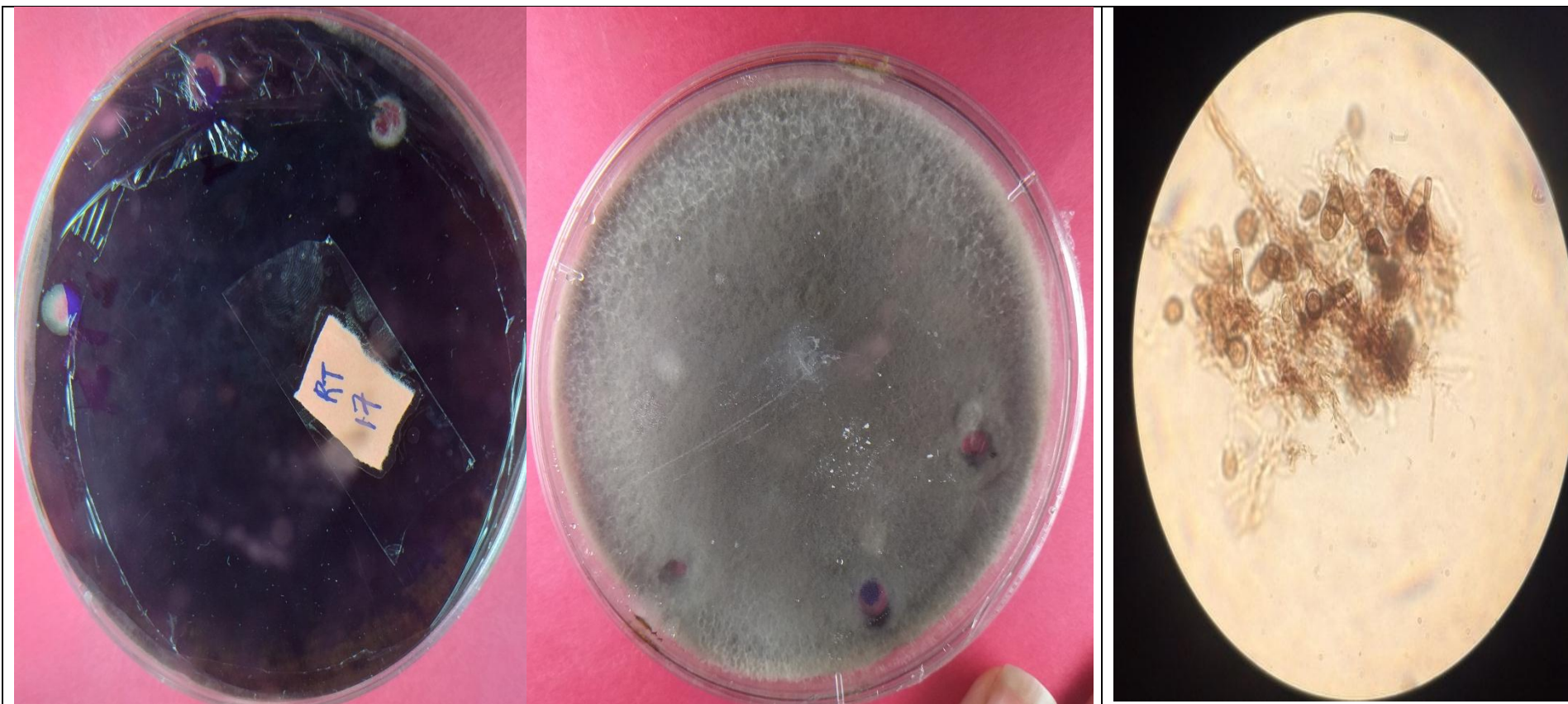
(Watanabe., 2010; Mouria *et al.*, 2012; Gonu *et al.*, 2015; Kidd *et al.*, 2016; Alsohaili *et al.*, 2017).



***Cladosporium spp1* de culture de 30J d'*Haloxylon* (texture poudreuse Surelevée de forme volcan d'un couleur noir de verso (gauche) et recto (centre) vert à Noir avec image microscopique (droite) du GX100-huile à émerssion- présente des conidies Unicellulaires regroupent en amas de forme citronné et irrégulier)
(Champion., 1997; Watanabe., 2010; Mouria *et al.*, 2012; Ogórek *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2016; Rachmania *et al.*, 2018)**

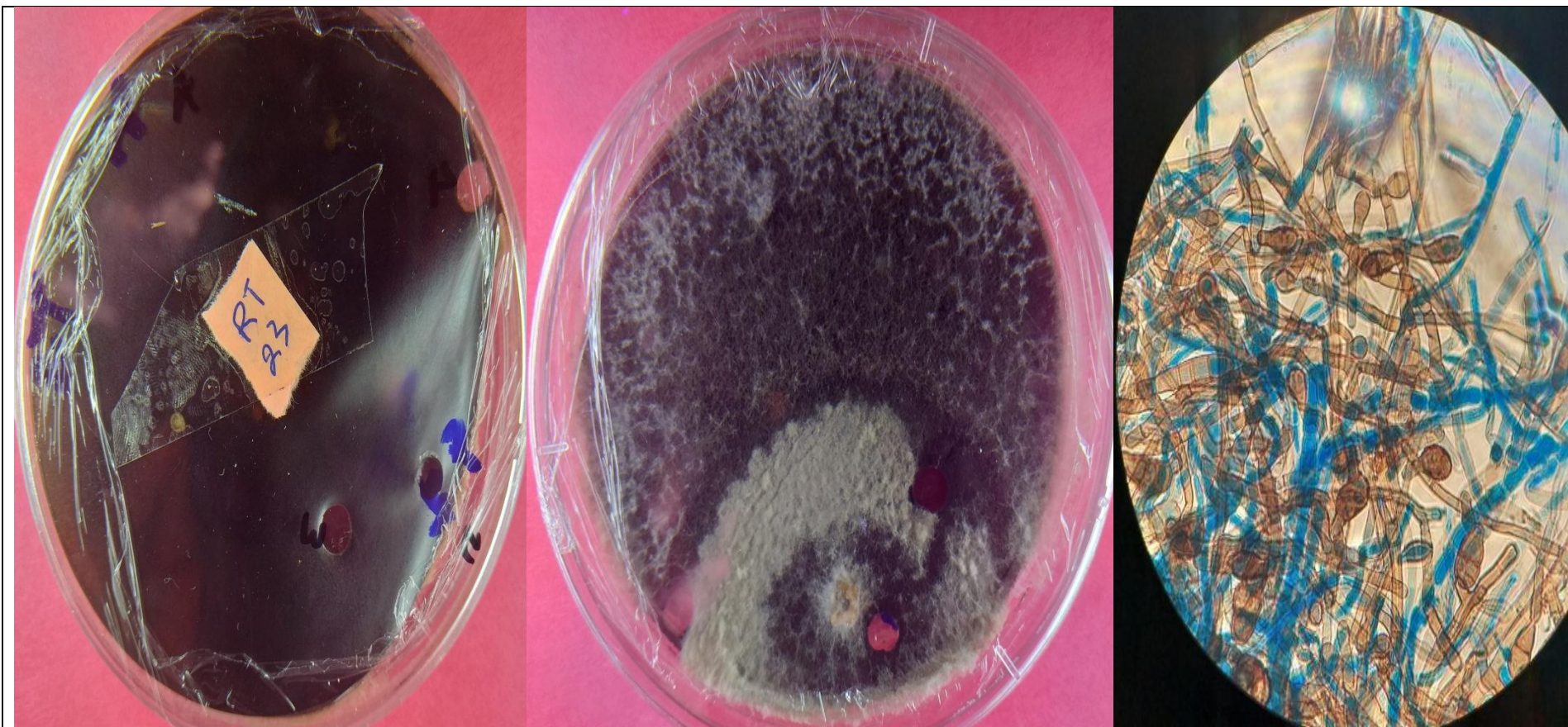


***Cladosporium spp2* de culture de 18J d'*Haloxylon* (texture poudreuse Surelevée cérébriforme d'un couleur vert foncé à noir de verso (gauche) et recto (centre) vert foncé avec image microscopique (droite) du GX100-huile à émerssion- présente des conidies Unicellulaires regroupent en amas de forme citronné et fusiforme à irrégulier)
(Champion., 1997; Watanabe., 2010; Mouria *et al.*, 2012; Ogórek *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2016; Rachmania *et al.*, 2018)**



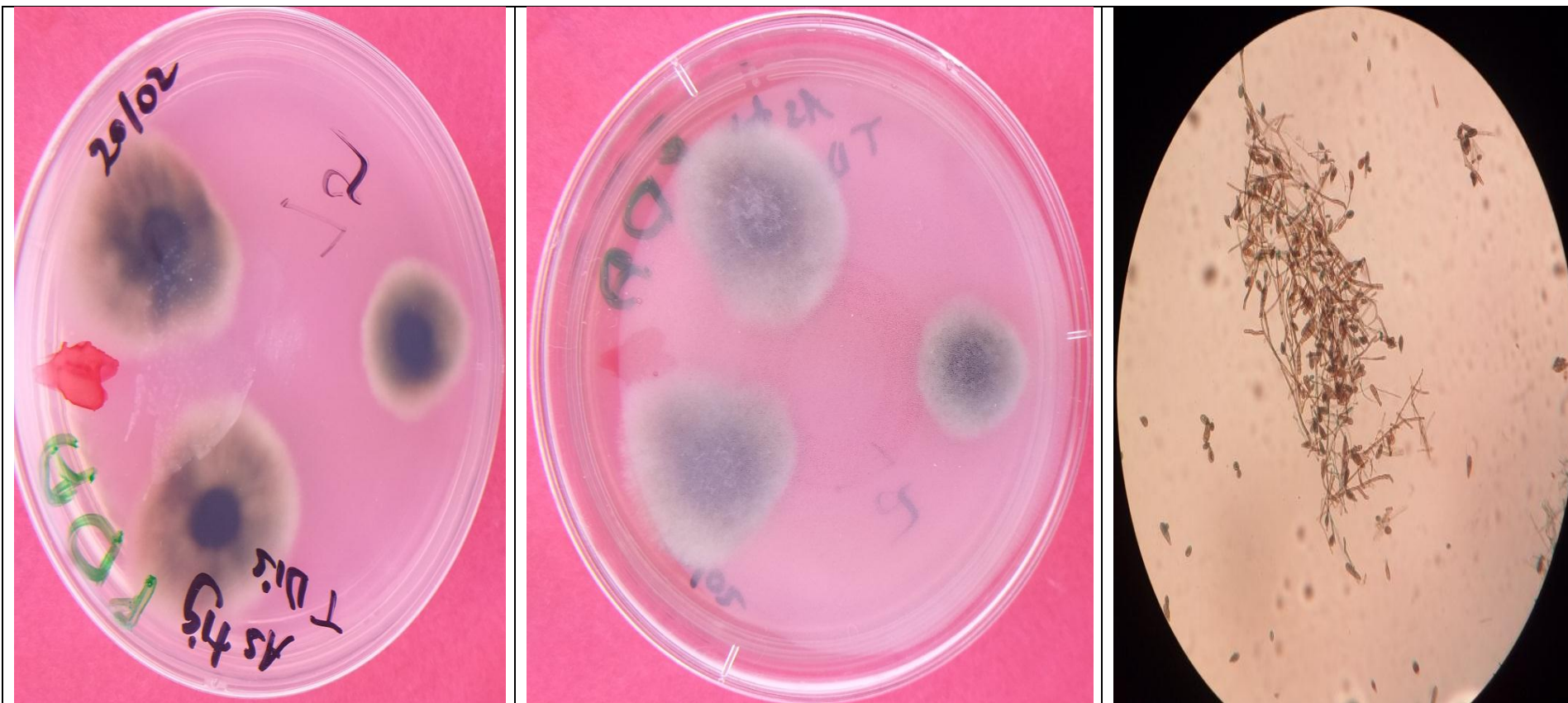
Alternaria spp1 de culture de 30J d'*Haloxylon* (texture poudreuse laineuse plane d'un couleur noir de verso (gauche) et recto (centre) vert blanc avec image microscopique (droite) du GX100-huile à émersion- présente des conidies pluricellulaires solitaires)

(Champion., 1997; Watanabe., 2010; Bessadat., 2013; Kidd *et al.*, 2016; Alshaili *et al.*, 2017)

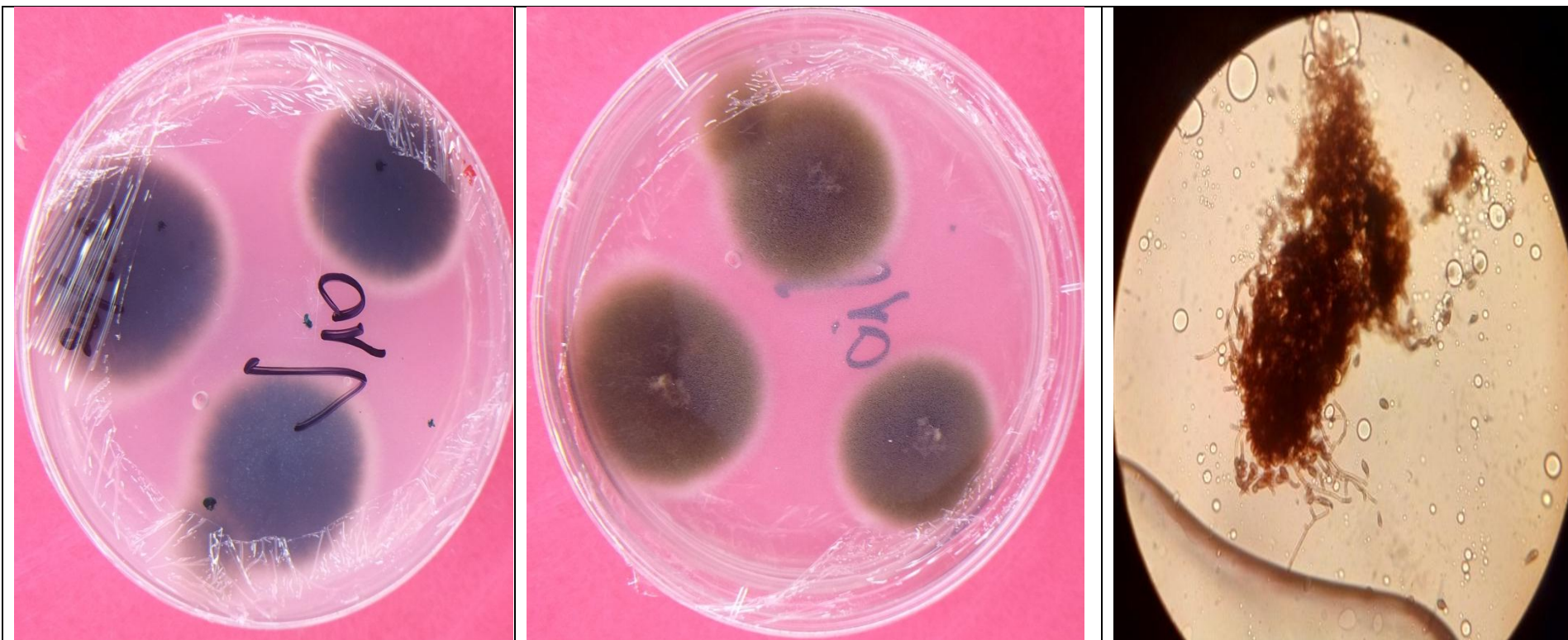


Alternaria spp2 de culture de 30J d'*Haloxylon* (texture Laineuse plus au moins duveteuse plane d'un couleur noir de verso (gauche) et recto (centre) noir gris avec image microscopique (droite) du GX100-huile à émerssion- présente un hyphe septé et un conidiophore simple et des conidies pluricellulaires solitaires)

(Champion., 1997; Watanabe., 2010; Bessadat., 2013; Kidd *et al.*, 2016; Alsohaili *et al.*, 2017)



***Alternaria spp3* de culture de 18J d'*Astragalus* (texture Laineuse à duveteuse plane d'un couleur noir au centre et vert marron à la périphérie de verso (gauche) et recto (centre) de Vert foncé au centre et vert clair à la périphérie avec couche blanche ainsi une image microscopique (droite) du GX20 présente un hyphe septé et un conidiophore simple et des conidies pluricellulaires solitaires) (Champion., 1997; Watanabe., 2010; Bessadat., 2013; Kidd *et al.*, 2016; Alsohaili *et al.*, 2017)**

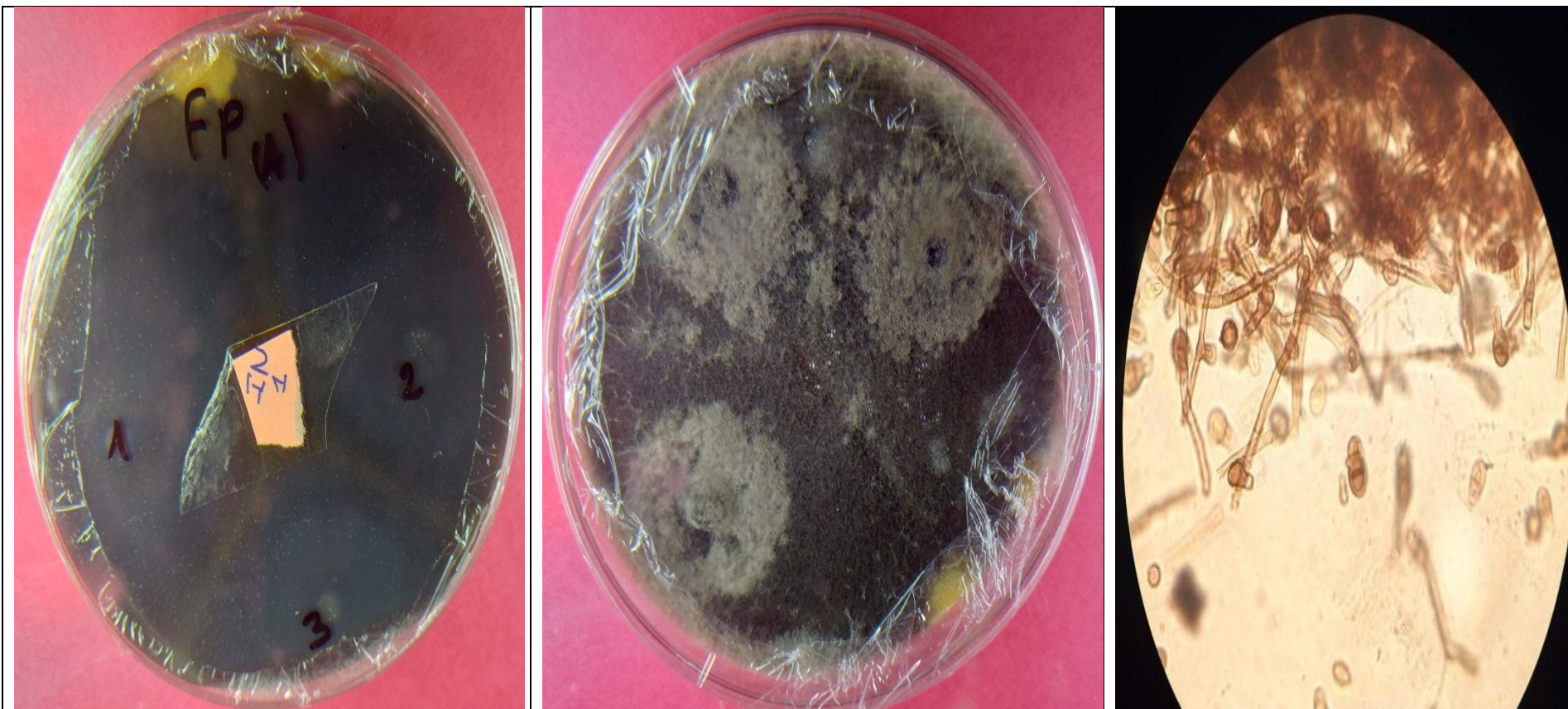


Alternaria spp4 de culture de 18J d'*Haloxylon* (texture Laineuse à duveteuse plane d'un couleur noir au centre et marron avec extrémité blanche de verso (gauche) et recto (centre) de Vert marron à extrémité blanche ainsi une image microscopique (droite) du GX20 présente un hyphe sépté et un conidiophore simple et des conidies pluricellulaires solitaires)
(Champion., 1997; Watanabe., 2010; Bessadat., 2013; Kidd *et al.*, 2016; Alshaili *et al.*, 2017)



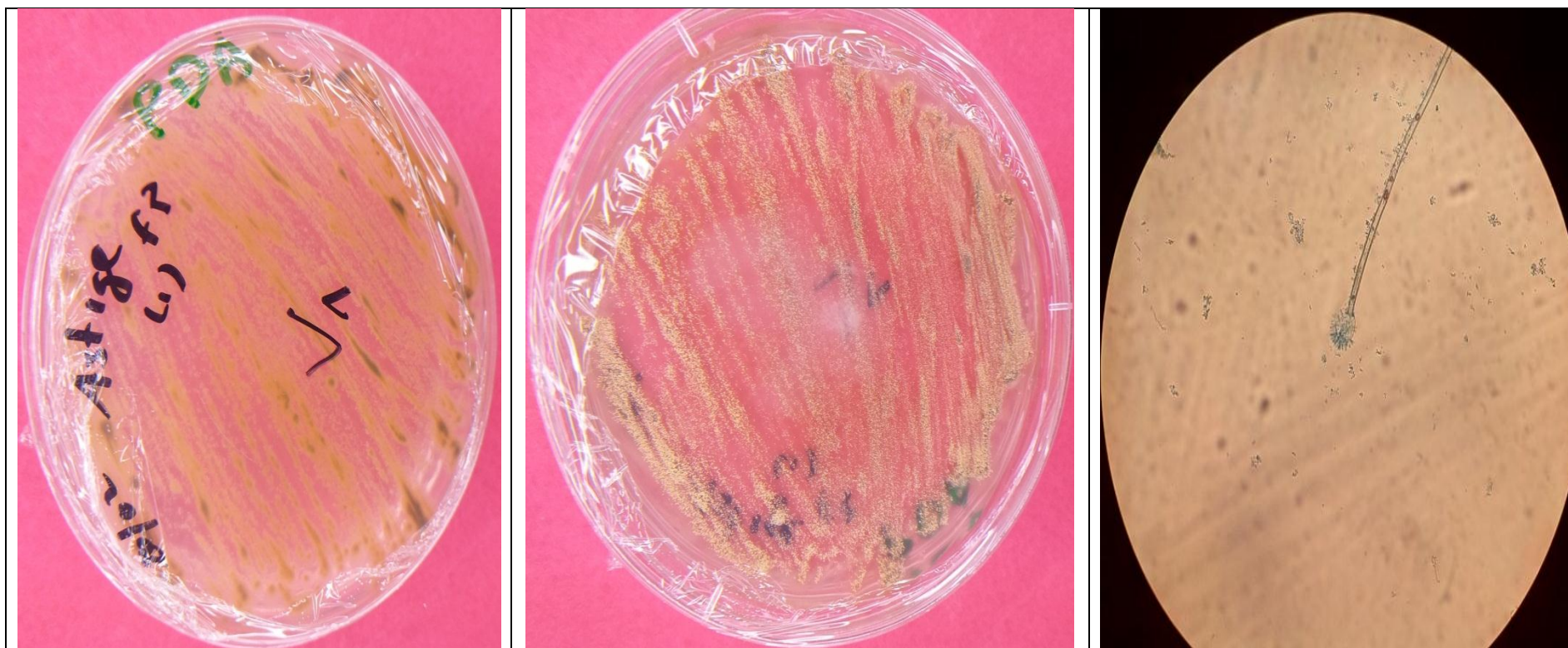
***Alternaria spp5* de culture de 30J d'*Astragalus* (texture Laineuse à duveteuse plane d'un couleur noir marron de verso (gauche) et recto (centre) Vert foncé blanc et marron clair et une image microscopique (droite) du GX40 présente un hyphe septé et un conidiophore simple et des conidies pluricellulaires solitaires)**

(Champion., 1997; Watanabe., 2010; Bessadat., 2013; Kidd *et al.*, 2016; Alsohaili *et al.*, 2017)



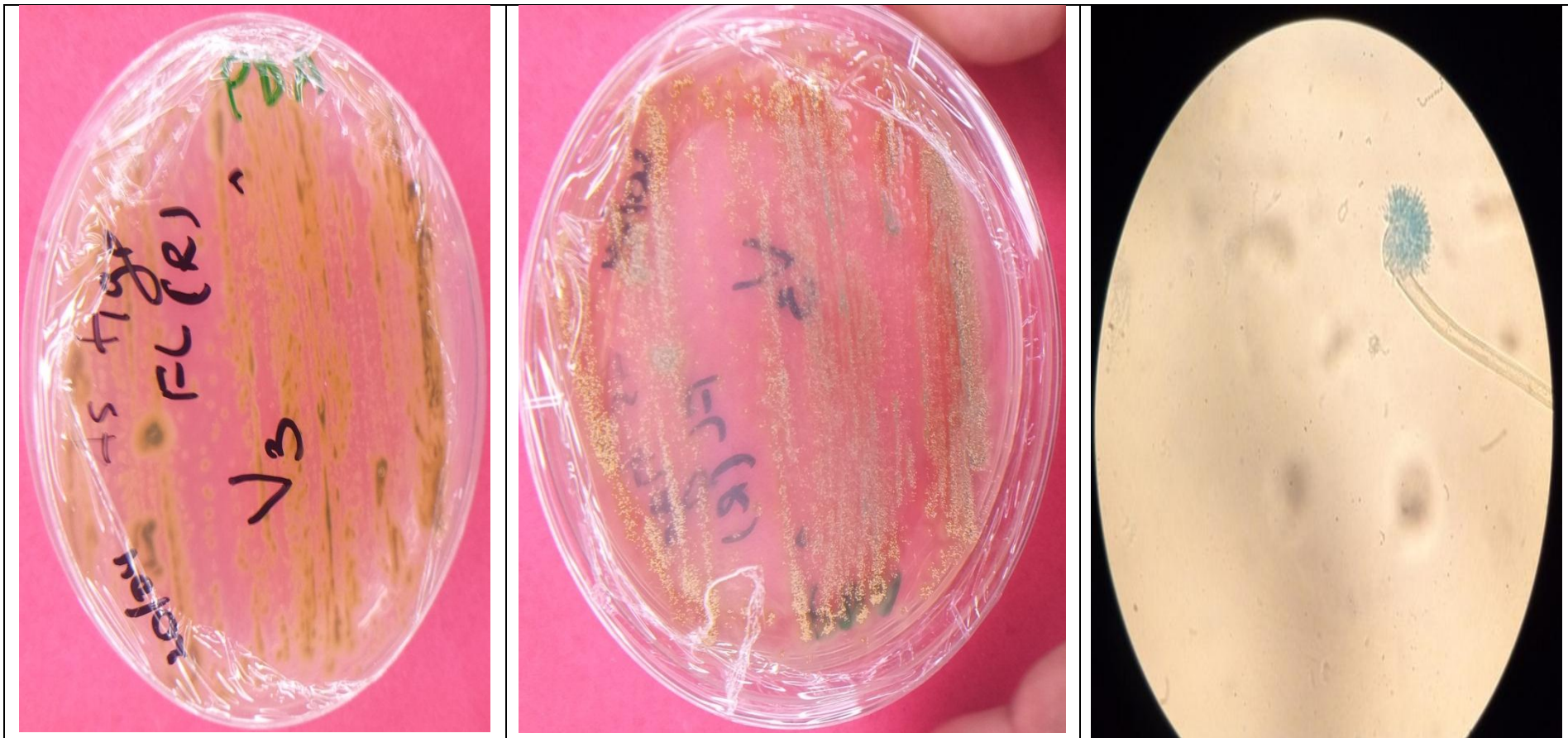
Alternaria spp6 de culture de 30J d'*Astragalus* (texture Laineuse à glabreuse surelevé d'un couleur noir de verso (gauche) et recto (centre) noir gris et une image microscopique (droite) du GX100-huile à émerssion- présente un hyphe septé et un conidiophore simple et des conidies pluricellulaires solitaires)

(Champion., 1997; Watanabe., 2010; Bessadat., 2013; Kidd *et al.*, 2016; Alsohaili *et al.*, 2017)



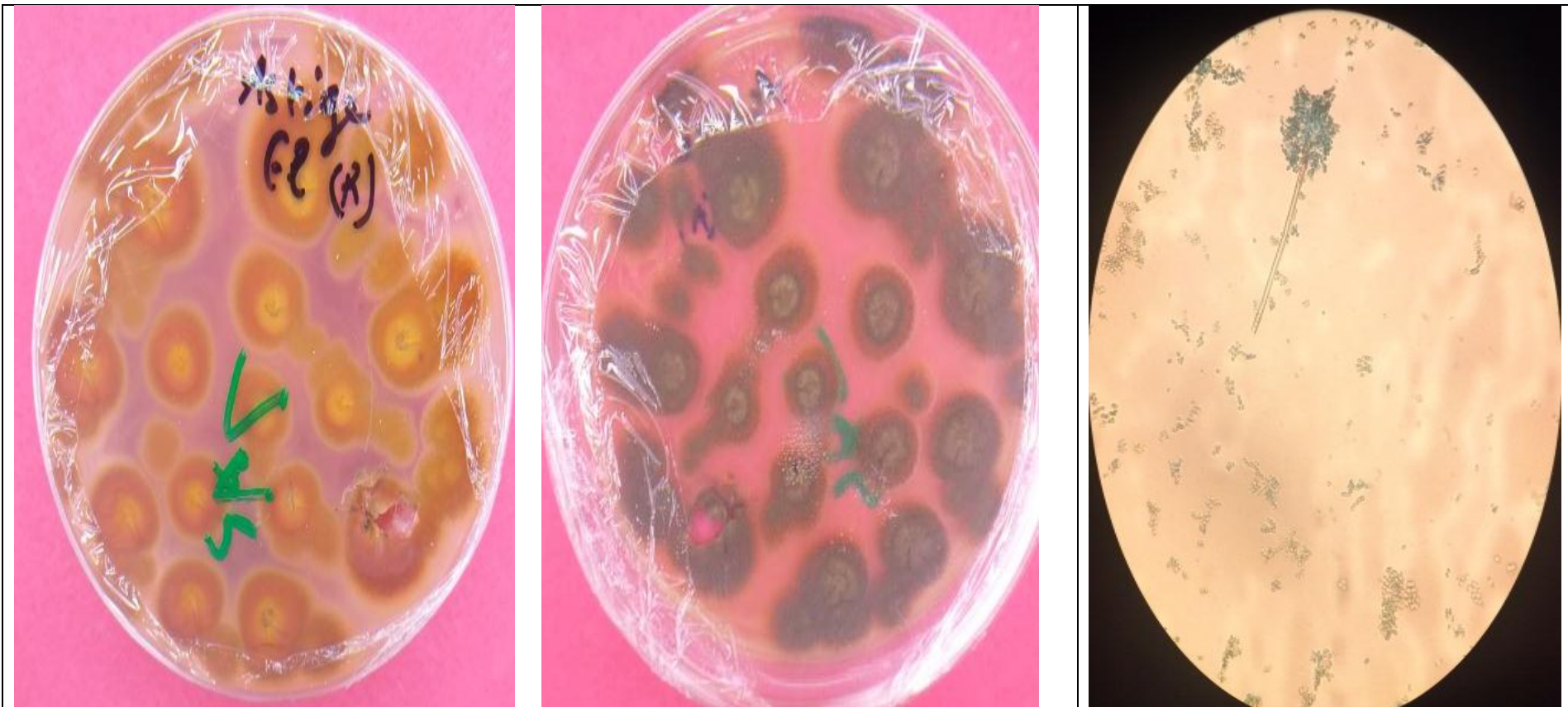
***Aspergillus spp1* de culture de 18J d'*Astragalus* (texture poudreuse -sableuse- plane d'un couleur jaune moutard de verso (gauche) et recto (centre) jaune doré et une image microscopique (droite) du GX100-huile à émergence- présente un conidiophore simple hyaline et des conidies Unicellulaires en amas de forme rond)**

(Watanabe., 2010; Mouria *et al.*, 2012; Gonu *et al.*, 2015; Kidd *et al.*, 2016;Alsohaili *et al.*, 2017)



Aspergillus spp2 suspecte d'être *Aspergillus niger* de culture de 34J d'*Astragalus* (texture poudreuse -sableuse- plane d'un couleur jaune moutard de verso (gauche) et recto (centre) jaune doré et une image microscopique (droite) du GX40 présente un conidiophore simple hyaline et des conidies Unicellulaires en amas de forme rond)

(Watanabe., 2010; Mouria *et al.*, 2012; Gonu *et al.*, 2015; Kidd *et al.*, 2016; Alsohaili *et al.*, 2017)



Aspergillus spp5 de culture de 30J d'*Astragalus* (texture laineuse surélevé cérébriforme d'un couleur jaune moutard de verso (gauche) et recto (centre) jaune doré et une image microscopique (droite) du GX40 présente un conidiophore simple hyaline et des conidies Unicellulaires en amas de forme rond)

(Watanabe., 2010; Mouria *et al.*, 2012; Gonu *et al.*, 2015; Kidd *et al.*, 2016; Alsohaili *et al.*, 2017)

3. Discussion

La valorisation des ressources naturelles devient de plus en plus importante pour des besoins thérapeutiques, et notre Sahara est riche par une couverture végétale de plantes médicinales diversifiées qui reste à exploiter (**Louerrad et al., 2016**).

Les champignons endophytes sont des micro-organismes qui font partie du microbiome végétal et qui sont considéré comme une source écologique pour un avenir prometteur grâce à la production des métabolites biologiquement actif.

Deux espèces végétales aux usages ethnobotaniques *Holoxylon scoparium* et *Astragalus armatus* ont été analysées pour la présence de champignons endophytes de leurs habitats naturels. Nos résultats viennent de mettre en relief l'identification de quelques genres d'endophytes qui font partie de la diversité microbienne à savoir les *Alternaria*, les *Aspergillus* et les *Cladosporium*.

- **Intérêt biologique des genres trouvés**

Des recherches faites sur les métabolites d'*Alternaria* présentent une multiple de fonctions, tels que: fonction cytotoxique, phytotoxine ainsi des activités antimicrobiennes (**Jingfeng et al., 2013**).

À titre d'exemple, ces métabolites sont classés en divers classe comme l'indique le **tableau 4** ci-dessous.

Tableau 4: Les métabolites isolées à partir *Alternaria* (Jingfeng et al., 2013).

La classe	l'espèce	Les métabolites
Composés azotés	<i>A.alternata</i>	Des Toxines Pyrophen Fumonisin B1
	<i>A. tenuissima</i>	N-Acetyltyramine
Stéroïde	<i>A.alternata</i>	Ergosterol
	<i>A. brassicicola</i> ML-P08	Cerevisterol
Terpenoïde	<i>A.alternata</i>	Bicycloalternarene 1
	<i>A. brassicicola</i>	Brassicicene A
Pyranone	<i>A. radicina</i>	Radicinin
	<i>A. arbusti</i>	Infectopyrone
Quinone	<i>A.alternata</i>	Alteichin
	<i>A.solani</i>	Macrosporin
	<i>A.porri</i>	Macrosporin
Phénoliques	<i>A. tagetica</i>	Tyrosol
	<i>A.dauci</i>	Zinniol

Le genre *Alternaria* présente une activité cytotoxique importante grâce aux pléthores métabolites produites tels que le **Porritoxin** qui est un agent antitumoral produit par *Alternaria porri* et le **Depudecin** extrait d'*Alternaria brassicicola* présentant une activité cytotoxique par inhibition d'enzyme histone désacétylase, encore, le **Dehydroaltenusin** isolé d'*Alternaria tenuis* qui est un inhibiteur spécifique d'ADN polymérase α des eucaryotes (Jingfeng et al., 2013) ; en outre le **Alternariol** ($C_{14}H_{10}O_5$) extrait d'*Alternaria brassicicola* qui présente une activité inhibitrice élevée contre le xanthine oxydase avec $IC_{50}=15.5\mu M$ (Gu., 2009) ainsi des récents travaux indiquent qu'il est un poison de topoisomérase I/II induisant l'activation d'apoptose (Jingfeng et al., 2013).

De plus parmi les espèces de ce genre il y'a qui présentent une activité antimicrobienne à travers les métabolites cités, comme exemple l'**altechromone A** ($C_{11}H_{10}O_3$), extrait d'*Alternaria brassicicola*, est un agent antibactérien vis-à-vis *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens* et *Escherichia coli* et antifongique contre *condida*

albicans avec MIC= 3,9/1,8/3,9/3,9 µg/ml respectivement (Gu., 2009) ; herbarin A (C₁₂H₁₂O₅) issue aussi d'*Alternaria brassicicola* est un antifongique, anti *Trichophyton rubrum* et *Candida albicans* avec MIC= 15.6µg/ml (Gu., 2009) et anti *Aspergillus niger* et *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* avec un MIC variant entre 1,8 à 62,5 µg/ml (Jingfeng et al., 2013), et dernièrement le (4S)- α,β -Dehydrocurvularin extrait d'*Alternaria spp* agent contre *Proteus vulgaris* et *Salmonella typhimurium* avec un MIC= 25 µg/ml (Jingfeng et al., 2013).

En outre le genre *Aspergillus* présente aussi des fonctions biologiques importantes : activités antivirales, antioxydantes, antimicrobiennes, antitumorales et aussi la production des flavonoïdes et des composés phénoliques (Patil., 2015; Abdel-Wahhab., 2020). L'espèce *Aspergillus flavus* présente une activité antimicrobienne : ATB contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella abony* avec zone d'inhibition = 18, 15, 15, 12, 10, 15mm respectivement. Et ATF_q contre *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* avec zone d'inhibition = 17, 15, 23mm respectivement (Patil., 2015).

De plus l'espèce *Aspergillus niger* exprime des métabolites à effet de baisser le Bcl₂ (B Cell lymphoma 2) et d'augmenter le Bax, (Bcl₂ associated X) caspase, P53 (Abdel-Wahhab., 2020).

D'autres travaux faits sur l'*Aspergillus sp*, endophyte de *Mitrephora wangii* offre une activité antibactérienne prometteuse grâce à ces métabolites tels que : β -thujaplicin, tripropionin, callitrin, cis-thujopsenal et E-ligustilide (Monggoot., 2018).

Aspergillus terreus exprime une activité ATB contre *Staphylococcus aureus*, et *Aeromonas hydrophila* et ATF_q contre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* avec un taux d'inhibition de 12% ; 10% ; 53.3% ; 30.3% respectivement (Goutam et al., 2016).

Par ailleurs des études faites sur le *cladosporium* endophyte de l'espèce *Cladosporium cladosporioides* montrent qu'il peut produire le taxol (un agent anti-tumoral) (Zhang et al., 2009) et peut aussi exprimer des activités antimicrobiennes via les composés suivants : cladosporin ; isocladosporin ; 5'-hydroxyasperentin ; cladosporin-8-methyl ether ; 5',6-diacetylcladosporin.

Le cladosporin inhibe la croissance de *Colletotrichum acutatum* ; *Colletotrichum fragariae* ; *Colletotrichum gloeosporioides*, et *Phomopsis viticola* avec 92,7, 90,1, 95,4, et

79,9% respectivement. Et le **isocladosporin** inhibe la croissance de *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, et *Phomopsis viticola* avec 50,4, 60,2, et 83,0% (Wang *et al.*, 2013).

A decorative graphic featuring a large, bold black number '5' inside a red-to-purple gradient circle. Below it, the word 'Conclusion' is written in a black, italicized serif font. The entire graphic is enclosed within a thin black outline of a rounded pentagon. A red-to-purple gradient line loops around the top and bottom of the pentagon, with a smaller red-to-purple gradient circle containing a white star at the bottom center.

5

Conclusion

IV. Conclusion

D'après **Strobel et Daisy (2003)**, une littérature au cours des dernières décennies a indiqué que de nombreuses espèces de plantes ethno-thérapeutiques avec une riche histoire botanique, échantillonnées à partir d'espèces de niches écologiques uniques sont connues pour abriter des microbes endophytes potentiels pour l'exploitation, grâce à la production des métabolites biologiquement actif.

Les objectifs fixés dans l'introduction de ce mémoire ont été partiellement atteint dont nous avons pu identifier, d'une manière sommaire, quelques champignons isolé d'*Haloxylon scaparium* et *Astragalus armatus* à savoir : les *Alternaria*, les *Aspergillus*, les *Cladosporium*.

Les résultats obtenus nous motivent à poursuivre les recherches et à diagnostiquer d'autres espèces qui n'ont pas été examiné en raison de la difficulté de l'opération et du manque de temps.

Il est supposé que les isolats identifiés dans notre étude sont des symbiotes qui présentent des activités biologiques intéressantes et présentent aussi une source de multiples enzymes.

Comme perspective, ce travail pourra être complété par la :

- Valorisation des activités enzymatique et antimicrobienne des souches isolées.
- Identification moléculaire des champignons endophytes d'*Haloxylon* et *Astragalus*.
- Extraction et purification des métabolites secondaires sécrétés par les champignons endophytes des deux plantes.
- Tester *in vitro* et *in vivo* les activités exprimées par ces champignons.



6

*Références
bibliographiques*



Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

1. Abdel-Wahhab, M. A., El-Nekeety, A. A., Hathout, A. S., Salman, A. S., Abdel-Aziem, S. H., Sabry, B. A., ... & Jaswir, I. (2020). Bioactive compounds from *Aspergillus niger* extract enhance the antioxidant activity and prevent the genotoxicity in aflatoxin B1-treated rats. *Toxicon*.
2. Alsohaili, S. A., & Bani-Hasan, B. M. (2018). Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in the Northern Eastern Desert of Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 11(3).
3. Amirita, A., Sindhu, P., Swetha, J., Vasanthi, N. S., & Kannan, K. P. (2012). Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. *World J Sci Technol*, 2, 13-19.
4. Aouarib K.,Lemsara R.(2016). Etude des activités antimicrobienne et enzymatique des champignons endophytes isolés à partir d'*Artemisia absinthium*. Université kasdi merbah-ouargla.

B

5. Bagheri, A. A., Saadatmand, S., Niknam, V., Nejadstari, T., & Babaeizad, V. (2013). Effect of endophytic fungus, *Piriformospora indica*, on growth and activity of antioxidant enzymes of rice (*Oryza sativa L.*) under salinity stress. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(11), 1337-50.
6. Benfoddil O.(2015).inventaire des champignons endophytes des feuille de *Pistacia atlantica Desf.*de dayete el goufa (Laghouat,Algérie). Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
7. Bessadat N.(2014).isolement et identification et caractérisation des *Alternaria spp* responsable de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaire. Université d'oran es-senia.
8. Bouchet P. H., guignard J. L. & Vihard J. Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. Masson (Ed) p. 36-45. 1999

C

9. Champion R.(1997).identifier les champignons transmis par les semens.institut national de la recherche agronomique.
10. Chetia *et al.*, 2019, chapitre 4 *in* Singh, B. P. (Ed.). (2019). *Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges*. Springer.

Références bibliographiques

D

11. Das, A., & Varma, A. (2009). Symbiosis: the art of living. In *Symbiotic Fungi* (pp. 1-28). Springer, Berlin, Heidelberg

G

12. Gonu, H., Opoku, N., Appiah-Opong, R., Oppong, K. G., Asirifi, I., & Ofori-Attah, E. (2015). Morphological Characteristics of Some Microfungal Species Isolated From Spontaneously Fermented *Jatropha curcas* Seed Meal.
13. Goutam, J., Singh, S., Kharwar, R. N., Ramarai, V. (2016). In vitro potential of endophytic fungus *Aspergillus terreus* (JAS-2) associated with *Achyranthus aspera* and study on its culture conditions. *Biol Med (Aligarh)*, 8(349), 2.
14. Gu, W. (2009). Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1677.

H

15. Hajiboland, R., Aliasgharzadeh, N., Laiegh, S. F., Poschenrieder, C. (2010). Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant and Soil*, 331(1-2), 313-327.
16. Hubbard M, Germida J, Vujanovic V (2012) Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress. *Botany* 90: 137–149.

J

17. Jingfeng, L., Fu, L., Peng, Y., Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. *Molecules*, 18, 5891-5935.

K

18. Kalim, B., Ali, N. M. (2016). Optimization of fermentation media and growth conditions for microbial xylanase production. *3 Biotech*, 6(2), 122.
19. Kaaniche, F., Hamed, A., Abdel-Razek, A. S., Wibberg, D., Abdissa, N., El Euch, I. Z., Sewald, N. (2019). Bioactive secondary metabolites from new endophytic fungus *Curvularia spp* isolated from *Rauwolfia macrophylla*. *PloS one*, 14(6), e0217627.
20. Khan, A. L., Waqas, M., Hussain, J., Al-Harrasi, A., & Lee, I. J. (2014). Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 can reduce cadmium toxicity in *Solanum lycopersicum* (Sitens and Rhe). *Biology and fertility of soils*, 50(1), 75-85.).

Références bibliographiques

21. Khan, A. L., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., Jung, H. Y., Lee, J. H., Lee, I. J. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC microbiology*, 12(1), 3
22. Khan, A. L., Hamayun, M., Ahmad, N., Hussain, J., Kang, S. M., Kim, Y. H., Hwang, Y. H. (2011). Salinity stress resistance offered by endophytic fungal interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and Glycine max. J. Microbiol. Biotechnol, 21(9), 893-902.
23. Kidd, S., Halliday, C. L., Alexiou, H., & Ellis, D. (2016). Descriptions of medical fungi. the Authors.
24. Kirschner, R. (2018). Fungi on the leaf—a contribution towards a review of phyllosphere microbiology from the mycological perspective. *Biosyst. Ecol. Ser*, 34, 433-448.
25. Kouadria, R. (2019) Isolation des champignons endophytes et étude de leurs impacts sur la tolérance à la salinité et aux polluants des plantes cultivées hôtes (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).

L

26. Languereau-Leman, F. (2002). La tolérance aux métaux lourds d'*Arrhenatherum elatius* (L.) Beauv. ex J. & C. Presl.; influence des endophytes racinaires fongiques sur le développement végétatif et la bioaccumulation. *Acta botanica gallica*, 149(1), 123-127.
27. Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. K., White Jr, J. F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Letters in applied microbiology*, 66(4), 268-276.
28. Latef, A. A. H. A., Chaoping, H. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 228-233.
29. Logiciel chemdrew professional version 16.0.0.82(68).
30. Logiciel chemdrew3D ultra version 16.0.0.82.
31. Louerrad, Y., Haddi, R., & Kaid Harche, M. (2016). Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale *Haloxylon scoparium* Pomel. *J. Bioresour. Valorization*, 1(1), 28-33.

Références bibliographiques

M

32. Maheshwari, R. (2006). What is an endophytic fungus?. *Current science*, 90(10), 1309-1309.
33. Manganyi, M. C., Regnier, T., Kumar, A., Bezuidenhout, C. C., & Ateba, C. N. (2018). Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides*. *South African Journal of Botany*, 116, 192-199.
34. Monggoot, S., Pichaitam, T., Tanapichatsakul, C., & Pripdeevech, P. (2018). Antibacterial potential of secondary metabolites produced by *Aspergillus spp.*, an endophyte of *Mitrephora wangii*. *Archives of microbiology*, 200(6), 951-959.
35. Mouria, B., Ouazzani-Touhami, A., & Douira, A. (2013). Isolement et identification de la mycoflore du compost des déchets urbains solides. *Nature et Technology*, (9), 13.

N

36. Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, 2014.

O

37. Ogórek, R., Lejman, A., Pusz, W., Miłuch, A., Miodyńska, P. (2012). Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. *Mikologia lekarska*, 19(2), 80-85.
38. Orr SP, Rudgers JA, Clay K (2005) Invasive plants can inhibit native tree seedlings: testing potential allelopathic mechanisms. *Plant Ecol* 181(2):153–165.
39. Ouzid Y.(2018). Activités biologiques et diversité en mycoendophytes des feuilles de *Peganum harmala* L. de la région de laghouat (algérie). Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

P

40. Parasuraman, P *et al.*, (2019), Chapitre 5 in Singh, B. P. (Ed.). (2019). *Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges*. Springer.
41. Patil, M. P., Patil, R. H., & Maheshwari, V. L. (2015). Biological activities and identification of bioactive metabolite from endophytic *Aspergillus flavus* L7 isolated from *Aegle marmelos*. *Current microbiology*, 71(1), 39-48.
42. Petrini O (1992) Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1: 185–196.
43. Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* (pp. 179-197). Springer, New York, NY

Références bibliographiques

44. Philippe, G. (2016). Lolitrem B and indole diterpene alkaloids produced by endophytic fungi of the genus *Epichloë* and their toxic effects in livestock. *Toxins*, 8(2), 47.

45. Priyanka *et al* 2019, chapitre3 in Singh, B. P. (Ed.). (2019). *Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges*. Springer.

R

46. Rachmania, M. K., Oetari, A., Fitri, R., Susetyo-Salim, T., & Sjamsuridzal, W. (2018, October). Isolation and morphological characterization of fungi from deteriorated old Chinese manuscripts from Central Library Universities Indonesia. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2023, No. 1, p. 020144). AIP Publishing LLC.

47. Rashmi M *etal*, 2019, chapitre 14 in Singh, B. P. (Ed.). (2019). *Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges*. Springer.

48. Ren A, Li C, Gao Y (2011) Endophytic fungus improves growth and metal uptake of *Lolium arundinaceum* Darbyshire Ex. Schreb. *Int J Phytoremediat* 13: 233–243.

49. Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.

50. Rudgers JA, Orr S (2009) Non-native grass alters growth of native tree species via leaf and soil microbes. *J Ecol* 97(2):247–255.

S

51. Sénéquier-Crozet, A., & Canard, B. (2016). Les champignons endophytes: impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique.

52. Singh, B. P. (Ed.). (2019). *Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges*. Springer.

53. Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural products*, 67(2), 257-268.

54. Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 491-502.

T

55. Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 18: 448–459.

Références bibliographiques

W

56. Wang, X., Radwan, M. M., Taráwneh, A. H., Gao, J., Wedge, D. E., Rosa, L. H., ... & Cutler, S. J. (2013). Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(19), 4551-4555.
57. Watanabe, T. (2010). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC press.

Z

58. Zeriguine N., Belyadi O. (2019). Activités antibactérienne et enzymatique d'un champignon endophyte *Penicillium spp.* Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A.
59. Zhang, P., Zhou, P. P., & Yu, L. J. (2009). An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current microbiology*, 59(3), 227.

7

Annexe

Annexe

Milieu PDA

- 200g pomme de terre.
- Eau distillé.
- 20g Glucose.
- 18g agar-agar.

Préparation PDA

- Prépare 200 ml Extrait de pomme de terre et compléter avec 1l d'eau distillé.
- Placé la solution dans une plaque chauffante.
- Ajout 20g glucose avec une agitation.
- Ajout de 18g d'agar-agar avec agitation.
- Divisé la solution dans des flacons.
- Autoclavé les flacons.
- Solubilise les flacons quand vous voulez utiliser.

Préparation gélatine glycéro

- Peser une masse de gélatine poudre.
- Versé un volume d'eau distillé et laissé la gélatine se gonfle.
- Faire sécher la préparation à l'aide d'un Büchner et peser sa masse (249,45g).
- Peser même volume de glycérol 249,45g et ajouté le sur la gélatine.
- Placé la solution dans un bain marie avec agitation jusqu'à être homogène.

Tableau 5: Les milieux de culture pour l'extraction d'enzymes

ENZYME	MILIEU DE CULTURE	REFERENCE
Amylase	milieu GYP mélangé avec 2% d'amidon soluble, après un temps d'incubation, le milieu sera inondé par 1% iode dans 2% potassium iodide	Kannan., 2012
Lipase	un milieu de peptone additionné par tween 20 a concentration 1%	
Cellulase	un milieu d'extrait de levure Peptoné additionné par 0.5% carboxyméthylcellulose de sodium après incubation le milieu sera rempli par 1% rouge de cango et 1M de chlorure de sodium pendant 15 min	
Pectinase	un milieu contenant protéine et pectine aussi sucre	Rashmi <i>et al.</i>, 2019
Xylanase	Milieu XBM (xylan broth medium)	Kalim et Nazish., 2016

A. Le genre *Cladosporium* :

Ce genre d'endophyte caractérisé par une croissance modérée à rapide dans un milieu PDA à 25°C avec une colonie de forme velouté et farineux gris-vert à vertolivâtre et noir de côté reverse de colonie leur hyphes sont rampants et septées et des spores verdâtre et généralement globuleuse et ovées et cloisonnés on distingue : *Cladosporium herbarum* , *Cladosporium cladosporioides* , *Cladosporium cucumerinum* , *Cladosporium bantianum* et etc... (Ogórek *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2016)

Tableau 6: Les caractères microscopiques de *Cladosporium* (Ogórek *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2016)

L'espèce	Les caractéristiques
<i>Cladosporium herbarum</i>	Dans un milieu MEA les colonies velouté se croitre 3-7cm dans 10j de couleur vert olive à brune olive et reverse olivacé-noir, conidiophore de 250µm de longue et 3-6 µm de large et des conidies septées brune fumé ou vert olive simple et parfois en chaine de forme allongé, ovale de diamètre 5,5-13 3,8-6 µm.
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Dans un milieu MEA les colonies velouté se croitre 3-4cm dans 10j de couleur vert olive à brune olive et reverse olivacé-noir, conidiophore de 350µm de longue et 2-6 µm de large et conidies brune olivacé ellipsoïdaux citronnés à paroi lisse se mesure 3-7 ×2-4 µm
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Des colonies sous forme spots de 3-4 mm et les colonies sur PDA sont emballés avec couleur noir verdâtre leur conidiophore du couleur marron et de 3-5 µm largeur et les conidies ellipsoïdal fusiforme et subsphérique
<i>Cladosporium bantianum</i>	Des colonies olivacés-gris se développe dans des températures plus de 42-43°C avec des conidies unicellulaires occasionnellement 2 cellules brune-pale à paroi lisse et ellipsoïdal à 2-3 x 4-7 µm

B. Le genre *Aspergillus* :

Ce genre de champignon été caractérisé par croissance rapide avec des colonies blanche, jaune, jaune brune, brune à noir et nuance de vert leur conidiophore se termine par vésicule couvré par des phialides et des conidies lisses à parois rugueuse hyalines ou pigmentées on distingue : *A.flavus* , *A.fumigatus* , *A.terrus*, *A.niger* etc... (**Kidd et al., 2016**)

Tableau 7: Les caractéristiques microscopiques d'*Aspergillus* (**Kidd et al., 2016**)

L'espèce	Les caractéristiques
<i>A.flavus</i>	Dans gélose Czapek les colonies sont granulaires et plates d'une teinte jaune et avec l'âge devient noir jaune-vert , conidiophore hyaline et rugueux et de conidies globuleux de 3-6 µm de diamètre
<i>A.fumigatus</i>	Dans gélose Czapek les colonies sont de couleur bleu-vert un conidiophore court et paroi lisse et des conidies globuleuses de diamètre 2.5-3.0 µm
<i>A.terrus</i>	Dans gélose CZzapek les colonies sont de cannelle à brune sable avec reverse jaune à brune foncé, conidiophore hyaline et paroi lisse avec des conidies globuleuse et ellipsoïdaux de diamètre 1.5-2.5 µm
<i>A.niger</i>	Dans gélose Czapek les colonies sont blanches ou jaune couvré par une couche noir-brune à noir, conidiophore hyaline et paroi lisse avec des conidies globuleuse de diamètre 3.5-5 µm de couleur noir-brune à noir avec paroi rugueux.

C. Le genre *Alternaria* :

La variabilité au sein des espèces d'*Alternaria* est un phénomène bien connu de ce genre qui présente un aspect velouté peu duveteux (**Bessadat., 2013**) et de cultures mycéliennes développées où les spores apparaissent soit solitaires soit en chaîne, on distingue : *A.brassicae*, *A.brassicicola*, *A.consortiale*, *A.dauci*, *A.linocola*, *A.raphani*, *A.tenuis*, *A.tenuissima* et etc... (**Champion., 1997**)

Tableau 8: Les caractères microscopiques des espèces d'*Alternaria* (Champion, 1997)

L'espèce	Les caractères
<i>A.brassicae</i>	Sur malt-agar les colonies se développe lentement moins de 3cm à 7j, mycélium duveteux peu élevé blanchâtre au début puis prend une teinte marron clair, les conidiophore donne 1 à 2 spores et rarement 3 sont de couleur marron clair très allongé cloisonné transversalement et peut longitudinalement elle mesure 38-193 X 11-27 μ l'apex : 11 X 105 μ
<i>A.brassicicola</i>	Sur malt-agar les colonies de taille variable et de contour très régulier le mycélium d'aspect velouté et des conidiophore produisent de 10-15 spores ces spores sont marron lisses et peu rigides présente une symétrie régulière par rapport l'axe longitudinal cloisonné essentiellement par des cloisons transversal se mesure : 20-75 X 10-18 μ
<i>A.consortiale</i>	Mycélium vert à marron foncé, conidiophore brun et géciculé produit un grand nombre de spore souvent isolées de taille moyenne 25 X 15 μ
<i>A.dauci</i>	Mycélium gris foncé au centre plus clair à la périphérie et formation d'une pigmentation brun rougeâtre et leur conidiophore émette une seul spore brunes lisse et de très grand taille avec un très grand nombre de cloison se mesure : 26-135 X1-29 μ et le filament apical 72 à 182 μ .
<i>A.raphani</i>	Mycélium est gris clair à gris verdâtre devient plus épais en vieillissant leur conidiophore porte une seul spore brune de taille variable souvent globuleuse elle mesure 70-115 X14-35 μ
<i>A.terius</i>	Un mycélium vert foncé et conidiophore droit très peu ramifiées produisent dizaine de spores brunes lisses verruqueuse avec bec court elles mesurent 11-50 X6-17 μ