



Université Mohamed Khider Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée
Réf. :

Présenté et soutenu par :
Lebbal Lamis

Le : jeudi 14 octobre 2021

Thème

Isolement et caractérisation des champignons filamenteux endophytes contribuant à la tolérance des espèces cultivées à la salinité

Jury :

Mme. Boulamaiz Sara	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. Wassila Dendouga	MCB	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Trabsa Hayat	MCA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

*Tous d'abord, louange à DIEU le clément le
miséricorde de nous avoir guidé et donné le
courage et la volonté de poursuivre nos études*

*J'exprime aussi toute ma gratitude au mon
encadreur DENDOUGA WASSILA pour sa
gentillesse et sa patience de les aider tout au
long de ce travail, à participer à les aider et à
les encourager de manière continue et à ses
conseils afin que je puisse terminer mon
travail.*

*Aussi je remercié l'ensemble des enseignants de
la faculté« Science de la nature et de la vie »*

Dédicaces

Je dédie ce travail

*À mon cher père et ma chère mère de tous ce que
vous avez faits pour me permettre d'atteindre cette
étape de ma vie Que le tout puissant vous accorde
une longue vie !*

*Ma profonde reconnaissance à mon époux Zohir
pour son soutien sans faille, sa grande indulgence et
sa compréhension*

*A mon fils Mohammed Ibrahim, je vous souhaite,
plein de succès et de bonheur !*

*À ma chère Sœur Amel et À mes frères Ossama et
Abd-Elmoaïne*

*A ma belle-famille plus particulièrement à ma belle-
mère*

À mes meilleurs amis

Et tout ceux qui me sont chers

Lamis

Sommaire

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Les champignons endophyte

1.1. Généralité	3
1.2. Taxonomie	4
1.3. Interaction champignons endophyte-plante	6
1.4. Importance écologique (biotique et abiotique) des champignons endophytes	6
1.5. Champignons endophytes source de métabolite bioactifs	9

Chapitre 2. Tolérance au stress salin

2.1. Stress salin	10
2.2. Problème de la salinité des sols	10
2.3. Effet de la salinité sur les plantes	10
2.3.1. Les mécanismes touchés pa la salinité	11
2.3.2. L'accumulation du sel par les plantes	11
2.3.3. Les stratégies d'adaptation	12
2.3.3.1 Une hémostasie cellulaire ionique et ajustement osmotique	12
2.3.3.2. Une détoxification ou une réparation des dommages causés par le	
Stress.....	12
2.3.3.3. Une régulation de la croissance	12

Partie expérimentale

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1. Isolement et identification des champignons endophytes	13
3.1.1. Matériel végétal	13

3.1.2. Isolement des champignons endophytes	13
3.1.3. Identification des champignons endophytes	13
3.2. Tests in vitro de germination des plantes cultivées en présence de champignons endophyte	14
3.3. Mesure de la croissance en présence et en absence des champignons endophytes à différentes concentration de NaCl	14
3.3.1. Paramètres suivis	15
3.3.2. Analyses statistiques	15

Chapitre 4. Résultats et discussion

4.1. Résultats	17
4.1.1. Isolements des champignons endophytes	17
4.1.2. Identifications des champignons endophytes	17
4.1.3. Mesure de la croissance des plantes cultivées en présence et en absence des champignons endophytes à différentes concentration de NaCl	17
4.2. Discussion	18
Conclusion	24
Bibliographie	26

Résumés

Liste des tableaux

Tableau 1. Critères de classification des champignons endophytes.....	5
Tableau 2. Quelques exemples d'endophytes fongiques qui confèrent aux plantes la tolérance aux stress abiotiques.....	7

Liste des figures

- Figure 1.** Mode de croissance des champignons endophytes dans les tissu des plantes hôtes 3
- Figure 2.** Shématisation du bilan de la circulation du soduim dans les plantes 11

Liste des abréviations

ABA : Acide abscissique

EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique

HA : Habitat-adapted

NC : Non Clavicipitaceae

NHA : Non Habitat-Adapted

PDA: Potato Dextrose Agar

PDB: Potato Dextrose Broth

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobactéria

TC : Taux de Colonisation, %

Introduction

Introduction

Le stress salin affecte les processus physiologiques des plantes, provoquant un déséquilibre des nutriments, modifiant les niveaux de régulateurs de croissance et inhibant la photosynthèse ainsi que la synthèse des protéines, ce déséquilibre entraîne une réduction de la croissance des plantes (Abeer *et al.*, 2015). Les champignons endophytes représentent une alternative biologique moins chère et certainement plus efficace que l'utilisation de moyens classiques de dessalement tels que le drainage pour la tolérance des plantes cultivées au stress salin. Les endophytes sont des microorganismes qui vivent dans les espaces intracellulaires des plantes hôtes (Strobel, 2003). Plusieurs travaux scientifiques ont prouvé que les endophytes fongiques peuvent coloniser les plantes (Kouadria *et al.*, 2018), en les aidant à survivre dans des conditions environnementales extrêmes en sécrétant des métabolites secondaires bénéfiques. Parmi plus de trois cent mille plantes sur terre, ou presque toutes les espèces végétales avaient divers champignons endophytes dans leurs tissus (Strobel, 2007). Ils jouent un rôle crucial en tant que décomposeurs, mutualistes et parasites dans les processus écologiques sur terre (Liu *et al.*, 2015). Les endophytes vivent et poussent dans les racines, les tiges et/ou les feuilles, sans provoquer de symptômes apparents de maladie (Petrini, 1991), dont les racines des plantes peuvent être associées à une grande variété de micro-organismes endophytes (Dighton *et al.*, 2005).

L'identification des champignons filamenteux, à partir des plantes, est très complexe (Souza *et al.*, 2004). En raison de leur identification morphologique difficile, les méthodes génétiques peuvent être utilisées pour classer les souches microbiennes dans divers niveaux taxonomiques hiérarchiques.

L'objectif visé dans ce manuscrit est de faire une synthèse d'articles scientifiques s'intéressant à la caractérisation des communautés d'endophytes fongiques associée aux plantes poussant dans des régions salines.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Champignons

endophytes

1.1. Généralité

Les plantes et les microorganismes présentent un complexe d'habitat écologique très divers (Bacon et White, 2000). Le terme endophyte a été utilisé pour la première fois par Debarry en 1866 pour décrire les champignons qui colonisent l'intérieur des tissus des végétaux, des tiges et des feuilles (Wilson, 1995).

D'une manière littérale, le terme « endophyte » signifie "dans la plante" (endon Gr = dans, phyton = plante). L'usage de ce terme est aussi large que sa définition et le spectre des hôtes ainsi que les organismes qui les habitent (ex : Bactéries, champignons...etc.) (Schulz et Boyle.2006).

Les endophytes sont des microorganismes (bactéries et champignons) qui peuvent coloniser et survivre à l'intérieur des tissus d'une plante apparemment saine (Bacon et White, 2000).

Les champignons endophytes sont majoritairement issus du *phylum Ascomycota* (Arnold AE, 2007) et présentent une grande diversité. Ils sont hétérotrophes et prélèvent des nutriments à l'hôte sans que celui-ci ne présente de quelconques signes de maladie. Ils peuvent croître dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Figure 1).

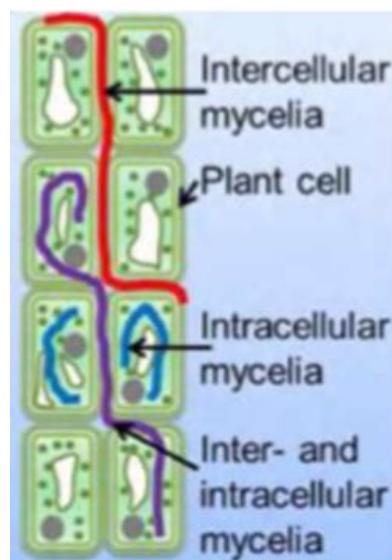


Figure 1. Mode de croissance des champignons endophytes dans les tissu des plantes hôtes (Kusari *et al.*, 2012)

Ces microorganismes sont ubiquistes, ils ont été détectés dans pratiquement toutes les espèces de plantes (Saikkonen K. *et al.*, 1998), à tous les latitudes (Arnold AE., 2007). Une même espèce de champignon endophyte est capable de coloniser plusieurs hôtes différents.

Deux modes de transmission sont observés chez les champignons endophytes : le mode de transmission est le moyen par lequel le champignon endophyte peut coloniser un autre individu végétal à partir de l'hôte initial :

- **La transmission verticale** : Elle se caractérise par la colonisation d'un nouvel hôte progéniture de l'hôte primaire.

- **La transmission horizontale** : Elle se caractérise par la colonisation d'un nouvel hôte n'ayant la plupart du temps pas de lien avec l'hôte primaire.

La caractérisation des groupes endophytes est basée surtout sur le groupe végétal infecté, la modalité de l'infection et de la répartition (colonisation) des tissus de l'hôte ainsi que le mode de transmission au sein de la communauté végétale (Bensaci, 2016).

1.2. Taxonomie

Les champignons endophytes représentent un groupe écologique et taxonomique extrêmement diversifié. La plupart des champignons endophytes appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota*. Cependant, certains appartiennent à d'autres taxons tels que les *Deuteromycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* et les *Oomycota* (Saar *et al.*, 2001). Les champignons endophytes peuvent être classés en deux familles : les *Clavicipitaceae* et les Non *Clavicipitaceae*.

La classification des endophytes est basée sur la colonisation des tissus, leur diversité, les bénéfices pour les plantes hôtes et le mode de transmission (Tableau 1).

Les endophytes appartenant au groupe des *Clavicipitaceae* infectent certaines plantes et incluent 22 genres tels que, *Atkinsonella*, *Balansia* et *Epichloé* (Bischoff et White, 2005). Ces champignons présentent une croissance systémique au niveau des tissus des parties aériennes et des rhizomes. Ils sont souvent transmis verticalement d'une génération à l'autre et peuvent augmenter la survie de leurs plantes hôtes par de nombreux mécanismes, incluant la production de métabolites secondaires (Bacon et White, 2000 ; Rodriguez *et al.*, 2009).

Les non *Clavicipitaceae* (NC) qui se transmettent horizontalement, appartiennent essentiellement aux genres *Balansia*, *Myriogenospora*, *Parepichloe* ou *Echinodthis* (Bacon et White, 2000). La majorité des plantes sur terre hébergent ce type d'endophytes (Arnold, 2007). Ces derniers peuvent coloniser les tissus du végétal soit localement -même une seule cellule végétale- ou d'une manière systémique (Boyle *et al.*, 2001). Les effets de ces champignons endophytes sur les plantes hôtes s'étendent de l'antagonisme envers les organismes

phytopathogènes au mutualisme en interaction avec la plante (Saikkonen *et al.*, 1998 et Arnold, 2007). Leurs effets bénéfiques potentiels incluent la protection des hôtes contre les maladies, les herbivores, la tolérance à la sécheresse et autres types de stress abiotiques (Mohamed Mahmoud, 2016).

Tableau 1. Critères de classification des champignons endophytes (Rodriguez *et al.*, 2009)

Critère	<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Non Clavicipitaceae</i>	Classe 3	Classe 4
	Classe 1	Classe 2		
Gamme d'hôtes	Large	Etroite	Etroite	Etroite
Tissus colonisés	Tige et rhizome	Tige, racine et rhizome	Tige	Racine
Colonisation, <i>in planta</i>	Etendue	Etendue	Limitée	Etendue
Biodiversité, <i>in planta</i>	Basse	Basse	Elevée	Inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Verticale et horizontale	Horizontale	Horizontale
Bénéfiques pour la plante hôte	NHA*	NHA* et HA	NHA*	NHA*

*Non adaptation à l'habitat (NHA pour Non habitat-adapted): présentent des avantages tels que la tolérance à la sécheresse et la promotion de la croissance, communs entre les endophytes quel que soit l'habitat d'origine. Adaptation à l'habitat (HA pour Habitat-adapted): les avantages résultent des pressions sélectives spécifiques de l'habitat tel que le pH, la température et la salinité.

1.3. Interaction champignons endophyte-plante

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

Les effets de cette interaction peuvent se manifester par une promotion de la croissance, une protection via l'induction de l'ISR (Induced Systemic Resistance) ou une résistance systémique induite et/ou une action antagoniste directe sur les agents pathogènes (He *et al.*, 2009).

N'importe quelle interaction plante-champignon endophyte est précédée par un contact physique entre la plante et le champignon, suivie par plusieurs barrières physiques et chimiques qui doivent être surmontées pour établir une association réussie (Kusari et Spiteller, 2012).

1.4. Importance écologique (biotique et abiotique) des champignons endophytes

Les microorganismes endophytes jouent un rôle important dans les systèmes écologiques en façonnant les communautés végétales et en médiatisant les interactions écologiques (Zhang *et al.*, 2006).

Il est intéressant de noter que la tolérance au stress conférée par certains endophytes, implique des adaptations fongiques spécifiques à l'habitat. Dans les sols géothermiques du parc national de Yellowstone (Etats Unis), une espèce végétale (*Dichanthelium lanuginosum*) est colonisée naturellement par un endophyte dominant (*Curvularia protuberata*). Ce champignon confère une tolérance à la chaleur à la plante hôte et ni le champignon ni la plante ne peuvent survivre séparément lorsqu'ils sont exposés à un stress thermique ou une température supérieure à 38°C (Redman *et al.*, 2002). Une étude comparative des isolats de *C. protuberata* provenant de plantes géothermiques et non géothermiques a révélé que sa capacité à conférer la tolérance à la chaleur était spécifique aux isolats provenant des plantes vivant dans les conditions

géothermiques. Il en ressort que l'aptitude à conférer la tolérance à la chaleur est un phénomène adapté à l'habitat (Rodriguez *et al.*, 2008).

Un autre exemple d'adaptation fongique propre à l'habitat concerne une graminée des dunes (*Leymus mollis*) abondante sur les plages côtières de Puget Sound, (Seattle, Etats Unis), colonisée naturellement par un endophyte fongique dominant (*Fusarium culmorum*). Cet endophyte confère une tolérance au sel à la plante hôte qui ne peut survivre dans les habitats côtiers sans l'endophyte adapté à l'habitat. Une évaluation comparative des isolats de *F. culmorum* de *L. mollis* et d'une plante non côtière a révélé que la capacité de conférer une tolérance au sel était spécifique aux isolats des plantes côtières, ce qui indique que la tolérance au sel est un phénomène adapté à l'habitat (Rodriguez *et al.*, 2008).

Des isolats de *C. protuberata*, *F. culmorum* et *C. magna* favorisent davantage l'adaptation spécifique des habitats des endophytes. Ainsi, *C. protuberata* confère la résistance à la chaleur mais pas la tolérance aux maladies ou à la salinité. Cependant, *F. culmorum* permet la tolérance au sel, mais pas à la chaleur ou à la tolérance à la maladie et *C. magna* confère la tolérance à la maladie mais pas à la chaleur ou à la salinité (Rodriguez *et al.*, 2008). Ces tolérances de stress conférant une symbiose, sont conformes aux dynamiques évolutives qui doivent se produire dans les différents habitats. Les champignons endophytes s'adaptant de ce fait au stress propre à l'habitat et procurent ainsi une tolérance à la plante qui les héberge (Rodriguez et Redman, 2008).

Cette adaptation spécifique à l'habitat est définie à travers le concept de symbiose HA (Habitat-Adapted), qui soutient l'hypothèse que la plante et l'endophyte établissent une interaction de symbiose permettant à la plante de survivre dans des habitats de conditions extrêmes (Peter Singh *et al.*, 2011) (Tableau 2).

Tableau 2. Quelques exemples d'endophytes fongiques qui confèrent aux plantes la tolérance aux stress abiotiques (Singh *et al.*, 2011).

Endophytes fongiques/ espèces/souches	Stress abiotique	Plantes hôtes	Références
<i>C. magna</i> L2.5	Sécheresse	<i>L. esculentum</i>	Redman <i>et al.</i> (2001)
<i>C. gloeosporioides</i> 95-41A	Sécheresse	<i>L. esculentum</i>	Redman <i>et al.</i> (2001)

<i>Fusarium culmorum</i> Fc18	Sécheresse	<i>Leymus mollis</i> <i>Oryza sativa</i> <i>L. esculentum</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2008)
<i>F. culmorum</i> FcRed1	Salinité	<i>L. mollis</i> <i>Oryza sativa</i> <i>L. esculentum</i> <i>D.lanuginosum</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2008)
<i>Fusarium sp.</i> <i>Alternaria sp.</i>	Chaleur, Sécheresse	<i>L. esculentum</i>	Rodriguez et Redman (2008)
<i>Piriformospora</i> <i>indica</i>	Salinité	<i>Hordeum</i> <i>vulgare</i>	Waller <i>et al.</i> (2005)
<i>Trichoderma</i> <i>hamatum</i>	Sécheresse	<i>Theobroma</i> <i>cacao</i>	Bae <i>et al.</i> (2009)
<i>Neotyphodium sp.</i>	Sécheresse	<i>Festuca</i> <i>pratensis</i>	Malinowski <i>et al.</i> (1997)
<i>N. coenophialum</i>	Sécheresse /Stresse hydrique	<i>Festuca elatior</i>	Belesky <i>et al.</i> (1989) et De Battista <i>et al.</i> (1990)
<i>Acremonium sp.</i>	Sécheresse	<i>Festuca elatior</i>	White <i>et al.</i> (1992)
<i>Curvularia</i> <i>protuberate</i>	Chaleur	<i>D.lanuginosum</i>	Redman <i>et al.</i> (2002a)
<i>C. protuberata</i>	Chaleur	<i>L. esculentum</i>	Rodriguez <i>et al.</i> (2008)
<i>Curvularia sp.</i>	Chaleur/Sécheresse	<i>L. esculentum</i>	Rodriguez et Redman (2008)

L: Lycopersicon. D: Dichanthelium .

1.5. Champignons endophytes source de métabolite bioactifs

Les champignons endophytes sont capables de produire des molécules d'intérêt thérapeutique très diverses, que ce soit sur le plan chimique ou sur le plan de leurs activités. Nous retrouvons des alcaloïdes, des polycétides, des terpènes. Ces molécules possèdent un spectre d'activité pharmacologique très large. Nous retrouvons : des anticancéreux, des antimigraineux, des antibiotiques, des antidépresseurs, des antidiabétiques, des antiinflammatoires, des immunosuppresseurs, etc. (Zeriguine et Belayadi, 2019).

Chapitre 2
Tolérance au stress
salin

2.1. Stress salin

La salinité constitue l'un des stress abiotiques les plus répandus de la planète, ce qui limite fortement le rendement (Khales et Baaziz, 2006). Elle est définie selon plusieurs chercheurs comme étant la présence de processus pédologique selon lequel le sol s'enrichit anormalement en sels solubles acquérant ainsi un caractère salin (Mansouri et Ouzzani, 2017)

Le plus souvent, le stress salin est causé par de fortes concentrations de Na^+ et de Cl^- dans la solution du sol. L'irrigation et la remontée des nappes phréatiques sont aussi des causes de la salinité (Kouadria, 2018).

Du point de vue agronomique, la tolérance au stress, se mesure par l'impact du stress sur le rendement (graines, parties végétatives..) et/ou la qualité des produits. Cependant, de point de vue écologique, la tolérance ou la résistance au stress se mesure par l'impact du stress sur la fitness, autrement dit sur la capacité des individus à se multiplier et/ou à avoir une descendance (Gravot, 2009).

Le stress biotique qui résulte de l'action d'un organisme vivant sur un autre organisme vivant telle qu'une attaque d'un pathogène, se différencie du stress abiotique exercé par un changement d'environnement comme une carence en azote (SERRANO *et al.*, 1999).

2.2. Problème de la salinité des sols

Selon Drevon *et al.* (2001), de nombreuses zones arides et semi arides du bassin méditerranéen rencontrent un problème de salinité, dont 40% des terres de la planète ont des problèmes liés à la salinité (Zahran, 1997).

Les sols salins présentent un niveau toxique des chlorures et sulfates de sodium, dont la conductivité électrique des solutions de sols saturées en sel est supérieure à 4 ds/m (40 mM NaCl (Shirokova *et al.*, 2000).

2.3. Effet de la salinité sur les plantes

Le milieu salin provoque de nombreux effets négatifs sur le comportement physiologique de la plante. Cela est dû au faible potentiel osmotique de la solution du sol (stress osmotique), aux effets des ions spécifiques (stress salin), à un déséquilibre nutritionnel ou à une combinaison de ces facteurs (Kausar *et al.*, 2014).

2.3.1. Les mécanismes touchés par la salinité

Chez les plantes sensibles, la première réponse à l'excès de sel est l'inhibition de la croissance foliaire, cela constitue chez les graminées une réponse aux composantes osmotiques du stress salin à travers l'ABA (acide abscissique) (Munns et Termaat, 1986) qui contrôle les stomates, l'assimilation du carbone photosynthétique se retrouve réduite à cause de l'effet du sel sur les composantes stomatiques et non stomatiques reliées aux cycles du CO₂ (Lazrek Ben Friha, 2008).

2.3.2. L'accumulation du sel par les plantes

Une plante cultivée sur un sol riche en sel doit faire face à la pénétration du sel dans ses tissus, ce dernier est soit rejeté soit accumulé (figure 2). Les ions de chlorure de sodium entrent par les racines, véhiculés ensuite par la sève xylémique jusqu'aux tiges et aux feuilles. Là ils seront soit stockés (plantes incluser) soit peu retenus et revéhiculés par la sève phloémique jusqu'aux racines (plantes excluser) (Levigneron *et al.*, 1995).

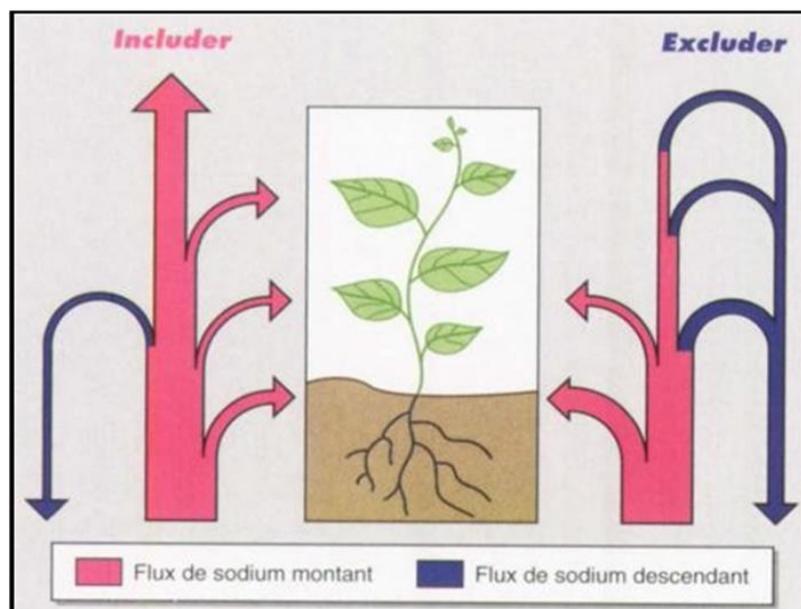


Figure 2. Shématisation du bilan de la circulation du soduim dans les plantes (Ouis, 2008)

2.3.3. Les stratégies d'adaptation

Selon Lazrek Ben Friha (2008), les mécanismes de tolérance au sel sont groupés en :

2.3.3.1. Une homéostasie cellulaire ionique et ajustement osmotique

L'homéostasie ionique au niveau des cellules est atteinte sous stress salin par les stratégies suivantes: 1) exclusion des ions Na^+ des cellules par les canaux ioniques: anti-transport Na^+/H^+ , ou bien par la limitation d'entrée des ions Na^+ , 2) compartimentation de Na^+ dans des vacuoles intracellulaire pour un ajustement osmotique, 3) la sécrétion de Na^+ . Ainsi la régulation du transport ionique joue un rôle fondamental pour la tolérance au sel chez les plantes.

2.3.3.2. Une détoxification ou une réparation des dommages causés par le stress

La détoxification des ROS constitue un élément clé de défense des plantes contre les stress abiotiques dont le stress salin. Les enzymes responsables de cette détoxification nommées antioxydants incluent la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, et des enzymes du cycle ascorbate-glutathion.

2.3.3.3. Une régulation de la croissance

Maintenir une croissance racinaire constitue un caractère adaptatif dans un environnement de faible disponibilité en eau tel que le milieu salin. L'allongement racinaire peut être dû à une augmentation d'activité des enzymes impliquées dans la construction du cytosquelette : par exemple la xyloglucan endotransglycosylase (Wu *et al.* 1994).

Partie expérimentale

Chapitre 3

Matériels et méthodes

Ce manuscrit présente une synthèse des articles dont l'objectif est d'isoler et d'identifier les champignons endophytes3.1 hébergeant les plantes spontanées poussant en milieux salés, et leur rôle dans la protection de ces plantes contre le stress salin.

3.1. Isolement et identification des champignons endophytes

3.1.1. Matériel végétal

Afin d'assurer un bon isolement des champignons endophytes, le choix des espèces végétales spontanées a été porté exclusivement sur des plantes fraîches (Devaraju et Satish, 2010).

Après prélèvement, les échantillons sélectionnés ont été mis dans des sacs en plastiques stériles et transportés immédiatement au laboratoire (Khan *et al.*, 2007).

3.1.2. Isolement des champignons endophytes

La procédure la plus utilisée pour détecter la présence des champignons endophytes dans les tissus internes des plantes est essentiellement basée sur la désinfection de la surface des échantillons apparemment sains pour éliminer les microorganismes épiphytes (Bills, 1996).

Pour l'isolement des champignons endophytes à partir des racines de petite taille et selon la méthode décrite par Huang *et al.* (2007). Chaque champignon développé sur les fragments des racines est isolé et purifié par des repiquages successifs pour l'identification et conservé sur PDA en culot à 4° C.

3.1.3. Identification des champignons endophytes

L'identification des champignons endophytes se fait comme tous les microorganismes macroscopiquement et microscopiquement. La caractérisation macroscopique se fait à l'œil nu, en se basant essentiellement sur les caractéristiques des cultures telles que l'aspect général de la surface de la colonie et sa couleur, sa texture et sa pigmentation (Suryanarayanan *et al.*, 2003).

L'identification microscopique se réalise par des observations au microscope optique, en tenant compte des caractères morphologiques des hyphes : cloisonnement, la forme et la couleur des formes reproductrices (fructifications), formes et la couleur des spores (Kim et Baek, 2011).

L'identification moléculaire d'isolats endophytes se réalise par une extraction de leur ADN génomique, l'amplification de la région ITS par des amorces universelles puis un séquençage (Kouadria *et al.*, 2018).

3.2. Tests in vitro de germination des plantes cultivées en présence de champignons endophytes

Kouadria *et al.*,(2018) ont testé la germination in vitro de blé et d'orge . Les graines de blé dur (*Triticum durum Desf.*) et d'orge (*Hordeum Vulgare L.*) sont d'abord, désinfectées avec l'hypochlorite de sodium 5% pendant 10 min, puis rincées soigneusement à l'eau distillée à trois reprises.

Laissées sécher à l'air libre pendant 30 min, les graines ont été transférées dans des boites de Pétri (Ø 90mm) tapissées de deux couches de papier filtre, puis mises à germer à l'obscurité pendant 4 jours, dans un phytotron (BINDER) réglé à une température de 25°C.

Ensuite, les graines ont subi quatre séries de traitements : le témoin (les graines ont reçu uniquement de l'eau distillée), les contrôles de traitements de stress salin (400, 600 et 800 meq/L), les graines traitées par les différents champignons endophytes préalablement identifiés (*Alternaria chlamydospora*, *Embellisia phragmospora*, *Phoma betae*, *Fusarium equseti*, *Fusarium graminearum* et *Chaetomium coarctatum*), et l'inoculation par les champignons sous stress salins.

Enfin, les souches de champignons endophytes ont été inoculées par une solution de suspension de spores à raison de 10^7 spores/ml.

3.3. Mesure de la croissance des plantes cultivées en présence et en absence de champignons endophytes à différentes concentration de NaCl

Gogoi *et al.* (2007) a été réalisé en cultivant le champignon dans différentes concentrations de NaCl, allant de 1 à 10 %, dans le milieu basal amendé avec 1% de glycérol.

La conception expérimentale de Kouadria *et al.* (2018), comportait quatre séries : contrôle (les graines ont reçu uniquement de l'eau distillée), graines traitées avec des inoculum fongiques (*Alternaria chlamydospora*, *Embellisi aphragmospora*, *Phoma betae*, *Fusarium quseti*, *Fusarium graminearum* et *Chaetomium coarctatum*), contrôle des traitements de stress salin

(400, 600 et 800meq/L), et l'inoculation de champignons avec un stress salin (les souches fongiques ont été inoculées par une solution de suspension de spores de 10^7 spores/mL).

Par rapport à l'étude réalisée par Kogej *et al.* (2005), ont réalisé dans un milieu gélosé à base de pomme de terre PDA additionné de NaCl à des concentrations différentes. Chaque boîte de Pétri contient un disque mycélien de 5 mm de diamètre de la souche fongique, a subi une incubation de 7 jours à une température de 30°C et deux répétitions ont été effectuées pour chaque souche. Le meilleur développement est déterminé par la mesure du diamètre de la croissance mycélienne de la colonie fongique par comparaison au témoin respectif non additionné de sel (0 g/L NaCl) (Mansouri et Ouzzani, 2017)

3.3.1. Paramètres suivis

D'après Kouadria *et al.* (2018) sont : Cinétique de germination ; Taux de germination finaux (Nombre de graines germées / Nombre total de graines)*100 ; Longueurs des radicules des coléoptiles (après 128h de mise en germination) ; Nombre des racines (après 128h).

3.3.2. Analyses statistiques

Dans la majorité des références consultées, le traitement ont été des données s'effectue par l'analyse de la variance (ANOVA, $P \leq 0,05$). Les résultats se présentent en moyennes \pm écarts types. Le test de Student-Neuman-Keuls est utilisé pour comparer ces moyennes (Mansouri et Ouzzani, 2017 ; Kouadria *et al.*, 2018).

Chapitre 4

Résultats et discussion

4.1. Résultats

4.1.1. Isolements des champignons endophytes

Après l'isolement des champignons endophytes sur le milieu PDA par des échantillons prélevés de différentes plantes a montrés une grande diversité d'isolats de ces microorganismes.

A partir des dix-huit échantillons de racines de palmier dattier prélevées pour l'isolement des champignons endophytes et sur les 1800 fragments incubés, un total de 460 champignons endophytes ont été isolés selon les résultats de Mohamed Mahmoud (2017).

4.1.2. Identification des champignons

Sur la base des caractéristiques macro et microscopiques. La plupart des champignons endophytes étaient affiliés aux *Ascomycota* (6 taxons) avec une abondance de *Sordariomycetes* (3 taxons), suivie par les *Eurotiomycetes* (2 taxons) et les *Dothideomycetes* (1 taxon), (Mohamed Mahmoud, 2017)

A partir l'identification moléculaire, l'homologie de séquence du gène de l'ARNr 18S de *Hypocrea spp.* NSF-08 avec l'aide du service blast NCBI a montré des similitudes de 98 % avec l'espèce la plus proche *Hypocrea schweinitzii* AF455511.1. A partir de ces caractéristiques, l'isolat endophyte NSF-08 peut être identifié comme *Hypocrea spp.* appartient à la classe fongique des *Ascomycètes*, de l'ordre des *Hypocreales* et désigné en outre comme *Hypocrea spp.* NSF-08 (Gogoi *et al.*, 2007).

4.1.3. Mesure de la croissance des plantes cultivée en présence et en absence de champignons endophytes à différentes concentration de NaCl

Kouadria *et al.* (2018) ont montré une réduction significative du pourcentage de germination sous stress salin ($P < 0,05$), reflétant qu'à mesure que le stress salin augmentait, les graines de blé dur présentaient une diminution plus prononcée du pourcentage de germination.

Les champignons endophytes ont amélioré la germination à tous les niveaux de concentration de NaCl ($P < 0,05$). *Embellisi aphragmospora* et *Chaetomium coarctatum* ont montré un pourcentage de germination de 100 %. *Alternaria chlamydospora*, *Phoma betae*, *Fusarium quaseti* et *Fusarium graminearum* ont présenté un taux de germination supérieur à 95% (Mansouri et Ouzzani, 2017).

Les champignons endophytes ont montré une amélioration significative du pourcentage de germination dans des conditions de stress salin ($P < 0,05$). Les graines de blé dur inoculées avec des souches de champignons ont représenté un pourcentage de germination avec des valeurs comprises entre 30% et 49,8% sous stress salin 800meq/l. Le pourcentage de germination le plus élevé a été montré par *Alternaria chlamydospora* dans des conditions de stress salin (93,4%, 62,4% et 49,8%, respectivement dans des conditions de salinité de 400, 600 et 800meq/L), (Kouadria *et al.*, 2018)

Les résultats de Gogoi *et al.* (2007), ont révélé que le chlorure de sodium à une concentration de 2,5 % produisait un maximum (3,58 mg/ml du poids sec de mycélien), ainsi un taux de 13,12 µg/ml du métabolite bioactif.

D'après les résultats obtenus par Mohamed Mahmoud (2016), la majorité des isolats ont montré une bonne croissance en présence de NaCl à 15 g/l et une croissance plus ou moins moindre à 75 g/l. En plus, l'espèce *Aspergillus terreus* a montré un bon développement et un faible changement de la couleur des spores avec un pigment de couleur marron diffusé dans le milieu en présence des deux concentrations de NaCl par rapport à leur croissance à 0 g/l. L'espèce *Fusarium oxysporum* et plus spécialement la souche *F. oxysporum* (B2172) a pu croître d'une manière normale dépassant même la croissance enregistrée à 0 et à 15 g/l (Figures 41 et 42). Alors que, l'isolat Morpho-espèce Blanc B21131 (Morphospecies 4) a pu se développer en présence de NaCl à 15 g/l par rapport à 0 g/l et aucune croissance n'a été notée à 75 g/l.

4.2. Discussion

Kouadria *et al.* (2018) ont prouvé avec leurs résultats suivants :

Les souches endophytes appartenant aux espèces étudiées (*Alternaria chlamydospora*, *Embellisi aphragmospora*, *Phoma betae*, *Fusarium quaseti*, *Chaetomium coarctatum* et *Fusarium graminearum*) ont amélioré la germination et la croissance des graines de blé dur traitées.

Waller *et al.* (2005) été démontré que les champignons endophytes des racines, *Piriformospora indica* de la classe des basidiomycètes améliore la résistance des plantes contre les maladies des racines et des feuilles et atténue le stress salin chez l'orge.

D'autres part, l'analyse de la résistance des plantes infestées *P.indica* montrant que ce dernier exerce une activité bénéfique contre deux pathogènes majeurs des céréales qui causent d'énormes pertes économiques mondiales, (Waller *et al.*,2005).

D'après Mansouri et Ouzzani (2017) Toutes les souches testées (*Penicillium sp.* AA197; *Alternaria sp.* AA1157; *Botryosphaeriaceae* AA112; *Botryosphaeriaceae* AA1101; *Alternaria sp.* BA125; *Botryosphaeriaceae* BA1510; *Fusarium sp.* BA327; *Fusarium sp.* IA2610; *Fusarium sp.* IA2710 ; *Aspergillus sp.* IA195 ; *Curvularia sp.* IA185 ; *Botryosphaeriaceae* IR165) sur le milieu PDB sont bien développées à une concentration de 15g/l de NaCl, ce qui explique qu'elles tolèrent modérément le sel selon la classification de Galinski (1993). Les souches appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, ainsi qu'à la famille des *Botryosphaeriaceae* sont des tolérants extrêmes à cause de leur croissance à une concentration égale à 75g/l de NaCl.

A partir l'application d'un stress salin croissant sur le blé dur associés avec les champignons endophytes ont montrées que les souches des champignons endophytes (*Alternaria chlamyospora*, *Embellisia phragmospora*, *Phoma betae*, *Fusarium quaseti*, *Chaetomium coarctatum* et *Fusarium graminearum*) ont amélioré la germination et la croissance des graines de blé dur traitées selon les résultats obtenus à partir de Kouadria *et al.*,(2018).

Conclusion

Conclusion

Au terme de ce travail, on a déduit le rôle important des champignons endophytes dans la tolérance des plantes cultivées au stress salin. Les principales conclusions tirées à partir des études expérimentales réalisées à différentes conditions de salinité, en absence et en présence des endophytes isolés à partir du système racinaire des plantes sont les suivantes :

- La majorité des espèces végétales cultivées sont abritées par des champignons endophytes.

- L'identification des champignons endophytes, à base des critères morphologiques n'est pas suffisante, elle nécessite d'être complétée par l'identification moléculaire. Les techniques moléculaires se terminent par le séquençage et l'analyse phylogénétique, elles permettent l'identification de l'ensemble des espèces de champignons endophytes.

- Les interactions des champignons endophytes-plantes améliorent leur croissance sur des sols salins.

- Les champignons endophytes qui améliorent la tolérance de plantes aux concentrations élevées de sel sont en particulier du genre : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botryosphaeria* et *Fusarium*). Ce sont des halophiles extrêmes qui tolèrent une concentration en chlorure de sodium de 75g/l.

Tous les travaux consultés, indiquent que les champignons endophytes sont utiles pour l'agriculture en améliorant la croissance des plantes cultivées dans les conditions de stress salin.

Cependant, d'autres études sont nécessaires pour explorer leur potentiel dans le secteur de la protection des plantes.

Bibliographie

Bibliographie

- Bacon, C.W. & White, J.F. 2000. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In: *Microbial Endophytes* (C.W.Bacon & J.F. White, eds): 237-261. Marcel Dekker, Inc., New York & Basel.
- Debary A. 1866. Morphology and physiology of fungi, lichens and myxomycetes. Engelmann, Leipzig.
- Kaur, N. and Gupta, A. K. 2005. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants *Current Science*, Vol. 88, No. 11, 1771- 1780
- Khan, Q. A. 2000. Physiological aspects of drought tolerance in winter wheat. Ph.D. Thesis. Department of Soil and Crop Sciences Colorado State University. 138p
- Kouadria R., 2018. Contribution des champignons endophytes à la tolérance aux facteurs adverses (biotiques et abiotiques) des espèces cultivées : isolement des champignons endophytes et étude de leur contribution à la tolérance à la salinité ou à des polluants, 195p.
- Krauss J., S. A. Harri, L. Bush, R. Husi, L. Bigler, S. A. Power, and C. B. Muller. 2007. Effects of fertiliser, fungal endophytes and plant cultivar on the performance of insect herbivores and their natural enemies. *Functional Ecology*, 21:107-116.
- Larran S. Perelló, A. Simón, M.R. et Moreno, V. 2002. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 683-686
- Malinowski DP. et Belesky DP. 1999. Endophyte infection affects the ability of tall fescue to use sparingly available phosphorus. *J Plant Nutr.* 1999 ; 22(4-5) : 835–53.
- Mansouri A. 2011. Les champignons endophytes chez le blé dur (*Triticum durum*. Desf): occurrence et rôle dans la tolérance au stress hydrique. pp : 17-22.
- Mansouri S. et Ouzzani A., 2017. Tolérance au stress abiotique de champignons endophytes isolés de *Zygophyllum album*, 81 p.
- Mohamed Mahmoud. F. 2017. Activités biologique des champions endophytes isolés du palmier dattier (*Pheonix dactylifera* L.). Ecole National Supérieure Agronomique d'El Harrach.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25:239–250.
- Munns R. et Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59, 651– 681.

- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves* (eds) Andrews, J.H. and Hirano, S.S. Springer-Verlag, New York, New York, USA, 179-197.
- Rodríguez, Canales, M. Borrás-Hidalgo, E. O 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants *Biotecnología Aplicada*; 22: 1-10
- Rodriguez, R. J., R. S. Redman, and J. M. Henson. 2004. The role of fungal symbionts in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9: 261-272.
- Rodriguez, R. J. White Jr, J. F. Arnold A. E. and Redman, R. S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles *New Phytologist* (2009) doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- Simmons, S. R. 1987. Growth, development and physiology. In: *Wheat and Wheat Improvement*. pp. 77-113. Madison, American Society of Agronomy Inc., Heyne EG ed.
- Stone JK., Bacon CW. et White JF. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined . In: Bacon CW, White JF, eds. *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, Inc, 3–30.
- Strobel G., Daisy B., Castillo U. et Harper J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67: pp 257-268.
- Suryanarayanan T. S., Venkatesan G. et Murali T. S. 2003. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Current Science*, 85 (4): 489-493.
- Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., Von W.D., Franken P. et Kogel K. H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 102: 13386-13391.
- Zabalgoeazcoa I. 2008 .Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*; : 138-146.
- Zhang J, Nguyen HT, Blum A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 50: 291-302.

الملخص

تلعب الفطريات الداخلية دورًا مهمًا في بقاء النباتات الحية في الموائل المجهدة. هذه الدراسة عبارة عن تجميع لمقالات علمية هدفها هو توصيف المجتمع الفطري الداخلي ، المرتبط بنباتات الجذر التي تنمو في البيئات المالحة. بناءً على خصائص الاستزراع وتشكل نمو المستعمرات التي تم فحصها في الأعمال المختلفة التي تمت الرجوع إليها ، يمكن عزل أنواع مختلفة من الفطريات الخيطية من التربة ذات الملوحة المتفاوتة. أثبتت جميع الدراسات التي تم الرجوع إليها من خلال العمل التجريبي أن النباتات المزروعة أصبحت مقاومة للإجهاد الملحي في وجود الفطريات الداخلية ، وخاصة السلالات التي تنتمي إلى الأنواع التالية : *Alternaria chlamydospora* و *Embellisia phragmospora* و *Phoma betae* و *Fusarium quseti* و *Chaetomium coarctatum* و *Fusarium graminearum*.

الكلمات المفتاحية : النباتات المزروعة – النمو – مقاومة – الفصل – الإجهاد الملحي – السلالات - الفطريات الداخلية

Résumés

Les champignons endophytes jouent un rôle important pour la survie des plantes vivantes dans des habitats stressants. Cette étude est une synthèse d'articles scientifiques dont leur objectif est la caractérisation de la communauté endophyte fongique, associée aux plantes racinaires poussant dans des environnements salins. Sur la base des caractéristiques de culture et de la morphologie de croissance des colonies examinées dans les différents travaux consultés, différentes espèces des champignons filamenteux peuvent être isolées à partir du sol avec une salinité variable. Toutes les études consultées ont prouvées avec un travail expérimentale que les plantes cultivées ont devenu résistantes au stress salin en présence des champignons endophytes, surtout les souches appartenant aux espèces suivantes : *Alternaria chlamydospora*, *Embellisia phragmospora*, *Phoma betae*, *Fusarium quseti*, *Chaetomium coarctatum* et *Fusarium graminearum*.

Mots clés: Champignons endophytes – Stress salin – Souches – Résistantes – Vivantes - Plantes cultivées.

Abstract

Endophytic fungi play an important role in the survival of living plants in stressful habitats. This study is a synthesis of scientific articles whose objective is the characterization of the fungal endophytic community, associated with root plants growing in saline environments. Based on the culture characteristics and the growth morphology of the colonies examined in the different works consulted, different species of filamentous fungi can be isolated from soil with varying salinity. All the studies consulted have proven with experimental work that cultivated plants have become resistant to salt stress in the presence of endophytic fungi, especially strains belonging to the following species: *Alternaria chlamydospora*, *Embellisia phragmospora*, *Phoma betae*, *Fusarium quaseti*, *Chaetomium coarctatum* and *Fusarium graminearum*.

Key word: Endophytic fungi – Salt stress – Strains – resistant – living - Cultivated plants.