

Département d'Agronomie

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté et Soutenu par :

CHELIK Djamila et TALBI Fatima

Pour l'Obtention du Diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité : Protection des cultures

THEME

**Tolérance a la salinité et activité solubilisatrice du
phosphore dicalcique des endophytes fongique
d'origine algale**

Soutenu le : 09-10-2023

Devant le jury composé de :

| | | | |
|-----------|-------------------------|--------------------------|-----|
| Président | BOUZOUINA Mohamed | Université de Mostaganem | Pr |
| Examineur | BENABDELMOUMENE Djilali | Université de Mostaganem | MCA |
| Encadreur | MAHIOUT Djamel | Université de Mostaganem | MCA |

Remerciement

Nous remercions **ALLAH** le tout puissant d'avoir nous donner le courage, la volonté et la patience de mener à terme le présent travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner tout nos gratitude.

Nous tenons tout d'abord adressé toutes nos reconnaissances à l'encadrant de ce mémoire, **Dr. MAHIOUT Djamel**, Nous le remercions pour son excellent encadrement, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité pour ce mémoire lors de notre préparation.

Nos vifs remerciements vont au **Pr. BOUZOUINA Mohamed** d'avoir nous acceptées au niveau du laboratoire de protection des végétaux ainsi pour ses précieux conseils, ses orientations, et ses efforts pour la disponibilité des ressources,

Au membre du jury **Dr. BENABDELMOUMENE Djilali** d'avoir accepté d'apporter leurs compétences dans l'évaluation de ce travail.

Nos remerciements s'étendent également au club **OCEANICA** Mostaganem précisément **M^{lle}. BENSMAINE Khadidja, Mr. BELDJILALI Mustapha, ZAHAF Bachir** et **ABED Khaldi** pour leurs travaux professionnels

Nos remerciements s'adresse aussi a nos professeurs de faculté SNV université Abdelhamid Ibn Badis de mostaganem spécialité protection des cultures qui ont perfectionné nos connaissances théoriques et pratique durant tout notre parcours professionnel.

A tous nos amis de promotion, en particulier **Amel, Safaa, Hadjer, Amani, Khiera et Salima** merci pour votre bonne amitié et pour tout le moment que nous avons partagé ensemble

Enfin, que tous ceux qui, de loin ou de près, ont participé à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de nos sincères gratitude.

Dédicace

Au nom du dieu le clément et le miséricordieux louange à ALLAH le tout puissant.

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement

à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère. A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher papa

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse: ma chère maman

A mes chers sœurs et frères qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir

tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A mon petit neveu Yahia mon brin de miel qu'Allah l'augmente en science et en piété

À mon fiancé, mon âme sœur et mon meilleur, qui depuis des années m'encourage, me comprend et a toujours été à mes côtés, que dieu lui donne du bonheur, santé et réussite.

A ma chère binôme Fatima et à toute sa famille

A mes amies, Au nom de l'amitié qui nous réunit, Et au nom de nos souvenirs inoubliables Safaa, Amel, Kawter, Hasna et Bedra

A tous ceux qui me sont chers

Djamila

Dédicace

Je dédie ce mémoire
A mes chères parents qui n'ont jamais cessé, de formuler des
prières à mon égard, de me soutenir et de l'épauler pour que je
puisse atteindre mes objectifs.

A ma soeur et mon petit frère Moulay ali cherif pour leurs
soutiens.

A ma famille paternelle TALBI sans exception et
surtout mes cousines Samia et Hachmia

A ma chère mima RAIS Oum Djilali qui je souhaite une bonne
santé.

A ma chère coupine et binôme CHELIK Djamilia pour sa
entente et sa sympathie

A ma famille maternelle Khataf et spécialement mes
chères cousines et seour : Djamilia et Kenza

A mes chères petits
cousins Sirage et Nadir



TALBI Fatima

Résumé

Un nouveau système agricole plus durable doit être développé pour augmenter la production sans compromettre la santé humaine et animale et la préservation des ressources essentielles, telles que le sol, l'eau et la diversité. Les champignons filamenteux endophytes, qu'ils soient utilisés individuellement, en combinaison entre eux ou avec d'autres micro-organismes, contribuent fortement à la promotion de la croissance des plantes et à l'atténuation de différents stress biotiques et abiotiques. Ainsi, la présente étude se concentre sur les champignons endophytes porteurs de caractères liés à la promotion de la croissance des plantes en milieu salin. Six isolats endophytes dont *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp. et *Gliocladium* sp. (plus un isolat non identifié) ont été ainsi isolés à partir d'algues marines collectées de la zone côtière de Stidia, dans la région de Mostaganem.

Le pouvoir de tolérance des endophytes à la salinité a été étudié. Pour ce faire, leurs colonies, cultivées sur milieu PDA, ont été confrontées à différentes concentrations de NaCl allant de 50 à 425mM. Les endophytes, selon l'isolat, montrent une bonne croissance ainsi qu'un pouvoir élevé de sporulation en présence de fortes concentrations de NaCl allant jusqu'à 425mM.

Ces isolats ont ensuite été testés *in vitro* pour un des traits importants spécifiques à la promotion de la croissance des plantes, à savoir la solubilisation du phosphore. Parmi les isolats testés, trois ont montré une efficacité de solubilisation par le test de screening sur milieu solide (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Gliocladium* sp.). Ces derniers ont été sélectionnés pour tester leurs aptitudes à solubiliser le phosphore *in vitro* en milieu liquide. Ils ont alors montré un excellent pouvoir solubilisant du phosphore dicalcique.

Mots clés : champignons endophytes, algues marines, milieux salés, croissance fongique, dissolution du phosphore

Abstract

A new, more sustainable agricultural system must be developed to increase production without compromising human and animal health ; and the preservation of essential resources, such as soil, water and diversity. Filamentous endophytic fungi, whether used individually, in combination with each other or with other microorganisms, contribute significantly to the promotion of plant growth and to the mitigation of various biotic and abiotic stresses. Thus, the present study focuses on endophytic fungi carrying features linked to the support of plant growth in saline environments. Six endophytic isolates including *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp. and *Gliocladium* (plus an unidentified isolate) were isolated from marine algae collected from the coastal area of Stidia, in the Mostaganem region.

The salinity tolerance of endophytes was studied. To do this, their colonies, grown on PDA medium, were exposed to different concentrations of NaCl ranging from 50 to 425 mM. Depending on the isolate, the endophytes showed good growth and high sporulation capacity in the presence of high concentrations of NaCl up to 425mM.

These isolates were then tested in vitro for one of the important traits specific to promoting plant growth, namely phosphorus solubilization. Among the isolates tested, three showed solubilization efficiency by the screening test on solid medium (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. and *Gliocladium* sp.). The latter were selected to test their ability to solubilize phosphorus, in vitro, in a liquid medium. They then showed an excellent solubilizing power of dicalcium phosphorus.

Keywords: endophytic fungi, marine algae, salty media, fungal growth, phosphorus dissolution

ملخص

اصبح من الضروري تطوير نظام زراعي جديد أكثر استدامة لزيادة الإنتاج دون المساس بصحة الإنسان والحيوان والحفاظ على الموارد الأساسية، مثل التربة والمياه والتنوع. الفطريات الخيطية الداخلية، سواء كانت مستعملة بشكل فردي أو بالاشتراك مع بعضها البعض أو مع الكائنات الحية الدقيقة الأخرى، تساهم بقوة في تعزيز نمو النبات وتخفيف الضغوط الحيوية وغير الحيوية المختلفة. وبالتالي، تركز الدراسة الحالية على الفطريات الداخلية التي تحمل خصائص مرتبطة بتعزيز نمو النبات في الوسط. PDA.

لقد تم عزل ست عزلات داخلية انطلاقاً من الطحالب البحرية التي تم جمعها من الساحل البحري لسيتيديا منطقة مستغانم. *Gliocladium sp.* و *Aspergillus niger* ، *Aspergillus sp.* *Penicillium sp.* تمت دراسة قدرة الفطريات الداخلية على تحمل الملوحة. وللقيام بذلك، تمت مواجهة مستعمراتهم، المزروعة على وسط بتركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم تتراوح من 50 إلى 425م

تظهر الفطريات الداخلية اعتماداً على نوع العزلة، نموًا جيدًا بالإضافة إلى قدرة عالية على التنبؤ في وجود تركيزات عالية من كلوريد الصوديوم تصل إلى 425 ملم. تم بعد ذلك اختبار هذه العزلات في المختبر بحثًا عن إحدى السمات المهمة الخاصة بتعزيز نمو النبات، وهي إذابة الفوسفور. من بين العزلات التي تم اختبارها، أظهرت ثلاث عزلات كفاءة إذابة الفوسفور بواسطة اختبار فحص في الوسط الصلب. *Gliocladium sp.* *Aspergillus niger.* *Penicillium sp.*

وقد تم اختيار هذه الأخيرة لاختبار قدرتها على إذابة الفوسفور، في المختبر، في وسط سائل. ثم أظهروا نتائج ممتازة في إذابة فوسفور ثنائي الكالسيوم .

الكلمات المفتاحية : الفطريات الداخلية ، الطحالب البحرية ، الوسط المالح، نمو فطري، إذابة فوسفور

Table des matières

| | |
|-----------------------------|-----|
| Liste des figures | II |
| Liste des Tableaux | III |
| Acronyms | IV |
| Introduction générale | 1 |

Partie Bibliographique

CHAPITRE I Généralités sur les algues marines

| | | |
|-------|--|----|
| I.1 | Introduction | 4 |
| I.2 | Habitat | 5 |
| I.3 | Classification et Systématique des algues | 5 |
| I.4 | Présentation des trois groupes d'Algues marines..... | 7 |
| I.4.1 | Chlorophyta ou Algues vertes..... | 7 |
| I.4.2 | Rhodophyta ou Algues rouges | 8 |
| I.4.3 | Phaeophyceae (Ochrophyta) ou Algues brunes | 9 |
| I.5 | Reproduction des algues | 10 |
| I.6 | Ecologie et distribution des algues marines..... | 11 |
| I.7 | Domaines d'utilisation des algues..... | 13 |

CHAPITRE II Les champignons endophytes

| | | |
|--------|--|----|
| II.1 | Introduction..... | 15 |
| II.2 | Les champignons endophytes | 15 |
| II.3 | Diversité des champignons endophytes..... | 17 |
| II.4 | Classification des champignons endophytes..... | 17 |
| II.4.1 | Endophytes classe 1..... | 17 |
| II.4.2 | Endophytes classe 2..... | 17 |
| II.4.3 | Endophytes classe 3..... | 18 |
| II.4.4 | Endophytes classe 4..... | 18 |
| II.5 | Modes de transmission des champignons endophytes | 19 |
| II.5.1 | La transmission verticale | 19 |
| II.5.2 | La transmission horizontale | 20 |
| II.6 | Rôles des endophytes..... | 21 |
| II.7 | Les endophytes d'algues..... | 22 |

Partie Expérimentale

CHAPITRE III Matériels et méthodes

| | |
|--|----|
| III.1 Matériels | 23 |
| III.1.1 Endophytes fongiques | 23 |
| III.1.2 Milieu de culture | 23 |
| III.2 Méthodes..... | 23 |
| III.2.1 Échantillonnage des macroalgues | 23 |
| III.2.2 Isolement des champignons endophytes | 24 |
| III.2.3 Identification des champignons endophytes | 25 |
| III.2.4 Screening des champignons endophytes pour la tolérance au sel (NaCl) | 25 |
| III.2.4.1 Mesure de la croissance mycélienne | 26 |
| III.2.4.2 Evaluation de la sporulation..... | 26 |
| III.2.5 Screening des souches solubilisant des phosphates inorganiques | 26 |
| III.2.5.1 Test de dépistage | 27 |
| III.2.5.2 Solubilisation des Phosphates en milieu liquide | 27 |
| III.3 Analyses statistiques | 29 |

CHAPITRE IV Résultats & Discussion

| | |
|--|----|
| IV.1 Résultats | 30 |
| IV.1.1 Les algues collectées et les endophytes isolés | 30 |
| IV.1.1.1 Pourcentage de colonisation des algues par les endophytes | 32 |
| IV.1.1.2 Identification morphologique des endophytes fongiques..... | 32 |
| IV.1.2 Test de tolérance au sel..... | 33 |
| IV.1.2.1 Mesure de la Croissance mycélienne des champignons endophytes cultivés en présence de NaCl..... | 33 |
| IV.1.2.2 Estimation de la sporulation | 37 |
| IV.1.3 Effet des champignons endophytes sur la solubilisation du phosphore | 38 |
| IV.1.3.1 Solubilisation qualitative du phosphate..... | 38 |
| IV.1.3.2 Solubilisation quantitative du phosphate..... | 39 |
| IV.2 Discussion | 40 |

| | |
|----------------------------------|----|
| Conclusion et perspectives | 40 |
| Bibliographique | 41 |
| Annexes..... | 48 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1: Comparaison d'une algue et d'une plante terrestre (svt.ac-dijon.fr/shemassvt)..... | 4 |
| Figure 2: Genre <i>Ulva</i> . L'autre forme de croissance rencontrée, le feuillu, forme en lame qui est souvent appelée "laitue de mer"..... | 8 |
| Figure 3: Les limbes feuillus rouges de <i>Porphyra leucosticta</i> (Source: Bothwell,2023) | 9 |
| Figure 4: <i>Padina pavonica</i> (latin: "queue de paon") à côté du <i>Codium tomentosum</i> vert et de <i>l'Ericaria tamariscifolia</i> . <i>l'Ericaria tamariscifolia</i> brune et touffue, au large de la côte de la Galice, dans le nord de l'Espagne (Source : Bothwell,2023)..... | 10 |
| Figure 5: Reproduction sexuée et asexuée d'une algue verte (Projetecolo.com/reproduction-des-algues-241.html) | 11 |
| Figure 6: Répartition bathymétrique de quelques algues (Pouchus Y.F. ; d'après Fleurence, | 13 |
| Figure 7: Mode de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes (Kusari et al, 2012)..... | 16 |
| Figure 8: Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisées (Andéol, 2016).... | 19 |
| Figure 9: Voies de transmission des endophytes chez les plantes : a) Graine colonisée par un endophyte provenant d'une plante-mère, b) Germination de la graine et colonisation par l'endophyte de la racine ainsi que dissémination dans la rhizosphère, c et d) Colonisation verticale du jeune plant et colonisation horizontale par différents micro-organismes environnementaux, e) colonisation des organes reproducteurs par des endophytes et dissémination future des graines colonisées (Barthélemy, 2019)..... | 20 |
| Figure 10 : Les différentes applications biologiques des endophytes fongiques issus d'algues marines en agriculture et en biotechnologies (Noorjahan et al, 2021)..... | 22 |
| Figure 11: Localisation géographique de la plage de <i>Stidia Mostaganem</i> (station de récolte) | 23 |
| Figure 12: Bacs de transport des algues | 24 |
| Figure 13: Méthode d'isolement des endophytes fongiques (Photo originale)..... | 24 |
| Figure 14: Test de solubilisation de phosphate sur milieu liquide (Photo originale, 2023)..... | 29 |
| Figure 15: Aspect général du thalle des algues collectées de la zone littorale de <i>Stidia</i> | 30 |
| Figure 16: Vue transversale en loupe binoculaire (G400X) du thalle des algues collectées de la zone littorale de <i>Stidia</i> | 30 |
| Figure 17: Aspect général des colonies des endophytes sur milieu PDA. | 33 |
| Figure 18: Structure microscopique des endophytes isolés, vu au microscope photonique au grossissement (G 400X) | 33 |

Figure 20 : Croissance mycélienne des endophytes après 3jours d'incubation sur milieu de culture PDA et en présence de différentes concentrations de NaCl.....35

Figure 21 : sporulation des champignons endophytes sur milieu de culture PDA en présence de NaCl (0, 50, 100, 150, 200mM).....37

Figure 22 : Courbe de régression de détermination du phosphate soluble en fonction du temps, sur milieu de culture supplémenté de phosphate dicalcique inculé avec 3 isolats fongiques.....40

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Schéma de classification des différents groupes d'algues (Gallardo, 2015)..... | 6 |
| Tableau 2: Classification des endophytes fongiques (Rodriguez. et al, 2009) | 18 |
| Tableau 3 : Classification des algues collectées "Ulva lactuca" _ "Eneromorpha compressa" _ "Dictyota spiralis" | 31 |
| Tableau 4: Classification des algues colectées "Sphaerococcus coronopifolius" _ "Asparagopsis armata" _ "Peyssonnelia corimacea feldmann" _ "Halopithys incurva" | 31 |
| Tableau 5 : Pourcentage (%) de colonisation des algues marines de la cote de Stidia par les endophytes fongiques | 32 |
| Tableau 6: Liste des isolats fongiques endophytes isolés à partir d'algues marines da la région de Stidia..... | 32 |
| Tableau 7: Croissance mycélienne des champignons endophytes sur milieu de culture PDA supplémenté en NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 425) après 7jours d'incubation à 25°C | 34 |
| Tableau 8: Croissance mycélienne (cm) des endophytes sur milieu PDA supplémenté en NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 425mM), après 3 jours d'incubation. | 36 |
| Tableau 9: Croissance mycélienne (cm) des différents endophytes, sur milieu de culture PDA supplémenté en NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 425= après 7jours d'incubation..... | 36 |
| Tableau 10: Indice de tolérance au sel [STI] de chaque champignon endophyte sur milieu de culture PDA supplémenté en NaCl (mM)..... | 37 |
| Tableau 11: Sporulation (x 10 ⁶ spores/ml) des différents endophytes, sur milieux de cultures salés (NaCl=0, 50, 100, 150, 200mM), après 7jours d'incubation | 38 |
| Tableau 12: Solubilisation du phosphate in vitro en milieu solide par 3 isolats fongiques | 38 |
| Tableau 13: Indice de solubilisation de phosphate dicalcique (Test réaliser sur boîte de Pétri). | 39 |
| Tableau 14: Sélection de la meilleure période de solubilisation du phosphate (mg/l) par les isolats fongiques. | 39 |

Acronyms

PDA : potato dextrose agar

NBRIP: National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium

PSI : Indice de solubilisation du phosphate

DCP : Dicalcium phosphate

D.O : Densité optique

STI : Indice de tolérance au sel

ICBN : International Code of Botanical Nomenclature

FAO : Food Agriculture Organisation

Introduction générale

Pour faire face à la croissance démographique mondiale ascendante et des dommages environnementaux, la productivité agricole doit augmenter de manière significative afin de nourrir la population mondiale (FAO., 2015). Parmi les contraintes environnementales, le stress salin est considéré comme un facteur majeur limitant le développement des plantes, particulièrement dans les zones arides et semi-arides du monde (Munns et Tester, 2008). La salinité des sols a des effets délétères sur la productivité agricole dans le monde entier, entraînant une perte annuelle de plus de 27 milliards de dollars US (Jha et al., 2011 ; Lata et al., 2018 ; Pal et al., 2021). Plus d'un cinquième de l'ensemble des terres arables et un tiers des terres irriguées sont déjà affectés par une salinité élevée et on prévoit que d'ici 2050, plus de la moitié des terres cultivées sera rendu improductif en raison des niveaux de stress salin affectant les cultures (Gupta et al., 2019 ; Siddiqui et al., 2022).

L'accumulation excessive d'ions (Na^+ et Cl^-) dans la rhizosphère endommage les racines des plantes et altère gravement leur métabolisme, ce qui entraîne un retard de croissance et une diminution ultérieure du rendement des cultures. En outre, une absorption excessive de Na^+ et d'ions Cl^- peut également restreindre l'absorption d'autres nutriments minéraux vitaux (Ca^{2+} , Mg^{2+} et K^+) et la carence en composants nutritionnels a des effets négatifs sur l'homéostasie ionique qui empêche la division et l'élongation cellulaire, provoquant une foliation prématurée, un vieillissement et limitation du développement des feuilles et des racines (Baltruschat et al., 2008 ; Xie et al., 2017 ; Ali et al., 2021). De même, la salinité du sol a des effets néfastes sur plusieurs autres processus métaboliques et physiologiques chez les plantes, notamment une baisse des taux de photosynthèse et une conductance stomatique réduite, en plus des dommages oxydatifs via la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Khatri et Rathore, 2019 ; Patel et Mishra, 2021).

Les carences en éléments nutritifs affectent également la croissance et la productivité agricole (Ashraf et al., 2012). Dans ce contexte, le phosphore (P) est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Il joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance et à l'amélioration de la production. Il joue également un rôle majeur dans la photosynthèse, la respiration, la formation de la membrane cellulaire, la glycolyse et pratiquement, toutes les activités enzymatiques (Ahmad et al., 2018 ; Billah et al., 2019).

La plupart du P (95-99%) présent dans le sol fait partie d'un composé insoluble et ne peut donc pas être utilisé par les plantes (Corona et al., 1996)). Comme le P est un élément stable dans les sols, il ne forme pas de gaz (comme l'ammoniac) et ne peut donc pas s'éloigner de l'endroit où il est appliqué. La stabilité des composés phosphatés dans les sols s'explique par le fait qu'ils sont très réactifs et réagissent rapidement avec d'autres composés (tels que Al^{3+} , Ca^{2+} et Fe^{3+}), qui deviennent de plus en plus insolubles dans le sol. Par conséquent, la libération et la mobilisation des formes insolubles et fixes du phosphore sont donc un aspect important de l'augmentation de la disponibilité du phosphore dans le sol. Pour résoudre ce problème, la plupart des agriculteurs utilisent régulièrement des engrais phosphatés chimiques qui s'incorporent dans le sol. Ce phosphore appliqué se transforme facilement en une forme insoluble et stable avec une disponibilité limitée et seulement 5% ou moins de la quantité totale de P dans le sol est disponible pour la nutrition des plantes (Pundarikakshudu, 1989 ; Boronin, 1998). En raison de l'impact négatif des engrais chimiques sur l'environnement et de leurs coûts croissants, l'utilisation des inoculants microbiens possédant des activités de solubilisation du phosphore dans les sols est considérée comme une alternative respectueuse de l'environnement aux applications d'engrais chimiques.

La solubilisation du phosphore en phosphate peut être réalisée entre autres par les bactéries endophytes lors de la sécrétion de phosphatases, le rendant ainsi assimilable par la plante. Certaines espèces fongiques sont également signalées comme étant des solubilisateurs de phosphore comme *Aspergillus* sp. (*A. spergillus awamori*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. foetidus*, *A. wentii*.) et *Penicillium* sp. (*P. digitatum*, *P. lilacinium*, *P. balaji*, and *P. funicolosum*) (Pande et al., 2017). Ainsi, dans des conditions de sol où le phosphore est sous forme hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, il a été montré que l'endophyte *Colletotrichum tofieldiae* contribue au développement de la plante-hôte par solubilisation du phosphore.

Des études suggèrent également que certains champignons endophytes semblent conférer une tolérance au stress via l'adaptation fongique spécifique à l'habitat, c'est-à-dire des espèces fongiques isolées des plantes poussant dans une zone particulière avec des niveaux de stress élevés sont particulièrement adaptées à l'amélioration de la tolérance au stress de l'hôte (Manjunatha et al., 2022). Par conséquent, l'isolement, la préservation et la caractérisation de ces endophytes fongiques qui survivent avec les plantes dans des environnements stressés sont primordiales. C'est pourquoi nous avons choisi l'étude des endophytes des algues marines, car à ce sujet peu d'études sont focalisées sur le pouvoir potentiellement bénéfiques des endophytes d'algues marines pour l'agriculture.

L'objectif de ce mémoire vise donc à :

- Isoler et identifier des champignons endophytes des algues marines de la zone littorale de Stidia, située au niveau de la région de Mostaganem,
- Etudier l'effet de différentes concentrations de NaCl sur la croissance mycélienne et la sporulation des endophytes,
- Mettre en évidence la capacité de ces endophytes à solubiliser phosphore.

Ce mémoire a été structuré en deux parties :

La première partie consiste en une synthèse bibliographique répartie en deux chapitres, l'un sur les algues marines ; l'autre sur les champignons endophytes. La seconde partie est scindée en deux chapitres, dans le premier y sont exposées les caractéristiques du matériel biologique utilisé et les différentes méthodes employées pour la réalisation des différentes expérimentations, et dans le deuxième les résultats auxquels on est parvenu et leur discussion. Une conclusion générale et des perspectives sont venues clôturer ce mémoire.

Partie
Bibliographique

CHAPITRE I

Généralités sur les algues marines

I.1 Introduction

Les algues sont un groupe de plantes connues depuis les civilisations anciennes. Elles sont connues sous le nom de phycophytes, qui sont des organismes aquatiques qui appartiennent au règne des Protistes. Les Phukos (algues) et les Phutons (plantes) font partie des Thallophytes chlorophylliens, des organismes capables de réaliser la photosynthèse. Les algues sont autotrophes, principalement aquatiques et quelques-unes sont terrestres. Le corps de la plante va de structures unicellulaires à multicellulaires, sans vascularisation et peu de différenciation en divers systèmes de tissus, d'où leur nom de thallophytes. Il peut s'agir d'une seule cellule d'une taille de $1\mu\text{m}$ à de grandes algues pouvant atteindre plus de 60 m (Fritsch, 1945).

La branche de la botanique qui s'occupe de l'étude des algues est connue sous le nom de Algologie / Phycologie (Gr. Phycos= algues; logos = étude). Les algues ont une grande diversité de tailles et de formes, elles peuvent être en forme de filaments, de feuilles, de plaques ou même de tubes. De plus, elles peuvent être soit libres, soit flottant dans l'eau, soit fixées sur des substrats tels que des rochers, des coquillages ou d'autres organismes.

Les algues se différencient des autres plantes par leur thalle, qui ne possède pas de racines, de tiges ou de feuilles. Elles présentent une structure cellulaire similaire à celle des plantes supérieures (**Figure 1**). Leur paroi cellulaire est partiellement composée de cellulose. Elles possèdent de petits noyaux et des plastes pigmentés appelées chromatophores. Ces derniers contiennent de la chlorophylle, qui est souvent masquée par des pigments supplémentaires, ce qui donne aux thalles des couleurs rouge, brune, verte ou bleue.

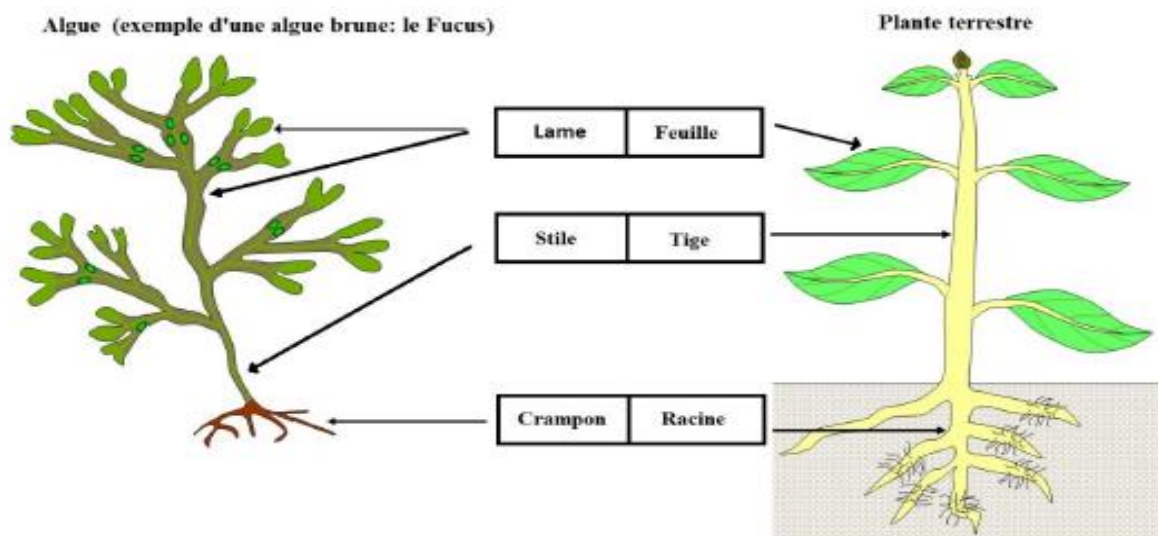


Figure 1: Comparaison d'une algue et d'une plante terrestre (svt.ac-dijon.fr/shemassvt)

Du point de vue écologique, les algues constituent le premier maillon des chaînes alimentaires : ce sont les producteurs quasi exclusifs des mers et des océans (7/10 de la surface du globe).

Pour réaliser la photosynthèse, les Algues sont tributaires de la lumière. Les Algues sont limitées pour cette raison en milieu aquatique à une zone superficielle qui, en général, ne dépasse pas 40 à 60 mètres de profondeur (ce qui, à l'échelle océanique représente une mince pellicule ; au-delà, le milieu marin est dépourvu de producteurs) (Roland et al. 2008).

On distingue dans les populations algales deux grands groupes. Le premier est constitué d'espèces qui flottent ou nagent en pleine eau ; celles-ci sont en général microscopiques et souvent unicellulaires. Elles forment la partie végétale et productrice du plancton et du phytoplancton (du gr. plankton= errant). Le second groupe – appelé phytobenthos (du gr. benthos = fond) – est constitué par des espèces fixées au fond des mers.

I.2 Habitat

Les algues sont un groupe d'organismes omniprésents dans divers habitats, tels que l'eau (algues aquatiques), la terre (algues terrestres). Elles poussent également en tant qu'épiphyte, endophyte, ainsi que dans des conditions extrêmes, en d'autres termes, on peut dire que les algues sont universelles.

I.3 Classification et Systématique des algues

La classification est le regroupement systématique d'organismes en catégories sur la base de relations entre eux, où la relation peut être évolutive ou structurale. La hiérarchie pour la classification des plantes est la Division, la Classe, l'Ordre, la Famille, le genre et l'espèce selon le code international de nomenclature botanique (ICBN) (Sharma, 2011). Le code International de nomenclature pour les algues, différentes catégories d'algues, les champignons et les plantes (ICBN) propose la nomenclature suivante :

| | | |
|-----------------|----------|--------------------|
| Division: | Phyta | E.g. Chlorophyta |
| Sub – division: | Phytina | |
| Classe: | Phyceae | E.g. Chlorophyceae |
| Sous – classe: | Phycidae | |
| Ordre: | | Ales |
| Sous – ordre: | Inales | |
| Famille: | Aceae | |
| Sous – famille: | Oideae | |
| Tribe: | | Ease |
| Genre: | | |
| Epece: | | |
| Variété: | | |

Forme:

La classification des algues a connu de grands changements au cours des trente dernières années et il n'existe aujourd'hui aucun schéma général accepté par tous les phycologues. Il existe plusieurs propositions systématiques, allant de 5 à 16 divisions. Gallardo (2015) a adopté un système de classification basé sur la compilation de plusieurs systèmes de classification (**Tableau 1**).

Tableau 1: Schéma de classification des différents groupes d'algues (Gallardo, 2015)

| Kingdom | Phylum | Subphylum | Class |
|--------------------------|--|----------------------|---------------------|
| Prokaryota eubacteria | Cyanophyta | | Cyanophyceae |
| Eukaryota | Glaucomphyta | | Glaucomphyceae |
| | Rhodophyta | Cyanidiophytina | Cyanidiophyceae |
| | | | Eurhodophytina |
| | | | Porphyridophyceae |
| | | | Rhodellophyceae |
| | | | Stylonematophyceae |
| | | | Bangiophyceae |
| | | | Florideophyceae |
| | | | Cryptophyceae |
| | | | Dinophyceae |
| | | | Haptophyceae |
| | | Khakista | Bacillariophyceae |
| | | | Bolidophyceae |
| | | | Chrysophyceae |
| | | | Synurophyceae |
| | | | Eustigmatophyceae |
| | | | Raphidophyceae |
| | | | Dictyochophyceae |
| | | | Pelagophyceae |
| | | | Pinguiophyceae |
| | | | Phaeothamniophyceae |
| | | Chrysomerothryceae | |
| | | Xanthophyceae | |
| | | Phaeophyceae | |
| | | Euglenophyceae | |
| | | Chlorarachniophyceae | |
| | | Prasinophytina | Prasinophyceae |
| | Tetraphytina | | |
| | | Chlorophyceae | |
| | | Chlorodendrophyceae | |
| | | Trebouxyophyceae | |
| | | Ulvophyceae | |
| | | Dasycladophyceae | |
| | | Coleochaetophyceae | |
| | Charophyta (Streptophyta <i>p. p.</i>) | | Conjugatophyceae |
| | | | Mesotigmatophyceae |
| | | | Klebsormidiophyceae |
| | | | Charophyceae |

L'organisation systématique des algues en divisions ou Phyla, et en classes est basée sur des caractéristiques de base telles, la composition chimique des pigments photosynthétiques, les substances de stockage, le type d'algues, le type de paroi cellulaire, et des caractères cytologiques comme l'ultrastructure cellulaire, en particulier les caractéristiques des chloroplastes et de leur structure et leur origine endosymbiotique.

Récemment, les classifications ont été étayées par la génétique moléculaire et, en particulier, l'interprétation de la séquence des bases de l'ADN du chloroplaste et des séquences d'ARN ribosomique 5S, 18S et 28S.

Sur la base de ces caractères, il existe au moins un phylum d'algues procaryotes, les Cyanophyta, et dix phyla d'algues eucaryotes : Glaucophyta, Chlorarachniophyta, Euglenophyta, Dinophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Ochrophyta, Rhodophyta, Chlorophyta et Charophyta (Tableau 1).

I.4 Présentation des trois groupes d'Algues marines

Les algues marine sont une très large répartition et occupent une grande variété d'habitats. Les Algues ont des couleurs variées dues à la présence de pigments masquant plus ou moins la chlorophylle. Ce caractère conduit à subdiviser le groupe en trois grandes lignées qui s'opposent par un ensemble de caractères biochimiques, structuraux et fonctionnels : les Algues Vertes, les Algues Brunes et les Algues Rouges. Enfin, les algues rouges, vertes et brunes ont des ultras structures différentes, c'est-à-dire les structures internes de la cellule. les algues rouges et les algues vertes ont deux membranes autour de leur chloroplastes, parce que ces chloroplastes étaient dérivé d'une endosymbiose primaire, tandis que les algues brunes ont quatre membranes, parce que les chloroplastes bruns provenaient d'un endosymbiose secondaire (Bothwell, 2023).

I.4.1 Chlorophyta ou Algues vertes

Les chlorophyta, ainsi que leur nom l'indique (**Figure 2**), sont en principe des Algues de couleur verte, celle-ci étant due à la nature de l'équipement pigmentaire contenu dans leurs chloroplastes. Cette couleur verte est quelque fois masquée par la présence d'inclusions cellulaires supplémentaires chargées de carotène. C'est ainsi que certaines algues présentent une couleur rouge. D'autres sous l'effet d'une forte insolation peuvent Les algues vertes marines présentent différents cas de longévité. Certaines sont pérennantes, c'est-à-dire

pouvant vivre plusieurs années (ex. *Codium*, *Halimeda*), tandis que d'autres sont annuelles et éphémères, avec une succession de générations au cours de l'année.



Figure 2: Genre *Ulva*. L'autre forme de croissance rencontrée, le feuillu, forme en lame qui est souvent appelée "laitue de mer"

I.4.2 Rhodophyta ou Algues rouges

A l'exception de quelques rares exemples unicellulaires, la plupart des algues rouges sont pluricellulaires et vont de simples filaments microscopiques à des lames épaisses pouvant mesurer de 1 à 3 m de long (Cabioc'h et al., 2014). Les algues rouges n'ont pas de cellules mobiles. Elles se définissent par un ensemble de caractères communs : caractères cytologiques (structure des plastes) et biochimiques (présence de chlorophylle a seule, masquée par des pigments surnuméraires phycoéthriques et les phycocyanines ; présence d'un amidon extraplastidial particulier appelé rhodamylon). Leur pigment dominant est la phycoérythrine. L'incorporation de la phycoérythrine avec d'autres pigments de chlorophylle est la raison pour laquelle les plastes de ces algues sont teintés de rose. La couleur des Rhodophyta est extrêmement variable, pour une même espèce, elle varie en fonction de l'intensité de l'éclairement, qui, lorsqu'il est excessif, peut entraîner la photo destruction des pigments surnuméraires ; elle varie aussi entre les espèces selon les proportions relatives des différents pigments et la construction du thalle (**Figure 3**). Selon Cabioc'h et al. (2014), certains

Rhodophyta apparaissent noirâtres à la lumière du jour ; leur pigmentation rouge ne peut être mise en évidence que par l'usage d'une lumière artificielle.

Les Rhodophycées sont des organismes marins constitués de plusieurs cellules, qui se divisent en deux groupes principaux en fonction de leur cycle de reproduction : les Bangiophycées et les Floridéophycées.



Figure 3: Les limbes feuillus rouges de *Porphyra leucosticta* (Source: Bothwell,2023)

I.4.3 Phaeophyceae (Ochrophyta) ou Algues brunes

Les Algues Brunes (**Figure 4**) élaborent une grande quantité de *caroténoïdes* (carotène, xanthophylle) qui dissimulent la couleur verte. Il s'agit bien de pigments ajoutés à la chlorophylle puisqu'il suffit par exemple de mettre du varech brun dans l'eau chaude pour voir diffuser les pigments foncés et faire apparaître la couleur verte de l'algue (Roland et al. 2008). Les phéophycées, également appelées En tant que produits de stockage caractéristiques, ils accumulent le polysaccharide laminarine, un polymère insoluble composé principalement de liaisons de β glucanes. La paroi cellulaire se compose d'une couche de cellulose et d'une couche externe de mucilage, comprenant des substances colloïdales appelées phycocolloïdes, telles que les alginates, qui sont des sels d'acide alginique, et la substance fucoidan, qui est principalement composée de polysaccharides sulfatés.

Les algues brunes sont pluricellulaires et macroscopiques à l'état adulte, se définissant par un ensemble de caractères communs, à la fois cytologiques (structure des

plastés) et biochimiques (présence de chlorophylle a et c, masquées par l'abondance des carotènes et des xanthophylles ; absence d'amidon intraplastidial), les réserves cytoplasmiques et vacuolaires sont de natures.



Figure 4: *Padina pavonica* (latin: "queue de paon") à côté du *Codium tomentosum* vert et de l'*Ericaria tamariscifolia*. L'*Ericaria tamariscifolia* brune et touffue, au large de la côte de la Galice, dans le nord de l'Espagne (Source : Bothwell,2023)

Les algues brunes sont, à quelques rares exceptions près, des organismes purement marins et constituent une composante importante de la végétation benthique des côtes rocheuses des hémisphères nord et sud. Certains occupent la zone intertidale, comme certains fucoïdes, et peuvent résister à la dessiccation pendant des heures, voire des jours (*Pelvetia canaliculata*) (Gallardo et al. 2015).

I.5 Reproduction des algues

Les algues se reproduisent souvent par multiplication végétative (reproduction asexuée) dans de nombreux cas. Ce processus de multiplication asexuée consiste à créer une copie identique à l'organisme initial. Le processus implique soit la division mitotique d'une cellule unique (comme chez les algues bleues), soit à la fragmentation d'un thalle pour former plusieurs organismes identiques. Les spores constituent souvent la forme de reproduction utilisée par les cellules spécialisées dans ce processus.

En plus de cela, les algues eucaryotes se reproduisent également de manière sexuée où deux cellules reproductrices, appelées gamètes, s'unissent pour former un œuf, ou zygote (**figure 5**).

La reproduction se déroule de façon alternée entre des phases de reproduction asexuée, effectuées par les thalles, et des phases de reproduction sexuée, effectuées par des thalles qui produisent des gamètes (figure.5). Lorsqu'il s'agit de leur reproduction, les organismes présentent une alternance de cycles de génération avec une diversité plus ou moins marquée. De plus, on observe également une alternance de phases correspondant à un nombre variable de chromosomes (allant de n à $2n$).

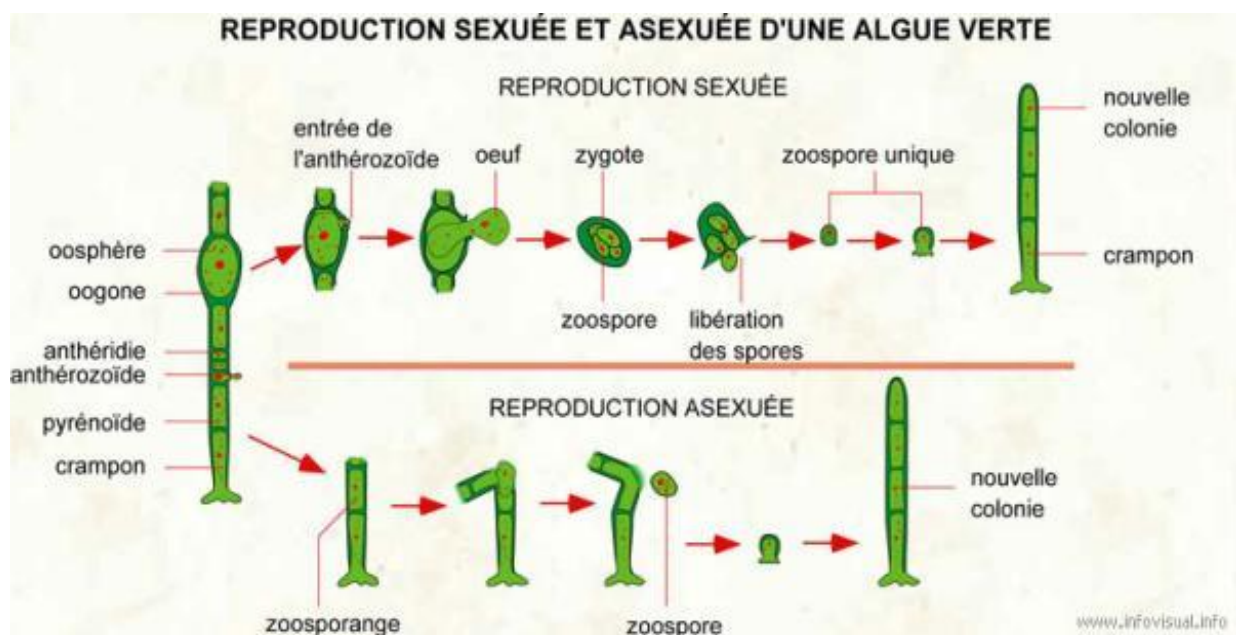


Figure 5: Reproduction sexuée et asexuée d'une algue verte Projetecolo.com/reproduction-des-algues-241.html)

I.6 Ecologie et distribution des algues marines

Les algues sont un groupe d'organismes ubiquistes présents dans divers habitats. Elles sont capables de coloniser n'importe quel milieu sur Terre, mais la plupart d'entre elles sont strictement aquatiques. Elles ont toutes besoin d'un environnement aquatique pour se reproduire. Beaucoup d'entre elles sont des organismes marins, tandis que d'autres vivent en eau douce. Les algues unicellulaires et coloniales vivent généralement en suspension dans l'eau, au sein du plancton. La taille des algues planctoniques varie entre 0,2 et 200 μm . Plusieurs catégories ont été reconnues : le macroplancton (plus de 200 μm), le microplancton

(entre 200 et 20 μm), nanoplancton (entre 20 et 10 μm), ultraplancton (entre 10 et 2 μm) et picoplancton (entre 2 et 0,5 μm) (Gallardo, 2015).

D'autres algues se développent sur le substrat et font partie du benthos, plus précisément de sa fraction végétale ou phytobenthos. Elles peuvent vivre sur des roches (épilithiques), sur des boues (épipéliques), sur des plantes (épiphytes), sur des animaux (épizootiques), à l'intérieur de roches (endolithiques) ou à l'intérieur de plantes ou d'animaux en tant qu'organismes vivants. La plupart des algues sont photoautotrophes, mais certaines, principalement les algues unicellulaires, sont à la fois hétérotrophes et photoautotrophes facultatives.

Les algues vivent toujours dans la zone photique, à une profondeur où la lumière peut pénétrer (**figure 6**). Les algues benthiques occupent une grande partie du plateau continental. Dans les eaux claires, elles peuvent atteindre de grandes profondeurs, comme dans la mer des Caraïbes où des algues rouges ont été trouvées à plus de 260 m de profondeur (Littler et al., 1986). La capacité des algues à vivre à différentes profondeurs est étroitement liée à la composition de leurs pigments photosynthétiques.

L'intensité lumineuse des écosystèmes aquatiques correspond aux longueurs d'onde de la région bleu-vert du spectre. Comme les pigments accessoires phycoérythrine, β -carotène, fucoxanthine et la siphonoxanthine sont capables d'absorber la lumière bleue-verte, les communautés d'algues benthiques des eaux profondes sont composées d'algues rouges, brunes et vertes.

Les algues ont tendance à augmenter la quantité totale de pigments et le rapport pigments accessoires : le rapport chlorophylle avec l'augmentation de la profondeur. Par exemple, l'algue rouge *Chondrus crispus* augmente sa quantité de phycoérythrine avec la profondeur (Sagert et al., 1997).

La température et la salinité de l'eau, ainsi que la lumière et la disponibilité des nutriments, la dessiccation, l'hydrodynamisme et l'exposition aux vagues et le dioxyde de carbone sont les facteurs responsables en grande partie de la répartition latitudinale des (Lüning 1990 ; Harley et al. 2012 ; Ramos et al., 2012, 2014.).

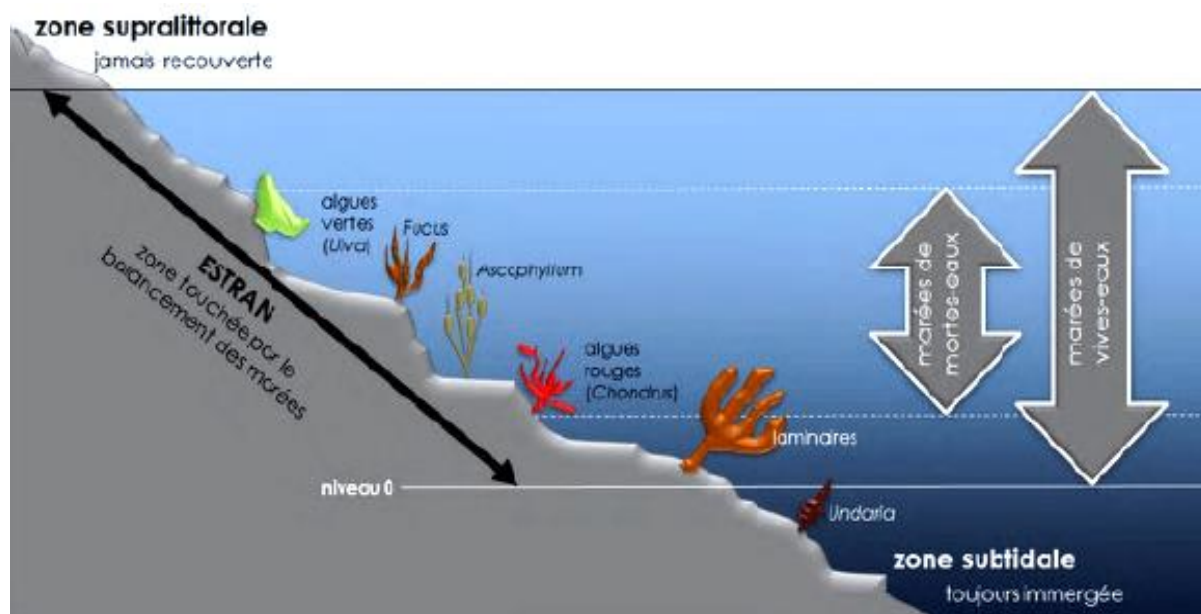


Figure 6: Répartition bathymétrique de quelques algues (Pouchus Y.F. ; d'après Fleurence, 2018).

I.7 Domaines d'utilisation des algues

Les algues brunes font l'objet, de par le monde, de nombreuses utilisations. La principale en est l'extraction de certains mucilages (alginates) à applications multiples. Des espèces sont également utilisées pour l'alimentation humaine, la nourriture du bétail, les cosmétiques. Certaines espèces constituent même un engrais organique très recherché.

En médecine et pharmacie, les algues renferment des composés chimiques d'intérêt ayant des propriétés biologiques, et qui sont utilisés dans des domaines médicaux ou pharmaceutiques, tels que des substances antivirales (sulfates de polysaccharides), des agents anticancéreux, des gels d'hydrocolloïdes favorisant la régénération osseuse et tissulaire.

Certains genres d'algues rouges sont également utilisées en industrie pour leur mucilage (agar-agar des *Gracilaria* et *Gelidium* ; carraghénanes des *Chondracanthus*). D'autres ont eu dans le passé des applications pharmaceutiques particulières : propriétés vermifuges des *Corallina*, *Alsidium*, *Symphocladia*, *Digena*, le pouvoir hémostatique de *Delesseria sanguinea*. Certaines espèces sont consommées pour l'alimentation humaine (*Palmaria* en Europe et au Canada).

Les algues vertes sont relativement peu utilisées de par le monde. Leurs propriétés chimiques font cependant l'objet de quelques applications. Par exemple certaines *Ulva*les et *Cladophorales* auraient été employées comme vermifuges. Des cultures de *Dunaliella* ont été

utilisées pour la production de β carotène destiné aux élevages de volailles (amélioration du jaune d'œuf). Les autres usages trouvés dans la littérature sont d'ordre alimentaire : les algues vertes sont employées dans l'alimentation humaine, soit comme légumes (Ulva, Monostroma, Codium, Caulerpa), soit comme épices (Caulerpa).

Il y'a actuellement une prise de conscience du rôle des algues dans l'amélioration du microbiome intestinal. La consommation d'algues augmente dans le monde entier, y compris les pays occidentaux, par contre les pays asiatiques restent toujours les principaux consommateurs et producteurs d'algues, sous forme de compléments alimentaires et d'additifs (gélifiants, épaississants, etc..), riches en micronutriments, tous nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme.

On leur porte aussi un grand intérêt en agriculture : Les algues enrichissent le sol de matière organique facilement décomposable. Ce sont à la fois des amendements et des engrais qui améliorent la structure du sol. En plus de contenir des oligo-éléments (fer, iode, zinc, manganèse, nickel, cuivre, etc.), elles contiennent également des sels minéraux. En raison de la présence d'alginate, les algues augmentent également la capacité de rétention d'eau du sol, favorisant ainsi la croissance des micro-organismes dans le sol. Elles synthétisent des phytohormones et agissent comme activateurs de croissance en augmentant le volume racinaire. Enfin, ils agissent comme éliciteurs pour stimuler les mécanismes de défense des plantes contre les envahisseurs et les stress (grêle, froid, sécheresse...).

En cosmétique, les algues ont la capacité d'être employées comme agents épaississants et stabilisants de mélanges, ainsi que comme ingrédients actifs. En général, ils ont des propriétés hydratantes, photoprotectrices, antibactériennes et antioxydantes.

CHAPITRE II

Les champignons endophytes

II.1 Introduction

Dans l'environnement, les microorganismes(virus, bactéries,champignons) interagissent entre eux et avec les végétaux par différents modes d'interactions ; la symbiose est l'un de ces modes, Le terme fut proposé par le botaniste allemand Anton de Bary en 1879, et décrivait alors la vie en association de différents organismes ,la symbiose est une association permanente entre deux ou plusieurs organismes distincts, au moins durant une partie de leurs cycles de vie (Smith et Read, 2000).(Schulz et Boyle 2005) ont identifiés trois types d'interactions hôte-endophyte, le mutualisme, le parasitisme et le commensalisme ; le plus courant est le mutualisme qui a été définie comme une association biologique de deux organismes d'espèces distinctes en vue d'un bénéfice mutuel (Strobel et al, 2004). Par rapport à la localisation des symbiotes on distingue deux types de symbiose :

- * L'ectosymbiose : le symbiote vit à la surface de l'hôte
- * L'endosymbiose : le symbiote est situé dans l'espace intercellulaire, intracellulaire

II.1. Définition des endophytes

Les plantes peuvent être un réservoir à un grand nombre de micro-organismes connus sous le nom d'endophytes. (Bacon & White 2000).Le terme « endophyte » englobe tous les microorganismes qui colonisent les tissus internes vivants des végétaux sans induire des symptômes visibles de la maladie et vivent en association mutuelle avec les végétaux pendant au moins une partie de leur cycle de vie (Bacon & White, 2000).Tous les types de microorganismes (bactéries ,virus ,champignons ,levures) ont été découverts en tant qu'endophytes. Les endophytes les plus fréquemment rencontrés sont les champignons (Staniek et al., 2008).

Stone et al. (2000) inclut aussi dans la définition d'endophytes les espèces de *Fusarium* associées aux racines comme intercellulaires, champignons asymptomatiques.

II.2 Les champignons endophytes

Le terme endophyte a été utilisé pour la première fois par De Bary en 1866 pour décrire les champignons qui colonisent l'intérieur des tissus des végétaux, des tiges et des feuilles(Moricca et Ragazzi, 2008), sans provoquer de symptômes évidents chez les plantes hôtes (Porrás-Alfaro et Bayman, 2011). Les champignons endophytes sont ubiquistes : ils ont été détectés dans pratiquement toutes les espèces de plantes (Wang et Dai, 2011), à toutes les latitudes (Arlond, 2007). Une même espèce de champignon endophyte est capable de coloniser plusieurs hôtes différents (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016), ou bien un large

éventail d'hôtes, ils sont alors non spécifiques à l'hôte, tandis que d'autres sont spécifiques, c'est-à-dire qu'ils se limitent à un ou quelques hôtes. Chaque organe de l'hôte peut être colonisé (Schulz et Boyle, 2005). Et il n'est pas surprenant que certaines espèces de plantes soient les hôtes de plus d'une centaine d'espèces d'endophytes différentes (Zabalgogeoazcoa, 2008). Ces endophytes peuvent croître dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Arnold, 2007) (**Figure 7**).

De nombreux endophytes infectent localement des parties de plantes, se limitant à une petite zone tissulaire. Ceci est étayé par le fait que souvent, plusieurs espèces endophytes sont récupérées de différents fragments de la même plante. En revanche, les espèces *Neotyphodium* et *Epichloë* infectent systématiquement l'espace intercellulaire des feuilles, des tiges reproductrices et des graines de leurs hôtes. Ces endophytes systémiques peuvent être isolés de plusieurs fragments de la même plante. Il existe aussi une spécificité d'organe ou de tissu, et certains endophytes peuvent être trouvés dans des parties spécifiques de la plante comme les racines, les feuilles ou les brindilles, tandis que d'autres peuvent infecter plusieurs de ces parties (Stone et al., 2004).

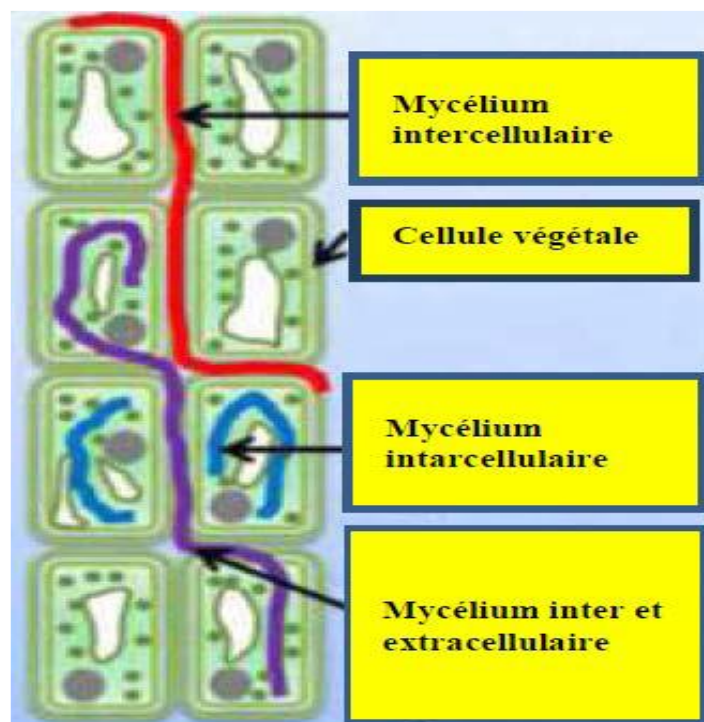


Figure 7: Mode de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes (Kusari et al, 2012).

II.3 Diversité des champignons endophytes

Les champignons endophytes représentent une grande diversité biologique. Ils sont majoritairement issus de l'embranchement des Ascomycota (Arnold, 2007), et certains appartiennent à d'autres taxons tels que les Deuteromycota, Basidiomycota, Zygomycota et les Oomycota (Zabalgoeazcoa, 2008), avec une estimation de 1,5 million d'espèces de champignons, alors que seules 100 000 espèces environ sont actuellement connues (Hawksworth, 2004). Une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante ont été découverts dans les études réalisées avant l'an 2000 (Stone et al., 2004). Le nombre d'espèces fongiques identifiées par espèce de plante hôte a considérablement augmenté (Zabalgoeazcoa, 2008).

II.4 Classification des champignons endophytes

Les champignons endophytes sont classés en deux groupes principaux fondés sur des différences par rapport à l'évolution de la parenté, la taxonomie, la gamme d'hôtes et la fonction écologique : Le premier groupe est constitué d'endophytes Clavicipitacées (C-endophytes) contenant un groupe spécial d'endophytes et appelé classe 1, tandis que le deuxième groupe, celui des endophytes non Clavicipitacées (NC-endophytes) sont divisés en trois groupes spéciaux : classe (2), classe (3) et classe (4) (Rodriguez *et al.*, 2009) (**Tableau 2 ; Figure 8**).

II.4.1 Endophytes classe 1

Ils appartiennent à la famille des *Clavicipitaceae* (*Ascomycota*) constituée actuellement de 37 genres. Quatre possèdent des espèces endophytismes : *Balansia*, *Epichloë*, *Ephelis* et *Neotyphodium* (Andéol, 2016). Ils colonisent principalement les tiges et les rhizomes (Rodriguez *et al.*, 2009).

II.4.2 Endophytes classe 2

Les endophytes de classe 2 comprennent une diversité d'espèces, toutes membres du Dikarya (*Ascomycota* ou *Basidiomycota*). La plupart d'entre elles appartiennent aux *Ascomycota*, avec une minorité de *Basidiomycota* (Andéol, 2016). Les endophytes de classe 2 se distinguent des autres endophytes-NC par le fait qu'ils colonisent généralement les racines, les tiges et les feuilles et qu'ils sont capables de former des infections étendues à l'intérieur des plantes (Ajaret *et al.*, 2021).

II.4.3 Endophytes classe 3

Les endophytes de classe 3 sont des membres des Dikaryomycota (Ascomycota ou Basidiomycota), avec une dominance particulière dans les Ascomycota. Les Pezizomycota sont particulièrement bien représentées (Ajaret al., 2021) et se trouvent plus souvent dans les tissus ligneux que dans le feuillage (Arnold et al., 2007).

II.4.4 Endophytes classe 4

Cette classe n'est pas encore bien définie. Ces endophytes appartiennent aux Ascomycota, du sous embranchement des Pezizomycotina: en particulier les ordres des Pleosporales, Pezizales et Helotiales. Ils sont associés à des arbustes ou arbres et colonisent uniquement les racines des plantes (Andéol, 2016),

Tableau 2: Classification des endophytes fongiques (Rodriguez. et al, 2009)

| | Clavicipitacées | Non- Clavicipitacées | | |
|---------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|
| Critères | Classe 1 | Classe 2 | Classe 3 | Classe 4 |
| Gammed'hôtes | Etroit | Vaste | Vaste | Vaste |
| Tissus colonisé | Tiges,racines et rhizomes | Tiges, racines et rhizomes | Tiges | Racines |
| Colonisation des plantes | Extensive | Extensive | Limitée | Extensive |
| Transmission | V/H | V/H | H | H |
| Bénéfice physique | NAH | NAH/AH | NAH | NAH |

- * Non adapté à l'habitat (NAH) : des avantages tels que la tolérance à la sécheresse et l'accélération de la croissance sont courants chez les endophytes, quel que soit leur habitat d'origine.
- * Adapté à l'habitat (AH) : les avantages résultent de pressions de sélection spécifiques à l'habitat telles que le pH, la température et la salinité.
- * *(V) : verticale.
- * *(H) : horizontale.

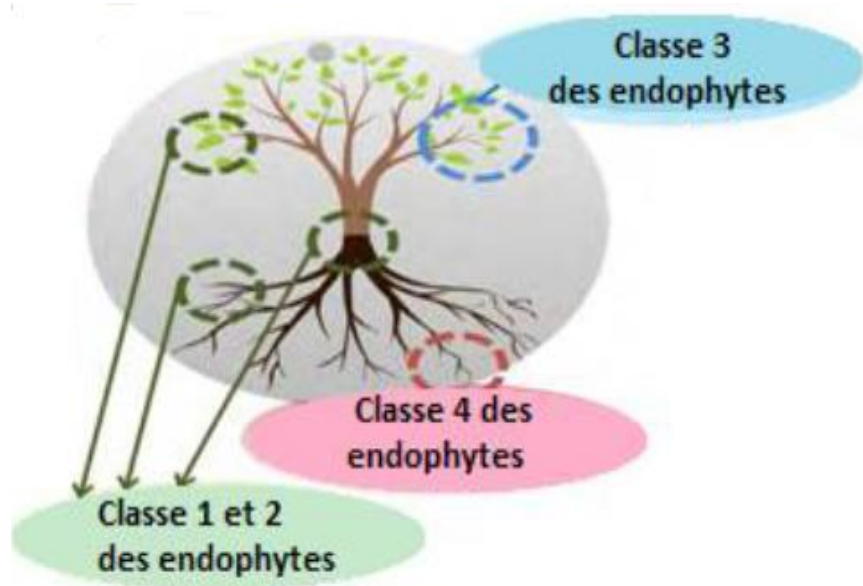


Figure 8: Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisées (Andéol, 2016).

II.5 Modes de transmission des champignons endophytes

Les voies de transmission de nombreux endophytes restent à déterminer mais des études ont pu montrer des exemples de transmissions horizontales (transmission par des facteurs environnementaux) ou verticales (transmission d'une plante « parent » à une plante « enfant »).

II.5.1 La transmission verticale

Selosse et Schardl (2007) démontrent que ce mode de transmission se fait par la croissance végétative des hyphes et la croissance se fait complètement à l'intérieur des tissus de la plante hôte. Les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance, via les graines (Saikkonen et *al.*, 2004).

En effet, en se développant au sein d'un embryon de graine, les endophytes aboutissent à la colonisation du jeune plant une fois cette dernière germée (**Figure 9**). La colonisation des graines permettant cette transmission peut s'effectuer selon trois voies :

- via les tissus non-vascularisés ou le xylème des plantes,
- *via* les organes reproducteurs femelles (ex. le stigmate),
- ou par la contamination exogène des graines à partir de l'environnement (Kandel et al., 2017).

L'exemple le mieux étudié de transmission verticale au sein de graines est la voie de propagation des espèces fongiques asexués du genre *Epichloë* (Philipson et Christey, 1986).

II.5.2 La transmission horizontale

Indépendamment d'une transmission verticale, un végétal peut à tout moment être colonisé par les racines, les tiges, les feuilles ou même les fleurs peuvent à tout moment être colonisés par les endophytes. Cette transmission horizontale s'effectue à travers le sol, l'atmosphère par la dissémination de spores, ou encore via des vecteurs tels que les insectes (**Figure 9**).

Ce groupe de champignons se transmettent horizontalement (Saikkonen et al, 2004), par les spores sexuées ou asexuées et infectent, par conséquent, les autres plantes (Gallery et al, 2007). La dissémination de spores est effectuée par un vecteur de dispersion. Après germination, l'hyphe pénètre le nouvel hôte soit par les stomates, soit par pénétration directe au travers de l'épiderme.

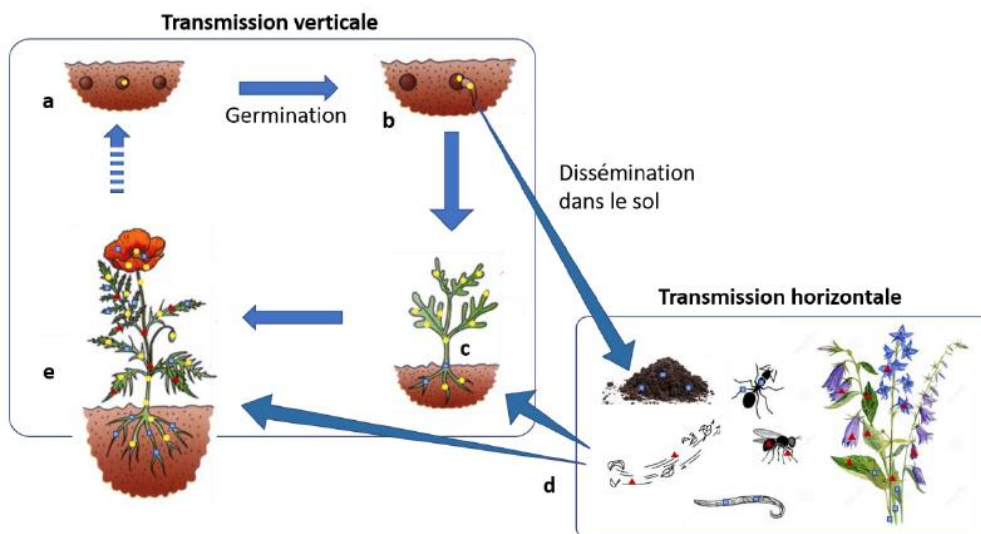


Figure 9: Voies de transmission des endophytes chez les plantes : a) Graine colonisée par un endophyte provenant d'une plante-mère, b) Germination de la grain et colonisation par l'endophyte de la racine ainsi que dissémination dans la rhizosphère, c et d) Colonisation verticale du jeune plant et colonisation horizontale par différents micro-organismes environnementaux, e) colonisation des organes reproducteurs par des endophytes et dissémination future des graines colonisées (Barthélemy, 2019).

La colonisation par les endophytes permet d'améliorer le développement de la plante-hôte, entre autres par une stimulation de sa croissance ainsi que par une augmentation de sa résistance face aux différents stress.

II.6 Rôles des endophytes

Certains endophytes produisent des composés biologiques actifs qui empêchent les bactéries, les champignons et les parasites de se développer dans la plante hôte. Ces composés sont appelés métabolites secondaires. Ils sont produits par les endophytes et ont des rôles différents (Deutsch et *al.*, 2021) (**figure 10**). Une facette intéressante de l'interaction entre les endophytes et leurs hôtes est la capacité de nombreux micro-organismes à améliorer la résistance de la plante en lui apportant plusieurs métabolites bioactifs (Gunatilaka, 2006).

Selon Bacon et White(2016), la plante fournit une niche de vie et de la nourriture à l'endophyte, tandis que ce dernier fournit une protection contre les pathogènes et les ravageurs et induit une tolérance aux facteurs abiotiques tels que la sécheresse et la salinité. Plusieurs études ont démontré que les plantes associées à des champignons endophytes ont été plus tolérantes à la sécheresse, à la chaleur, à la toxicité des métaux et à une salinité élevée (Lewis, 2004 ; Rodriguez et *al.* 2009 ; Waller et *al.*, 2005).

Les endophytes utilisent plusieurs mécanismes pour lutter contre les microorganismes phytopathogènes : la production d'antibiotiques, la stimulation des mécanismes de défense de l'hôte, la concurrence pour la nourriture ou les sites de colonisation, et le mycoparasitisme (Cao et *al.*, 2009). Des travaux ont rapporté également que les endophytes possèdent de plus une action nématocide (Martinuz et *al.*, 2012; Mendoza et Sikora, 2009; Sikora et *al.*, 2008).

Les champignons endophytes ont la capacité de fixation de l'azote atmosphérique, la solubilisation des minéraux tel que le phosphore (Bio-fertilisation) et la production des régulateurs de croissance tels que les auxines, les gibbérellines, les cytokinines et l'éthylène (Ahmad et *al.*, 2008). Ils ont aussi un effet direct par la production d'HCN, de sidérophores et des enzymes de lyse cellulaire (Farrar et *al.*, 2014).

Les composés naturels issus d'endophytes fongique dérivés d'algues ont fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières décennies, et plus particulièrement au cours des dix dernières années. Un certain nombre de nouveaux composés ont été isolés et identifiés, avec un large éventail de propriétés biologiques, notamment des activités anticancéreuses,

antibiotiques, antivirales, antioxydantes et inhibitrices ou activatrices de kinases. (Zhanget al., 2016).

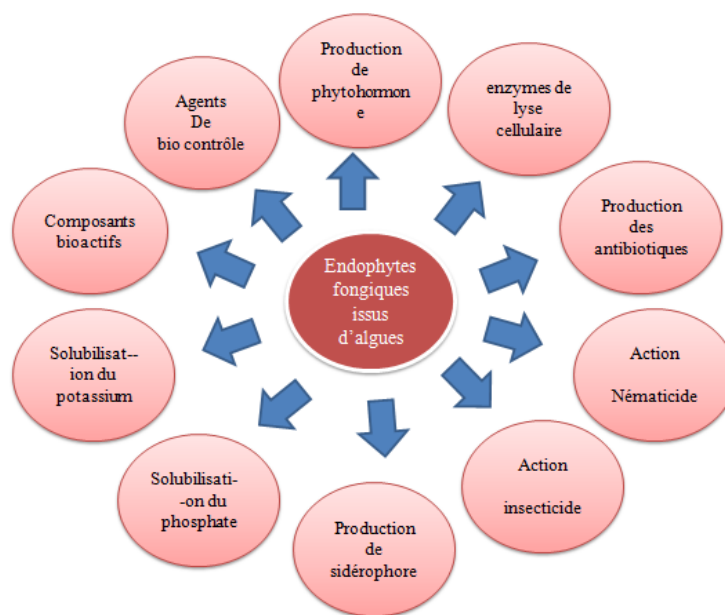


Figure 10 : Les différents applications biologiques des endophytes fongiques issus d'algues marines en agriculture et en biotechnologies (Noorjahan et al, 2021).

II.7 Les endophytes d'algues

Les champignons occupent toutes les niches vivantes et non vivantes de la planète, y compris celles des cheminées thermiques, des sédiments rocheux profonds et des environnements désertiques et marins (Strobel, 2003). Ces champignons endophytes font partie des groupes de champignons inexplorés issus de ces écosystèmes (Dreyfuss et Chapella, 1994). Les champignons endophytes en tant qu'espèces ubiquistes ils ont été obtenus dans pratiquement tous les habitats marins possibles, y compris les plantes marines (algues, bois flotté et plantes de mangrove), les invertébrés marins (éponges, coraux, ascidies et holothuries) et les vertébrés (principalement les poissons). Les algues sont l'une des sources les plus importantes de champignons d'origine marine. (Rateb, 2011).

Les champignons endophytes dérivés d'algues marines ont fait l'objet d'une attention considérable au cours des dernières décennies en raison de leur production importante de métabolites secondaires structurellement variés ayant diverses activités biologiques(Zhang et al., 2016).

Partie

Expérimentale

CHAPITRE III

Matériels et méthodes

III.1 Matériels

III.1.1 Endophytes fongiques

Le matériel utilisé est constitué de 6 souches fongiques endophytes. Ces dernières ont été isolées à partir d'algues marines de la région de Stidia localisée à environ 17 km à l'ouest de la ville de Mostaganem (**figure 11**).

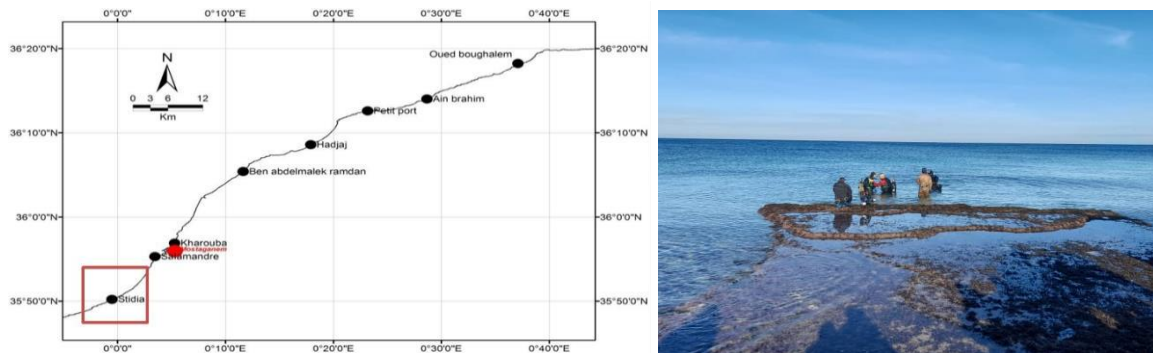


Figure 11: Localisation géographique de la plage de Stidia Mostaganem (station de récolte)

III.1.2 Milieu de culture

Le choix d'un milieu de culture adéquat est indispensable au bon développement des endophytes fongiques. Ainsi, le milieu de culture PDA (**Annexe 1**) assure les meilleures conditions pour l'isolement et la culture de ces derniers.

III.2 Méthodes

III.2.1 Échantillonnage des macroalgues

Les algues ont été collectées d'une manière aléatoire, près du rivage et plus loin jusqu'à 10 mètres de profondeur. Les algues sont triées selon la profondeur de leur échantillonnage. Elles sont mises dans des sacs en plastique contenant l'eau de mer. Ces sacs sont déposés dans des bacs en plastique transparents contenant également l'eau de mer. Les boîtes sont scellées hermétiquement avec un couvercle et transportées rapidement au laboratoire (**figure 12**). À l'aide d'une pompe, de l'air est insufflé dans l'eau ambiante pour garantir la survie des espèces d'algues récoltées jusqu'à l'isolement des endophytes.



Figure 12: Bacs de transport des algues

III.2.2 Isolement des champignons endophytes

Les algues collectées sont soigneusement lavées avec de l'eau de robinet ensuite l'eau distillée stérile, puis découpées en petits fragments. Ces derniers sont désinfectés à l'éthanol 70% pendant 3 secondes par deux prises, après rincés successivement dans 3 bains d'eau distillée stérile.

Les fragments de thalles ainsi stérilisés sont séchés sur papier buvard stérile pour éliminer l'excès d'eau présente sur leur surface (**Figure 13**). On a cultivé 20 fragments pour chaque échantillon d'algue. Ils sont soigneusement déposés en boîte de Pétri (90 mm de diamètre) contenant le PDA additionné d'un antibiotique (chloramphénicol 0,5mg/L). Les cultures sont déposées dans une étuve préalablement réglée à 25 ± 2 °C pour une période de 10 jours. (YNON et al, 2021)



Figure 13: Méthode d'isolement des endophytes fongique (Photo original)

a), Lavage des échantillons d'algues ; b), Séchage des fragments sur papier buvard ; c), Découpe des fragments ; d), Dépôt des fragments sur milieu de culture PDA

La pointe hyphale fongique émergeant de l'extrémité coupée du segment de thalle a été sous-culturée sur milieu de culture PDA. Afin de confirmer l'efficacité de la stérilisation et de vérifier que les isolats provenaient des tissus internes, nous avons prélevé des aliquots à partir de l'eau du troisième lavage que nous avons étalé sur une boîte de Pétri contenant du PDA. L'absence de colonies mycélienne après 10 jours d'incubation indique que les champignons obtenus dans les autres bôites de Pétri sont bien des endophytes. Enfin, les isolats obtenus sont conservés dans un réfrigérateur à 4 °C pour des études ultérieures.

➤ **Le pourcentage de colonisation**

Le pourcentage de colonisation est calculé selon la méthode de Pimentel et al. (2006), en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de colonisation} = \frac{\text{nombre de segments colonisés}}{\text{nombre total des segment}} \times 100$$

III.2.3 Identification des champignons endophytes

Les endophytes fongiques isolés sont cultivés sur un milieu PDA pendant 10 jours. Après cette période, les mycéliums et les spores ont été analysés morphologiquement à l'aide d'un microscope photonique (G=400X). L'identification du genre de champignon endophyte s'est basée sur la clé de Barnett et Hunter (1998). Les critères morphologiques comprennent l'aspect de la cellule, l'aptitude à la filamentation et à la sporulation, l'apparence des cultures en milieu solide.

III.2.4 Screening des champignons endophytes pour la tolérance au sel

(NaCl)

Récemment, des alternatives respectueuses de l'environnement utilisant des micro-organismes de biocontrôle et de bioremédiation (bactéries et champignons) sont largement rapportées pour promouvoir la tolérance des plantes aux stress abiotiques tels que le stress salin.

Les souches fongiques endophytes isolées à partir des différentes espèces d'algues ont été examinées par une étude de leur capacité à conférer une tolérance au sel via des essais « *in vitro* ».

En bref, des explants mycéliens de 5mm de diamètre sont prélevés à partir des colonies de champignons endophytes en pleine croissance mycélienne et âgées de sept jours. Ils sont aseptiquement déposés au centre de la boîte de Pétri (90 mm de diamètre) contenant 20ml du milieu de culture PDA additionné ou non de NaCl (50, 100, 150, 200, 425 mM). Les boîtes sont incubées à l'obscurité pendant 7 jours à 25 °C. selon la méthode de LIU et al (2023).

III.2.4.1 Mesure de la croissance mycélienne

Les croissances mycéliennes notées durant le 3^{ème} et le 7^{ème} jour après l'ensemencement du milieu de culture sont comparées à celles des boîtes de Pétri témoins (sans sel).

La formule suivante a été utilisée pour calculer l'indice de tolérance au sel (STI) :

$$STI = \frac{\text{Diamètre (mm) de la colonie dans un milieu supplémenté en NaCl}}{\text{Diamètre (mm) de la colonie dans le milieu témoin (sans NaCl)}}$$

III.2.4.2 Evaluation de la sporulation

La sporulation de chaque isolat est estimée à partir des cultures âgées de 7 jours. La technique consiste à verser 10ml d'eau distillée stérile sur la colonie du champignon endophyte. La colonie grattée superficiellement à l'aide d'une pipette pasteur effilée sur une flamme d'un bec bunsen pour libérer les conidies présentes. Elle est filtrée à travers une mousseline. Sous microscope optique, à l'aide d'une cellule de Malassez, le nombre de spores présentes dans chaque échantillon est compté.

III.2.5 Screening des souches solubilisant des phosphates inorganiques

Le phosphore est le deuxième élément important pour la croissance des plantes. Il se trouve dans la nature sous forme organique et inorganique. La plante peut absorber le Phosphore sous forme de $H_2PO_4^-$ ou HPO_4^{2-} mais la plus grande partie du Phosphore dans le sol est sous forme de minéraux. Le phosphate forme des complexes avec différents ions métalliques tels que Ca, Al, Zn et Fe, en fonction de la nature et de l'état du sol.

Certains micro-organismes sont les candidats qui peuvent solubiliser le phosphate minéral et le rendent accessible aux plantes par divers mécanismes tels que la sécrétion d'acides organiques de faible poids moléculaire, l'excrétion d'ions H⁺, la synthèse de différentes enzymes, la chélation et l'échange d'ions. Les micro-organismes solubilisent les phosphates insolubles comme le phosphate tricalcique et le phosphate naturel en sécrétant divers acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide céto gluconique, l'acide oxalique, l'acide citrique qui chélatent les cations comme Ca²⁺, Al²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ et détachent la liaison cation-oxygène du phosphate minéral par les groupements hydroxyle et carboxyle ou par la sécrétion d'ions H⁺. L'approvisionnement du sol par des formes solubles de phosphates à travers les moyens biologiques par la voie des champignons et des bactéries solubilisant le phosphate a été rapportée par plusieurs auteurs (Bonjean et Fortin, 2023).

III.2.5.1 Test de dépistage

Les souches sont soumises à un test de dépistage pour prouver leur potentiel de solubilisation du phosphate. Le milieu NBRIP (**Annexe 2**) contenant du DCP a été préparé et versé dans des boîtes de Pétri stériles. Un explant mycélien de 5mm de diamètre est déposé au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu NBRIP. Les boîtes de Pétri sont mises à incuber à 28 °C pendant 5 à 7 jours. Les isolats dont les boîtes présentent un halo autour de la colonie étaient supposés solubiliser les phosphates.

Une zone claire autour d'une colonie en croissance indiquait une solubilisation du phosphate et était mesurée en tant qu'indice de solubilisation du phosphate (PSI). Le PSI a été calculé comme le rapport du diamètre total (colonie + zone de halo) au diamètre de la colonie (Edi-Premono et al., 1996).

$$PSI = \frac{(\text{diamètre de la colonie} + \text{Diamètre de l'halozone})}{\text{Diamètre de la colonie}}$$

Les colonies encerclées par des zones claires solubilisées ont été prélevés et sélectionnées pour estimer la solubilisation des phosphates en milieu liquide.

III.2.5.2 Solubilisation des Phosphates en milieu liquide

Des précultures du champignon ont été préparées pendant 10 jours sur milieu de culture PDA. Un aliquots de 1ml d'une suspension sporale de 10⁶ spores/ml est utilisé pour ensemercer un Erlen Meyer contenant 100ml de milieu NBRIP avec 5g/l de phosphate insoluble testé (DCP).

Dans une enceinte climatisée contrôlée, les cultures sont cultivées en aérobiose à 28 °C, sur un agitateur rotatif à 150 tr/min pendant 12 jours. Les flacons inoculés avec de l'eau distillée stérile ont servi de contrôle.

Après prélèvement toutes les 48 heures dans les conditions stériles, les échantillons collectés ont été centrifugés à 11000 tours/mn pendant 15mn afin d'éliminer les matières en suspension et la fraction mycélienne (**figure14**). (ISLAM, M.K et al 2019)

❖ **Estimation quantitative du phosphate par la méthode de l'acide ascorbique. (Ames BN 1964)**

C'est une méthode colorimétrique utilisée pour le dosage du phosphate. Elle est basée sur la lecture de la densité optique (D.O.).

- Préparation des solutions

1. Solution I : acide ascorbique à 10% (conserver à 4 °C).
2. Solution II : Molybdate d'ammonium ((NH₄)₆.Mo7O₂₄.4H₂O) 0,42% dans H₂SO₄ 1N (prélever 28,6 ml d'H₂SO₄ concentré avec 4,2g de molybdate d'ammonium et compléter 1000 ml avec de l'eau distillée) (conserver à la température ambiante).
3. Solution III : mélanger 1 partie de la solution I à 6 parties de la solution II et conserver dans un bain glacé.

- Mesures du phosphate

1. Introduire successivement un volume de 0,7ml de la solution III et 0,3ml de la solution à analyser ou 0,3 ml d'eau distillée pour le blanc.
2. Incuber le mélange à 45 °C pendant 20 minutes et observer le développement de la couleur.
3. Mesurer la densité optique dans un spectrophotomètre UV-visible (Jenway 6715) à 820nm.
4. Calculer la teneur en phosphore en utilisant une courbe d'étalonnage préparée à l'aide d'une série de solutions à concentrations ascendantes de KH₂PO₄.



Figure 14: Test de solubilisation de phosphate sur milieu liquide (Photo originale, 2023)

III.3 Analyses statistiques

Les mesures des tests de salinité et de la solubilisation sur milieu de culture solide NBRIP ont été réalisées en quinquplicata, tandis que celles de la solubilisation sur milieu liquide NBRIP ont été accomplies en triplicata.

Les données ont été présentées en moyennes \pm SD, évaluées par l'ANOVA bi-factorielle et la comparaison des moyennes par le test de Student-Neumans Keuls ($P<0,05$) montre un effet significatif.

CHAPITRE IV

Résultats & Discussion

IV.1 Résultats

IV.1.1 Les algues collectées et les endophytes isolés

L'isolement des champignons endophytes effectué à partir du thalle algal Sept espèces d'algues spontanées sont collectées de la zone littorale de Stidia (**figure 15 ; Figure 16**). L'identification des algues a été faite au laboratoire des ressources marines de l'université de Mostaganem, en se basant sur de nombreuses clés d'identification taxonomique (Pareira et Neto, 2015) et les sites électroniques (Guiry, etGuiry, 2023. AlgaeBase. ; WoRMS.) (**tableau 3; tableau4**).

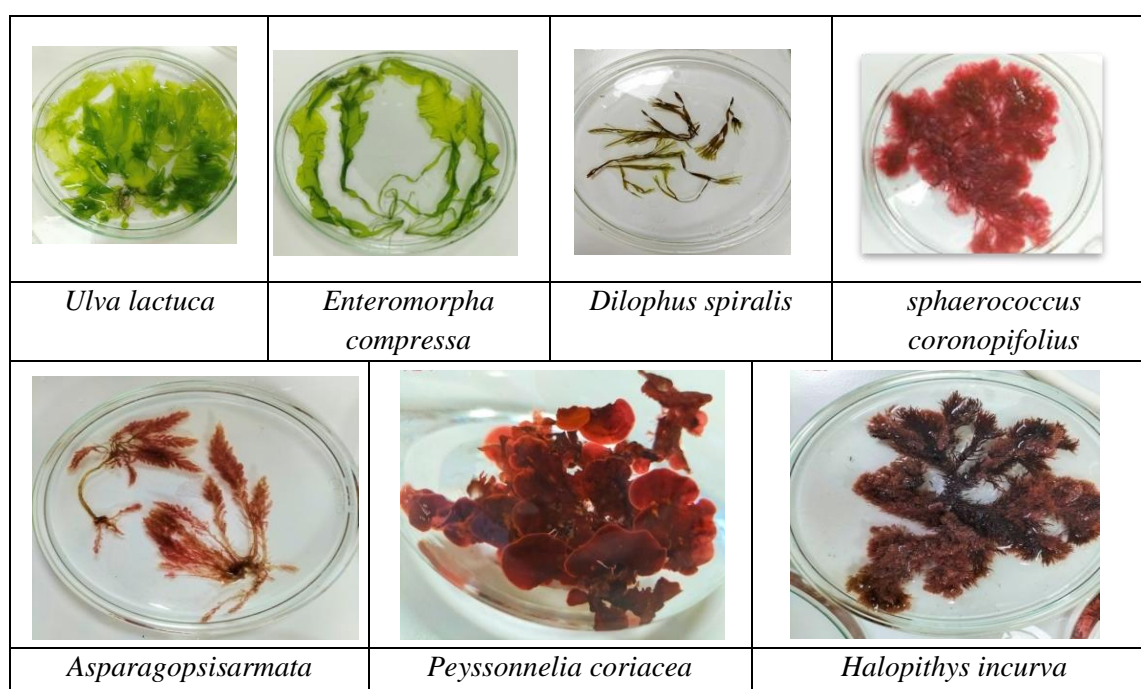


Figure 15: Aspect général du thalle des algues collectées de la zone littorale de Stidia

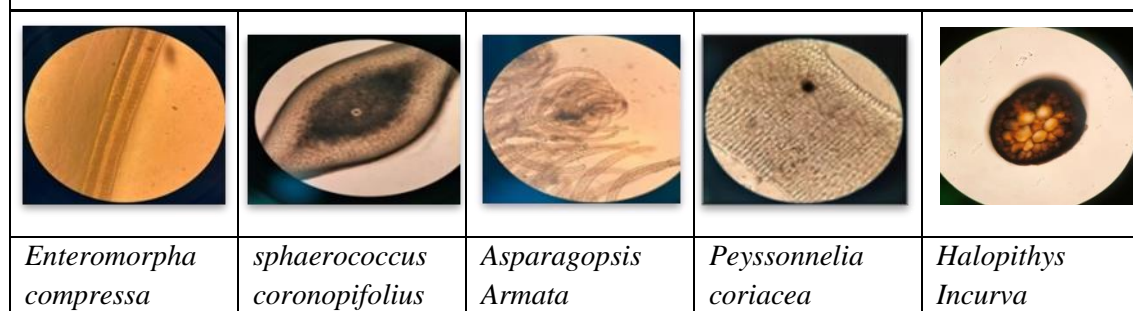


Figure 16: Vue transversale en loupe binoculaire (G400X) du thalle des algues collectées de la zone littorale de Stidia.

Tableau 3 : Classification des algues collectées "Ulva lactuca" _ "Enteromorpha compressa" _ "Dictyota spiralis"

| | | | |
|---------------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Règne: | <u>Plantae</u> | <u>Plantae</u> | Chromista |
| Classe: | <u>Ulvophyceae</u> | <u>Ulvophyceae</u> | Phaeophyceae |
| Ordre: | <u>Ulvales</u> | <u>Ulvales</u> | Dictyotales |
| Famille: | <u>Ulvaceae</u> | <u>Ulvaceae</u> | Dictyotaceae |
| Genre: | <u>Ulva</u> | Enteromorpha | Dictyota |
| Espèce: | <i>Ulva Lactuca</i> | <i>Enteromorpha compressa</i> | <i>Dictyota spiralis</i> |
| Descripteur: | Linnaeus | Linnaeus | Dictyota spiralis Montagne, |
| Année description: | 1753 | 1753 | 1846 |

Tableau 4: Classification des algues collectées "Sphaerococcus coronopifolius" _ "Asparagopsis armata" _ "Peyssonnelia coriacea feldmann" _ "Halopithys incurva"

| | | | | |
|---------------------------|--|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Règne: | Plantae | Plantae | Plantae | Plantae |
| Classe: | Florideophyceae | Florideophyceae | Florideophyceae | Florideophyceae |
| Ordre: | Gigartinales | Bonnemaisoniales | Peyssonneliales | Ceramiales |
| Famille: | Sphaerococcaceae | Bonnemaisoniaceae | Peyssonneliaceae | Rhodomelaceae |
| Genre: | Sphaerococcus | Asparagopsis | Peyssonnelia | Halopithys |
| Espèce: | <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> | <i>Asparagopsis armata</i> | <i>Peyssonnelia coriacea</i> | <i>Halopithys incurva</i> |
| Descripteur: | Sphaerococcus coronopifolius Stackhouse, | Asparagopsis armata Harvey | Peyssonnelia coriacea Feldmann | <i>Halopithys Küzing</i> |
| Année description: | 1797 | 1855 | 1941 | 1843 |

IV.1.1.1 Pourcentage de colonisation des algues par les endophytes

Certaines colonies d'endophytes fongiques sont apparues sur le milieu de culture PDA seulement 3 jours après l'incubation des explants, alors que d'autres ne sont visibles qu'après 10 jours.

Quatre espèces d'algues sur sept hébergent des endophytes, ce qui représente un taux d'infection de 57,1%. Le pourcentage de colonisation des algues par les endophytes varie selon l'espèce d'algue (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Pourcentage (%) de colonisation des algues marines de la cote de Stidia par les endophytes fongiques

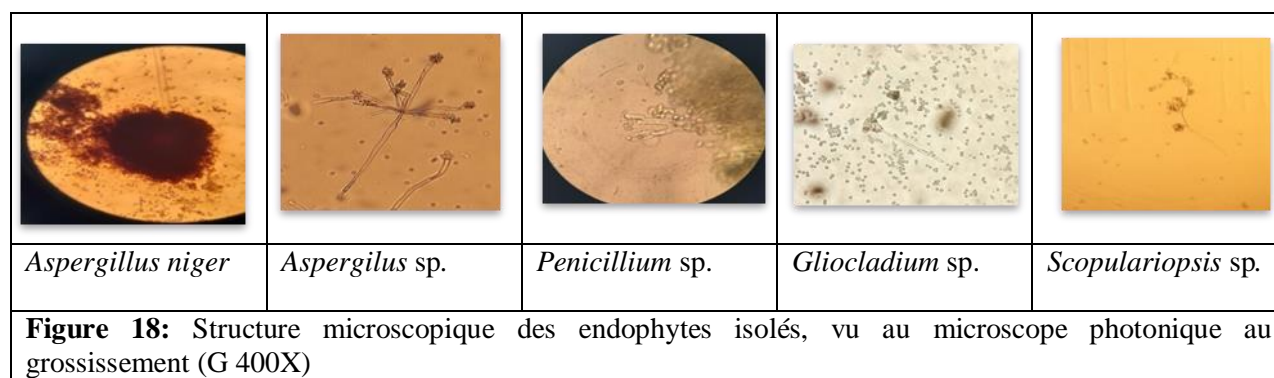
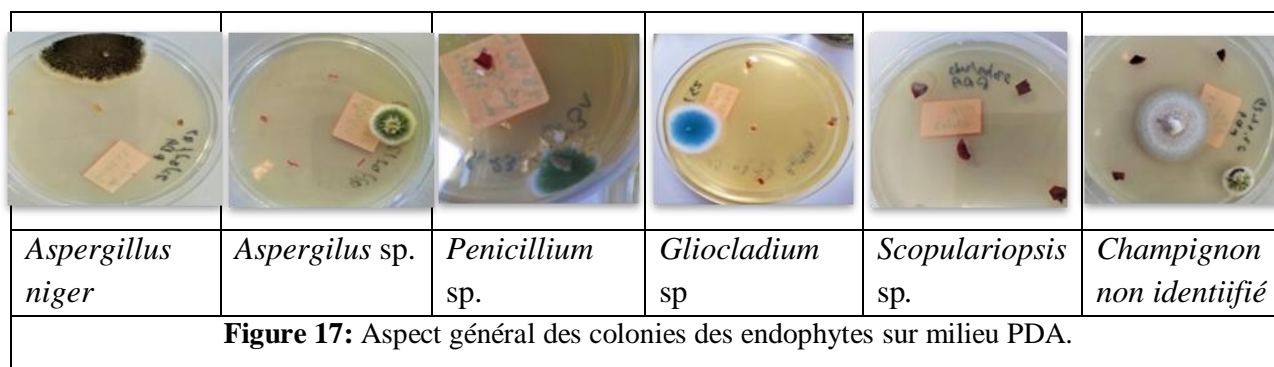
| Espèces d'algues | Le pourcentage de colonisation |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> | 05% |
| <i>Peyssonneliacoriacea</i> | 15% |
| <i>Asparagopsis armata</i> | 05% |
| <i>Dilophus spiralis</i> | 00% |
| <i>Ulva compressa</i> | 00% |
| <i>Ulva lactuca</i> | 00% |
| <i>Halopithys incurva</i> | 05% |

IV.1.1.2 Identification morphologique des endophytes fongiques

Les observations macro et microscopiques de l'ensemble des colonies isolées ont permis d'identifier cinq (05) genres de champignons (**Figure 17, Figure 18, Tableau 6**). Un champignon est resté non identifié en raison de l'absence de production des spores par celui-ci sur milieu PDA. Nous avons utilisé la clé d'identification de Barnett et Hunter (1998).

Tableau 6: Liste des isolats fongiques endophytes isolés à partir d'algues marines de la région de Stidia.

| Isolats | Code de l'isolat | Algue | Endophyte |
|---------|------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 1 | AZ1v | <i>Peyssonneliacoriacea</i> | <i>Penicillium</i> sp. |
| 2 | AZ31 | <i>Halopithys incurva</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
| 3 | AW1 | <i>Asparagopsis armata</i> | <i>Gliocladium</i> sp. |
| 4 | AY1 S | <i>Peyssonneliacoriacea</i> | <i>Scopulariopsis</i> sp. |
| 5 | AY1 O | <i>Peyssonneliacoriacea</i> | Non identifié |
| 6 | AX1 | <i>sphaerococcus coronopifolius</i> | <i>Aspergillus</i> sp. |



Les endophytes fongiques ont testés pour leur tolérance au NaCl et le pouvoir de solubilisation du phosphate inorganique.

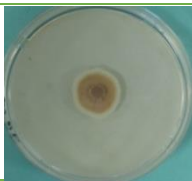


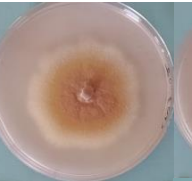
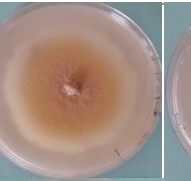
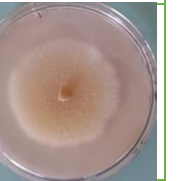
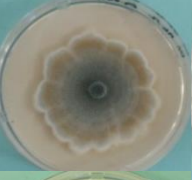

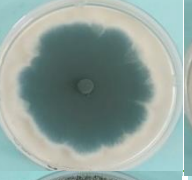
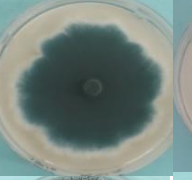
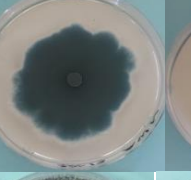

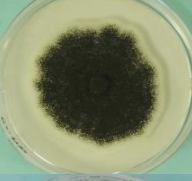
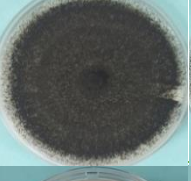

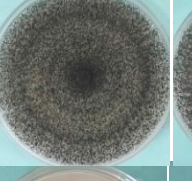
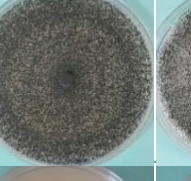







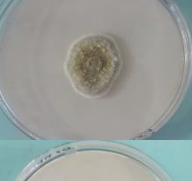
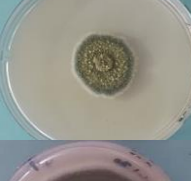
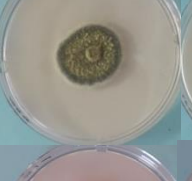
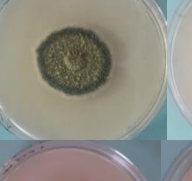

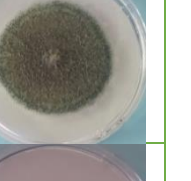






IV.1.2 Test de tolérance au sel

IV.1.2.1 Mesure de la Croissance mycélienne des champignons endophytes cultivés en présence de NaCl

Le test de salinité détermine la tolérance des souches fongiques au stress salin. Cette étude a été réalisée pour étudier la capacité de la tolérance au sel NaCl des endophytes fongiques cultivés sur milieu de culture PDA supplémenté de NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 425mM) à 25 °C. La croissance mycélienne des colonies des champignons endophytes a été notée au 3^{ème} et 7^{ème} jour d'incubation. La croissance mycélienne estimée révèle des disparités significatives. Les isolats ont été comparés entre eux pour trouver les champignons endophytes présentant une excellente croissance mycélienne avec une bonne tolérance au sel. Selon les résultats, les isolats AZ31 et Aw1 ont montré une importante croissance mycélienne en présence de NaCl. L'isolat AZ31 a colonisé tout le diamètre de la boîte de Pétri au bout de 7 jours d'incubation même à 425mM. Par ailleurs, une croissance relativement moins importante a été notée dans le cas des isolats AZ1V, AX1, AY10. L'endophyte AY1S montre une croissance

relativement plus importante par rapport au témoin sans sel et cela au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en NaCl situant ainsi l'optimum de croissance de la colonie de cet isolat à 150mM. La souche *Aspergillus niger* présente une importante croissance mycélienne mais une pigmentation noire moins intense dans les boîtes de Pétri contenant 100mM et plus (**Tableau7, Figure 19, Figure 20**).

Tableau 7: Croissance mycélienne des champignons endophytes sur milieu de culture PDA supplémenté en NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 425) après 7jours d'incubation à 25°C

| Isolat endophyte | Dose de NaCl | | | | | |
|------------------|---|---|---|--|---|---|
| | 0 mM | 50 mM | 100 mM | 150 mM | 200 mM | 425 mM |
| AY1S |  |  |  |  |  |  |
| AW1 |  |  |  |  |  |  |
| AZ31 |  |  |  |  |  |  |
| AY10 |  |  |  |  |  |  |
| AX1 |  |  |  |  |  |  |
| AZ1V |  |  |  |  |  |  |

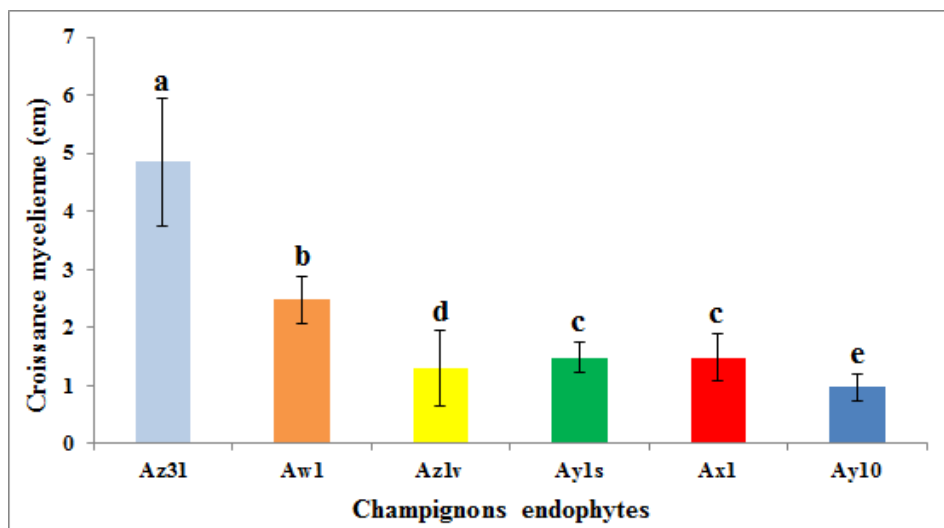


Figure 19: Croissance mycélienne des endophytes après 3 jours d'incubation sur milieu de culture PDA et en présence de différentes concentrations de NaCl.

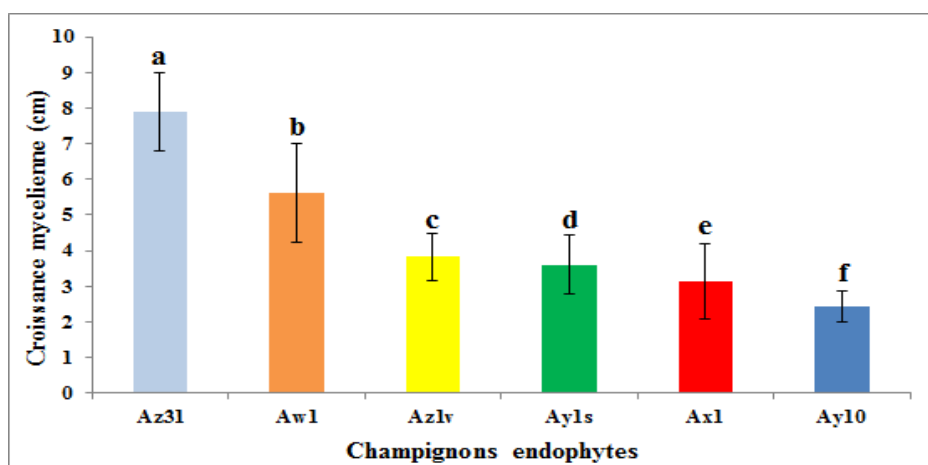


Figure 20: Croissance mycélienne des endophytes après 7 jours d'incubation sur milieu de culture PDA et en présence de différentes concentrations de NaCl.

La croissance mycélienne après 3 jours d'incubation estimée à des concentrations de sel allant de 0 jusqu'à 425mM. Le maximum de croissance de chaque isolat avec sa concentration optimale du NaCl sont dans l'ordre : **AZ31** ($5,82 \pm 0,20a$) à 150mM, **AW1** ($2,82 \pm 0,04d$) à 50mM, **AX1** ($2,24 \pm 0,14f$) à 200mM, **AZ1V** ($1,88 \pm 0,10g$) à 50mM, **AY1S** ($1,71 \pm 0,38ghi$) à 425mM et **AY10** ($1,44 \pm 0,08hij$) à 0mM (**Tableau 8**).

Tableau 8: Croissance mycélienne (cm) des endophytes sur milieu PDA supplémenté en NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 425mM), après 3 jours d'incubation.

| Isolats NaCl(mM) | AZ31 | AW1 | AX1 | AZ1v | AY1S | AY1O |
|---------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| 0 | 2,69±0,21de | 2,39±0,19ef | 1,14±0,13jkl | 1,22±0,18jkl | 1,46±0,25hij | 1,44±0,08hij |
| 50 | 4,48±0,41c | 2,82±0,04d | 1,20±0,07jkl | 1,88±0,10g | 1,22±0,03jkl | 0,92±0,10kl |
| 100 | 5,27±0,15b | 2,73±0,14de | 1,24±0,05jkl | 1,64±0,16ghi | 1,34±0,06ijk | 0,84±0,11l |
| 150 | 5,82±0,20a | 2,72±0,17de | 1,40±0,07hij | 1,20±0,27jkl | 1,51±0,07ghij | 0,82±0,08l |
| 200 | 5,50±0,36b | 2,42±0,15ef | 2,24±0,14f | 0,88±0,17l | 1,66±0,13ghi | 0,92±0,04kl |
| 425 | 5,33±0,46b | 1,78±0,34gh | 1,68±0,08ghi | 0,95±0,16kl | 1,71±0,38ghi | 0,88±0,08l |

Au 7^{ème} jour d'incubation **AZ31** enregistre la valeur de croissance mycélienne la plus élevée (8,40±0,00a) à 100mM, suivie respectivement **AW1** (6,88±0,05b) à 50mM, **AX1** (5,2±0,00cd) à 200mM, **AZ1V** (4,74±0,17ef) à 50mM, **AY1S** (4,52±0,67fg) à 425mM et **AY1O** (3,23±0,04kl) à 0mM d'NaCl (**Tableau 9**).

Tableau 9: Croissance mycélienne (cm) des différents endophytes, sur milieu de culture PDA supplémenté en NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 425= après 7 jours d'incubation

| Isolats NaCl (mM) | AZ31 | AW1 | AX1 | AZ1v | AY1S | AY1O |
|-------------------------|------------|-------------|----------------|--------------|----------------|---------------|
| 0 | 5,52±0,28c | 5,54±0,28c | 2,44±0,28mnopq | 4,22±0,23ghi | 2,65±0,22mnopq | 3,23±0,04kl |
| 50 | 8,24±0,16a | 6,88±0,05b | 2,37±0,09nopq | 4,74±0,17ef | 2,82±0,08lmn | 2,69±0,10mnop |
| 100 | 8,40±0,00a | 6,69±0,15b | 2,36±0,10nopq | 3,91±0,14ij | 3,18±0,23klm | 2,25±0,09opq |
| 150 | 8,40±0,00a | 6,55±0,21b | 2,76±0,05lmno | 3,63±0,25jk | 4,02±0,10hij | 2,17±0,04pq |
| 200 | 8,40±0,00a | 5,07±0,81de | 5,2±0,00cd | 3,58±0,50jk | 4,44±0,18fgh | 2,10±0,13q |
| 425 | 8,40±0,00a | 2,98±0,20lm | 3,6±0,28jk | 2,96±0,61lm | 4,52±0,67fg | 2,16±0,11pq |

Il s'avère d'après ces résultats que l'indice de tolérance au sel (STI) au 3^{ème} jours varie selon l'isolat. L'isolat AZ31 a montré l'indice de tolérance au sel le plus élevé (21.63) à 150 mM de NaCl, tandis que l'STI le plus faible (5.69) a été obtenu avec AY1O à 150mM de NaCl. En revanche, au niveau du 7^{ème} jour le (STI) a changé par rapport au 3^{ème} jour. Les

plus fortes valeurs ont été notées chez AX1 (21,31) tandis que, les plus faibles valeurs ont été indiquées chez AW1 (5,38) (**Tableau 10**).

Tableau 10: Indice de tolérance au sel [STI] de chaque champignon endophyte sur milieu de culture PDA supplémenté en NaCl (mM)

| | Après 3 jours | | | | | Après 7 jours | | | | |
|-------------|---------------|-------|-------|-------|-------|---------------|-------|-------|-------|-------|
| | 50 | 100 | 150 | 200 | 425 | 50 | 100 | 150 | 200 | 425 |
| AZ31 | 16,65 | 19,59 | 21,63 | 20,45 | 19,81 | 14,93 | 15,22 | 15,22 | 15,22 | 15,28 |
| AW1 | 11,8 | 11,42 | 11,38 | 10,12 | 7,44 | 12,42 | 12,07 | 11,82 | 9,15 | 5,38 |
| AZ1V | 15,41 | 13,44 | 9,83 | 7,21 | 7,79 | 11,23 | 9,26 | 8,6 | 8,48 | 7,01 |
| Ay1S | 8,36 | 9,179 | 10,34 | 11,37 | 11,71 | 10,64 | 12 | 15,17 | 16,75 | 17,06 |
| AX1 | 10,53 | 10,88 | 12,28 | 19,65 | 14,74 | 9,72 | 9,67 | 11,31 | 21,31 | 14,75 |
| AY1O | 6,39 | 5,83 | 5,69 | 6,39 | 6,11 | 8,33 | 6,96 | 6,72 | 6,5 | 6,69 |

IV.1.2.2 Estimation de la sporulation

Les résultats de la sporulation observés pour les isolats fongiques cultivés à une température constante de 25 °C sur des milieu de culture PDA supplémenté en sel NaCl (0, 50, 100, 150, 200 mM) révèlent des disparités significatives. En effet, l'isolat Aw1 se distingue par sa plus grande abondance en spores par rapport aux isolats Az31 et Az1v, soit $61,28 \times 10^6$ contre $41,27 \times 10^6$ spores/ml et $22,24 \times 10^6$ spores/ml respectivement. En contraste, les isolats Ay1s et Ax1 n'ont généré que $3,79 \times 10^6$ et $3,26 \times 10^6$ spores/ml, démontrant ainsi un taux de sporulation nettement inférieur (**Figure21, Tableau 11**).

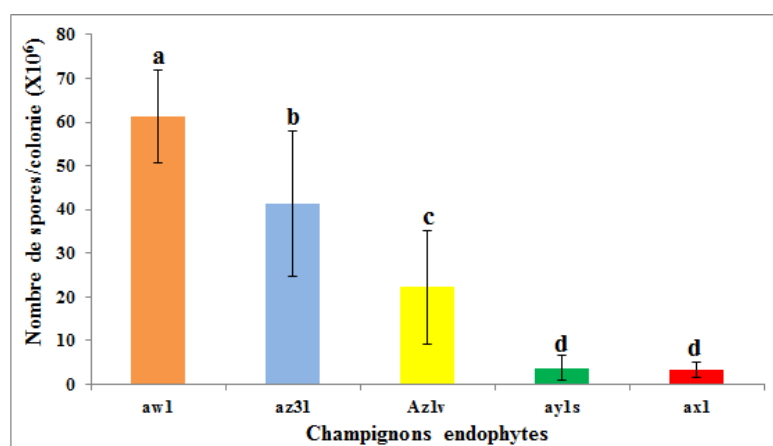


Figure 21: sporulation des champignons endophytes sur milieu de culture PDA en présence de NaCl (0, 50, 100, 150, 200mM).

Tableau 11: Sporulation ($\times 10^6$ spores/ml) des différents endophytes, sur milieux de cultures salés (NaCl=0, 50, 100, 150, 200mM), après 7 jours d'incubation

| Isolats endophytes | | | | | |
|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|--------------|--------------|
| NaCl (mM) | Aw1 | AZ3 1 | AZ1v | Ay1S | AX1 |
| 0 | 54,246±32,11abcde | 38,871±19,96bcde | 9,255±2,58fg | 0,375±0,35g | 0,926±0,46g |
| 50 | 79,466±22,89a | 45,52±28,37bcde | 26,791±19,93defg | 2,262±1,42fg | 3,57±0,58fg |
| 100 | 62,92±27,78abc | 21,263±5,58efg | 41,233±6,29bcdefg | 2,893±2,48fg | 2,262±1,06fg |
| 150 | 59,16±27,20abcd | 68,507±22,69ab | 25,434±11,90defg | 8,114±1,64fg | 4,658±2,01fg |
| 200 | 50,606±36,46abcde | 32,18±14,54cdefg | 8,466±4,22fg | 5,328±2,37fg | 5,188±4,49fg |

Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$).

IV.1.3 Effet des champignons endophytes sur la solubilisation du phosphore

IV.1.3.1 Solubilisation qualitative du phosphate

En utilisant le phosphate dicalcique comme substrat, trois isolats sur six ont montré une significative solubilisation du phosphate dicalcique sur milieu NBRIP. Il s'agit des isolats Aw1, AZ31 et AZ1v (**tableau12**). L'indice de solubilisation du phosphate (PSI) varie du 0 à 3.59. L'isolat AZ1V a produit le PSI le plus élevé (3.59) dans le 5^{ème} jours, tandis que l'PSI le plus faible (2) a été obtenu avec AW1 (**tableau13**).

Tableau 12: Solubilisation du phosphate in vitro en milieu solide par 3 isolats fongiques

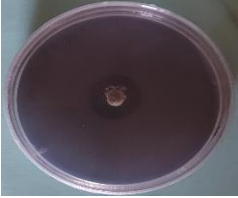


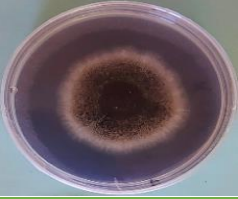
| Isolats | 2 jours | 5 jours |
|---------|---|--|
| AZ1v |  |  |
| AZ31 |  |  |



Tableau 13: Indice de solubilisation de phosphate dicalcique (Test réaliser sur boîte de Pétri).

| Isolat | 2 Jours | 5 Jours |
|--------------|---------|---------|
| AZ1 v | 3,487 | 3,597 |
| AZ3 1 | 2,302 | 2,502 |
| AW1 | 0 | 2,3 |

IV.1.3.2 Solubilisation quantitative du phosphate

La solubilisation du phosphate par les champignons isolés a été analysée dans le milieu de bouillon NBRIP en utilisant un substrat de composé phosphaté récalcitrant (CaHPO_4). La capacité de solubilisation du P des isolats fongiques variait en fonction de la période d'incubation. La meilleure période d'observation a été choisie en fonction de leur solubilisation moyenne du P, soit 12 jours (**tableau 14**).

Tableau 14: Sélection de la meilleure période de solubilisation du phosphate (mg/l) par les isolats fongiques.

| Champignon | Après 6 jours | Après 8 jours | Après 10 jours | Après 12 jours |
|-------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| AW1 | 39,976±6,363 | 54,007±1,172* | 53,224±1,592 | 46,561±5,359 |
| AZ31 | 44,954±5,428 | 53,106±1,432* | 48,991±8,689 | 52,236±1,937 |
| AZ1V | 46,443±2,642 | 47,893±1,894 | 52,126±1,158* | 48,912±1,46 |

L'Astérix indique le jour de solubilisation le plus élevé.

Le taux de solubilisation du phosphate augmente avec le temps. Une forte corrélation a été observée entre la dose de phosphate solubilisée et le temps (**figure 22**). Une forte corrélation positive a été observée et le coefficient de corrélation R est de 0,99.

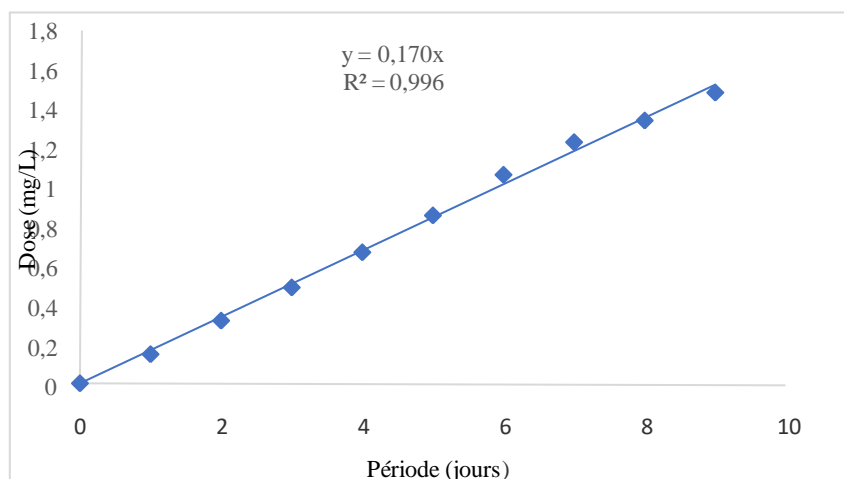


Figure 22: Courbe de régression de détermination du phosphate soluble en fonction du temps, sur milieu de culture supplémenté de phosphate dicalcique inculé avec 3 isolats fongiques

IV.2 Discussion

Plusieurs études ont montré des variations de la diversité endophytique selon le genre hôte des algues (Suryanarayanan et al., 2010; Flewelling et al. 2013a,b). selon les travaux de Deutsch et al. (2021), l'isolement a été négatif avec les espèces *ulva lactuca* et *enteromorpha compressa*. Nos travaux confirment les travaux de ces derniers auteurs puisque les isollements que nous avons effectués à partir de ces mêmes espèces n'ont pas révélé la présence des endophytes.

Six isolats endophytes fongiques ont été isolés à partir d'algues marines de la côte de Stidia, dans la région de Mostaganem. Ces isolats appartiennent au genre *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Gliocladium*, et *Penicillium*.

Les isolats appartenant aux genres *Aspergillus* sp et *Penicillium* sp. se sont avérés extrêmement tolérants au sel ceci est d'abord démontré par leur croissance à une concentration égale à 425mM de NaCl. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Gund-Cimerman et al. (2002) révélant que des endophytes fongiques vivant dans des environnements contenant des concentrations de 15 à 332 % de NaCl, où jusqu'ici on a supposé que seules des bactéries pouvaient s'y développer. Par ailleurs, Kispapo et al. (2003) ont rapporté l'existence de certaines espèces de champignons filamenteux dans la mer morte où le taux de NaCl atteint 340 g/l. Mohamed Mahmoud (2017) a montré que certaines souches appartenant au genre *Fusarium* sp. et à l'espèce *Aspergillus terreus* isolés à partir des

racines du palmier dattier peuvent résister et croître dans le milieu PDA additionné de 75g/l de NaCl. Cette croissance dépasse largement leurs témoins respectifs.

Mansouri et Ouzzani (2017) ont montré que toutes les souches testées (*Penicillium* sp. AA197; *Alternaria* sp. AA1157; *Botryosphaeria* sp. AA112; *Botryosphaeria* sp. AA1101; *Alternaria* sp. BA125; *Botryosphaeria* sp. BA1510; *Fusarium* sp. BA327; *Fusarium* sp. IA2610; *Fusarium* sp. IA2710; *Aspergillus* sp. IA195; *Curvularia* sp. IA185; *Botryosphaeria* sp. IR165) sur le milieu PDB se sont bien développées à une concentration de 15g/l de NaCl. Galinski (1993) a classé les champignons selon leurs adaptations à différentes concentrations de NaCl. Ainsi, les souches appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, ainsi qu'à la famille des *Botryosphaeria* sont des tolérants extrêmes à cause de leur croissance à une concentration égale à 75g/l de NaCl.

Selon Bennaïm (2020), les 2 champignons endophytes *Penicillium minioluteum* LHL09 et *Penicillium funiculosum* LHL06 isolés à partir de *Glycine max* L. (soja) améliorent la croissance de leur plante hôte en régulant la biosynthèse des hormones et des flavonoïdes (Khan et al., 2011a). Il a été signalé aussi que le champignon endophyte du concombre *Exophiala* sp. LHL08 contribue dans la tolérance de la salinité par l'augmentation de la teneur en acide salicylique (Khan et al., 2011b).

Par ailleurs, Mendes et al. (2014) ont rapporté que les genres les plus dominants parmi les champignons endophytes solubilisant les phosphates étaient *Aspergillus*, *Penicillium* et *Talaromyces*. Islam et al. (2019) ont rapporté *Aspergillus niger*, *Aspergillus floccosus*, *Aspergillus niveus*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium* sp. Et *Talaromyces pinophilus*. Cependant, il existe de grandes variations dans les capacités de solubilisation du phosphate parmi les espèces fongiques (Barrooso et al., 2006).

Dans la présente étude, *Aspergillus niger* a montré d'excellentes capacités de solubilisation du phosphore. Islam et al. (2019) ont obtenu des niveaux de solubilisation élevés pour *Aspergillus niger*, suivi de *Penicillium* sp. et *Talaromyces pinophilus*. Selon ces mêmes auteurs, les capacités de solubilisation des phosphates d'*Aspergillus niger* est une propriété universelle.

Parmi les champignons filamenteux *Aspergillus* spp. sont largement utilisés pour la production d'aliments fermentés, des acides organiques et des enzymes (Wongwicharn et al., 1999). *Aspergillus niger* a une longue histoire dans l'utilisation industrielle. Cette espèce est

utilisée pour la production commerciale d'enzymes, e.g. pectinase, glucose oxidase, glucoamylase, hemicellulase, glucanases, acide protéinase, catalase (Liu et al., 1999 ; Lee et al., 1989). Et l'acide citrique (Friedrich et al., 1989).

Il est intéressant de noter qu'après *A. niger*, *Penicillium sp.* a montré également une excellente capacité de solubilisation du phosphate par l'halo de solubilisation.

Conclusion et perspectives

Dans cette étude des isolements mycologiques ont été effectués à partir des algues marines de la zone côtière de Stidia. Les isolements effectués à partir de *Ulva lactuca*, *Enteromorpha compressa* et *Dilophus spiralis* se sont révélés infructueux. En effet, aucun endophyte fongique n'a été obtenu. En revanche, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Peyssonnelia coriacea* et *Asparagopsis armata* ont permis d'obtenir 6 espèces d'endophytes avec un taux d'isolement variant entre 5 et 15%.

Les isolats identifiés morphologiquement appartiennent tous au phylum des *Ascomycota*, incluant les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Gliocladium* et *Scopulariopsis*.

Le pouvoir de tolérance des endophytes à la salinité ainsi que leur capacité à solubiliser le phosphore a été étudié. Pour ce faire, leurs colonies, cultivées sur milieu PDA, ont été confrontées à six concentrations de NaCl (0, 50, 100, 150, 200 et 425mM). Les endophytes montrent une bonne croissance ainsi qu'un pouvoir élevé de sporulation, à des degrés différents, en présence de fortes concentrations de NaCl allant jusqu'à 425mM. Ceci révèle une adaptation au stress salin.

Les isolats ayant montré une efficacité de solubilisation par le test de screening sur milieu solide (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Gliocladium* sp.) ont été sélectionnés pour tester leurs aptitudes à solubiliser le phosphore, *in vitro*, en milieu liquide. Ces derniers ont montré un excellent pouvoir solubilisant du phosphore dicalcique. Ces souches, de ce fait, pourront être un moyen biologique alternatif aux engrais chimiques. Leur application est une approche respectueuse de l'environnement dans le système de l'agriculture durable.

Le présent travail, ouvre des perspectives de recherches :

- Une extension de la zone de collecte d'échantillons sur le littoral algérien ;
- Identification moléculaire des souches isolées ;
- Tester l'adaptation des endophytes au stress salin et leur pouvoir à solubiliser le phosphore *in vivo* et *in situ* en menant des recherches sur quelques espèces de cultures stratégiques ;
- Tester l'effet antagoniste de ces néophytes sur des champignons phytopathogènes ;
- Etudier l'effet de ces endophytes sur plusieurs éléments nutritifs essentiels aux cultures.

Bibliographique

- **Ahmad, F., Ahmad, I., Aquil, F., Khan, M.S., Hayat, S., 2008.** Diversity and potential of non-symbiotic diazotrophic bacteria in promoting plant growth. In: Plant- Bacteria Interactions (Ahmad, I., Pichtel, J. and Hayat, S.), ed., 81-82.
- **Ali, R., Gul, H., Hamayun, M., Rauf, M., Iqbal, A., Hussain, A., Lee, I.J., . (2022).** Endophytic Fungi Controls the Physicochemical Status of Maize Crop under Salt Stress. Polish Journal of Environmental Studies, 31(1), 561-573.
- **Ames, B.N., 1966.** Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. Methods in Enzymology, 8, 115-118.
- **Arnold, A.E., 2007.** Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biology Reviews 21, 51–66. *Aspergillus candidus*. Journal of Infection 51 : e195–e197.
- **Arnold, A.E., Lutzoni, F., 2007.** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots Ecology 88:541–549
- **Bacon, C.W., White, J.F., 2000.** Microbial Endophytes. Marcel Dekker, New York, USA.
- **Bacon, C.W., White, J.F., 2016.** Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. Symbiosis 68:87–98. doi: 10.1007/s13199-015-0350-2
- **Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B.D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K.H., Schäfer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., Skoczowski, A., 2008.** Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. N. Phytol. 180, 501–510.
- **Bennaim, O., Daifallah, F., 2020.** Champignons endophytes: un puissant agent de lutte biologique et un réservoir de métabolites secondaires bioactifs (Doctoral dissertation).
- **Boronin, A.M., 1998.** Rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas* enabling plant growth and development, Sorovsky Educ. Mag. 10 (1998) 25–31.
- **Bothwell, John., 2023.** Seaweeds of the World: A Guide to Every Publisher: Princeton University Press.
- **CACHAN, P., MANGENOT, G., 1997.** « SYMBIOSE », Encyclopædia Universalis

- **Cao, R., Liu, X., Gao, K., Mendgen, K., Kang, Z., Gao, J., Dai, Y., Wang X. 2009.** Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soil borne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology* 59: 584-592.
- **Dawar, S., Dias, D.A., Yasmeen, R., 2022.**Scrutinizing the application of saline endophyte to enhance salt tolerance in rice and maize plants. *Front. Plant Sci.* 12,770084.
- **Deutsch, Y., Gur, L., Frank, I.B., Ezra, D., 2021.**EndophytesFrom Algae, a Potential Source for New Biologically Active Metabolites for Disease Management in Aquaculture *Front Mar. Sci.* 8:636636.doi: 10.3389/fmars.2021.636636
- **Dreyfuss,MM.,Chapela, IH., 1994.** Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. *Biotechnology.* 1994; 26: 49-80.Editors Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture.
- **Edi-Premono, M., Moawad, A.M. and Vleck, P.L.G.,1996** Effect of Phosphate Solubilizing *Pseudomonas Putida* on the Growth of Maize and Its Survival in the Rhizosphere. *Indonesian Journal of Crop Science*, 11, 13.
- **Farrar, K., Bryant, D., Cope-Selby, N., 2014.** Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnology Journal.*, 12: 1193-1206.
- **Fleurence, J., 2022.** Les algues en agrobiologie Bilan et perspectives, Université de Nantes, France.
- **Flewelling, A. J., Ellsworth, K. T., Sanford, J., Forward, E., Johnson, J. A., Gray, C. A. 2013 a.** Macroalgal endophytes from the atlantic coast of Canada: a potential source of antibiotic natural products *Microorganisms* 1, 175–187.
doi: microorganisms 1010175
- **Flewelling, A. J., Johnson, J. A., Gray, C. A. 2013 b.** Isolation and bioassay screening of fungal endophytes from North Atlantic marine macroalgae. *Bot.Mar.* 56, 287–297.
doi: 10.1515/bot-2012-0224
- **Gallardo,T., 2015.**Marine Algae: General Aspects (Biology,Systematics,Field and Laboratory Techniques).In *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology.* Pereira,L., Patricio, J., Neto, M.J(Eds)398 pages
- **Gallery, R.E., Dalling, J.W., Arnold A.E., 2007.** Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with *Cecropia*. *Ecology* 88: 582-588.

- **Gupta, S., Schillaci, M., Walker, R., Smith, P.M.C., Watt, M., Roessner, U., 2021.** Alleviation of salinity stress in plants by endophytic plant-fungal symbiosis: Current knowledge, perspectives and future directions. *Plant and Soil*, 461, 219-244.
- **Hammami, H., Baptista, P., Martins, F., Gomes, T., Abdelly, C., Mahmoud, O.M.B., 2016.** Impact of a natural soil salinity gradient on fungal endophytes in wild barley (*Hordeum maritimum* With.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 184.
- **Harley, C.D.G., Anderson, K.M., Demes, K.W., Jorve, J.P., Kordas, R.L., Coyle, T.A., 2012.** Effects of climate change on global seaweed communities. *Journal of Phycology* 48: 1064–1078.
- **Hawksworth, D.L., 2004.** Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology* 50: 9–18.
- **Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R.T., Hacquard, S., Kracher, B., Neumann, U., Ramírez, D., Bucher, M., O'Connell, R.J., Schulze-Lefert, P., 2016.** Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell* 2016, 165, p. 464–474.
- **Huckelhoven, R., Neumann, C., von, W.D., Franken, P., 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.
- **Islam .M.K., Sano, A., Majumder, M.S.I., Houssain, M.A., Sakagami, J.-I., 2019** Isolation and Molecular characterization of phosphate solubilisation filamentous fungi from subtropical soils in Okinawa
- **Jha, Y., Subramanian, R.B., Patel, S., 2011.** Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. *Acta Physiol. Plant.* 33, 797–802.
- **Khatri, K., Rathore, M.S., 2019.** Photosystem photochemistry, prompt and delayed fluorescence, photosynthetic responses and electron flow in tobacco under drought and salt stress. *Photosynthetica* 57 (1), 61–74.
- **Lata, R., Chowdhury, C., Gond, S.K., White, J.F., 2018.** Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Lett. Appl. Microbiol.* 66, 268–276.
- **Lee, I.J., 2021.** *Aspergillus awamori* ameliorates the physicochemical characteristics and mineral profile of mung bean under salt stress. *Chem. Biol. Technol.* 8, 1–13.

- **Lewis, G.C., 2004.** Effect of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Annals of Applied Biology*; 144: 53-63.
- **Libbal, L., 2021.** Isolement et caractérisation des champignons filamenteux endophytes contribuant à la tolérance des espèces cultivées à la salinité.
- **Litter, M.M., Litter, D.S., Blair, S.F., Norris, J.N., 1986.** Deep-water plant communities from an uncharted seamount off San Salvador Island, Bahamas: distribution, abundance, and primary productivity. *Deep-Sea Research Part A Oceanographic Research Papers*33: 881–892.
- **Lüning, K., 1990.** Seaweeds, Their Environment, Biogeography and Ecophysiology. Wiley & Sons, New York.
- **Liu, Z., Xu, N., Pang, Q., Khan, R.A.A., Xu, Q., Wu, C., Liu, T., 2023** A Salt-Tolerant Strain of *Trichoderma longibrachiatum* HL167 Is Effective in Alleviating Salt Stress, Promoting Plant Growth, and Managing Fusarium Wilt Disease in Cowpea
- **Manjunatha, N., Manjunatha, N., Li, H., Sivasithamparam, K., Jones, M.G.K., Edwards, I., Wylie, S.J., Agarrwal, R., 2022.** Fungal endophytes from salt-adapted plants confer salt tolerance and promote growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) at early seedling stage. *Microbiology* 168, 001225.
- **Martinuz, A., Schouten, A., Menjivar, R.D., Sikora, R.A., 2012.** Effectiveness of systemic resistance toward *Aphis gossypii* (Hom., *Aphididae*) as induced by combined applications of the endophytes *Fusarium oxysporum* Fo162 and *Rhizobium etli*G12. *Biological Control.*, 62:206-212.
- **Mendoza, A.R., Sikora, R.A., 2009.** Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *Biocontrol.*, 54:263-272.
- **Moricca, S., Ragazzi A., 2008.** Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* 98: 380-386. *Nat Prod Rep* 2011; 28: 290–344
- **Murphy, J. and Riley, J.P. 1962** A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36.
- **Pal, K.K., Dey, R., Sherathia, D.N., Devidayal, Mangalassery, S., Kumar, A., Rupapara, R.B., Mandaliya, M., Rawal, P., Bhadania, R.A., Thomas, M., Patel, M.B., Maida, P., Nawade, B.D., Ahmad, S., Dash, P., Radhakrishnan, T., 2021.** Alleviation of salinity stress in peanut by application of endophytic bacteria. *Front. Microbiol.* 12, 650771.

- **Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., Kaushik, S., 2017.** Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, in edition.
- **Patel, J., Mishra, A ., 2021.** Plant aquaporins alleviate drought tolerance in plants by modulating cellular biochemistry, root-architecture, and photosynthesis. *Physiol. Plant* 172 (2), 1030–1044.
- **Pereira, L., & Neto, J.M., 2014.** *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology* (1st ed.). CRC Press.
- **Pérez Corona, M.E., Van Der Klundert, I., Verhoeven, J.T.A., 1996.** Availability of organic and inorganic phosphorus compounds as phosphorus sources for carex species, *New Phytol.* 133: 225–231.
- **Porras-Alfaro, A., & Bayman, P., 2011.** Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual review of phytopathology* 49, 291-315.
- **Pundarikakshudu, R., 1989.** Studies of the phosphate dynamics in a vertisol in relation to the yield and nutrient uptake of rainfed cotton, *Exp. Agric.* 25 (1989) 39–45.
- **Ramos, E., Juanes, J.A., Galván, C., Neto, J.M., Melo, R., Pedersen, A., Scanlan, C., Wilkes, R., van den Bergh, E., Blomqvist, M., Karup, H.P., Heiber, W., Reitsma, J. M.C., 2012.** Coastal waters classification based on physical attributes along the NE Atlantic region. An approach for rocky macroalgae potential distribution. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 112, 105-114.
- **Rateb, M.E., Ebel, R., 2011.** Secondary metabolites of fungi from marine habitats.
- **Rodriguez, R.J., White Jr, J.F., Arnold, A.E., Redman, R.S., 2009.** Fungal endophytes : diversity and Functional roles. *New phytologist.* Vol (182) : 314-330.
- **Roland, J.C., Bouteau, H.E.M., Bouteau, F., 2008.** *Atlas biologie végétale 1. Organisation des plantes sans fleurs, algues et champignons* (Sciences Sup, 7^o Ed.)
- **Saikkonen, K., Helander, M., Faeth, S.H., 2004.** Fungal endophytes: hich- hikers of the green world. In: Gillings M. and Holmes A. J. (Eds). *Plant microbiology.* Garland Science; pp. 81-101.
- **Saikkonen, K., Wali, P., Helander, M., Faeth, S.H., 2004.** Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science.* 9, 275–280.
- **Schulz, B., & Boyle, C., 2005.** The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661-686.
- **Selosse, M.A., & Schardl, C.L., 2007.** Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission An evolutionary perspective. *New Phytologist* 173: 452-458.

- **Sénéquier-crozet, A., Canard, B., 2016.** Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. Science pharmaceutique .Dumas-01266084.
- **Siddiqui, Z.S., Wei, X., Umar, M., Abideen, Z., Zulfiqar, F., Chen, J., Hanif, A., Dawar ,S., Dias, D. A., Yasmeen , R., 2022.**Scrutinizing the application of saline endophyte to enhance salt tolerance in rice and maize plants. Frontiers in Plant Science, 12, 770084.
- **Sikora, R.A., Pocasangre, L., ZumFelde, A., Niere, B., Vu, T.T., Dababat, A.A., 2008.** Mutualistic endophytic fungi and *in planta* suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control.*, 46:15-23.
- **Smith, S.E., & Read D.J.,2010.** Mycorrhizal symbiosis. 2nd ed. Academic Press, London, UK.
- **Staniek, A, Woerdenbag, H.J., Kayser, O., 2008.**Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. J. Plant Interact, 3: 75–93.
- **Stone, J.K., Polishook, J.D., White, J.F., 2004.**Endophytic fungi. In: Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods (Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S., eds). Elsevier Academic Press, San Diego, USA. pp. 241-270.
- **Strobel, G., & Daisy, B., 2003.** Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67: 491-502.
- **Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. Harper, J., 2004.** Natural products from endophytic microorganisms. Journal of Natural Products **67**: 257-268.
- **Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Geetha, V., 2010.** Internal mycobiota of marine macroalgae from the Tamilnadu coast: distribution, diversity and biotechnological potential. Bot. Mar. 53, 457–468. doi : 10.1515/BOT.2010.045
- **Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T.,2005.** The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102(38), 13386-13391.
- **Wang,Y., Dai,C.C.,2011.**Endophytes :a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. Annals of microbiology 61, 207-215.
- **Whitelaw, M.A., 2000** Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi, Advances in Agronomy.69, 99-151.doi: 10.1016/S0065-2113(08)60948-7.

- **Wilkes, R., Van Den Bergh, E., Gall, EA.,Melo, R., 2014.** Biological validation of physical coastal waters classification along the NE Atlantic region based on rocky macroalgae distribution. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (in press).doi: 10.1016/j.ecss.2014.05.036.
- **Xie, Y., Han, S., Li, X., Amombo, E., Fu, J., 2017.** Amelioration of salt stress on Bermudagrass by the Fungus *Aspergillus aculeatus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*,30 (3), Doi: 10.1094/MPMI-12-16-0263-R .
- **Ximenes, MC.,Silió, A., Méndez, F., González, B., 2012.** Coastal waters classification based on physical attributes along the NE Atlantic region. An approach for rocky macroalgae potential distribution. *Estuarine, Coastal & Shelf Science* 112: 105–114.
- **Yadav, A.N.,Mishra, S., Kour, D.,Yadav, N., Kumar, A., 2021.**Algal-Derived Endophytic Fungi: Chemical Diversity and Biological Activity 2016 *Planta Med* 2016; 82(09/10): 832-842
- **Ynon, D., Lior, G., Ilana, B. F. and David, E., 2021.** Endophytes From Algae, a Potential Source for New Biologically Active Metabolites for Disease Management in Aquaculture
- **Zabalgozcoa, I., 2008.** Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 138-146.
- **Zhang, P., Li, X.,Wang,B.G.,2016.**Secondary Metabolites from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungi: Chemical Diversity and Biological Activity. *Planta Med.* 2016 Jun; 82 (9-10):832-42.

Annexes

Annexe 1

Tableau 1 : Composition du milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

| Produit chimiques | Quantité |
|--------------------------|-----------------|
| Poudre de PDA | 39g |
| Eau distilé | 1000ml |

Annexe 2

Tableau 2 : Composition du milieu de culture NBRIP

| Produit chimique | Quantité |
|---|-----------------------|
| Glucose | 10 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,1 g |
| KCl | 0,1 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,25 g |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0,25 g |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 5 g |
| Qsp | 1000 ml eau distillée |