

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955- سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences biologiques

Spécialité: Microbiologie appliquée

Intitulé :

Etude des activités antioxydantes et antifongiques des champignons endophytes de l'Olivier sauvage et de leurs métabolites secondaires contre *Rhizoctonia solani* de pomme de terre

Présenté Par :

- Djeghader Selma
- Laouar amani
- Telilani Aya
- Zouari Rania

Membre de Jury:

| | | |
|---------------------------|--------------|-----------------------------|
| Pr. Zaidi N. (Professeur) | Présidente | Univ. 20 Août 1955 – Skikda |
| Dr. Laib I. (M.C.A) | Promotrice | Univ. 20 Août 1955 – Skikda |
| Dr. Boucetta S. (M.C.A) | Examinatrice | Univ. 20 Août 1955– Skikda |

Année universitaire 2023/2024

Remerciement

Tout d'abord, il convient d'exprimer une profonde gratitude à Dieu Tout-Puissant pour avoir accordé la force, la sagesse et la persévérance nécessaires à la réalisation de ce mémoire.

Sa Guidance et Ses bénédictions ont été une source constante d'inspiration et de réconfort.

Ensuite, des remerciements sincères sont adressés à l'encadreur, Dr Laib Imen. Son soutien indéfectible, ses conseils avisés et sa patience ont été d'une aide précieuse tout au long de ce parcours. Son expertise et son dévouement ont considérablement enrichi ce travail. La confiance qu'elle a témoignée a permis de progresser et d'atteindre les objectifs fixés.

Le président du jury Pr. Zaidi N. qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.

À Dr. Boucetta S. pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons également à remercier nos familles pour leurs aide, soutien moral et leurs Encouragements tout au long de nos années d'études, « que Dieu les protège».

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont Participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

À ma famille,

Pour votre soutien indéfectible, votre amour inconditionnel et vos encouragements constants qui ont été ma source de force tout au long de ce parcours académique.

À mon encadreur,

Pour votre expertise précieuse, votre mentorat inspirant et votre soutien inébranlable qui ont façonné ce travail de recherche.

À mes collègues,

Pour notre collaboration enrichissante, nos échanges stimulants et notre camaraderie qui ont rendu cette expérience académique significative.

SELMA

Dédicace

À l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie:

À la source de ma volonté à mon chère père Mohamed qui ma appris le sens de la Persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragement.

À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie Ma mère Sakina Boulehas qui m'apporté son appui durant toutes mes années d'étude, Pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

Je ne cesserais jamais de remercier mon dieu pour m'avoir donnée une mère et un père comme Vous. Puisse dieu vous protéger inchallah.

À mes chères sœurs Hanan, Dalal et Aridje.

À mon chère frère Imad.

À mes chères amis Manel, Oumeima, et Racha.

À mes collègues Rania, Aya et Selma.

À toute ma famille et tous ceux qui m'ont consacré temps, patience, et conseils surtout dans les Moments difficiles.

À tous mes professeurs du primaire jusqu'au niveau universitaire.

Amani



Dédicace

Je dédie ce travail à mon cher père Ibrahim et à ma mère Naima. Sources inépuisables d'amour, d'affection et de sacrifice. En témoignage de ma gratitude pour leur patience et leur soutien inévitable tout au long de mes longues années d'études. Aux tantes Noura et Shahinaz avec qui j'ai grandi, toutes les dédicaces du monde ne peuvent exprimer mon profond amour et ma gratitude. Que Dieu leur donne santé et longue vie, mes quatre frères Ayoub, Louay, Abdul Rahim, Ishaq Shuaa Shamsi, mon oncle Didin qui est mon deuxième père, ma chère grand-mère, à mes amis "hayem "et proches, et à tous ceux qui me sont chers. Je dédie cet humble travail.

Aya

Dédicace

Louange dieu seul,

Ce modeste travail est dédié spécialement

A mes chers parents Youcef et Hakima,

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,

À ma chère sœur Asma,

Pour ses encouragements constants et son soutien moral.

Et à ses petits anges Joude et Wael, Merci pour votre présence inestimable.

A mes chers frères, Salah eddine et Bilel pour leur appui et leur encouragement

Et À mon petit frère Iyad, notre trésor, Ta joie et ton enthousiasme m'ont toujours inspiré.

À la mémoire de Mes grands-parents Abi et Mani,

Vous qui avez été les piliers de ma vie, vos conseils et votre amour inconditionnel m'ont guidé tout au long de ce parcours.

À mes oncles Khaireddine, Djaber et Adel, et à mes tantes Fatiha, Wahiba et Radia,

Pour votre soutien indéfectible et vos encouragements constants.

À mes chers cousins Hadjer, Khawla et Douaa,

Votre soutien et vos encouragements ont été une source de motivation constante.

Et a toute ma famille,

À mes chères amies, Hadjer, Ikram, Hadjer, Selma et Rayan,

Votre amitié précieuse et votre soutien constant ont illuminé mon parcours.

À mes collègues Aya et Amani,

Pour votre entente et vos sympathies.

Pour finir, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment, je dédié ce mémoire.

Rania

Liste des figures :

| | |
|--|-----------|
| Figure 1 : Arbre de l' <i>Oléastre</i> | 04 |
| Figure 2 : Fruits d' <i>Oléastre</i> | 06 |
| Figure 3 : Feuilles d'olivier | 06 |
| Figure 4 : Fleurs d' <i>Oléastre</i> | 07 |
| Figure 5 : Répartition géographique naturelle du complexe <i>Olea europaea</i> (l'olivier : Méditerranéen; <i>Subsp. Europaea</i>) | 08 |
| Figure 6 : Représentation schématique de l'association endophyte fongique avec son hôte | 13 |
| Figure 7 : Cycle de vie et mode de transmission (verticale et horizontale) des champignons endophytes | 14 |
| Figure 8 : Plantes de pomme de terre naturellement infectées par le chancre de la tige et la maladie du charbon noir de la pomme de terre | 20 |
| Figure 9 : Feuilles d'un <i>Olea europaea</i> (olivier sauvage) | 25 |
| Figure 10 : Séchage des feuilles d'olivier sauvage après rinçage | 26 |
| Figure 11 : Isolement des souches fongiques des feuilles d'olivier sauvage | 26 |
| Figure 12 : Incubation des souches sous agitation pendant 21 jours | 28 |
| Figure 13 : Isolement de <i>Rhizoctonia solani</i> à partir de la pomme de terre | 30 |
| Figure 14 : Évaluation de l'activité antifongique par antagonisme contre <i>R. solani</i> | 31 |
| Figure 15 : Analyse phylogénétique moléculaire par la méthode de Neighbor Joining (NJ) | 38 |
| Figure 16 : Pourcentage d'inhibition (%) de <i>R. solani</i> par les différentes souches endophytes | 44 |
| Figure 17 : Test d'antagonisme contre <i>R. solani</i> | 45 |
| Figure 18 : Inhibition de la croissance de <i>R. solani</i> par les différentes concentrations des extraits fongiques | 50 |

Liste des tableaux :

| | |
|--|-----------|
| Tableau 1 : Critères de classification des champignons endophytes | 12 |
| Tableau 2 : Identifications macroscopique et microscopique des souches isolées | 34 |
| Tableau 3 : Analyses par UPLC ESI MS M des extraits d' <i>Alternaria alternata</i> , <i>Didymosphaeria rubi-ulmifolii</i> et <i>Sordaria humana</i> | 39 |
| Tableau 4 : Les valeurs IC50 en µg/ml | 42 |
| Tableau 5 : Taux d'inhibition de <i>R. solani</i> par les extraits fongiques | 48 |

Liste des abréviations :

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

HA : Habitat-adapted.

PDA : Potato dextrose agar.

NHA : Non Habitat-Adapted.

Tables de matières :

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | |
| Dédicace | |
| Liste des Figures | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |
| Résumés | |
| Abstract | |
| ملخص | |
| Introduction | 01 |
| Synthèse bibliographique | 03 |
| Chapitre 01: <i>Olea europaea</i> | |
| 1. Origine | 03 |
| 2. Évolution | 03 |
| 3. Définition | 04 |
| 4. Taxonomie | 04 |
| 5. Descriptions et morphologie | 04 |
| 5.1 Description | 04 |
| 5.2 Morphologie de l'olivier sauvage | 05 |
| 6. Place de l'olivier sauvage dans le monde | 07 |
| 6.1 Répartition géographique d'olivier et écologie | 07 |
| 7. Utilisation de l' <i>Oléastre</i> | 08 |
| 8. Activités biologiques de l' <i>Oléastre</i> | 08 |
| Chapitre 02 : Les champignons endophyte | |
| 1. Définition | 10 |
| 2. Biodiversité des champignons endophytes | 10 |
| 3. Taxonomie des champignons endophytes | 11 |
| 4. Interaction plante-endophytes | 12 |
| 5. Mode de transmission | 13 |
| 6. Les métabolites secondaires des champignons endophytes | 14 |
| 7. Rôles des champignons endophytes | 15 |
| 7.1. Rôles écologiques des endophytes | 15 |
| 7.2. Rôles des endophytes dans la tolérance aux stress abiotiques | |
| 7.3. Rôles physiologiques des champignons endophytes | 16 |
| 7.4. Rôle antifongique des champignons endophytes | 16 |
| 7.5. Rôle antioxydants des champignons endophytes | 17 |
| Chapitre 03 : <i>Rhizoctonia Solani</i> | |
| 1. Généralité | 18 |
| 2. Maladies de la Rhizoctonie de la pomme de terre | 18 |
| 3. Cycle et symptômes des maladies de la Rhizoctonie de la pomme de terre | 18 |
| 4. Les groupes d'anastomose de <i>R. solani</i> | 20 |
| 5. Phytotoxines de <i>R. solani</i> et mécanisme d'action | 21 |
| 6. Management de la maladie de <i>Rhizoctonia Solani</i> | 22 |
| Matériel et méthodes | |
| 1. Matériel végétal | 25 |
| 2. Méthode | 25 |
| 2.1. Isolement | 25 |
| 2.2. Identification morphologique des champignons endophytes | 27 |

Sommaire

| | |
|---|----|
| 2.3. Identification moléculaire | 27 |
| 2.4. Fermentation et extraction de métabolites secondaires à partir de champignons endophytes | 28 |
| 2.5. Analyse PAR UPLC-ESI-MS-MS | 28 |
| 2.6. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits fongiques | 29 |
| 2.6.1. Méthode DPPH | 29 |
| 2.6.2. Méthode ABTS | 29 |
| 2.7. Evaluation de l'activité antifongique des souches fongiques contre <i>Rhizoctonia solani</i> | 30 |
| 2.7.1. Isolement et identification moléculaire | 30 |
| 2.7.2. Evaluation de l'activité antifongique par antagoniste | 31 |
| 2.7.3 Evaluation de l'activité antifongique par extraits fongiques | 32 |
| 2.8. Analyse statistique | 32 |
| Resultats et discussion | 33 |
| 1-Resultat d'isolement | 33 |
| 2. Identification macroscopique et microscopique des souches isolées | 33 |
| 3. Identification moléculaire | 37 |
| 4. Analyses PAR UPLC-ESI-MS-MS | 39 |
| 5. Activité antioxydante | 42 |
| 6-Activité fongique | 44 |
| 6.1. Test d'antagonisme | 44 |
| 6.2. Activité antifongique des extraits des souches endophytes d'olivier sauvage. | 48 |
| Conclusion | 52 |
| Références Bibliographiques | |

Abstract

Résumé :

Cette étude vise à isoler, identifier et examiner l'activité antioxydante et antifongique des champignons endophytes d'*Olea europaea subsp. europaea var. sylvestris* (Oléastre) contre *Rhizoctonia solani* de la pomme de terre. Trois espèces de champignons isolées ont été identifiées : *Soridaria humana*, *Alternaria alternata* et *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*. Une analyse chimique par UPLC-ESI-MS-MS des métabolites secondaires extraits de ces champignons a révélé une variété de composés, y compris la riboflavine, l'acide folique et l'épicatéchine, soulignant la richesse et la diversité des métabolites fongiques. En ce qui concerne l'activité antioxydante, les trois isolats ont montré une grande efficacité. En utilisant la méthode DPPH, des valeurs de IC50 de 0,13 mg/ml \pm 0,005 ; 0,11 mg/ml \pm 0 ; 0,11 mg/ml \pm 0 ont été obtenues. Avec la méthode ABTS, les valeurs de IC50 étaient de 0,11 mg/ml \pm 0 ; 0,12 mg/ml \pm 0 ; 0,11 mg/ml \pm 0,01 pour *Soridaria humana*, *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* et *Alternaria alternata* respectivement. L'activité antifongique de ces isolats contre *Rhizoctonia solani* a été évaluée par deux méthodes : la technique de la double culture et par extrait. Les résultats ont montré des pourcentages d'inhibition maximaux de 100 % pour *Soridaria humana*, 85 % pour *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* et 50% pour *Alternaria alternata*. De plus, les extraits de *Sordaria humana* ont montré des taux d'inhibition complète de *R. solani*.

Mots clés : champignons endophytes, métabolites secondaires, activité antifongique, activité antioxydante, *Rhizoctonia solani*

Abstract

Abstract:

This study aims to isolate, identify, and examine the antioxidant and antifungal activity of endophytic fungi from *Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* (Wild Olive) against *Rhizoctonia solani* in potatoes. Three isolated fungal species were identified: *Soridaria humana*, *Alternaria alternata*, and *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*. Chemical analysis by UPLC-ESI-MS-MS of the secondary metabolites extracted from these fungi revealed a variety of compounds, including riboflavin, folic acid, and epicatechin, highlighting the richness and diversity of fungal metabolites. Regarding antioxidant activity, all three isolates showed high efficacy. Using the DPPH method, IC₅₀ values of 0.13 mg/ml ± 0.005; 0.11 mg/ml ± 0; and 0.11 mg/ml ± 0 were obtained. With the ABTS method, IC₅₀ values were 0.11 mg/ml ± 0; 0.12 mg/ml ± 0; and 0.11 mg/ml ± 0.01 for *Soridaria humana*, *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*, and *Alternaria alternata*, respectively. The antifungal activity of these isolates against *Rhizoctonia solani* was evaluated by two methods: dual culture technique and extract method. The results showed maximum inhibition percentages of 100% for *Soridaria humana*, 85% for *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*, and 50% for *Alternaria alternata*. Furthermore, extracts of *Sordaria humana* showed complete inhibition rates of *R. solani*.

Keywords: endophytic fungi, secondary metabolites, antifungal activity, antioxidant activity, *Rhizoctonia solani*

Abstract

ملخص :

تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتحديد وفحص النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للفطريات للفطريات الداخلية لنبات الزيتون البري (*Olea europaea subsp. europaea var. sylvestris*) ضد *Rhizoctonia solani* في البطاطا. تم تحديد ثلاثة أنواع من الفطريات المعزولة : *Didymosphaeria rubi* و *Alternaria alternata* و *Soridaria humana ulmifolii* أظهر تحليل كيميائي باستخدام UPLC-ESI-MS-MS للمركبات الثانوية المستخلصة من هذه الفطريات مجموعة متنوعة من المركبات، بما في ذلك الريبوفلافين والحمض الفوليك والإبيكاتيكين، مما يؤكد ثراء وتنوع المركبات الفطرية. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للأكسدة، أظهرت العزلات الثلاثة فعالية كبيرة. باستخدام طريقة DPPH ، تم الحصول على قيم IC50 بمقدار 0.13 ملغ/مل ± 0.005؛ 0.11 ملغ/مل ± 0؛ 0.11 ملغ/مل ± 0. باستخدام طريقة ABTS ، كانت قيم IC50 هي 0.11 ملغ/مل ± 0؛ 0.12 ملغ/مل ± 0؛ 0.11 ملغ/مل ± 0. لكل من *Didymosphaeria* و *Soridaria humana* و *Alternaria alternata* على التوالي. تم تقييم النشاط المضاد للفطريات لهذه العزلات ضد *Rhizoctonia solani* باستخدام طريقتي الزراعة المزدوجة والمستخلص. أظهرت النتائج نسب تثبيط قصوى بنسبة 100% لـ *Soridaria humana* و 85% لـ *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* و 50% لـ *Alternaria alternata* بالإضافة إلى ذلك، أظهرت مستخلصات *Sordaria humana* معدلات تثبيط كاملة لـ *R. Solani*

الكلمات الرئيسية: الفطريات الداخلية، المركبات الثانوية، النشاط المضاد للفطريات، النشاط المضاد للأكسدة، *Rhizoctonia solani*.

Introduction

Introduction

La pomme de terre est une denrée alimentaire majeure en Algérie et à l'échelle mondiale, jouant un rôle crucial dans le système alimentaire mondial (FAO, 2008). Elle se classe au quatrième rang parmi les cultures agricoles mondiales, après le blé, le maïs et le riz (FAO, 2018), offrant des avantages significatifs tels que sa facilité de culture, son potentiel élevé de rendement et sa valeur nutritive énergétique élevée. En Algérie, la production annuelle de pommes de terre atteint 41 millions de quintaux sur 130 000 hectares, avec sept wilayas concentrant près de 70% de cette production, El-Oued étant le principal producteur avec 28% (Bessaoud et Lefki, 2018).

La culture de la pomme de terre est sérieusement menacée par diverses maladies, notamment *la Rhizoctone brune*, causée par *Rhizoctonia solani Kühn*, un champignon répandu qui affecte les tubercules, les tiges et les stolons, entraînant des pertes de rendement significatives et une baisse de la qualité et de la valeur nutritive des récoltes (Demirci *et al.*, 2011). En Algérie, la compréhension de cette maladie reste limitée, en particulier ses implications pour les variétés cultivées dans le Sahara.

Le contrôle traditionnel de la Rhizoctone brune repose principalement sur l'utilisation de fongicides, une méthode économique mais associée à des problèmes croissants tels que la résistance des pathogènes, la pollution et des risques pour la santé et l'environnement (Ali *et al.*, 2012). Pour surmonter ces défis, des alternatives comme le biocontrôle par des champignons endophytes émergent comme des solutions prometteuses. Les endophytes, vivant à l'intérieur des plantes sans causer de dommages visibles, produisent des métabolites secondaires aux propriétés antifongiques potentielles, offrant ainsi une méthode durable et respectueuse de l'environnement pour contrôler les pathogènes telluriques comme *Rhizoctonia solani* (Li *et al.*, 2022).

Des études récentes montrent que certains endophytes peuvent inhiber efficacement la croissance de *Rhizoctonia solani* (Osman *et al.*, 2011 ; Kaddes *et al.*, 2020 ; Komeil et Saad , 2021 ; Msairi *et al.* ,2022), tandis que d'autres ont exploré le potentiel des métabolites secondaires des endophytes dans la lutte contre d'autres maladies fongiques (Esslmani *et* Lahlou, 2003 ; Fadhela, 2017 ;Salmi, 2022 ;Chihat, 2022 ;Guedider,2022). Ces approches soulignent l'importance de développer des stratégies de lutte biologique basées sur des mécanismes naturels pour améliorer la résistance des cultures de pomme de terre

Dans ce contexte, cette recherche vise à évaluer l'efficacité des extraits de champignons endophytes isolés des feuilles d'olivier sauvage contre *Rhizoctonia solani* en conditions *in vitro*. En isolant, purifiant et identifiant ces champignons, suivis de la fermentation et de l'extraction de leurs métabolites, l'étude cherche à démontrer leur potentiel antifongique et antioxydant,

Introduction

visant à renforcer les pratiques de gestion contre cette maladie dévastatrice pour la culture de la pomme de terre.

Synthèse Bibliographique

1. Origine :

L'olivier est une espèce qui a toujours été présente dans le bassin méditerranéen, en particulier au Moyen-Orient, depuis des milliers d'années, bien avant qu'il ne soit domestiqué (Rugini et al. 2011). Les preuves archéologiques suggèrent que la culture de l'olivier a commencé dans le bassin méditerranéen oriental il y a environ 6000 ans (Zohary & Spiegel-Roy, 1975 ; Kaniewski et al. 2012). Des preuves palynologiques, anthropologiques et archéologiques indiquent la présence de certaines formes d'oliviers lors de la dernière glaciation dans les régions méditerranéennes occidentales et orientales (Carrion & Dupré, 1996 ; Watts et al. 1996).

2.Évolution :

L'*Oléastre* méditerranéen (*Olea europaea subsp. europaea var. sylvestris* (Mill.) Leh.) a persisté et diversifié depuis le pléistocène. La crise de salinité messénienne a conduit à la disparition des espèces subtropicales à l'ouest du bassin méditerranéen archaïque et au développement d'espèces méditerranéennes thermophiles et xérophiles. Cela explique l'établissement du genre *Olea* en Afrique du Nord, en Europe du Sud et finalement dans les îles de la Macaronésie. L'expansion progressive du paysage méditerranéen pendant le Pliocène a favorisé l'apparition de plantes thermophiles et xérophiles (Suc et al. 1984). Les olives sauvages font partie du complexe oléicole dans lequel six sous-espèces sont reconnues (Médail et al. 2001 ; Green, 2002). Ces taxons sont naturellement distribués de l'Afrique du Sud au sud de l'Asie, dans les montagnes sahariennes, en Macaronésie, et le bassin méditerranéen. Les explorations phylogénétiques ont démontré l'existence d'un ancêtre commun des six sous-espèces d'oliviers datant de la fin du Miocène et du début du Pliocène, il y a environ 4 à 8 millions d'années (Besnard et al. 2009). Les flux génétiques limités entre l'Afrique du Nord et l'Afrique tropicale, résultant du processus historique d'aridification des conditions climatiques du Sahara à la fin du Miocène (Schuster et al. 2006), ont éventuellement contribué à la divergence de la sous-espèce *cuspidata* des autres sous-espèces (Besnard et al. 2009). Dans le paysage méditerranéen, les arbustes *Olea europaea var. sylvestris* ont évolué à partir de plantations historiques abandonnées ou brûlées (Gianguzzi & Bazan, 2019). Ainsi, le vieux porte-greffe, dont le tronc est un *Oleaster*, est une preuve de l'ancienne culture méditerranéenne (Zohary & Spiegel-Roy, 1975 ; Marcuzzi, 1996).

3. Définition :

D'un point de vue botanique, l'olivier sauvage est défini comme une sous-espèce ou un cultivar d'olivier qui ne produirait jamais un descendant par autofécondation capable de produire de gros fruits ou des fruits à forte teneur en huile (Kostelenos & Kiritsakis, 2017) (Figure1).



Figure.1: Arbre de l'Oléastre (Achouri, 2018).

4. Taxonomie :

L'olivier sauvage méditerranéen, également appelé *Oleaster* ou *Silvestris* (*O. europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* (Mill.) Lehr.), appartient à la famille des *Oleaceae* et à la sous-famille des *Oleideae*, le genre *Olea*, qui comprend trois sous-genres : *Olea*, *Tetrapilus* et *Paniculatae*. Le sous-genre *Olea* est divisé en deux sections : *Olea* et *Ligustroides*. Suite à une révision approfondie de Green (2002), le genre *Olea* comprend 33 espèces et neuf sous-espèces. Six sous-espèces forment la sous-section *Olea* qui s'étend à travers les régions de la Méditerranée (*O. europaea*), asiatique (*O. cuspidata*), du massif saharien (*O. laperrinei*), africaine (*O. maroccana*), Macronesienne (*O. cerasiformis* et *O. guanchica*). La sous-espèce *Europaea* (var. *sativa* et var. *sylvestris*) est diploïde (2x) (Bitonti et al., 1999). Tandis que les sous-espèces *cerasiformis* et *maroccana* sont tétraploïdes (4x) et hexaploïdes (6x), respectivement (Brito et al. 2008; Besnard et al., 2008). Alors que la sous-espèce *laperrinei* connaît la coexistence de deux types diploïde et triploïde (Besnard & BaaliCherif, 2009; Besnard & De Casas, 2016).

5. Descriptions et morphologie :

5.1 Description :

L'*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris* est un arbre caractéristique des régions méditerranéennes, souvent considéré comme un arbre forestier par de nombreux chercheurs. Il est l'une des espèces végétales les plus anciennes, avec de nombreux spécimens encore vivants dans tous les pays méditerranéens européens (Baldoni et al., 2006). Cependant, la variété

sylvestris est en déclin en raison des incendies de forêt et de l'urbanisation intensive qui caractérisent la côte méditerranéenne (Chiappetta & Muzzalupo, 2012). L'olivier est un arbre à croissance lente, dont la production de fruits commence cinq à six ans après la plantation. Avec une bonne gestion, ces arbres peuvent continuer à produire des fruits pendant des centaines d'années (Zohary *et al.*, 2012). L'olivier sauvage, ou *Oleaster* (*Olea europaea* L. var. *sylvestris* (Mill.) Lehr.), est une espèce ligneuse qui caractérise le paysage méditerranéen. Il est une composante emblématique de la forêt naturelle et de la végétation du maquis. C'est un arbre à croissance lente qui peut atteindre 15-20 mètres de haut. Bien que cet arbre soit connu pour vivre depuis des milliers d'années, il forme rarement des forêts. Les communautés d'*Oléastre* s naturelles ont été soumises à une déforestation extensive, entraînant des pertes significatives en termes de superficie et de biomasse (Gianguzzi & Bazan, 2019). Il est réparti sur l'ensemble du bassin méditerranéen (Meusel *et al.*, 1978). Les *Oléastre* s forment des communautés forestières adaptées à la zone xérophile de la région méditerranéenne - haut maquis, bois ou micro-bois - et représentent des stades plus évolués de la végétation actuelle (Gehu & Rivas-Martinez, 1981). Ces formations sont reliées à des stations rupestres et semi-rupestres, avec des sols pauvres, plus ou moins érodés, situés sur différents types de substrats de différents degrés de compactage (Gianguzzi & Perrino, 2016).

5.2 Morphologie de l'olivier sauvage :

L'*Olea europaea* var. *sylvestris* se distingue de la Var. *europaea* par ses jeunes branches durcies et épineuses, ses feuilles plus ou moins lancéolées mais toujours obtuses, ses petits fruits et son port rustique et arbustif (Gianguzzi & Bazan, 2020). L'espèce *O. oleaster* a des pousses épineuses, de petites feuilles ovales à sphériques et de petits fruits noirs, à faible teneur en huile. Les *Oléastre* s se distinguent des oliviers cultivés par la présence de pousses juvéniles spinescentes, de fruits plus petits avec moins de mésocarpe, de plus faible teneur en huile et par un stade juvénile long, de longue durée chez certaines plantations (Therios, 2009) ; dans de nombreux cas, ce stade peut dépasser 1000 ans (Chiappetta & Muzzalupo, 2012).(figure2).



Figure 2 : fruits d'Oléastre (Achouri, 2018).

Le tronc est souvent torsadé et câblé, et il peut atteindre une taille considérable, jusqu'à 15 m chez les spécimens monumentaux (Baldoni et al., 2000). Il a une grande capacité de former de nouvelles branches latérales à partir de nombreuses zones méristématiques ou de bourgeons axillaires formés au moment de l'initiation des feuilles, et les drageons poussent fréquemment autour du collet à la base du tronc (Rapoport et al., 2016). Les branches sont nombreuses, elles ont des épines chez les jeunes plants, et peuvent avoir un aspect dressé, étalé ou retombant (Chiappetta & Muzzalupo, 2012). L'écorce est grise - cendrée - colorée, plus ou moins lisse chez les jeunes arbres, devenant rugueuse chez les adultes.

Les feuilles sont opposées, coriaces, avec une marge lisse. Le limbe est elliptique-lancéolé, la surface adaxiale est verte et glabre, la surface abaxiale a de petites écailles argentées en forme de bouclier (Chiappetta & Muzzalupo, 2012). (Figure 3)



Figure 3: Feuilles d'olivier (Achouri, 2018).

Les fleurs sont blanches, pédonculées, très nombreuses et regroupées en racèmes axillaires (Chiappetta & Muzzalupo, 2012). La fleur de l'olivier sauvage est hermaphrodite et se caractérise par un petit périanthe blanchâtre recouvrant l'androcée et le gynécée. De nombreux oliviers sont andromonoïques car les individus isolés portent à la fois des fleurs hermaphrodites et staminées (Cuevas & Polito, 2004). Parfois, des individus portant des fleurs hermaphrodites et les deux

unisexuées sont également observés. Cependant, les fleurs staminées sont plus fréquentes que les carpellées (Breton & Bervillé, 2013). (Figure 4)

Le calice a quatre feuilles ovoïdes, tandis que la corolle, blanche, est formée de quatre pétales de 2 - 4 mm. Il y a deux étamines par fleur, le stigmate est bifide et l'ovaire a quatre niches. Le fruit



FIGURE 04 : Fleurs D'oléastre (Achouri ,2018)

est une drupe ovoïde-globuleuse, de 5 à 7 mm de diamètre et de 10 à 15 mm de longueur. La pulpe est initialement verte puis brun-noir à maturité (Chiappetta & Muzzalupo, 2012). L'endocarpe est dur et ligneux avec une seule graine, rarement deux (Camarda et al., 1983).

6. Place de l'olivier dans le monde :

6.1 Répartition géographique d'olivier sauvage et écologie :

L'olivier sauvage est une espèce thermophile bien adaptée au climat méditerranéen. Selon Carrión et al.(2010), *Olea* aurait subsisté dans des zones refuges thermophiles situées dans les régions sud du nord du bassin méditerranéen, au sud du Levant et au nord de l'Afrique.

Olea europaea L. var. *sylvestris* (l'Oléastre , l'olivier sauvage ou spontané) est considérée comme un bioindicateur thermosensible pour la définition du niveau de thermoméditerranéobioclimatique et sa répartition naturelle a été confiné aux zones côtières du bassin méditerranéen L'émergence de l'olivier est due principalement à sa plasticité écologique et la valeur nutritionnelle de son fruit dont on extrait de l'huile riche en Omega 3n.

Actuellement, la culture de l'olivier s'étend au-delà du bassin méditerranéen, touchant des zones

En Australie, en Amérique du Sud et du Nord (Argentine, Chili, États-Unis) ainsi qu'en Afrique du Sud, comme l'ont souligné Rugini et Fedeli (1990) ; Loussert et Brousse (1977) ont identifié trois groupes de répartition du genre *Olea* dans le monde : le groupe afro-méditerranéen, le groupe indo-sino-malésien et le groupe natalo-malgache. (Figure 5).

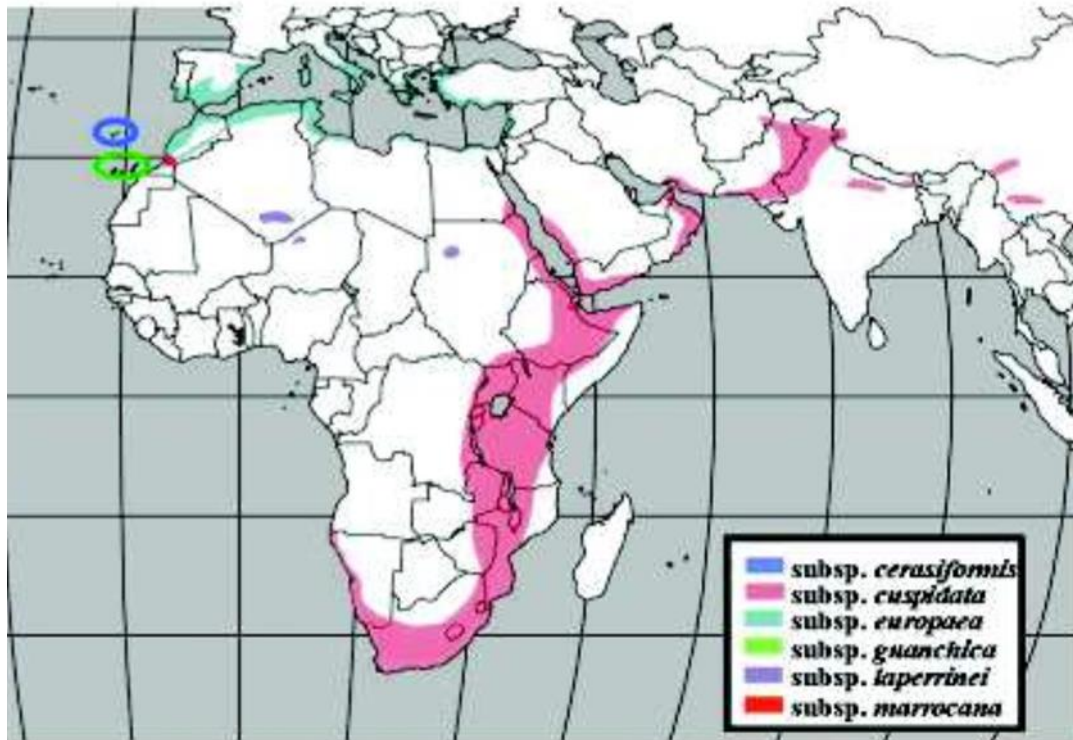


Figure .5: Répartition géographique naturelle du complexe *Olea europaea* (l'olivier : Méditerranéen; Subsp. *europaea*). (Rubio de casas, et al., 2006)

7-Utilisation de l'*Oléastre* :

Selon Mulas (1998), les populations d'olivier sauvage jouent un rôle crucial dans la lutte contre la désertification en raison de leur résistance au vent et à la sécheresse, de leur capacité à repousser après des incidents tels que les incendies ou les gelées, et de leur longévité exceptionnelle, pouvant atteindre plusieurs milliers d'années. Guerin *et al.* (2003) ainsi que Breton *et al.* (2006) soulignent que l'*Oléastre* peut servir de barrière naturelle contre les incendies, tout en présentant des avantages économiques et esthétiques, et en contribuant à la préservation des sols en limitant l'érosion. De plus, selon Breton (2006), l'*Oléastre* est souvent utilisé comme porte-greffe pour les oliviers, en raison de sa capacité à s'adapter aux conditions difficiles. Son huile est également traditionnellement utilisée comme hydratant cutané.

8. Activités biologiques de l'*Oléastre* :

Les feuilles, en décoction, sont diurétiques et agissent contre le refroidissement et sont efficaces contre l'hypertension artérielle (Kahouadji, 1995), elles ont été largement utilisées dans les remèdes traditionnels dans les pays européens et méditerranéens comme des extraits des tisanes, et des poudres. Ils contiennent plusieurs composés potentiellement bioactif (Wainstein *et al.*, 2013). 32 L'extrait de feuilles est utilisé comme adjuvant dans les formes légères de diabète

(au cours de la grossesse ou en cas d'obésité) (Ghedira, 2008). Elles sont aussi largement utilisées en tant que remède pour le traitement de la fièvre et d'autres maladies comme le paludisme. Les feuilles possèdent également des propriétés antimicrobiennes contre certains micro-organismes tels que des bactéries, des champignons et mycoplasmes (Ghanbari et *al.*, 2012). Elles contiennent du cinchonidine, une quinoléine alcaloïde aux propriétés antipaludiques. Les feuilles, l'écorce et les fruits contiennent aussi l'oleuropéine, possédant des activités antioxydantes, hypotensive, hypoglycémiant, hypocholestérolémiant et antiseptique (Ghedira, 2008). Elles ont également une activité astringente et sont capables de limiter l'érysipèle (infections cutanées streptococciques), l'herpès, tumeurs malignes, ulcération gangreneuse (Goodyer, 2000)

1. Définition :

Les champignons sont souvent identifiés comme les endophytes les plus couramment isolés (Strobel et *al.*, 2004). Le concept d'endophyte a été introduit pour la première fois par De Bary en 1866 pour caractériser les champignons qui colonisent l'intérieur des tissus végétaux, y compris les tiges et les feuilles (Moricca et Ragazzi, 2008).

La définition la plus répandue des champignons endophytes est celle proposée par Petrini (1991), qui les décrit comme tous les microorganismes qui vivent à l'intérieur et/ou entre les cellules (Pimentel et *al.*, 2011) des organes végétaux à un certain stade de leur existence. Ils peuvent coloniser les tissus internes des plantes sans provoquer de dommages visibles à l'hôte (Hyde et Soyong, 2008). Pendant longtemps, on a cru que ces champignons n'avaient aucune fonction ou intérêt particulier. Cependant, au cours des dernières années, les endophytes ont été exploités (Moricca et Ragazzi, 2008) comme une source potentielle de composés aux propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anticancéreuses, insecticides, etc. (Maheshwari, 2006).

2. Biodiversité des champignons endophytes :

Les champignons endophytes sont omniprésents, et il est généralement admis que la plupart, sinon toutes, les espèces végétales dans les écosystèmes naturels abritent des champignons endophytes (Rodriguez et *al.*, 2009). Les hôtes les plus étudiés comprennent les plantes cultivées, les arbres forestiers, les arbustes et les membres de la famille des *Ericaceae*. De plus, certaines familles de plantes, comme les *Orchidaceae*, montrent une relation étroite avec leurs endophytes associés (Bayman et Otero, 2006).

La diversité des espèces, la fréquence et l'abondance des endophytes sont influencées par les conditions climatiques et édaphiques, ainsi que par l'hétérogénéité des habitats et des niches occupées par leurs hôtes (Sieber, 2002). De nombreux endophytes colonisent des organes spécifiques, tandis que d'autres sont uniquement trouvés dans les racines ou les organes de surface. Cependant, chaque organe de l'hôte peut potentiellement être colonisé (Schulz et Boyle, 2005).

L'étude des champignons endophytes a commencé avec les travaux de Petrini (1986), et depuis lors, plusieurs aspects de leur biologie ont été explorés, y compris la diversité taxonomique, la reproduction, l'écologie et les effets sur leurs hôtes (Saikkonen et *al.*, 1998). Les recherches en laboratoire sur de petits échantillons ne révèlent pas nécessairement la véritable diversité des champignons endophytes. Si ces estimations sont extrapolées aux données de terrain, le nombre d'endophytes potentiellement associés à une espèce végétale est souvent estimé à plusieurs centaines (Sánchez Márquez et *al.*, 2007).

De nombreuses espèces végétales, à la fois herbacées et ligneuses, hébergent des endophytes fongiques. Une diversité et une spécificité ont été observées à la fois chez les espèces ligneuses et herbacées Cohen (2006) a suggéré que les champignons endophytes ne seraient pas spécifiques à l'hôte, tandis que Hoffman et Arnold (2008) ont démontré que les communautés endophytes varient significativement entre les espèces d'hôtes et même entre les hôtes étroitement apparentés. Les variations géographiques sont souvent les facteurs les plus contributifs à la diversité des champignons endophytes.

Ces derniers, lorsqu'ils sont isolés d'un même hôte, ont tendance à varier d'une région géographique à une autre (Collado et al., 1999). Dans un contexte géoclimatique, les endophytes semblent être plus diversifiés dans les zones tropicales que dans les zones tempérées ou froides du monde (Fisher et al., 1995 et Arnold et Lutzoni, 2007). L'âge de la plante hôte influence également la diversité des champignons endophytes ; il semble que les plantes plus âgées hébergent plus d'endophytes dans leurs tissus que les plantes plus jeunes (Arnold et al., 2003).

3. Taxonomie des champignons endophytes :

Les endophytes sont généralement présents dans les tissus aériens des plantes, mais ils peuvent également être trouvés dans leurs racines. La manière dont les endophytes colonisent les plantes varie d'une espèce à l'autre, d'un cultivar à l'autre, et même d'un organe à l'autre au sein d'une même plante (Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006). Les champignons endophytes colonisent systématiquement les plantes, en cohabitant avec les colonies bactériennes et les biofilms, résidant soit dans les espaces intercellulaires des tissus vasculaires, soit à l'intérieur des cellules (Kusari et Spiteller, 2012). L'environnement interne des tissus végétaux, qui est relativement stable, rend les endophytes plus bioactifs (He et al., 2009). Sur le plan taxonomique, les endophytes fongiques sont, à quelques exceptions près,

Des Ascomycètes ou leurs formes anamorphes (Carroll, 1988 et Sridhar et Raviraja, 1995). Selon Rodriguez et al. (2009), les champignons endophytes peuvent être divisés en deux groupes : les *Clavicipitaceae* et les Non *Clavicipitaceae*. La classification de ces microorganismes repose principalement sur la colonisation des tissus, leur diversité in planta, les avantages qu'ils procurent à leurs plantes hôtes et le mode de transmission du champignon (transmission verticale par la graine ou transmission horizontale par dissémination) (tableau1).

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

| Critère | <i>Clavicipitaceae</i> | | <i>NON Clavicipitaceae</i> | |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------|
| | Classe 1 | Classe 2 | Classe 3 | Classe 4 |
| Gamme d'hôtes | Large | Etroite | étroite | Etroite |
| Tissus colonisés | tige et rhizome | tige, racine et rhizome | tige | Racine |
| Colonisation, in planta | étendue | Etendue | limitée | Etendue |
| Biodiversité, in planta | basse | Basse | élevée | inconnue |
| Transmission | verticale et horizontale | verticale et horizontale | horizontale | horizontale |
| Bénéfiques pour la plante hôte | NHA* | NHA* et HA | NHA* | NHA* |

HA : Habitat-adapted

NHA : Non Habitat-Adapted

4. Interaction plante-endophytes :

Les endophytes établissent une relation intime avec leurs hôtes et sont ainsi mieux protégés contre divers stress biotiques et abiotiques, ce qui leur permet d'interagir plus longtemps avec la plante (Hallmann et al. 1997). Les conséquences de cette interaction peuvent se traduire par une stimulation de la croissance, une protection par l'induction de la Résistance Systémique Induite (ISR) ou une action antagoniste directe sur les pathogènes (He et al., 2009). Toute interaction entre une plante et un champignon endophyte commence par un contact physique, suivi du franchissement de plusieurs barrières physiques et chimiques pour établir une association réussie (Kusari et Spiteller, 2012). Selon Kusari et al. (2014), l'interaction entre le champignon et la plante hôte est caractérisée par un équilibre entre la virulence du champignon et les défenses de l'hôte (figure6).

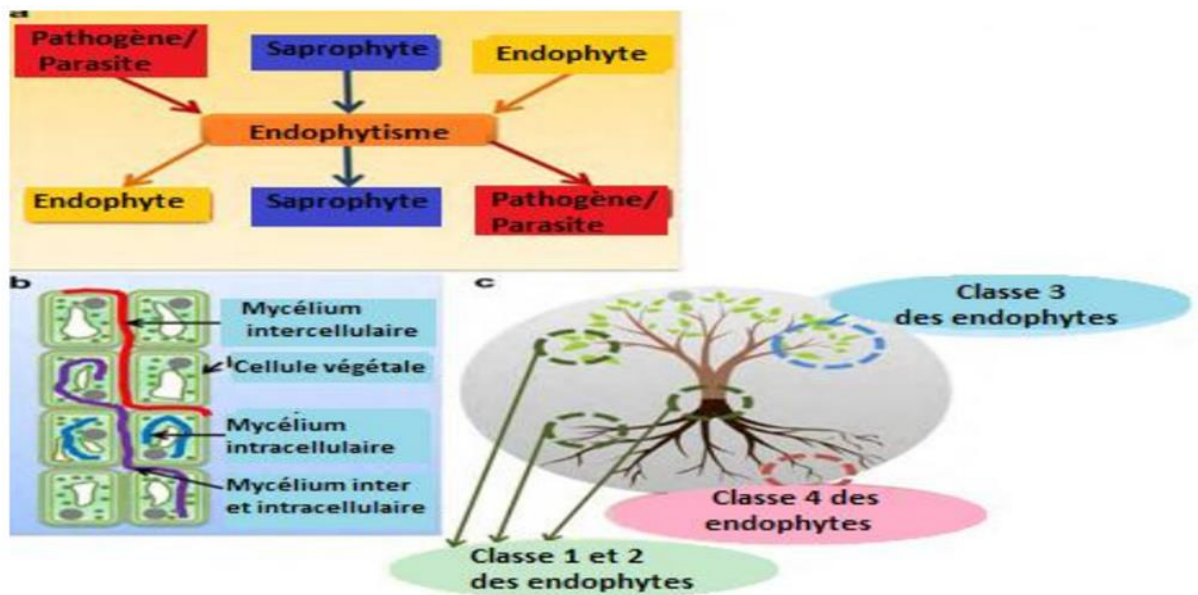


Figure. 6 : Représentation schématique de l'association endophyte fongique avec son hôte (Kusari et Spiteller, 2012).

- A) Modes de vie possibles des champignons endophytes avant et après l'endophytisme.
 B) Différents modèles de localisation des endophytes fongiques dans les tissus végétaux.
 C) Emplacement des différentes classes d'endophytes selon Rodriguez et *al.*, (2009) .

5. Mode de transmission :

Les champignons endophytes sont universellement présents, ayant été découverts dans presque toutes les espèces de plantes (Saikkonen et al., 1998) et à toutes les latitudes (Arnold AE, 2007).

Une seule espèce de champignon endophyte peut coloniser de nombreux hôtes différents.

Il existe deux modes de transmission observés chez les champignons endophytes, qui déterminent comment un champignon endophyte peut coloniser un autre individu végétal à partir de l'hôte initial:

- La transmission verticale : Ce mode est caractérisé par la colonisation d'un nouvel hôte, descendant de l'hôte initial. Cela se produit lorsque une hyphes de champignon endophyte pénètre une graine, un grain de pollen (Hodgson et *al.*, 2014) ou une propagule de la plante hôte. Cela permet la contamination de la progéniture de l'hôte initial. Le champignon endophyte reste génétiquement identique (propagation par reproduction asexuée), mais peut s'implanter soit dans un clone (colonisation d'une propagule), soit dans un hôte génétiquement différent, issu d'une nouvelle génération (colonisation d'un grain de pollen ou d'une graine). La transmission verticale par la graine a principalement été observée chez certaines espèces de champignons endophytes de la famille des Clavicipitaceae qui colonisent les Poaceae, les Cypéraceae et les Juncaceae. Cependant, elle a également été observée chez d'autres espèces d'endophytes capables de

coloniser plusieurs espèces non graminoides (*Pinus* spp., *Vigna unguiculata*, *Theobroma cacao*, *Castanea* spp., *Colophospermum mopane*) (Currie et al.,2014).

- La transmission horizontale : Ce mode est caractérisé par la colonisation d'un nouvel hôte qui n'a généralement pas de lien de parenté avec l'hôte initial. Elle se fait par la dissémination de spores par un vecteur de dispersion. Après germination, l'hyphe pénètre le nouvel hôte soit par les stomates, soit par pénétration directe à travers l'épiderme. La plupart des espèces d'endophytes, qui colonisent la majorité des végétaux, présentent ce mode de transmission. Les spores peuvent provenir de la reproduction sexuée ou asexuée du champignon. (figure 7) .

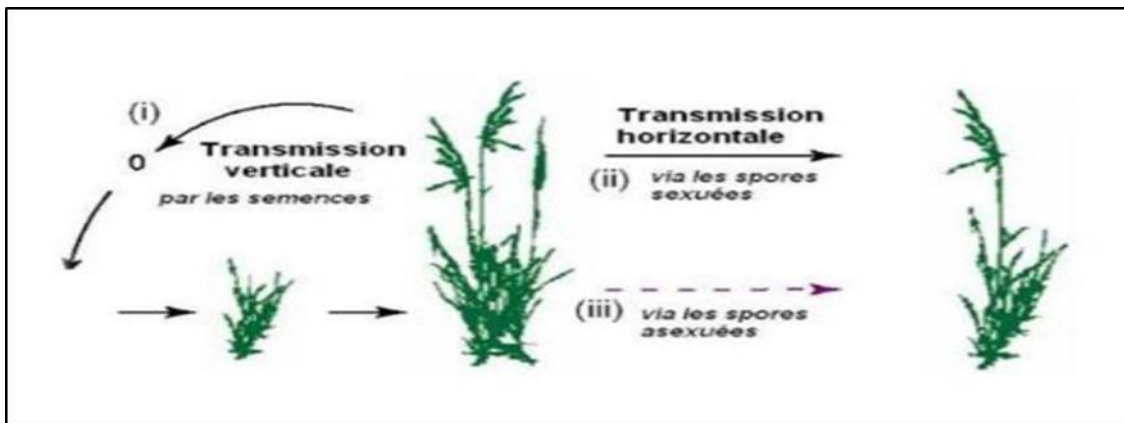


Figure 07 : cycle de vie et mode de transmission (verticale et horizontale) des champignons endophytes (Saikkonen et al.,2004).

6. Les métabolites secondaires des champignons endophytes :

Un métabolite secondaire est défini en contraste avec un métabolite primaire, qui est essentiel au fonctionnement vital d'un organisme, comme les acides nucléiques et les acides aminés. Les métabolites secondaires, bien qu'ils n'interviennent pas directement dans le développement ou la reproduction de l'organisme, confèrent généralement un avantage écologique à l'organisme.

Ces molécules peuvent avoir un intérêt thérapeutique pour l'homme, mais chez le champignon endophyte, le rôle des métabolites secondaires est diversifié, incluant par exemple des toxines et des phytohormones.

Les champignons endophytes produisent une variété de métabolites secondaires. Les classes chimiques les plus courantes sont les alcaloïdes, les peptides non ribosomiques, les polycétides et les terpènes (Spatafora et al.,2015.,Spiteller.,2015). Les terpènes sont synthétisés à partir du mévalonate, les polycétides proviennent du malonylCoA (malonyl Coenzyme A), et les alcaloïdes et les peptides utilisent des acides aminés.

Les principaux systèmes enzymatiques producteurs de métabolites secondaires des champignons endophytes sont les polycétides synthases (PKS), les non ribosomal peptid synthases (NRPS), et les enzymes responsables de la synthèse d'alcaloïdes indoliques (Spatafora et *al.*, 2015) (Keller et *al.*, 2005).

En raison de la fréquence élevée d'isolement des endophytes fongiques (Zhang et *al.*, 2006), ces derniers produisent un nombre de métabolites secondaires qui dépasse celui de toutes les autres classes de microorganismes endophytes. Les produits naturels issus des endophytes fongiques présentent un large éventail d'activités biologiques et peuvent être classés en plusieurs catégories : alcaloïdes, stéroïdes, terpénoïdes, isocoumarines, quinones, phénylpropanoïdes et lignanes, phénols et acides phénoliques, métabolites aliphatiques et lactones (Zhang et *al.*, 2006 ; Elfita et *al.*, 2012 ; Lee et *al.*, 2014 et Shukla et *al.*, 2014).

7. Rôles des champignons endophytes :

7.1. Rôles écologiques des endophytes :

Les endophytes jouent un rôle écologique essentiel dans la vie des plantes. L'interaction entre l'endophyte et la plante hôte est généralement mutuellement bénéfique. L'endophyte est protégé par la plante contre les concurrents du sol et a un accès direct aux ressources nutritives. En retour, l'endophyte peut protéger la plante hôte contre d'autres organismes concurrents et soutenir la croissance et le développement de la plante, l'absorption des nutriments du sol et la résistance à des conditions abiotiques défavorables (Sikora, 1992; Schardl et *al.*, 2004; Müller et Krauss, 2005; Trillas et Segarra, 2009; Weyens et *al.*, 2009; Aly et *al.*, 2011; Bakker et *al.*, 2013; Ludwig-Müller, 2015).

7.2. Rôles des endophytes dans la tolérance aux stress abiotiques :

Les plantes sont exposées à des conditions environnementales fluctuantes, les obligeant à s'adapter à des températures extrêmes, des insuffisances d'eau et des produits chimiques. Plusieurs études ont démontré que les plantes associées à des champignons endophytes ont été plus tolérantes à la sécheresse, la chaleur, la toxicité des métaux et à une salinité élevée (Waller et *al.*, 2005). Les champignons endophytes des graminées fourragères (Fétuque élevée) augmentent de manière significative la tolérance à la sécheresse de cette espèce (Clay et Schardl, 2002). La teneur en eau des graminées associées à des endophytes était plus élevée que celle des graminées dépourvues d'endophytes (Buck et *al.*, 1997). Redman et *al.* (2002) ont démontré que les champignons endophytes pourraient aussi augmenter la tolérance à la chaleur chez leurs hôtes. Il a été suggéré que l'endophyte agirait comme un déclencheur biologique pour activer la réponse au stress plus rapidement et plus fortement que dans les plantes non symbiotiques. Cette résistance à la température peut être très avantageuse pour ces plantes qui pourraient croître dans

des chaleurs où tous les agents pathogènes, les ravageurs et les mauvaises herbes ne résisteraient pas.

7.3. Rôles physiologiques des champignons endophytes :

Les plantes sont constamment menacées par une variété d'agents tels que les microorganismes (champignons, bactéries et virus), les herbivores et les insectes. Cependant, les plantes possèdent des mécanismes de défense contre ces agents, dont les obstacles structurels qui se renforcent rapidement lors du processus d'infection (cire, lignine, cellulose, composés phénoliques et des protéines de la paroi cellulaire) sont le type le plus performant de défense. Parmi les rôles joués par les champignons endophytes, on peut mentionner :

- Protection contre les microorganismes pathogènes : plusieurs mécanismes peuvent être utilisés par les endophytes pour inhiber 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 décolonisation, et le mycoparasitisme (Cao et *al.*, 2009). De nombreuses espèces de champignons endophytes produisent plusieurs métabolites secondaires dont des substances antibiotiques (Strobel, 2002 ; Wang et *al.*, 2007). Plusieurs extraits liquides des cultures des endophytes ont démontré une inhibition de la croissance de plusieurs espèces de champignons phytopathogènes (Kim et *al.*, 2003).

7.4. Rôle antifongique des champignons endophytes :

Avec l'augmentation de la population mondiale, il est crucial de développer de nouvelles méthodes pour augmenter la production alimentaire. Toutefois, les champignons phytopathogènes sont une source majeure de pertes. L'usage de fongicides synthétiques est souvent envisagé comme une solution courante pour combattre ces maladies. Cependant, des études ont révélé que 52,3% des métabolites produits par les champignons endophytes inhibent la croissance d'un ou plusieurs microbes pathogènes (Gond et *al.*, 2010). L'efficacité antifongique des champignons endophytes varie selon les isolats. Certains ont montré un large spectre antifongique sur la croissance du mycélium de la plupart des champignons phytopathogènes testés (Chang Hong et *al.*, 2001). Par conséquent, en raison de leur richesse en métabolites antifongiques, les mycoendophytes représentent une source importante de métabolites bioactifs (Karaoui, 2017). Par exemple, une étude basée sur l'isolement des champignons endophytes à partir des feuilles de citronnier a révélé que trois d'entre eux, à savoir : *Colletotrichum*, *Alternaria* et *Nigrospora*, ont un effet antifongique variable contre *Penicillium digitatum*, avec un taux d'inhibition supérieur à 60% (Guerbouz et Khoudour, 2020).

7.5. Rôle antioxydants des champignons endophytes :

Les antioxydants, qui sont des molécules essentielles pour la protection des cellules contre les dommages causés par les radicaux libres, peuvent aider à prévenir diverses maladies dégénératives (Kaul et al., 2012). Traditionnellement, ces antioxydants naturels sont extraits de plantes médicinales, de fruits et de légumes. Cependant, les recherches récentes ont identifié les champignons endophytes comme une nouvelle source puissante d'antioxydants (Sharma et al., 2019).

Les champignons endophytes produisent une variété de composés antioxydants qui peuvent améliorer la tolérance au stress des plantes hôtes (Malinowski et Belesky 2006, Schulz et al. 2002, Yuan et al. 2009). Par exemple, l'endophyte *Pestalotiopsis microspora* produit les antioxydants puissants pestacine et isopestacine, qui éliminent les radicaux libres superoxyde et hydroxyle (Strobel et Daisy 2003). De plus, le mannitol, un alcool de sucre fongique couramment produit par les champignons endophytes, a une activité antioxydante (Jennings et al. 1998, Richardson et al. 1992). Il est également produit par l'état endophytique *Alternaria alternata*, où il a été suggéré qu'il supprime les réponses de défense des plantes médiées par ROS dans son hôte de tabac (Jennings et al. 1998).

Les champignons endophytes, grâce à leur production d'antioxydants, peuvent contribuer à améliorer la tolérance globale au stress oxydatif chez les plantes hôtes. Cela renforce l'idée que les plantes et les champignons endophytes sont des sources précieuses d'antioxydants naturels, soulignant le rôle potentiellement important des champignons endophytes dans ce domaine (Srinivasan et al., 2010). Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives pour l'utilisation des champignons endophytes dans la lutte contre les maladies dégénératives liées aux radicaux libres.

1. Généralité :

Rhizoctonia Solani a été décrit pour la première fois par Julius Kühn en 1858

Ce champignon constitue un ensemble d'espèces comprenant des groupe génétiquement distincts, appelés groupe d'anastomose. *Rhizoctonia* est un champignon Basidiomycota, qui ne produit pas de spores asexuées (appelées conidies) et ne produira qu'occasionnellement des spores sexuées (basidiospores)

Rhizoctonia possède une large gamme d'hôtes (Sneh, 1996). Elle affecte les organes souterrains, provoque la pourriture des racines, infecte les stolons et forme des sclérotés sur les tubercules

2. Maladies de la *Rhizoctonie* de la pomme de terre :

Les maladies les plus destructrices de la production de pommes de terre sont le charbon noir et le chancre de la tige causés par le champignon du sol *Rhizoctonia solani* Kühn (Téléomorphe : *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) (Kara et Arici, 2019). Les sclérotés (structures de repos fongiques asexuées denses), le mycélium (forme de croissance hyphale) ou les basidiospores sont les formes de *R. solani* utilisées pour survivre car elle ne produit pas de spores asexuées (Ajayi-Oyetunde et Bradley, 2018). La maladie est bien connue dans les régions de culture de la pomme de terre. Cependant, son incidence est plus élevée dans les climats tempérés que dans les tropiques. La maladie provoque des pertes économiques tant quantitatives que qualitatives. Quantitativement, les pertes surviennent en raison de l'infection des tiges, stolons et racines, ce qui diminue la taille et le nombre de tubercules, tandis que les pertes qualitatives surviennent car la maladie est fréquemment associée à des tubercules malformés et à des décolorations du charbon noir. *Rhizoctonia solani* n'attaque pas seulement les pommes de terre mais également d'autres plantes, notamment le riz, le maïs, le blé, la laitue, la betterave sucrière, le coton, la luzerne, l'arachide, le soja (Ajayi-Oyetunde et Bradley, 2018), et le niébé (Kankam et al., 2018). Le chancre de la tige est favorisé par des températures fraîches car il retarde l'émergence après la plantation.

3. Cycle et symptômes des maladies de la *Rhizoctonie* de la pomme de terre :

Les maladies de la *Rhizoctonie* de la pomme de terre peuvent être divisées en deux étapes : les chancres de *Rhizoctonia*, qui sont des lésions souterraines des organes végétaux pouvant survenir pendant la croissance de la plante ; et le dépôt de sclérotés à la surface des tubercules (Kara et Arici, 2019). La source d'inoculum lance le cycle de vie de *R. solani*. Les mycéliums ou les sclérotés, présents dans le sol ou la matière végétale en décomposition dans le champ, ou à la surface des tubercules de semence, peuvent être la source d'inoculum (Johnson et Leach 2020). Le pathogène peut se développer de manière saprophyte pendant le développement du mycélium, ou peut pénétrer dans les racines de la pomme de terre, y compris les tiges, les stolons et les tubercules en

développement. Des lésions enfoncées brun à noir sont observées sur les pousses, les stolons ou les racines peu de temps après l'émergence de la plante. Ces lésions peuvent provoquer un étranglement de la tige, entraînant un flétrissement et la mort (Wharton *et al.*, 2007). Des coussinets causés par l'infection des agents pathogènes sur les surfaces des pousses et des racines de la plante hôte sont créés par le pathogène, et la pénétration ne se produit que dans des conditions favorables dans ces zones. Les bourgeons d'infection pénètrent ensuite dans les faisceaux vasculaires sous les coussinets d'infection, où ils se développent en symptômes du 'chancre'. Le chancre de la tige se caractérise par des lésions enfoncées brun et noir sur la tige et une tige gravement étranglée, ce qui peut entraîner une croissance réduite des plantes, un flétrissement ou une mort précoce (Atkinson *et al.*, 2010). De plus, un phénomène d'ébourgeonnement des pousses, où les lésions étranglent et tuent les jeunes pousses, peut se produire et entraîner une mauvaise émergence des plantes et un enracinement clairsemé dans les cultures affectées (Johnson et Leach, 2020). Le processus d'infection peut se produire, détruire ou causer des malformations et des 'fissures' des tubercules sur les stolons nouvellement formés. Des sclérotés de couleur foncée se développent sur les tubercules filles, ce qui est appelé le charbon noir seulement à la fin du cycle de croissance, ce qui est le symptôme le plus visible (Woodhall *et al.*, 2008).

L'effet des maladies de la *Rhizoctonie* sur la pomme de terre dépend de la souche de *R. solani* impliquée, de la variété de pomme de terre et des facteurs environnementaux. Il a été démontré que *R. solani* AG-3 réduisait de manière significative les rendements globaux, ainsi que les rendements commercialisables, et augmentait l'incidence du charbon noir de la pomme de terre (Otrysko et Banville, 1992). Il a également été constaté par Hartill (1989) que l'infection par *R. solani* entraînait une augmentation du nombre de tubercules attaqués par le champignon et une augmentation du nombre de tubercules poussant sur les aisselles des feuilles. Cela suggère que les chancres des stolons obstruent le transfert des produits photosynthétiques. L'infection des tubercules par *R. Solani* AG-3 était détecté comme étant la source de taches sombres sur la peau des tubercules stockés avant le durcissement de la peau, en raison du dépôt de matière cireuse imperméabilisante dans la réaction du tubercule. (figure 8)

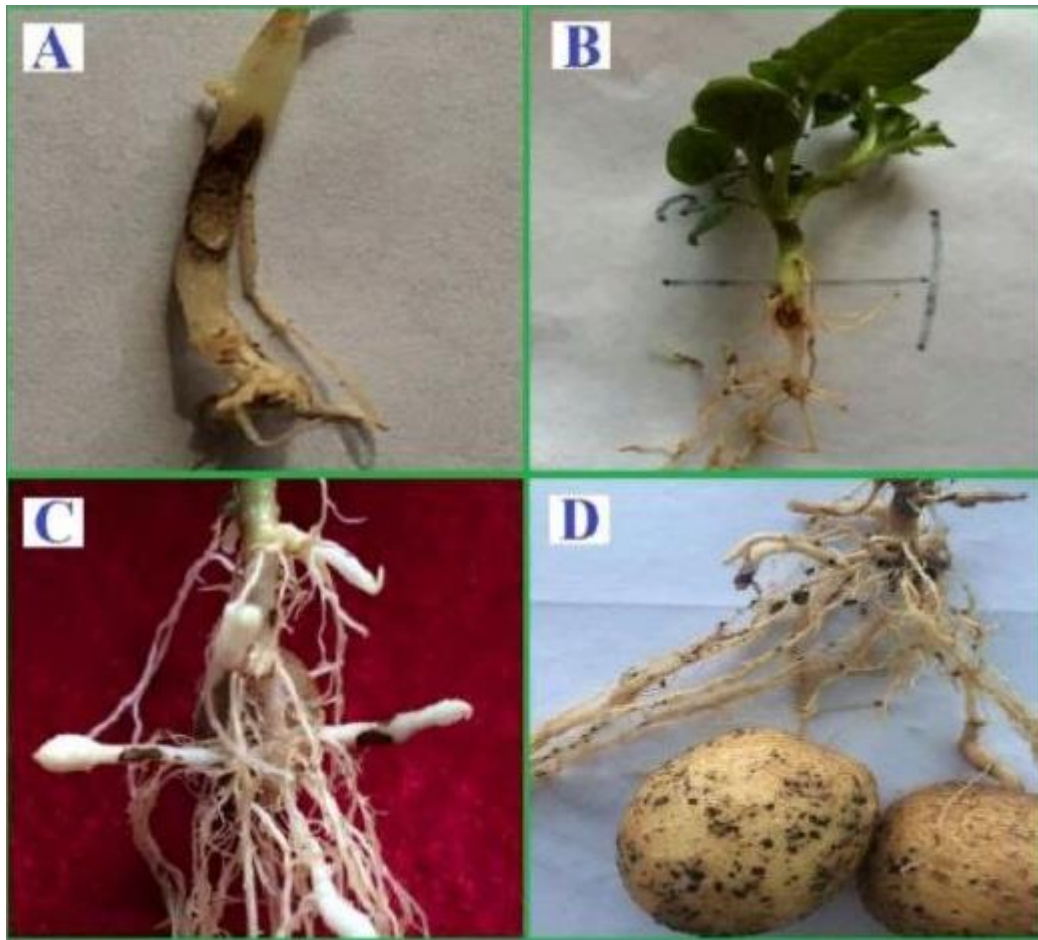


Figure 08 : Plantes de pomme de terre naturellement infectées par le chancre de la tige et la maladie du charbon noir de la pomme de terre. (A : Les bourgeons de pomme de terre montrent des croûtes après le semis ; B : Les racines de pomme de terre présentent des ulcérations brunes ; C : Les stolons de pomme de terre montrent des croûtes/chancres ; D : Sclérotés de *Rhizoctonia solani* (charbon noir) à la surface du tubercule)(Kankam *et al.*; 2021).

4. Les groupes d'anastomose de *R. solani*

De nombreux critères ont été utilisés pour délimiter les sous-groupes de *Rhizoctonia solani*, la méthode la plus largement utilisée pour le diviser en groupes plus petits et plus homogènes était exclusivement sur la base de critères tels que l'anastomose hyphale (Parmeter Junior *et al.*, 1969; Ogoshi, 1976; Anderson, 1982; Carling *et al.*, 1987; Sneh *et al.*, 1991; González García *et al.*, 2006), les groupes d'anastomose que l'on désigne par l'abréviation AG (Anastomosis Groups=) sont reconnus sur la base de la capacité de leurs hyphes à fusionner avec ceux d'une autre souche (Carling *et al.*, 1994; Brown *et Ogle*, 1997).

Ce jour, treize groupes anastomotiques (AG) désignés sous les noms AG1 à AG13 et AGBI ont été assignés sur la base de l'interaction des anastomoses hyphales. Parmi ces AG, AG-3, AG-5, AG-8, AG-4 et AG-2 ont été signalés comme infectant la pomme de terre (Nejad *et al.*, 2007). Des

tests de pathogénicité de ces isolats réalisés sur la pomme de terre ont montré que les isolats de AG-3 étaient plus virulents que les autres (Woodhall *et al.*, 2007). Ils ont travaillé sur la modification d'amorces précédemment publiées pour étudier les groupes d'anastomoses de *R. solani*. Les groupes d'anastomoses ont été attribués aux isolats par des analyses PCR conventionnelles et des observations hyphales. Vingt isolats de *R. solani* AG-3 ont été isolés à partir de pommes de terre malades produites dans les zones inférieures d'Égypte. La pathogénicité de ces isolats a été testée sur neuf variétés de pommes de terre en conditions de serre. Les symptômes de la croûte noire et du chancre du collet ont confirmé la pathogénicité de *R. solani* AG-3.

5. Phytotoxines de *R. solani* et mécanisme d'action :

Rhizoctonia solani peut pénétrer dans l'hôte par des moyens mécaniques ou à l'aide d'enzymes ou de toxines (Hu *et al.*, 2018). Les effets néfastes des phytotoxines produites par *R. solani* sur les plantes ne peuvent être surestimés. Par exemple, Lai *et al.* (1968) ont constaté dans leurs études que *R. solani* produit des phytotoxines qui peuvent entraîner des modifications de la perméabilité des membranes cellulaires et la dégradation de la paroi cellulaire de *Phaseolus aureus*. Yoder (1980) a rapporté que l'un des principaux facteurs impliqués dans la croissance du chancre causé par *R. solani* chez les plants de haricots est la production de phytotoxines. De même, Wyllie (1962) a postulé que le développement de symptômes dans les tissus hôtes avant la colonisation hyphale pourrait être dû à la production de substances phytotoxiques par *R. solani*. L'acide phénylacétique (PAA), trois dérivés hydroxy (OH-) et un dérivé méthoxy (MeO-) de (PAA), produits par *R. solani*, sont essentiels dans le processus de parasitisme et d'infection des plantes (Hu *et al.*, 2018). Le rôle du PAA et de ses dérivés dans les activités de régulation de la croissance des plantes et la phytotoxicité sur d'autres espèces végétales a été rapporté (Hu *et al.*, 2018). Cependant, dans les études précédentes, les résultats contradictoires et les limitations méthodologiques sur le rôle fondamental du PAA dans le développement de la maladie de *Rhizoctonia* et les concentrations optimales nécessaires pour induire la maladie chez leur hôte ne sont pas clairs (Betancourt et Ciampi, 2000). Les informations sur le rôle des dérivés OH- et MeO- du PAA dans la croissance et le développement des plantes ou la maladie de *Rhizoctonia* font défaut. Le PAA a également montré des propriétés antimicrobiennes et inhibe la croissance de *R. solani* (Hu *et al.*, 2018). Cependant, cela contredit les observations de Ding *et al.* (2008) selon lesquelles le champignon développe et métabolise le PAA. Lakshman *et al.*, (2006) ont rapporté que les dérivés OH- et MeO- du PAA sont absorbés par *R. solani* à partir de Les phytotoxines produites par *Rhizoctonia solani* jouent un rôle crucial dans le processus de parasitisme et d'infection des plantes (Hu *et al.*, 2018). Le rôle de l'acide phénylacétique (PAA) et de ses dérivés dans les activités de régulation de la croissance des plantes et la phytotoxicité sur d'autres espèces végétales a été rapporté (Hu *et al.*, 2018). Cependant, dans

les études précédentes, les résultats contradictoires et les limitations méthodologiques sur le rôle fondamental du PAA dans le développement de la maladie de *Rhizoctonia* et les concentrations optimales nécessaires pour induire la maladie chez leur hôte ne sont pas clairs (Betancourt et Ciampi, 2000). Les informations sur le rôle des dérivés OH- et MeO- du PAA dans la croissance et le développement des plantes ou la maladie de *Rhizoctonia* font défaut. Le PAA a également montré des propriétés antimicrobiennes et inhibe la croissance de *R. solani* (Hu et al., 2018). Cependant, cela contredit les observations de Ding et al. (2008) selon lesquelles le champignon développe et métabolise le PAA. Lakshman et al. (2006) ont rapporté que les dérivés OH- et MeO- du PAA sont absorbés par *R. solani* à partir de la phénylalanine via la voie du shikimate. Hermann et Weaver (1999) ont indiqué que cette voie comprend deux intermédiaires métaboliques avec la voie du métabolisme du carbone de l'acideC quinique (QA), qui est causée par la présence de QA dans le substrat de croissance lorsqu'il est libéré de la lignine dans le matériau végétal en décomposition. La transition entre les phases parasitaire et saprophyte du cycle de vie de ce champignon peut être régulée par l'interaction de ces voies métaboliques. L'activation de la voie du QA a récemment été démontrée pour contribuer à la séquestration des intermédiaires de la voie du shikimate, ce qui réduit le développement du précurseur du PAA, la phénylalanine, chez *R. solani* et d'autres filaments fongiques (Liu et al., 2003a). Liu et al. (2003b) ont déclaré que cela réduit la pathogénicité de *R. solani* lorsque les processus métaboliques au sein du champignon sont perturbés par l'ajout de substrats contenant du QA provenant des cultures hôtes. : Elucidating the role of the phenylacetic acid metabolic complex in the pathogenic activity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 3

6- Management de la maladie de *Rhizoctonia Solani* :

La stratégie de management de la maladie de *R. solani* vise à modifier le métabolisme fongique, offrant ainsi une idée novatrice par rapport aux pratiques de contrôle existantes, telles que l'utilisation de fongicides, qui sont essentiellement basées sur la réduction des populations de champignons (Sweetingham, 1996). Une prise de conscience élargie du métabolisme de *R. solani* aboutira à la formulation de méthodes de suppression de la maladie plus réussies et avancées.

Les différentes mesures de contrôle de la maladie de la pomme de terre causée par *Rhizoctonia* comprennent les éléments suivants :

Lutte biologique :

L'utilisation de microorganismes antagonistes a été proposé comme une composante de la lutte biologique pour contrôler *Rhizoctonia solani* comme les champignons *Gliocladium sp*, qui assurent le meilleur potentiel inhibiteur sur *Rhizoctonia solani* (Alaya Ben Salem et al.), et Cinq isolats de *Trichoderma harzianum* qui se sont avérés antagonistes contre *Rhizoctonia solani* (Demirci et al., 2011; Ibrahim, 2017). Ou encore des isolats bactériens *Pseudomonas sp* ont un

excellent potentiel d'utilisation comme agents de lutte biologique efficaces favorisant la croissance des plantes avec une incidence réduite de la maladie (Tariq *et al.*, 2010), même trois souches de bactéries *Pseudomonas fluorescens* B1, *Pseudomonas fluorescens* B2, et *Serratia plymuthica* B4, ont un potentiel élevé des endophytes dans le contrôle biologique de *Rhizoctonia solani* dans des conditions de champs (Grosch *et al.*, 2005). Plusieurs plantes ont été étudiées contre *Rhizoctonia solani*, comme *Dodonaea viscosa* qui a pu être utilisé pour la gestion de la maladie (Aslam *et al.*, 2010).

A un titre d'exemple La croissance moyenne des isolats de *R. solani* en l'absence et en présence d'isolats fongiques antagonistes dans la méthode des métabolites volatils. L'analyse statistique a révélé des différences significatives entre les champignons étudiés dans leur efficacité à inhiber la croissance des pathogènes. Le pourcentage d'inhibition de croissance le plus élevé a été trouvé avec *A. fumigatus* et *T. virens* (62,50 à 68,75 %). En revanche, le pourcentage d'inhibition le plus faible a été rapporté avec *C. lunata* (38,46 %), qui différait significativement de tous les autres traitements.

Lutte chimique :

Le contrôle chimique utilise des composés synthétiques pour tuer ou inhiber les organismes nuisibles (Oudejans, 1991). Des fongicides comme captan, fludioxonil et mancozèbe sont efficaces contre les maladies de *Rhizoctonia* sur les pommes de terre (Bains *et al.*, 2002). Cependant, aucun produit chimique n'est homologué spécifiquement pour *R. solani*, et leur usage est coûteux et parfois inefficace (Isakeit, 2011).

Bien que les fongicides puissent augmenter la résistance des plants, leur surutilisation pose des problèmes de coût, de toxicité et de résistance microbienne (Seong *et al.*, 2017). Il est donc nécessaire de développer des méthodes alternatives, comme les biofertilisants organiques, pour une gestion durable des maladies (Diallo *et al.*, 2011).

Lutte culturale :

Les pratiques culturelles sont largement recommandées pour gérer les maladies des plantes (Katan, 2010). Dans les champs de pommes de terre, ces méthodes incluent la rotation des cultures, l'inondation, le contrôle des mauvaises herbes, les cultures antagonistes et les amendements organiques (Arici et Sanli, 2014). La rotation des cultures est une méthode efficace et peu coûteuse, particulièrement bénéfique pour gérer la maladie de *Rhizoctonia solani* en réduisant les niveaux d'inoculum (Larkin et Brewer, 2020). Selon Adesiyani *et al.* (1990), les cultures sensibles sont alternées avec des cultures résistantes ou immunes. Par exemple, au Canada, un système de rotation biennal avec du trèfle rouge réduit la gale noire comparé à l'orge ou au ray-grass italien (Larkin *et al.*, 2010). Isakeit (2011) recommande d'utiliser des tubercules non infectés et de faire une rotation

des pommes de terre pendant 1-2 ans pour prévenir le chancre de la tige. Les cultures antagonistes produisent des composés toxiques pour les pathogènes fongiques, ce qui peut les détruire après l'invasion des plantes (Grainge et Almed, 1988; Karban, 2011). Ces plantes, appelées cultures pièges, empêchent les champignons de compléter leur cycle de vie.

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal :

Pour l'isolement des souches de champignons endophytes, un échantillon de feuilles d'un *Olea europaea* (olivier sauvage) sain et sans signes de maladie a été prélevé. Cet arbre est situé dans les champs de la commune de Sallah Bouchour, wilaya de Skikda (36.706900,6.852600). Le prélèvement a été effectué en Mars 2024 (figure 9).



Figure 9: Feuilles d'*Olea europaea* (olivier sauvage)

2. Méthodes :

2.1. Isolement :

Les champignons endophytes ont été isolés à partir des feuilles d'*Olea europea*, en adoptant la méthodologie établie par Petrini *et al.* (1993), avec quelques modifications mineures. Les échantillons végétaux ont d'abord été rincés à l'eau du robinet pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris et les particules de sol adhérentes, puis ils ont été lavés à l'eau distillée. Le traitement de surface a été réalisé en immergeant les échantillons de tissus séchés à l'air (2 cm) dans de l'éthanol à 70%, suivi d'un rinçage à l'eau distillée stérile. Les échantillons de tissus ainsi traités ont ensuite été laissés à sécher à l'air libre (figure 10).



Figure 10: Feuilles d'olivier sauvage séchées après rinçage

Les tissus ont ensuite été coupés en petits morceaux de 5 x 5 mm², qui ont ensuite été placés sur des boîtes de Pétri de gélose de pomme de terre dextrose (PDA) amendées à la streptomycine (150 mg .ml⁻¹) (figure 11).

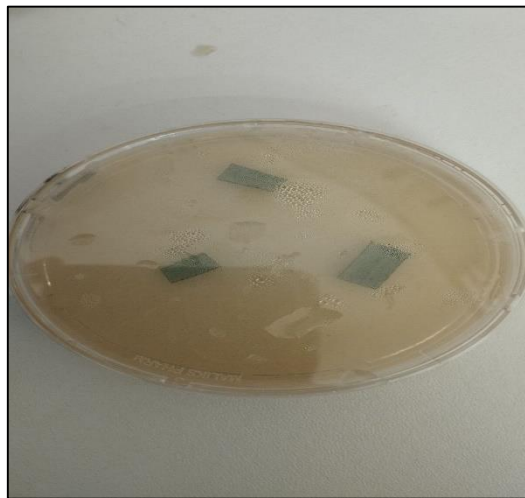


Figure 11 : Isolement des souches fongiques des feuilles d'olivier sauvage

Les boîtes ont ensuite été incubées à une température de 28 ± 2 °C et observées pour l'émergence de mycélium fongique à intervalles réguliers de 2 -7.

La purification des souches est effectuée par prélèvement d'un hyphes terminal après culture en boîte de Pétri sur un milieu neuf. La souche estensemencée au centre de la boîte. Le prélèvement a lieu lorsque le développement de la souche est suffisant. L'étude approfondie d'une souche est effectuée à partir d'une culture issue d'une seule spore.

2.2. Identification morphologique des champignons endophytes :

Les champignons isolés d'*Olea europea* ont été identifiés sur la base de ses caractéristiques morphologiques et microscopiques en utilisant le manuel de laboratoire de Barnett et Hunter(1998).

- **Identification macroscopique**

L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation à l'œil nu, des caractères cultureux (Aspect de la colonie, couleur des colonies et variation des couleurs en fonction du temps, couleur de l'envers des colonies).

- **Identification microscopique**

Toutes les moisissures isolées ont été soumises à une identification microscopique réalisée par une observation au grossissement X40. Cette identification étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycelium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture de parois).

2.3. Identification moléculaire :

L'ADN a été extrait d'une culture fongique fraîchement cultivée sur un milieu PDA. L'isolement de l'ADN génomique total a été effectué par la méthode décrite par Sim et al. (2010) avec quelques modifications mineures. Les gènes ribosomiaux ITS et 5.8 s ont été amplifiés avec l'amorce universelle pour les champignons : ITS 1F (5 TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3) et ITS 4R (5 TCC GCT TAT TGA TAT GC 3) dans un thermocycleur (Prima- 96, HIME-DIA). Tous les fragments ont été amplifiés dans un mélange de réaction total de 25 ml comprenant 2,5 ml de tampon PCR 10X, 0,5 ml de dNTPs, 1ml de chaque amorce (ITS1 et ITS 4), 0,25ml de Taq 1unit, 18,750ml d'eau milli Q (ultra pure) et 1ml d'échantillon d'ADN. La PCR a été réalisée avec un démarrage à chaud à 95 °C pendant 5 min (pré-dénaturation) suivi de 35 cycles à 94 °C pendant 1 min, 52 °C pendant 1 min (anéaling), 72 °C pendant 1 min (extension) et une extension finale à 72 °C pendant 5 min. Le produit amplifié a ensuite été purifié et élué par le kit mini ADN Gel/PCR Hi Yield de Real Genomics. Le produit d'ADN amplifié pur a été. La séquence de la souche correspondait aux séquences de référence disponibles dans la base de données du Centre national d'information biotechnologique (NCBI) en utilisant l'outil de recherche d'alignement local de base (nBLAST) pour sa correspondance la plus proche. Pour construire l'arbre phylogénétique, Molecular Evolutionary Genetics Analytics 7 a été utilisé. L'arbre optimal avec la somme des longueurs de branche = 14.13467475 est montré. Le pourcentage d'arbres répliqués dans lesquels les taxons associés se regroupent ensemble dans le test de bootstrap (1000 répliques) est indiqué à côté des branches (Saitou et Nei, 1987 ; Kumar et al., 2016).

2.4. Fermentation et extraction de métabolites secondaires à partir de champignons endophytes :

Chaque champignon endophyte isolé a été mis en culture dans 300 ml de bouillon de pomme de terre dextrose (PDB), répartis dans deux flacons de 500 ml. Ces cultures ont été incubées à une température de 28 ± 2 °C pendant une durée de 21 jours. Par la suite, les bouillons de culture ont été extraits avec un volume équivalent d'acétate d'éthyle (EtOAc). L'extrait EtOAc a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif réglé à une température de 60 °C et une vitesse de rotation de 65 tr/min. Enfin, l'extrait a été séché (figure 12).



Figure 12 : Incubation des souches sous agitation pendant 21 jours

2.5 Analyse par UPLC-ESI-MS-MS

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un instrument Shimadzu 8040 UPLC-ESI-MS-MS, équipé d'une pompe binaire Nexera XR LC-20AD et amélioré avec la technologie UFMS pour une sensibilité accrue. L'optimisation des standards polyphoniques a été réalisée par injection directe, éliminant ainsi le besoin d'une colonne. Les conditions ESI ont été définies comme suit : gaz CID à 230 KPs ; dynode de conversion à $-6,00$ kV ; température de l'interface à 350 °C ; température du DL à 250 °C ; débit du gaz nébulisant à 3,00 L/min ; bloc thermique à 400 °C ; et débit du gaz de séchage à 15,00 L/min. La phase mobile était composée de solvant A (eau avec 0,1 % d'acide formique) et de solvant B (méthanol). Le débit était maintenu à 0,4 mL/min et le volume d'injection était de 5 μ L. L'analyse a utilisé une colonne Restek Ultra C18 3 μ m 150 \times 4,6 mm, la température du four étant maintenue constante à 35 °C. Le gradient a été programmé comme suit : de 0,1 à 2 min A à 95 %, de 2 à 15 min A à 95 %, de 15 à 18 min A à 5 %, de 18 à 20 min A à 5 %, et de 25 à 25 min A à 95 %. Dans cette étude, l'identification et la quantification de 27 composés au total ont été réalisées dans des extraits fongiques.

2.6. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits fongiques :

2.6.1. Méthode DPPH

L'activité antioxydante des extraits fongiques a été déterminée en évaluant la capacité de piégeage des radicaux libres sur le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), selon la méthode décrite par Villaño et al. (2007), avec quelques modifications mineures. Une aliquote de 0,5 mL d'extraits éthanoliques a été ajoutée à 1,95 mL de solution DPPH (60 µM dans de l'éthanol), puis vortexée. L'absorbance a ensuite été mesurée à 515 nm en utilisant un spectrophotomètre UV/Vis. L'activité antioxydante (AA) a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$I\% = \frac{(A0 - A)}{A0} \times 100$$

D'où : A0 : l'absorbance de la solution de DPPH

A : absorbance de l'échantillon

Par la suite, la valeur IC50 a été déterminée, qui correspond à la concentration provoquant l'inhibition de 50% du radical libre DPPH.

2.6.2. Méthode ABTS

Pour la préparation de la solution mère d'ABTS, 5 ml d'eau, 19,2 mg d'ABTS et 3,3 mg de K₂S₂O₈ sont mélangés. Le mélange réactionnel est ensuite laissé à incuber à l'obscurité pendant 16 heures à température ambiante. La solution de travail d'ABTS⁺ est obtenue en diluant la solution mère d'ABTS avec de l'eau jusqu'à ce qu'une absorbance d'environ 0,7 à 734 nm soit atteinte (Re et al., 1999).

Dans chaque tube, 1 ml des différentes concentrations (0-1mg/ml) des extraits de la plante, encapsulés et non encapsulés, et 160 µl de la solution d'ABTS sont ajoutés. Ces tubes sont incubés à l'obscurité pendant 30 minutes. La lecture des absorbances est ensuite effectuée à 734 nm.

L'activité antioxydante est calculée en utilisant la formule suivante :

$$I\% = \frac{(A0 - A)}{A0} \times 100$$

D'où :

A0 : l'absorbance de la solution d'ABTS

A : absorbance de l'échantillon

Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS sont tracés en fonction des concentrations d'extrait pour déterminer l'index IC50.

2.7. Evaluation de l'activité antifongique des souches fongiques contre *Rhizoctonia solani*

2.7.1. Isolement et identification moléculaire

Isolation de *R. solani* et conditions de culture Afin d'isoler les champignons associés aux tubercules de pomme de terre, des échantillons de tubercules de pomme de terre présentant des symptômes typiques (noirceur) et atypiques (déformation du tubercule) de la maladie de *Rhizoctonia* ont été collectés (figure 13). Les tubercules ont été lavés à l'eau du robinet, coupés en petits morceaux, stérilisés avec une solution de NaOCl (1%) pendant 2 minutes, lavés à l'eau distillée stérile pour éliminer tout résidu de matériau stérile. Les morceaux de tubercule ont été stérilisés en surface dans de l'hypochlorite de sodium (1% NaOCl) pendant deux minutes, rincés à deux reprises dans de l'eau distillée stérile et séchés avec des papiers filtres pour éliminer tout excès d'eau. Les morceaux de pomme de terre ont été transférés dans des boîtes de Pétri contenant de l'Agar Dextrose de Pomme de Terre (PDA), complété avec un antibiotique de Chloramphénicol à une concentration de 200 mg / L. Les boîtes de Pétri ont été incubées à une température de 25±2 pendant quatre jours. Une colonie de *R. solani* apparue a été purifiée sur le même milieu (PDA) et identifiée sur la base des caractères morphologiques décrits par Parmeter et Whitney (1970).



Figure 13 : Isolement de *Rhizoctonia solani* à partir de la pomme terre

Les isolats de *R. solani* ont également été déjà identifiés en utilisant la technologie de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et en déterminant les séquences nucléotidiques. La région ITS partielle de chaque isolat de *R. solani* a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces universelles ITS1 (TCCGTTGGTGAACCAGCGG) et ITS4 (TCCTCCGC TTATGATATGC) (White *et al.*, (1990)). Pour le séquençage de l'ADN, les produits amplifiés par PCR ont été

purifiés sur gel en utilisant le kit de purification PCR FavorPrep et la paire d'amorces (ITS1 et ITS4) ont été utilisées pour identifier la souche. Les séquences nucléotidiques obtenues ont ensuite été alignées et comparées avec les séquences appartenant aux autres isolats fongiques et précédemment publiées dans la base de données NCBI en utilisant l'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST) (Zhang et al., 2012). Un alignement de séquences multiples des séquences nucléotidiques a été effectué et des arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant le logiciel MEGA6, en utilisant la méthode du voisinage.

2.7.2. Evaluation de l'activité antifongique par antagoniste :

Le test d'antagonisme sur boîte de petri de culture double a été utilisé pour évaluer l'influence des champignons endophytes contre *Rhizoctonia* (Elsherbiny et al. 2021). Les champignons ont été cultivés pendant sept jours à 28°C sur un milieu PDA. *Rhizoctonia* a été inoculée comme témoin (figure 14).

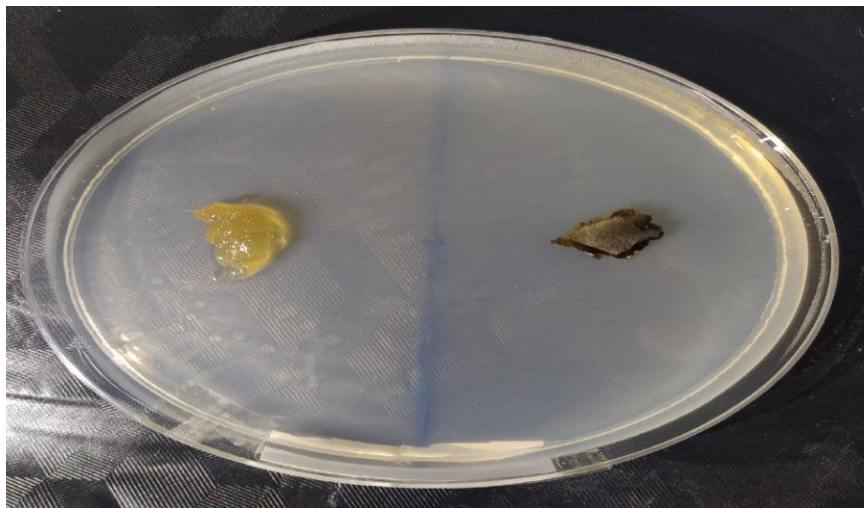


Figure 14 : Evaluation de l'activité antifongique par antagoniste contre *R. Solani*

Pour évaluer l'impact inhibiteur des champignons endophytes sur la prolifération du pathogène, le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale de *Rhizoctonia* a été déterminée.

$$I\% = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

où R1 et R2 sont les valeurs de croissance radiale des champignons dans les boîtes « témoins positifs et les boîtes de culture double, respectivement (Sumaiya et al., 2023).

2.7.3 Evaluation de l'activité antifongique par extraits fongiques :

L'activité antifongique des extraits a été évaluée *in vitro*. Les extraits ont été ajoutés à des milieux PDA à 50, 100, 150, et 200 mg /L-1. Les milieux de culture ont été inoculés d'une culture

Matériel et Méthodes

de *Rhizoctonia* en croissance active. Les cultures ont été incubées dans l'obscurité à 28 °C pendant trois jours. Le diamètre du mycélium a été mesuré quotidiennement dans deux directions perpendiculaires. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés après 72 h d'incubation.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale de *Rhizoctonia* est calculé en utilisant la formule suivante

$$I(\%) = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

R1:représente la valeur de la croissance radiale du champignon dans les boîtes « témoins positifs »

R2:représente la valeur de la croissance radiale du champignon les boîtes contenant l'extrait fongique

Ces expériences ont été réalisées en triple (Choma *et al.* 2011 ; Dissanayak *et al.*, 2015).

2.8. Analyse statistique :

Les moyennes, accompagnées de leurs écarts types, ont été calculées à partir de trois répétitions et représentées graphiquement à l'aide de Microsoft Excel 2013. Pour comparer les moyennes obtenues, un test ANOVA à un facteur a été effectué, suivi d'un test Post hoc - Tukey, en utilisant le logiciel Minitab® LLC (version 19.1.1.0, 2019). Les lettres en exposant (a, b, c, d) indiquent une différence significative au seuil de 0,05.

Résultats et discussion

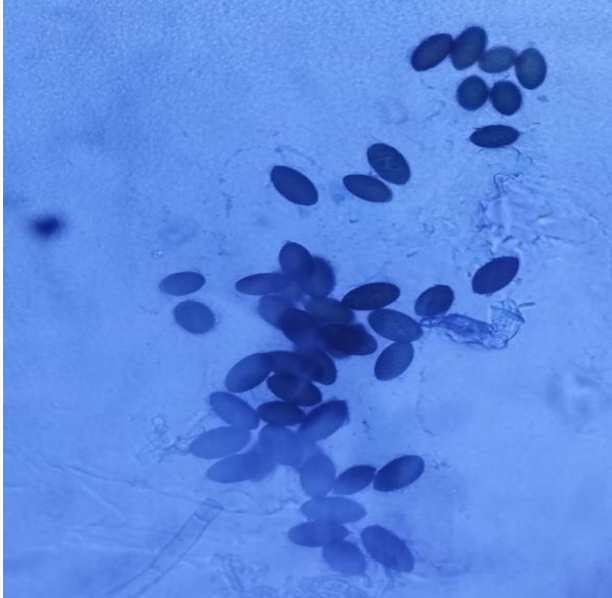
1-Resultat d'isolement :

L'exploration de la diversité fongique dans les feuilles d'*Oléastre* a conduit à l'identification de quatre souches distinctes. Suite à une identification morphologique et moléculaire (tableau 2 figure 15), trois espèces ont été déterminées : *Soridaria humana*, *Alternaria alternata* et *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus par d'autres chercheurs. Par exemple, Chliyeh et al. (2014) ont identifié une gamme d'espèces différentes sur les feuilles d'oliviers, y compris *Alternaria alternata*, *Pestalotia fici*, *Penicillium sp*, *Cladosporium sp*, entre autres, en utilisant la méthode modifiée du Blotter. De plus, ils ont signalé pour la première fois la présence de plusieurs champignons dans les oliviers, dont *Sclerotinia sp.*, *Trichothecium roseum*, *Drechslera australiensis*, *Circinella sp.* et *Pestalotia fici*. D'autres études, comme celle de Landuma et al. (2016), ont révélé un large éventail de 14 isolats fongiques différents à partir de feuilles désinfectées et non désinfectées, comprenant diverses espèces telles que *Alternaria SP*, *Aspergillus niger*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium sp.*, *Anthrinium sp.*, et d'autres. Malhadas et al. (2017) ont également signalé la présence de *P. commune*, *A. alternata* et *P. canescens*. D'autres auteurs, tels que Benzina-Tihar et al. (2020), ont trouvé *T. harzianum* et plusieurs isolats de *T. atroviride*. De même, Nicoletti et al. (2020) ont identifié *Alternaria sp.*, *Chaetomium sp.*, *Diaporthe sp.*, *Fusarium sp.*, *E. nigrum* et *Nigrospora oryzae*. Plus récemment, Asia Nzir et al. (2022) ont découvert la présence de *Fusarium redolens*. Ces études témoignent de la diversité fongique présente dans les feuilles d'oliviers, avec des variations dans les espèces isolées en fonction des méthodes et des conditions spécifiques de chaque étude. En ce qui concerne l'olivier sauvage, la diversité des champignons endophytes présents dans ses différents organes (aériens et racinaires) a été largement étudiée par diverses approches (Nicoletti et al., 2020). Les résultats jusqu'à présent ont montré que la communauté fongique endophyte associée à l'olivier est diverse et est influencée par le cultivar hôte (Fernández-González et al., 2019), la saison et la localisation géographique (Martins et al., 2016), et l'organe de la plante (Abdelfattah et al., 2015).”

2. Identification macroscopique et microscopique des souches isolées

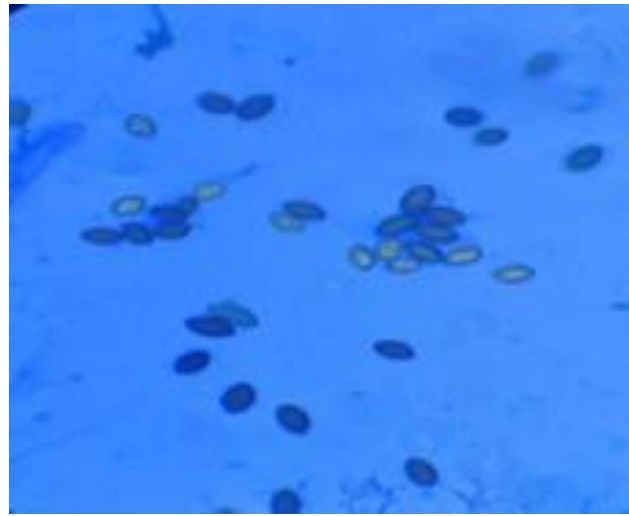
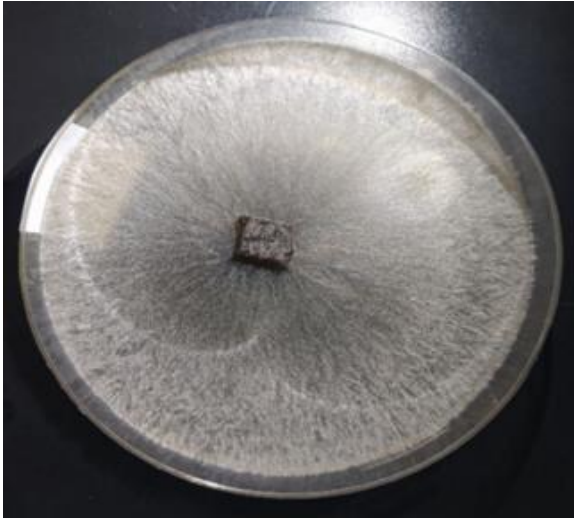
L'identification macroscopique, associée aux observations microscopiques des champignons endophytes de l'*Oléastre*, est illustrée de manière détaillée dans le tableau 2

Tableau (2) : identifications macroscopique et microscopiques des souches isolées

| La souche endophyte fongique | MACROSCOPIQUE | Observation microscopique (x 40) | Aspect Macroscopique et Microscopique |
|------------------------------|--|---|---|
| <i>Souche 1 (SK1)</i> |  |  | <p>Les colonies de SK1 sont caractérisées par leur teinte distincte de brun clair. Elles arborent une surface lisse qui, dévoile une structure ascospores forme ovales.</p> |

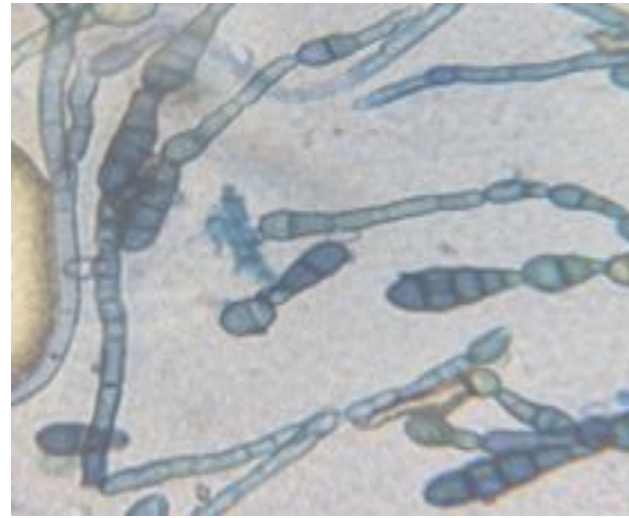
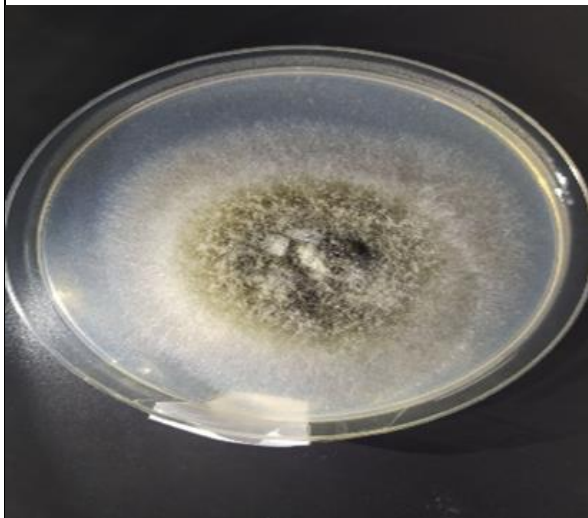
Résultats et discussion

Souche 2(SK2)



Les colonies de cette souche sont de couleur noire et présentent une texture duveteuse, caractérisée par la présence de ascospores forme ovales.

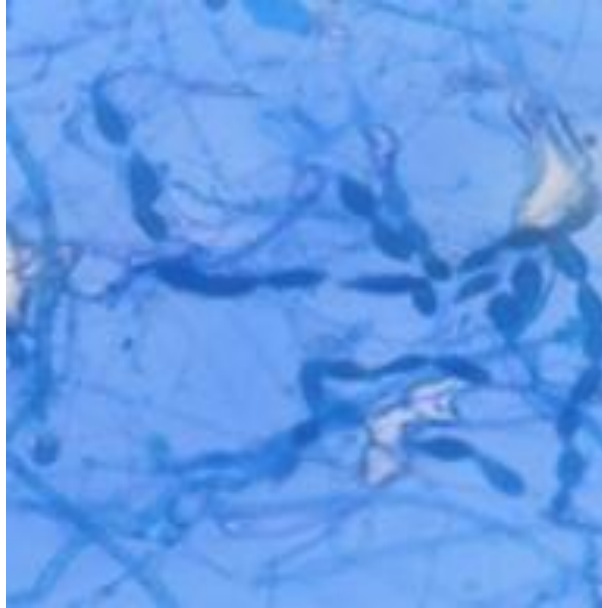
Souche 3(SK4)



Les colonies sont légèrement veloutées, de couleur initialement blanche qui devient ensuite vert olivé. Les conidies sont généralement allongées et polycellulaires

Résultats et discussion

Souche 4(SK5)



Les colonies de cette souche ont initialement de couleur blanche verdâtre et présentent une texture cotonneuse. Avec le temps, la couleur des colonies peut s'intensifier et devenir plus sombre en raison de la production de spores. Les macroconidies sont typiquement formées, avec multi septa (formant un mycélium cloisonné). Les conidies sont généralement produites en chaînes caractéristiques.

3. Identification moléculaire :

Dans le cadre de notre étude, nous avons procédé à une identification moléculaire pour confirmer les résultats de la pré-identification.

Pour ce faire, un arbre phylogénétique a été construit en utilisant le logiciel MEGA7.0.26. Nous avons comparé quatre séquences à dix-sept séquences d'ascomycètes proches de celles obtenues par BLAST. Ces séquences ont été alignées avec ClustalW avant d'utiliser la méthode d'inférence phylogénétique Neighbor-Joining (NJ). La robustesse de l'arbre a été testée avec le test du Bootstrap, en générant 1000 arbres artificiels. La souche *Fonsecaea nubica* CBS 269.64 a été utilisée comme groupe externe.

L'interprétation des résultats de cette analyse phylogénétique a permis de tirer plusieurs conclusions.

Les souches SK1 et SK2 seraient attribuées à l'espèce *Sordaria humana*. La souche SK4 serait attribuée à l'espèce *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*. Enfin, la souche SK5 serait attribuée à l'espèce *Alternaria alternata*. Ces résultats soulignent l'importance de l'identification moléculaire dans la confirmation des résultats de la pré-identification.

L'analyse phylogénétique moléculaire par la méthode de Neighbor-Joining (NJ) est illustrée dans la figure (15). L'arbre optimal avec la somme de la longueur des branches = 0,63680960 est présenté. Le pourcentage d'arbres de répliquats dans lesquels les taxons associés sont regroupés ensemble dans le test de bootstrap (1000 répliquats) est indiqué à côté des branches (Felsenstein, 1985).

L'arbre est dessiné à l'échelle, avec les longueurs des branches dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode du Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004). Elles sont exprimées en unités du nombre de substitutions de bases par site. L'analyse a impliqué 22 séquences nucléotidiques.

Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait un total de 476 positions dans l'ensemble de données final (Kumar *et al.*, 2016).

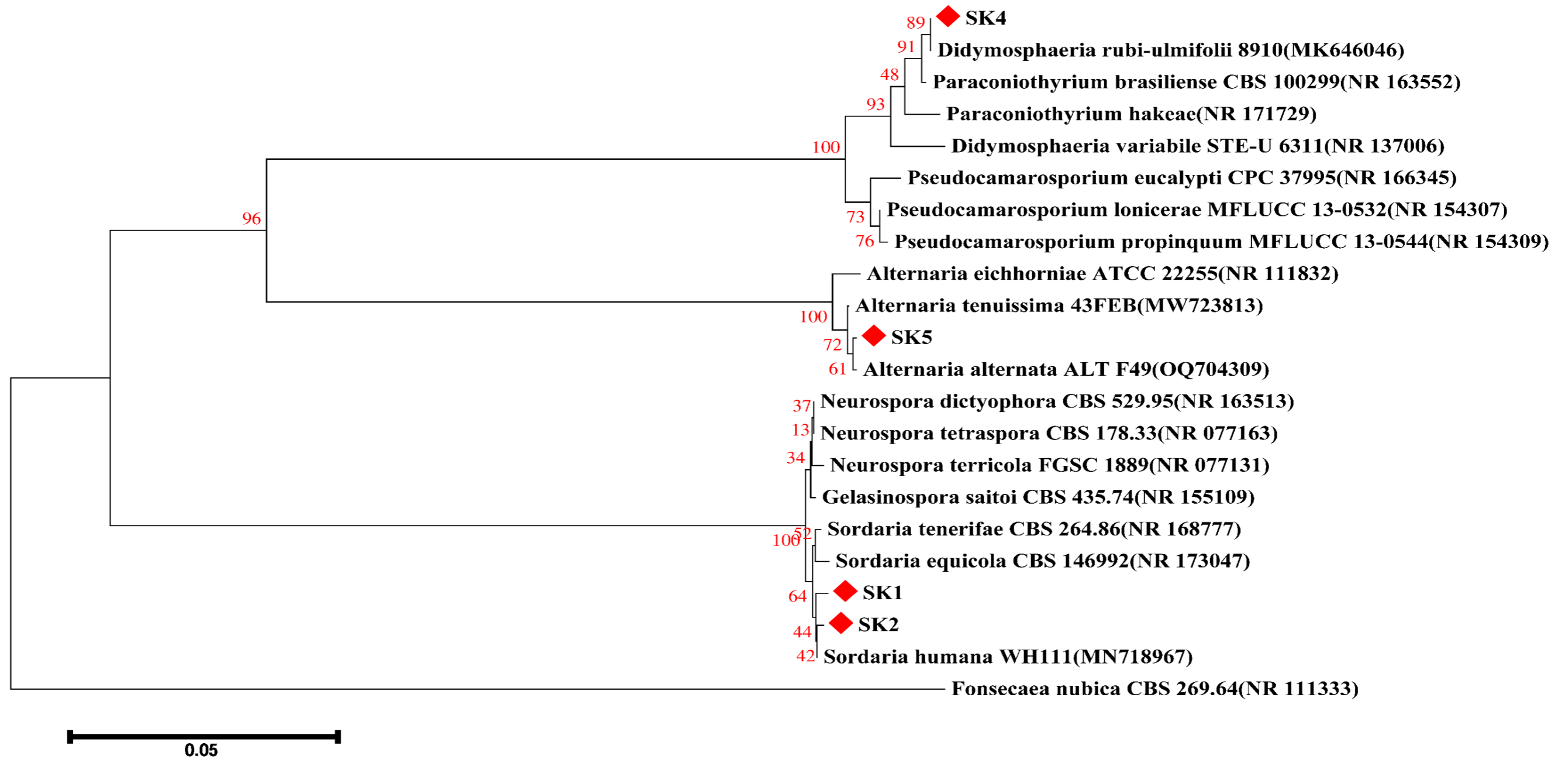


Figure 15 . Analyse phylogénétique moléculaire par la méthode de Neighbor-Joining (NJ)

Résultats et discussion

4. Analyses UPLC ESI MS MS:

Le tableau (3) montre les analyses LC-MS/MS pour chaque extraits des souche fongique .

Tableau (3) : Analyses UPLC ESI MS M d extrait d *Alternaria alternata* , *Didymosphaeria rubi -ulmifolii* et *Sordaria humana* .

| ID# | Name | Molecular Formula | Molecular Weight | ESI Charge (+/-) | m/z | Ret. Time | Quantification (µg Analyte/g of Extract of <i>Alternaria alternata</i>) | Quantification (µg Analyte/g of Extract of <i>Didymosphaeria rubi -ulmifolii</i>) | Quantification (µg Analyte/g of Extract of <i>Sordaria Humana</i>) |
|-----|---------------|---|------------------|------------------|--|-----------|--|--|---|
| 1 | Kojic acid | C ₆ H ₆ O ₄ | 142.11 | (+) | 143.0000>69.0500 | 14.689 | 12174 | 26701 | 18913 |
| 2 | Folic Acid | C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ | 441 | (+) | 442.9000>323.4500 | 18.553 | 110980 | 160682 | 108446 |
| 3 | beta carotene | C ₄₀ H ₅₆ | 536.87 | (+) | 537.2000>23.1000 | 15.477 | 35311 | 185160 | 51698 |
| 4 | Curcumin | C ₂₁ H ₂₀ O ₆ | 368.4 | (+) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 4491 | 0 |
| 5 | Cinnamic acid | C ₉ H ₈ O ₂ | 148.16 | (+) | 149.0500>117.0000 | 12.147 | 56617 | 28803 | 12689 |
| 6 | Epicatechin | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | 290.27 | (+) | 290.9000>123.1000 | 7.542 | 190875 | 14558 | 422451 |
| 7 | thymol | C ₁₀ H ₁₄ O | 150.22 | (+) | 151.1000>109.0500 | 11.519 | 16570 | 0 | 10781 |
| 8 | Luteolin | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 286.24 | (+) | 286.7500>153.0000 | 11.081 | 4736 | 25025 | 0 |
| 9 | chrysin | C ₁₅ H ₁₀ O ₄ | 254.24 | (+) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 10441 | 34346 |

Résultats et discussion

| | | | | | | | | | |
|----|------------------|---|--------|-----|--|--------|----------|----------|----------|
| 10 | Oleanolic Acid | C ₃₀ H ₄₈ O ₃ | 456.7 | (+) | 457.3000>411.5000 | 17.099 | 20314 | 189930 | 1075 |
| 11 | acide maleic | C ₄ H ₆ O ₅ | 134.09 | | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | Oleuropin | C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃ | 540.5 | (-) | 541.3000>524.5500 | 20.259 | 7572 | 3640 | 12408 |
| 13 | Quercetin | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | 302.23 | (+) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 3495 | 0 |
| 14 | Resveratrol | C ₁₄ H ₁₂ O ₃ | 228.24 | (+) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 27859 | 11160 |
| 15 | Riboflavin | C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆ | 376.4 | (+) | 377.9000>361.3500 | 14.704 | 24578324 | 27567957 | 34782090 |
| 16 | Rutin | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 610.5 | (+) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 59617 | 1735 |
| 17 | Sinapic Acid | C ₁₁ H ₁₂ O ₅ | 224.21 | (+) | 225.0000>91.1000 | 10.600 | 8642 | 17563 | 27500 |
| 18 | Syrinjcic Acid | C ₉ H ₁₀ O ₅ | 198.17 | (+) | 199.0000>155.1500 | 20.680 | 43170 | 63820 | 0 |
| 19 | ferulic acid | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 194.18 | (+) | 194.8000>177.0500 | 3.027 | 161510 | 15553 | 0 |
| 20 | naringenin | C ₁₅ H ₁₂ O ₅ | 272.25 | (+) | 273.0500>153.0000 | 10.790 | 26468 | 28909 | 22178 |
| 21 | acide picrique - | C ₆ H ₃ N ₃ O ₇ | 229.1 | (-) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | Chlorogenic Acid | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 354.31 | (-) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | Kampferol | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 286.24 | (+) | No peak is detected. | 0.000 | 0 | 0 | 0 |

Résultats et discussion

| | | | | | | | | | |
|----|----------------------------------|--|---------------|-----|--|--------|------|------|--------|
| 24 | 3.5.dihydroxybenzoic Acid | C₇H₆O₄ | 154.12 | (-) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 5569 | 0 |
| 25 | 4-mythoxybenzoic Acid | C₈H₈O₃ | 152.15 | (+) | 151.0500>107.0500 | 7.486 | 3550 | 0 | 618433 |
| 26 | Caffeic Acid | C₉H₈O₄ | 180.16 | (-) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | Vanillic Acid | C₈H₈O₄ | 168.15 | (-) | No peak is found in Window/Band range. | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | gallic acid | C₄H₄O₄ | 170.12 | (-) | 169.0000>124.9000 | 10.839 | 3008 | 5941 | 7851 |
| 29 | p-Coumaric Acid | C₉H₈O₃ | 164.16 | (-) | 163.0500>118.9500 | 8.684 | 2461 | 0 | 0 |

Les résultats obtenus par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ont permis d'identifier la composition chimique de différentes souches fongiques. Pour la souche *Alternaria alternata*, un total de 17 composants a été détecté, avec une emphase particulière sur des majeurs tels que la riboflavine, l'acide férulique, l'épicatéchine et l'acide folique. La souche *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*, quant à elle, affiche une composition plus riche de 20 composants, incluant des majeurs comme la riboflavine, le bêta-carotène, l'acide oléanolique et l'acide folique. Enfin, la souche *Sordaria humana* présente 16 composants, parmi lesquels se distinguent des majeurs tels que l'acide folique, la riboflavine, l'acide mythoxybenzoïque et l'épicatéchine.

Les recherches menées par Wang et al. (2021) ont mis en évidence la présence des composés Paeonia et lactiflora dans la souche d'*Alternaria alternata*. Cette découverte s'ajoute aux résultats de l'analyse PAR UPLC ESI MS Mréalisée par Deshidi et al. (2017), qui ont identifié les principaux composants de cette souche, incluant l'alternariol, l'éther méthyle 9-alternariol, ainsi qu'un nouvel isomère structurel de l'alternariol. Par ailleurs, les travaux de Li et al. (2016) ont révélé la présence des composés 12-méthoxy sordariol, Bisordariols A, Bisordariols B, Bisordariols C et Bisordariols D dans la souche *Sordaria macrospora*. Cette découverte est appuyée par les résultats de Bouillant et al. (1989), qui ont identifié les composés Cyclosordariolone, Heptacyclosordariolone et cis-Sondariol pour la même souche. Ces études soulignent la diversité des composés présents dans ces souches fongiques, ainsi que l'importance de l'analyse PAR UPLC ESI MS Mdans leur caractérisation chimique.

5. Activité antioxydante :

Le tableau 04 illustre les valeurs IC50, exprimées en µg/ml, pour chaque extrait de souche fongique. Ces valeurs sont comparées à celles du Trolox, un antioxydant de référence, dans le cadre des tests de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS.

Tableau (04) : Les valeurs IC50 en µg/ml d DPPH et ABTS

| Les souches fongiques | IC50 (mg/ml) DPPH | IC50 (mg/ml) ABTS |
|---|---------------------------|--------------------------|
| <i>Didymosphaeria rubi- ulmifolii</i> | 0,11 ± 0,00 ^a | 0,12 ± 0,00 ^a |
| <i>Sordaria humana</i> | 0,13 ± 0,005 ^a | 0,12 ± 0,00 ^a |
| <i>Alternaria alternata</i> | 0,11 ± 0,00 ^a | 0,11 ± 0,01 ^a |
| <i>Trolox</i> | 0.09±0.57 ^a | 0.10±0.58 ^a |

Les résultats obtenus pour les deux méthodes DPPH et ABTS montrent une forte activité antioxydante. Les IC₅₀ obtenues pour la méthode DPPH sont de 0,13±0,005 mg/ml pour *Sordaria humana*, 0,11±0,00 mg/ml pour *Didymosphaeria rubi –ulmifolii* et *Alternaria alternata*, respectivement. Tandis que pour la méthode ABTS sont 0,12±0,00mg/ml pour *Sordaria humana* et *Didymosphaeria rubi –ulmifolii*, 0,11±0,01mg/ml pour *Alternaria alternata*.

Il n'existe pas une différence significative ($p \geq 0,05$) entre les IC₅₀ des 3 souches isolées. Cette activité est très puissante en comparant les IC₅₀ des souches avec TROLOX. Pour la méthode ABTS, aucune différence significative ($p \geq 0,05$) n'a été observée entre les valeurs d'IC₅₀ des trois souches isolées. Cependant, l'activité antioxydante s'avère très puissante lorsque les valeurs d'IC₅₀ des souches sont comparées à celle du TROLOX. En revanche, les résultats de l'évaluation de l'AA diffèrent de manière notable de ceux rapportés par Ouzid et al. (2018), qui ont noté une concentration d'IC₅₀ de 6,14 ± 0,07 mg/mL. De même, Braz et al. (2009) ont documenté des valeurs variant de 86,7 µg/mL à 687,2 µg/mL, démontrant une grande diversité d'activités antioxydantes au sein de cette souche. Plus récemment, Chatterjee et al. (2019) ont identifié une valeur d'IC₅₀ significativement plus faible, à 38,0 ± 1,7 µg/mL pour la fraction d'*Alternaria alternata*, soulignant une amélioration notable de l'efficacité antioxydante.

Les études sur les activités antioxydantes des extraits de champignons, tels que *Sordaria sp.* et *Alternaria sp.*, ont révélé des valeurs significatives d'IC₅₀ dans divers tests, mettant en lumière leur potentiel en tant que sources de composés bénéfiques. Par exemple, les travaux de Maduranga (2018) ont montré que *Sordaria sp.* isolée à partir de différents lichens présente une forte activité de piégeage des radicaux, avec des valeurs d'IC₅₀ allant de 24,6 à 31,19 µg/mL. D'autres recherches, comme celles d'Ouzid et al. (2018) et de Fernandes et al. (2009), ont également confirmé les capacités antioxydantes de certains extraits fongiques, avec des valeurs d'IC₅₀ variées allant de 6,14 mg/mL à 86,7 µg/mL.

Cette activité antioxydante peut être attribuée à la présence de composés phénoliques, comme le confirme l'analyse phytochimique PAR UPLC ESI MS M (Elghaffar et al., 2022). Les flavan-3-ols, tels que les catéchines (CT) et les épicatechines (ECT), ont été identifiés comme des contributeurs majeurs à cette activité (Rockenbach et al., 2011; Makris et al., 2007). Des études ont également montré que la structure moléculaire de ces composés, ainsi que des facteurs tels que la géométrie plane et la présence de liaisons hydrogène, influencent leur efficacité antioxydante (Leopoldini et al., 2007; Vagánek et al., 2014).

De plus, des champignons endophytes, comme ceux isolés à partir de lichens, ont été identifiés comme des sources prometteuses de métabolites antioxydants (Khiralla *et al.*, 2015). Ces métabolites, tels que l'acide oléanolique et l'acide férulique, ont démontré une activité antioxydante significative dans diverses études (Xin Wang *et al.*, 2010; Choe, 2020). Par exemple, l'acide oléanolique a montré une activité antioxydante supérieure à celle de l'alpha-tocophérol et de l'acide ursolique dans certaines conditions expérimentales (Mei-Chin Yin *et al.*, 2007).

En outre, certains métabolites, tels que la riboflavine, ont été identifiés comme des nutriments antioxydants essentiels, jouant un rôle critique dans divers processus biologiques (Lykstad et Sharma, 2021). Des études ont mis en évidence les effets antioxydants de la riboflavine et ont souligné son importance pour la santé humaine (Ashoori *et al.*, 2014; Ertas *et al.*, 2018).

6-Activité antifongique :

6.1. Test d'antagonisme

Les résultats du test d'antagonisme, qui a été réalisé en plaçant les souches en opposition avec *R. solani* dans la même boîte de Pétri, sont présentés dans les figures (16, 17)

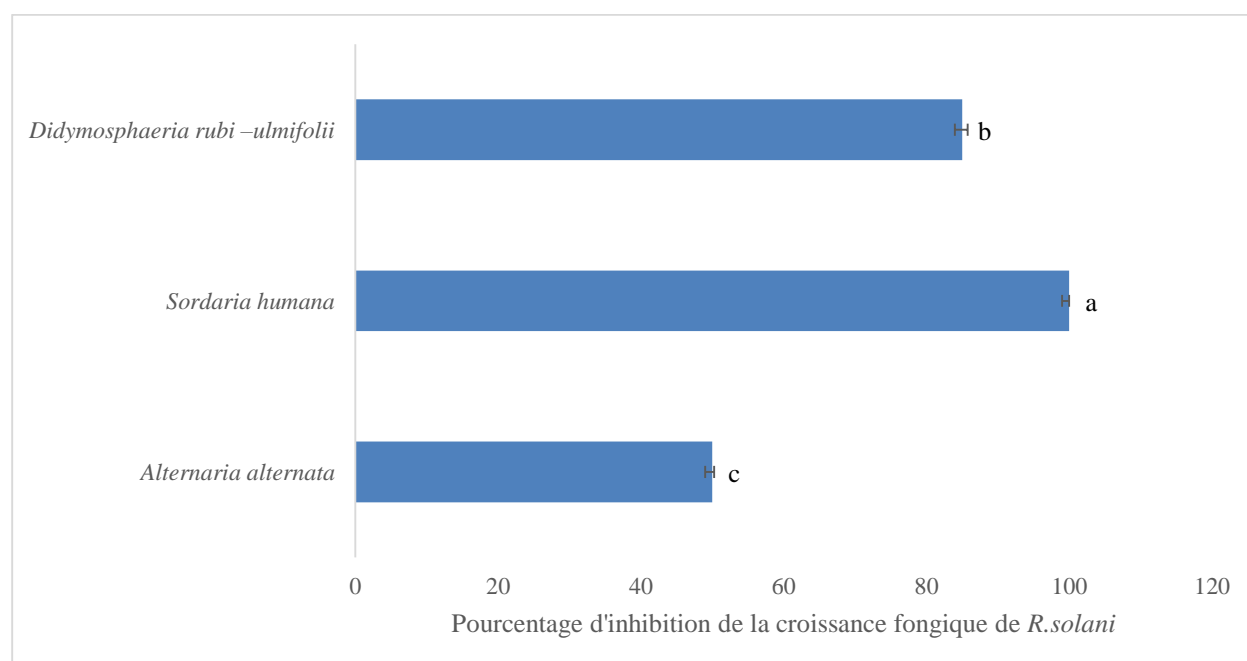


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition (%) de *R. solani* par les différentes souches endophytes

Les résultats présentés dans les figures (16, 17) ont montré une différence significative ($p < 0.05$) entre les champignons étudiés dans leur efficacité, toutes ayant montré une forte

Résultats et discussion

efficacité dans l'inhibition de la croissance de agent pathogène (*R.solani*). Le pourcentage d'inhibition de croissance le plus élevé a été avec *Soridaria humana* ($100\pm 0.00\%$) suivi par avec *Didymosphaeria-rubi-ulmifolii* ($85 \pm 0.35\%$) , et *Alternaria alternata* ($50 \pm 0.10\%$) cette dernière était égal avec l'agent pathogène.

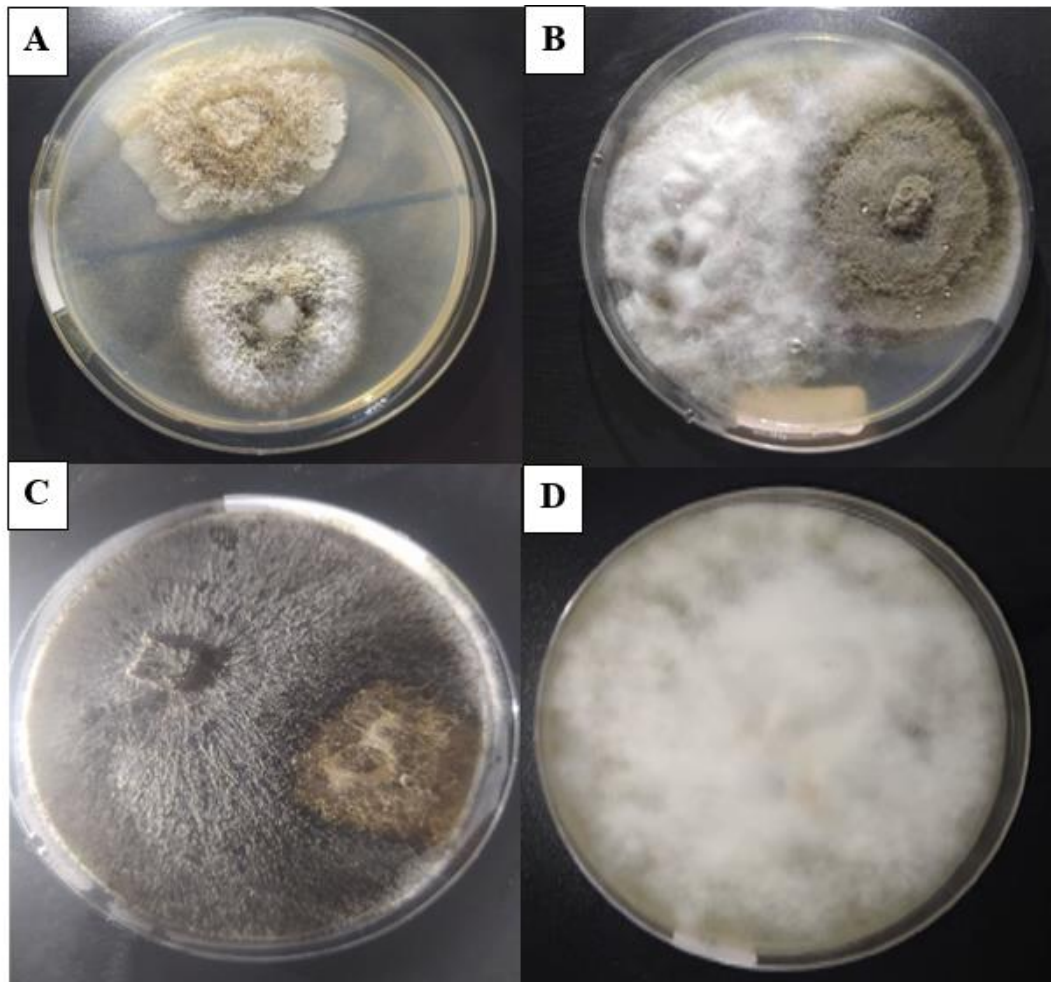


Figure 17 : Test d'antagonisme contre *R. solani* : A : *Alternaria alternata*, B : *Didymosphaeria-rubi-ulmifolii*, C : *Soridaria humana*, D : Témoin :*R. solani*

Nos résultats sont en accord avec les études précédentes qui ont démontré une activité antifongique significative des genres isolés contre les maladies fongiques des plantes.

Les recherches sur l'activité antagoniste des isolats de *S. fimicola* contre le pathogène *F. graminearum* montrent des résultats prometteurs. À une concentration de 1×10^9 spores/ml, ces isolats ont montré des taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. graminearum* de 84%, 88% et 91% respectivement (Dubey *et al.* 2014). En augmentant les concentrations, une diminution encore plus marquée de la croissance du pathogène a été observée.

Résultats et discussion

En particulier, l'activité antagoniste de *S. fimicola* a été bien documentée. À la même concentration de 1×10^9 spores/ml, *S. fimicola* a montré des taux d'inhibition élevés : plus de 78% pour le traitement du sol, et plus de 83% pour les traitements foliaires et des semences chez deux cultivars de blé. Le traitement combiné des semences et du sol a même montré un taux d'inhibition supérieur à 90% (Abdallah *et al.* 2018). *S. fimicola* avait déjà été identifié pour son activité antagoniste contre *F. graminearum* dans le maïs, en conditions de serre. Abdallah *et al.* (2018) ont observé non seulement une inhibition de la croissance de *F. graminearum*, mais aussi une réduction de la production de zéaralénone, une mycotoxine. Dewan *et al.* (1994) avaient attribué cette activité à la libération de composés bioactifs, notamment le triaccontanol et l'indole-3-carboxaldéhyde, qui agissent comme stimulateurs de croissance naturels. Ces composés contribuent à la croissance des plantes et réduisent l'incidence des maladies, comme celle causée par *Gaeumannomyces graminis var. tritici*.

Les études actuelles corroborent ces résultats, indiquant que l'effet antagoniste de *S. fimicola* contre *F. graminearum* et son soutien au développement des plantes sont probablement dus à la production de ces composés bioactifs. Ces recherches mettent en lumière le potentiel des isolats microbiens comme agents de biocontrôle efficaces pour la gestion des maladies fongiques dans les cultures, offrant ainsi une alternative écologique et durable aux traitements chimiques traditionnels.

La co-culture de *R. solani* vs la *Sordaria humana*, une zone de confrontation a été observée lors de la co-culture. Cette zone sombre était située dans la zone où les deux micro-organismes interagissent (zone d'interaction), comme décrit par Bertrand *et al.* (2014). Cela suggère que les deux micro-organismes sont engagés dans une "guerre chimique" par la production de métabolites secondaires. Ces métabolites peuvent agir comme des régulateurs transcriptionnels ou des modificateurs des voies biosynthétiques des micro-organismes concurrents (Bolívar-Anillo *et al.*, 2024).

Les mécanismes de contrôle principaux, traditionnellement supposés être le mycoparasitisme, l'antibiose et la concurrence pour les ressources et l'espace, ont évolué pour inclure des effets significatifs sur les plantes, notamment l'induction de résistance systémique ou localisée. Ces champignons sont maintenant utilisés en quantités significatives en agriculture, tant pour le contrôle des maladies que pour l'augmentation des rendements (Melo et Faull, 2000 ; Harman, 2006 ; Paul et Masih, 2006).

Les endophytes fongiques sont connus pour inhiber le développement de *Rhizoctonia solani* par la production d'enzymes hydrolytiques de la paroi cellulaire, telles que la β -glucosidase (Melo et Faull, 2000). Ces champignons ont la capacité de coloniser toutes les

parties du système racinaire et de persister longtemps lorsqu'ils sont appliqués en traitement des semences (Paulitz et Belanger, 2001). Leur mode d'action comprend également la compétition pour les nutriments par la production d'enzymes lytiques, empêchant ainsi la germination des conidies du pathogène (Paulitz et Belanger, 2001). En outre, les endophytes fongiques possèdent une résistance innée à la plupart des produits chimiques agricoles, bien que certaines souches montrent des susceptibilités ou des résistances à une gamme de pesticides (Harman, 2006).

Ces organismes ont été utilisés contre un large spectre de pathogènes, aussi bien telluriques que foliaires (Camporota 1985; Davet 1986; Ouazzani-Touhami *et al.*, 1994; Hmouni *et al.*, 1999; Mouria *et al.*, 1997). Des recherches ont également montré que certaines souches fongiques peuvent stimuler la croissance de certaines plantes, comme la laitue, en l'absence de tout agent pathogène (Lynch *et al.*, 1991a). En particulier, les endophytes fongiques induisent des changements structuraux et chimiques dans les parois cellulaires des plantes, augmentant ainsi leur résistance aux infections par les phytopathogènes (Brimner et Boland, 2003).

Des études récentes ont exploré des interactions spécifiques entre les endophytes fongiques et d'autres champignons pathogènes. Par exemple, les hyphes des endophytes et du pathogène *R. solani* ne se rencontrent pas directement; cependant, les hyphes des endophytes fongiques interagissent directement avec les hyphes pathogènes, les connectant et les coupant, ce qui entraîne la déformation et l'effondrement des hyphes de *R. solani* (Motlagh *et al.*, 2022). Les spores des endophytes fongiques entourent et déforment également les hyphes de *R. solani*, provoquant une accumulation de mélanine, un rétrécissement cytoplasmique, une coagulation et une malformation du mycélium (Hishar *et al.*, 2023).

Certaines souches fongiques démontrent un mécanisme de parasitisme/hyperparasitisme contre *R. solani*, où le mycélium des souches fongiques s'enroule en spirale et pénètre le mycélium de *R. solani*, entraînant un rétrécissement cytoplasmique, une coagulation et une malformation des hyphes pathogènes (Hishar *et al.*, 2023). De plus, l'étude des interactions entre le filtrat de *C. lunata* et *R. solani* a révélé que les hyphes traités avec le filtrat accumulaient de la mélanine et montraient des déformations notables, des gonflements et un amincissement des parois cellulaires, tandis que les hyphes non traités montraient une croissance normale et équilibrée (Komeil *et al.*, 2019).

6.2. Activité antifongique des extraits des souches endophytes d'olivier sauvage

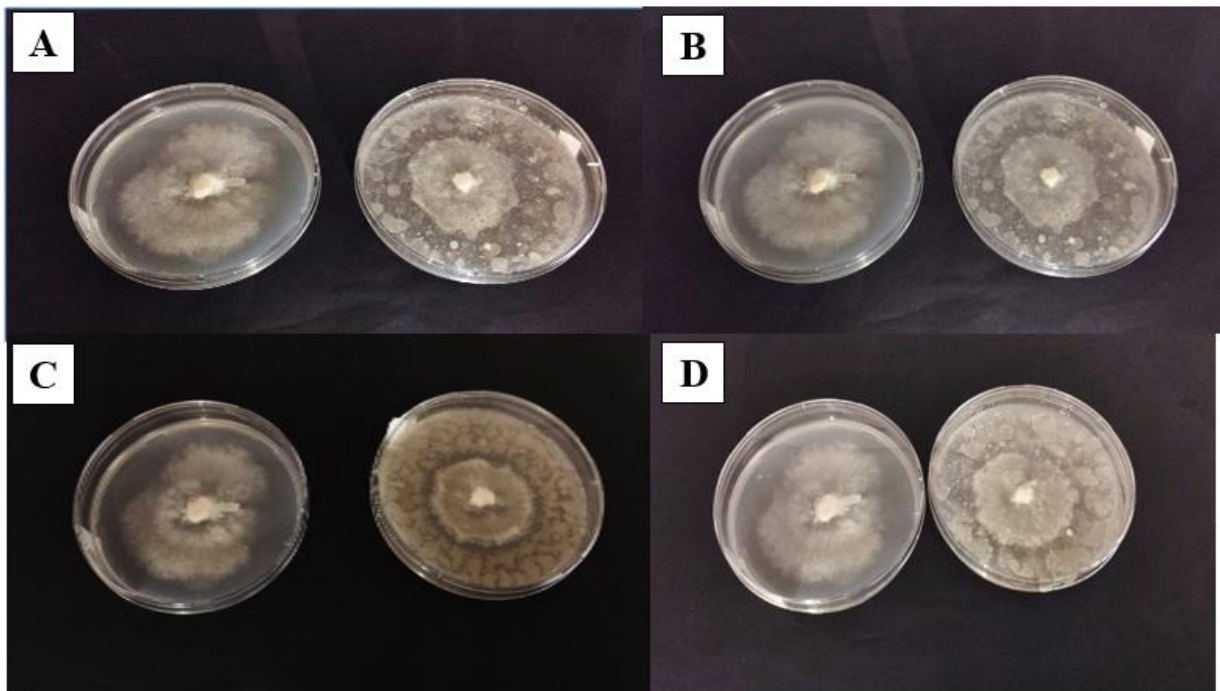
Les taux d'inhibition de la croissance de *R. solani* par les extraits fongiques sont montrés dans le tableau(5):

Tableau (05) : Taux d'inhibition de *R.solani* parles extraits fongiques

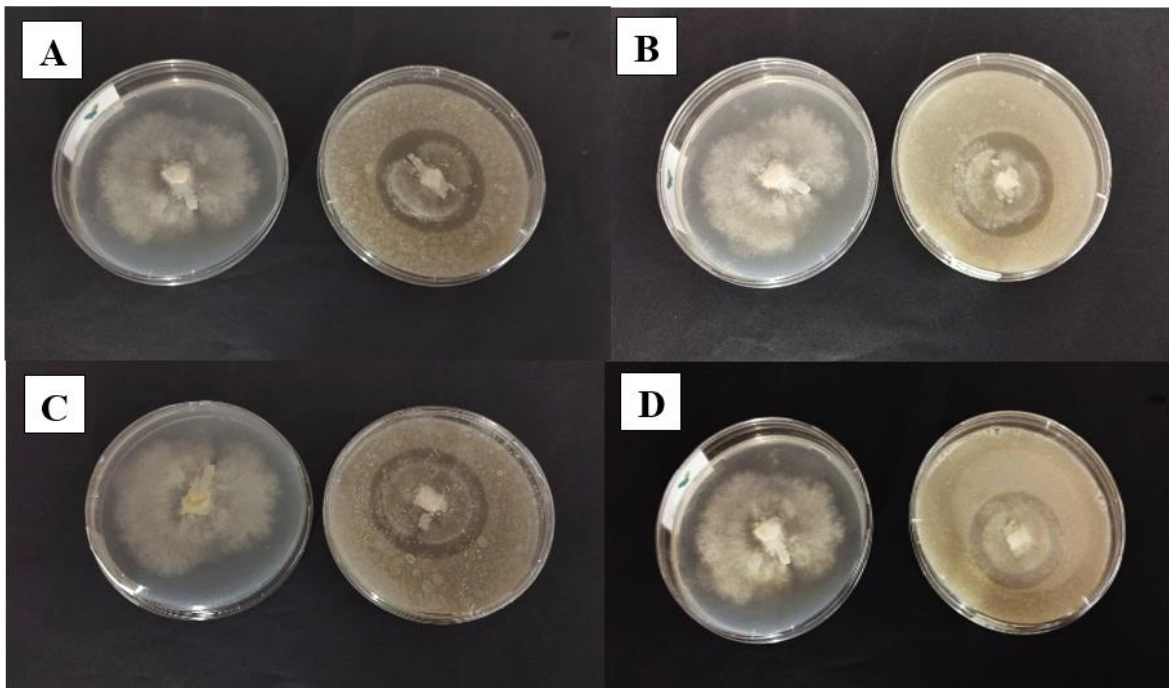
| | <i>Concentration (mg/ml)</i> | | | |
|--|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 0,005 | 0,010 | 0,015 | 0,02 |
| <i>I(%)d'Alaternaria alternata</i> | 44,4±0,9% ^a | 50±0,9% ^b | 54,4%±0,9 ^c | 55,5±0,9% ^d |
| <i>I(%)Soridaria humana</i> | 48,8±1,1% ^a | 65±1,1% ^b | 85,5±1,1% ^c | 100±0.00% ^d |
| <i>I(%)Didymosphaeri a rubi –ulmifolii</i> | 58,8±0,9% ^a | 61,1±0,9% ^b | 62,2±0,9% ^c | 86,6±0,9% ^d |

Les résultats ont révélé que les quatre extraits de souches fongiques influencent la croissance du pathogène *R. solani* à des concentrations allant de 0,005 à 0,02, bien que les niveaux d'efficacité diffèrent par rapport au témoin(figure18) . Dans la souches *Alternaria alternata* les pourcentages d'inhibition de la croissance du *R .solani* étaient de 44.4%,50% , 54,4% , 55 ,5% aux concentrations de 0.005, 0.010, 0,015, 0.02 mg/ml , respectivement. Et en *Sordaria Humana* , une forte activité antifongique a été enregistré avec une inhibition totale à un e concentration de 0.02 mg/ml d'extrait . Les pourcentages d'inhibition enregistrés pour cette souche sont :48,8%, 65%, 85,5% 100% aux concentrations de 0.005, 0.010, 0,015, 0.02mg/ml , respectivement. Cependant les taux d'inhibition de *R. solani* par les extraits de *Didymosphaeria rubi ulmifoli* étaient de : 58,8%, 61.1%, 62, 2%, 86,6%aux concentrations de 0.005, 0.010, 0,015, 0.02 mg/ml, respectivement (tableau 5).

(1)



(2)



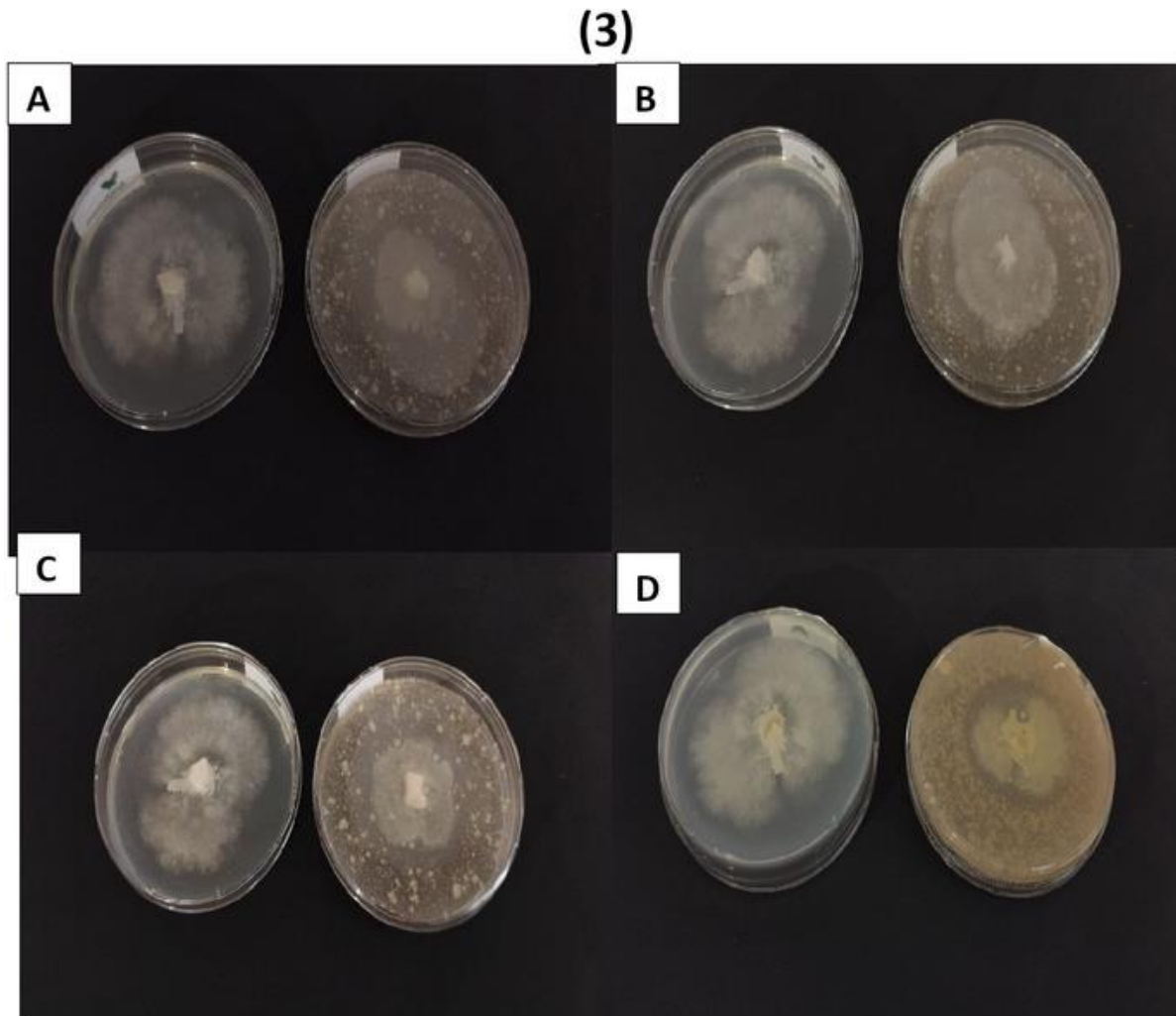


Figure 18: Inhibition de la croissance de *R. solani* par les différentes concentrations des extraits fongiques : (1) : *Alternaria alternata*, (2) : *Sordaria humana* (3) *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* , A : concentration 0.05mg/ml ; B : concentration ; 0.01mg/ml ; C : concentration 0.015 mg/ml ; D : concentration 0.02 mg/ml

Les résultats indiquent que *Sordaria sui par Didymosphaeria rubi-ulmifolii* sont les souches les plus efficaces en termes de pourcentage d'inhibition à cause de la riboflavine, le bêta-carotène et l'acide oléanolique , particulièrement à des concentrations plus élevées. Les données sont cohérentes et précises, confirmant une relation directe entre la concentration et l'efficacité d'inhibition des souches fongiques étudiées

Musetii et al. (2006) ont signalé que tant le champignon endophyte *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl que trois métabolites secondaires, utilisés en solutions mixtes à deux concentrations différentes, ont inhibé la sporulation de *P. viticola* sur les feuilles de vigne, que celles-ci soient conservées dans des chambres d'humidité ou sur des plantes maintenues en serre. Cependant,

Résultats et discussion

le mécanisme d'inhibition de la sporulation de ces molécules chez les feuilles de vigne infectées par *P. viticola* est inconnu (Musetti et al., 2006).

Li et al. (2016) ont isolé les champignons endophytes *Sordaria macrospora* de l'écorce de la plante *Ilex cornuta*. Ces champignons ont produit du sordariol et des dérivés du sordariol : 12-méthoxy sordariol, bisordariols A-D, xyralinol A et deux dérivés isobenzofuranyl. Le sordarin, un diterpène antifongique qui inhibe la synthèse des protéines chez les champignons, a été isolé de *Sordaria arenosa*. Ce composé agit sur le facteur d'élongation 2, qui promeut la translocation du ribosome sur l'ARNm. Cette translocation est inhibée par le sordarin, qui stabilise le complexe ribosome-facteur d'élongation 2, empêchant ainsi la formation de chaînes peptidiques (Liang et al., 2008). Cela montre que le genre *Sordaria* est une source de molécules bioactives avec des applications potentiellement bénéfiques en médecine et en agriculture, comme récemment rapporté par Charria-Girón et al. (2022). Les métabolites secondaires de *Sordaria* ont réussi à inhiber à la fois la croissance du mycélium et la germination des conidies de *B. cinerea*, mais leurs mécanismes d'action sont encore inconnus. En fait, il a été signalé que 51 % des molécules isolées des champignons endophytes étaient inconnues (Bolívar-Anillo et al., 2024).

Les mécanismes d'action des métabolites secondaires des endophytes sont divers. Il a été suggéré que ces composés peuvent affecter la perméabilité de la membrane cellulaire, entraînant la fuite de composants protéiques et électrolytiques intracellulaires (Khalil et al., 2014). De plus, certains métabolites secondaires peuvent se lier à l'ergostérol dans la membrane cellulaire, perturbant ainsi les fonctions cellulaires ou inhibant la biosynthèse de l'ergostérol (Cowen et al., 2014; Khallil et Youcef, 2020). Les composés volatils produits par les souches endophytes peuvent également jouer un rôle dans la suppression du métabolisme fongique, tant localement par diffusion aqueuse que plus largement par diffusion aérienne (Morath et al., 2012). Ces composés volatils ont été associés à des changements morphologiques dans les hyphes fongiques, et certains ont démontré la capacité de modifier la perméabilité de la membrane plasmique de *B. cinerea* (Li et al., 2012).

Conclusion

Conclusion

Les champignons endophytes sont une source prometteuse de nouveaux produits naturels bioactifs, avec un potentiel d'application dans divers domaines, notamment la médecine, l'agriculture et l'industrie. Bien que l'exploration de cette ressource microbienne riche soit encore à ses débuts, le potentiel considérable de ces organismes est déjà évident.

Dans cette étude, des champignons endophytes ont été isolés à partir d'*Olea europaea subsp. europaea var. sylvestris* (Oléastre). Trois isolats fongiques, *Sordaria humana*, *Alternaria alternata* et *Didymosphaeria rubi-ulmifolii*, ont été identifiés à partir des feuilles d'*Olea europaea*. Ces champignons endophytes ont montré une activité antifongique variable contre *Rhizoctonia solani*, évaluée par deux méthodes : la culture double et l'effet des extraits fongiques. Les résultats ont révélé que l'isolat *Sordaria humana* était le plus efficace pour inhiber *R. solani* de la pomme de terre, avec une inhibition totale de 100 % pour les deux méthodes, suivi par *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* et *Alternaria alternata*.

En ce qui concerne l'activité antioxydante, les trois isolats ont démontré une forte efficacité. En utilisant la méthode DPPH, des valeurs de IC50 de 0,13 mg/ml ± 0,005, 0,11 mg/ml ± 0 et 0,11 mg/ml ± 0 ont été obtenues. Avec la méthode ABTS, les valeurs de IC50 étaient respectivement de 0,11 mg/ml ± 0, 0,12 mg/ml ± 0 et 0,11 mg/ml ± 0,01 pour *Sordaria humana*, *Didymosphaeria rubi-ulmifolii* et *Alternaria alternata*.

Pour les recherches futures, il est recommandé de :

- Poursuivre l'étude de la mycoflore endophyte d'*Olea europaea* et d'élargir les parties de la plante étudiées (racines, fruits, fleurs).
- Cibler d'autres champignons phytopathogènes afin d'évaluer le spectre d'action des champignons endophytes d'*Olea europaea*.

En outre, il serait intéressant d'explorer davantage les applications potentielles de ces champignons endophytes dans le traitement sur le terrain et la formulation de biopesticides. L'utilisation de champignons endophytes et de leurs métabolites secondaires pourrait offrir une alternative écologique et durable aux méthodes de lutte contre les maladies des plantes actuellement utilisées. Cette perspective pourrait ouvrir de nouvelles voies pour la gestion intégrée des maladies des plantes et contribuer à une agriculture plus durable et respectueuse de l'environnement.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abd El-Aziz, A. R., Mahmoud, M. A., Al-Othman, M. R., El-Sherif, E. M., & El-Marzouky, H. (2013). Differential interaction between isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3 and potato cultivars. *African Journal of Microbiology Research*, 7(12), 1045-1054.
- Abdelfattah, A., Li Destri Nicosia, M. G., Cacciola, S. O., Droby, S., & Schena, L. (2015). Metabarcoding analysis of fungal diversity in the phyllosphere and carposphere of olive (*Olea europaea*). *PLoS One*, 10(7), e0131069.
- Ajayi-Oyetunde, O. O., & Bradley, C. A. (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *rhizoctonia* seedling disease of soybean. *Plant pathology*, 67(1), 3-17.
- Arici, S. E., & Sanli, A. (2014). Effect of some essential oils against *Rhizoctonia solani* and Streptomycetes scabies on potato plants in field conditions. *Annual Research & Review in Biology*, 4(12), 2027-2036.
- Atkinson, D., Thornton, M. K., & Miller, J. S. (2010). Development of *Rhizoctonia solani* on stems, stolons and tubers of potatoes I. Effect of inoculum source. *American Journal of Potato Research*, 87, 374-381.
- Bains, P. S., Bennypaul, H. S., Lynch, D. R., Kawchuk, L. M., & Schaupmeyer, C. A. (2002). *Rhizoctonia* disease of potatoes (*Rhizoctonia solani*): Fungicidal efficacy and cultivar susceptibility. *American journal of potato research*, 79, 99-106.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi.
- Benzina-Tihar, F., Reghmit, A., Oulebsir-Mohandkaci, H., & Sahir-Halouane, F. (2020). Les champignons endophytes de l'olivier (*Olea europaea* cv. *europaea*) du Nord algérien et criblage de leurs activités antagonistes contre le *Verticillium dahliae*. *IOBC-WPRS Bull*, 151, 7-15.
- Bessaoud, O., & Lefki, K. (2018). *Diagnostic du système de régulation de la pomme de terre en Algérie* (Doctoral dissertation, CIHEAM-IAMM).
- Betancourt, O., & Ciampi, L. (2000). Contribución al estudio y control de *Rhizoctonia solani*: I: bioensayo de fitotoxicidad de ácido fenilacético producido in vitro por *R. solani* AG-3. *Fitopatología*, 35(2), 119-125.
- CHIHAT, S. (2022). *Identification et étude de l'effet antagoniste de Trichoderma spp. de différents sols et écosystèmes en Algérie à l'égard de quelques maladies fongiques* (Doctoral dissertation).
- Chliyeh, M., Rhimini, Y., Selmaoui, K., Touhami, A. O., Filali-Maltouf, A., El Modafar, C., ... & Douira, A. (2014). Survey of the fungal species associated to olive-tree (*Olea europaea* L.) in Morocco. *International Journal of Recent Biotechnology*, 2(2), 15-32.
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684-2691.
- Demirci, E., Dane, E., & Eken, C. (2011). In vitro antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia on potato tubers against *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Biology*, 35(4), 457-462.

Références Bibliographiques

- Diallo, S., Crépin, A., Barbey, C., Orange, N., Burini, J. F., & Latour, X. (2011). Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 75(3), 351-364.
- Dissanayak, K. N., & Terney Pradeep Kumara, P. B. (2015, June). Impacts of *Acanthaster planci* (Crown-of-Thorns Starfish) population expansion on the Coral ecosystem of Pigeon Island Marine National Park, Sri Lanka. NARA.
- Elsherbiny, E. A., Taher, M. A., Abd El-Aziz, M. H., & Mohamed, S. Y. (2021). Action mechanisms and biocontrol of *Purpureocillium lilacinum* against green mould caused by *Penicillium digitatum* in orange fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 131(3), 1378-1390.
- Essalmani, H., & Lahlou, H. (2003). Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum f. sp. lentis*. *Comptes rendus. Biologies*, 326(12), 1163-1173.
- Fadhela, M. M. (2017). *Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.)* (Doctoral dissertation, ENSA).
- Farrokhi-Nejad, R., Cromei, M. G., & Moosawi-Jorf, S. A. (2007). Determination of the anastomosis grouping and virulence of *Rhizoctonia spp.* associated with potato tubers grown in Lincoln, New Zealand. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 10(21), 3786-3793.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791.
- Fernández-González, A. J., Villadas, P. J., Gómez-Lama Cabanás, C., Valverde-Corredor, A., Belaj, A., Mercado-Blanco, J., & Fernández-López, M. (2019). Defining the root endosphere and rhizosphere microbiomes from the World Olive Germplasm Collection. *Scientific reports*, 9(1), 20423.
- Grainge, M., & Ahmed, S. (1988). *Handbook of plants with pest-control properties* (pp. 470-pp).
- GUEDIDER, H. (2022). *Le ver blanc dans le Nord-Ouest Algérien; étude bioécologique, moyens et méthodes de lutte* (Doctoral dissertation).
- Hu WenJin, H. W., Pan XinLi, P. X., Li FengFeng, L. F., & Dong WuBei, D. W. (2018). UPLC-QTOF-MS metabolomics analysis revealed the contributions of metabolites to the pathogenesis of *Rhizoctonia solani* strain AG-1-IA.
- Kaddes, A., Fauconnier, M. L., Sassi, K., Berhal, C., Nasraoui, B., & Jijakli, H. (2020). Efficacité des Composés Organiques Volatils fongiques (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 24.
- Kankam, F., Larbi-Koranteng, S., & Adomako, J. (2021). Rhizoctonia disease of potato: Epidemiology, toxin types and management. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 49(1), 197-209.

Références Bibliographiques

- Kankam, F., Larbi-Koranteng, S., & Adomako, J. (2021). *Rhizoctonia* disease of potato: Epidemiology, toxin types and management. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 49(1), 197-209.
- Kankam, F., Sowley, E. N. K., & Qiu, H. Z. (2018). Influence of 3-methylthiopropionic acid (MTPA) produced by *Rhizoctonia solani* AG-3 on yield and dry matter accumulation of potato. *Asian J Res Crop Sci*, 2, 1-9.
- Kara, A., & Arici, Ş. E. (2019). Determination of Gamma Rays Efficiency Against *Rhizoctonia solani* in Potatoes. *Open Chemistry*, 17(1), 254-259.
- Kara, A., & Arici, Ş. E. (2019). Determination of Gamma Rays Efficiency Against *Rhizoctonia solani* in Potatoes. *Open Chemistry*, 17(1), 254-259.
- Katan, J. (2010). Cultural approaches for disease management: present status and future prospects. *Journal of plant pathology*, S7-S9.
- Komeil, D. A., & Saad, M. M. (2021). The antagonistic activity of certain fungal endophytes against some phytopathogenic fungi through their metabolites and extracellular enzymes. *Phytoprotection*, 101(1), 21-30.
- Kumar, J., Sharma, V. K., Singh, D. K., Mishra, A., Gond, S. K., Verma, S. K., ... & Kharwar, R. N. (2016). Epigenetic activation of antibacterial property of an endophytic *Streptomyces coelicolor* strain AZRA 37 and identification of the induced protein using MALDI TOF MS/MS. *PLoS One*, 11(2), e0147876.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Landum, M. C., do Rosário Félix, M., Alho, J., Garcia, R., Cabrita, M. J., Rei, F., & Varanda, C. M. (2016). Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. *Microbiological research*, 183, 100-108.
- Larkin, R. P., & Brewer, M. T. (2020). Effects of crop rotation and biocontrol amendments on *rhizoctonia* disease of potato and soil microbial communities. *Agriculture*, 10(4), 128.
- Larkin, R. P., Griffin, T. S., & Honeycutt, C. W. (2010). Rotation and cover crop effects on soilborne potato diseases, tuber yield, and soil microbial communities. *Plant Disease*, 94(12), 1491-1502.
- Liu, C., Lakshman, D. K., & Tavantzis, S. M. (2003). Quinic acid induces hypovirulence and expression of a hypovirulence-associated double-stranded RNA in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 43, 103-111.
- Malhadas, C., Malheiro, R., Pereira, J. A., de Pinho, P. G., & Baptista, P. (2017). Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-12.
- Martins, F., Pereira, J. A., Bota, P., Bento, A., & Baptista, P. (2016). Fungal endophyte communities in above-and belowground olive tree organs and the effect of season and geographic location on their structures. *Fungal ecology*, 20, 193-201.

Références Bibliographiques

- Msairi, S., Chliyeh, M., El Gabardi, S., El Alaoui Moulay, A., Selmaoui, K., Mouria, A., ... & Douira, A. (2022, May). Effect of Endomycorrhizae on the Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and the Growth of Olive Plants. In *International Conference on Advanced Intelligent Systems for Sustainable Development* (pp. 743-756). Cham: Springer Nature Switzerland.
- Nazir, A., Hafeez, S., & Habeeb, A. R. (2022). Bioactive potentials of endophyte (*Fusarium redolens*) isolated from *Olea europaea*. *Archives of Microbiology*, 204(4), 219.
- Nicoletti, R., Di Vaio, C., & Cirillo, C. (2020). Endophytic fungi of olive tree. *Microorganisms*, 8(9), 1321.
- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M. L., Panabières, F., Marais, A., ... & Blein, J. P. (2001). Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), 2825-2834.
- Otrysko, B. E., & Banville, G. J. (1992). Effect of infection by *Rhizoctonia solani* on the quality of tubers for processing. *American Potato Journal*, 69, 645-652. !
- Oudejans, J. H. (1991). Components of integrated pest management. *Agro-pesticides: properties and functions in integrated crop protection*, 15-25.
- Parmeter, T.R., and H.S. Whitney. 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. Pages 7-19 in J.R. Parmeter, éd., *Rhizoctonia solani: Biology and Pathology*. University of California Press, Berkley.
- Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L., & Viret, O. (1993). Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural toxins*, 1(3), 185-196.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Salmi, D. (2022). *Isolement et identification de champignons endophytes foliaires d'Urtica dioica L. et étude de leur activité biologique* (Doctoral dissertation, Université Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou).
- Sim, J. H., Khoo, C. H., Lee, L. H., & Cheah, Y. K. (2010). Molecular diversity of fungal endophytes isolated from *Garcinia mangostana* and *Garcinia parvifolia*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 651-658.
- Sumaiya, S., Gupta, M., Sharma, A., Naved, T., Akhtar, J., & Sarwat, M. (2023). A Comprehensive Review on Medicinal Properties of Dawa-ul-Kurkum and its Ingredients against Liver Ailments in the Light of Ancient Wisdom and Modern Research. *Ethnic Knowledge and Perspectives of Medicinal Plants*, 467-487.
- Sweetingham, M. W. (1996). Integrated control of *Rhizoctonia species*. In *Rhizoctonia species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control* (pp. 549-558). Dordrecht: Springer Netherlands.

Références Bibliographiques

- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(30), 11030-11035.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, *71*(1), 230-235.
- Wharton, P., Kirk, W., Berry, D., & Snapp, S. (2007). *Rhizoctonia* stem canker and black scurf of potato. *University of Idaho. Moscow, Idaho, USA*.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, *18*(1), 315-322.
- Woodhall, J. W., Lees, A. K., Edwards, S. G., & Jenkinson, P. (2008). Infection of potato by *Rhizoctonia solani*: effect of anastomosis group. *Plant Pathology*, *57*(5), 897-905.
- Woodhall, J. W., Lees, A. K., Edwards, S. G., & Jenkinson, P. (2007). Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. *Plant pathology*, *56*(2), 286-295.
- Zhang, Z. J., Wang, X. M., & McAlonan, G. M. (2012). Neural acupuncture unit: a new concept for interpreting effects and mechanisms of acupuncture. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*(1), 429412.