



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الابراهيمي

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Phytopathologie

Thème

Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de la plante médicinale *Santolina rosmarinifolia* L.

Présenté par :

- Kadi Hanifi Houda
- Rebai Rima

Devant le jury :

Président : Dr Bettache Azzeddine MC Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

Promoteur : Mr Sadrati Nouari MAA Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

Examineur : Mr Meribai Abdelmalek MAA Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

Année universitaire : 2015/2016

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, nous remercions Allah, notre Dieu qui nous a donné la force et la patience pour accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à notre promoteur monsieur Sadrati Nouari qui a mis toute sa compétence à notre disposition et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce modeste travail.

Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à monsieur Bettache Azzeddine d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Nous adressons un grand merci à monsieur Meribai Abdelmalek pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Nos derniers remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail et particulièrement

Monsieur Rebai Khalil.

RIMA et HOUDA



DEDICACE

Nous dédions ce modeste travail

*À nos très chers parents pour leurs énormes
sacrifices déployés pour guider nos pas et nous
poussant de l'avant sans jamais faiblir.*

*À nos ami(e)s qui nous couvrent de leur soutien,
affection et encouragement.*

RIMA et HOUDA

Un total de neuf mycoendophytes ont été isolés à partir de la plante médicinale *Santolina rosmarinifolia* L. (Djaàda) collectée par notre promoteur dans la région de Bordj Bou Arreridj (Djebel El Mansoura, Algérie) pendant le printemps de 2015. Cette présente étude est basée sur l'extraction des métabolites secondaires extra et intracellulaires de ces champignons endophytes et d'évaluer les différentes activités biologiques (enzymatique, antibactérienne, et antifongique) de ces endophytes.

L'évaluation de la production d'enzymes extracellulaires par ces champignons endophytes a démontré que 66.66 % d'entre eux ont une activité amylolytique, 100% une activité lipolytique, 44.44 % activité estérasiqque et 77.77% activité proteasiqque (lait écrémé), 100% activité de la gélatinase, 33.33% activité de la laccase.

D'autre part, l'activité antimicrobienne a été déterminée par les extraits bruts d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane et d'hexane en utilisant la méthode de diffusion en puits. Vingt-sept extraits ont été testés sur quinze bactéries pathogènes pour l'être humain, cinq champignons phytopathogènes et deux levures. Il en ressort que l'inhibition de la croissance des microorganismes testés varie en fonction de l'espèce microbien, de l'origine de l'extrait (intracellulaire ou bien extracellulaire) et selon le type du solvant utilisé. Les résultats obtenus ont démontré que les métabolites secondaires extracellulaires ont apparu plus bioactifs que les métabolites intracellulaires. De sorte que tous les extraits extracellulaires ont montré une activité inhibitrice sur au moins un ou plusieurs microorganismes pathogènes.

Les effets antimicrobiens les plus efficaces des métabolites extracellulaires ont été observés avec les extraits d'acétate d'éthyle, où la plus grande zone d'inhibition pour l'activité antibactérienne (47 mm) a été observée contre la bactérie *Micrococcus luteus* suivit par *Proteus mirabilis* (43 mm), *Escherichia coli* (42mm), *Staphylococcus aureus* (41mm). Et pour l'activité antifongique la zone d'inhibition la plus grande (22.5 mm) a été observée contre le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* tandis que et la zone la plus faible a été observée contre l'espèce *Aspergillus flavus* (8.5mm).

Mots clés : *Santolina rosmarinifolia* L., Champignons endophytes, activité enzymatique, métabolites secondaires (extra et intracellulaires), activité antimicrobienne.

A total of nine endophytic fungal strain were isolated from the medicinal plant *Santolina rosmarinifolia* L. (Djaàda) collected by our promoter in the region of Bordj Bou Arreridj (Djebel El Mansoura, Algeria) during the spring of 2015.

The present study is carried out by the extraction of the extracellular and intracellular secondary metabolites of these endophytic fungi and evaluation of the different biological activities (enzymatic, antibacterial, and antifungal) of these endophytes.

Screening of these fungal isolates for different extracellular enzymes showed that 66.66% of them have an amylolytic activity, 100% lipolytic activity, 44.44% esterase activity, 77.77% protease activity (skimmed milk), 100% gelatinase activity, 33.33% of laccase activity. The antimicrobial activity was determined by the crude extracts of ethyl acetate, dichloromethane, and hexane using agar well diffusion method. Twenty-seven extracts were tested against 15 human pathogenic bacterial strains, 5 phytopathogenic fungi and 2 yeasts.

It shows that the inhibition of the growth of microorganisms tested varies depending on the microbial species, origin of the extract (intracellular or extracellular) and the type of solvent used.

This reveals that the growth inhibition of the microorganisms tested varies according to the microbial species, to the extract origin (intracellular or extracellular) and according to the type of solvent. The results showed that extracellular secondary metabolites have appeared more bioactive than intracellular metabolites. Where all the extracellular extracts showed inhibitory activity on at least one or more pathogenic microorganisms.

The most effective antimicrobial effects of extracellular metabolites have been observed with the ethyl acetate extracts, where the largest zone of inhibition for the antibacterial activity was observed (47 mm) against *Micrococcus luteus* followed by *Proteus mirabilis* (43 mm), *Escherichia coli* (42mm), and *Staphylococcus aureus* (41mm). For the antifungal activity, the largest zone of inhibition was observed (22.5 mm) against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* while the lowest zone was observed against *Aspergillus flavus* (8.5mm).

Keywords : *Santolina rosmarinifolia* L., Endophytic fungi, enzymatic activity, secondary metabolites, antimicrobial activity.

تم عزل 9 أنواع من الفطريات الداخلية للنباتات انطلاقاً من النبتة الطبية *Santolina rosmarinifolia* L. (الجعدة) والتي تم جمع عيناتها من طرف الأستاذ المؤطر في فصل الربيع لسنة 2015 من منطقة جبل المنصورة (ولاية برج بوعريش، الجزائر).

تعتمد هذه الدراسة على استخلاص المستقلبات الثانوية (داخل وخارج خلوية) لهذه الفطريات واختبار بعض نشاطاتها البيولوجية (النشاط المضاد للميكروبات والفطريات والنشاط الإنزيمي).

أظهرت نتائج اختبار قدرة هذه العزلات على إنتاج الإنزيمات خارج خلوية أن 66.66% من بين هذه العزلات قد أنتجت إنزيم الأميلاز، و100% أنتجت إنزيم الليباز، في حين أن 44.44% أنتجت إنزيم الإستيراز، و77.77% أنتجت إنزيم البروتياز، بينما 100% أنتجت إنزيم الجيلاتيناز، و33.33% أنتجت إنزيم اللاكاز.

بالنسبة للنشاطية المضادة للميكروبات لـ 27 مستخلصاً فطرياً فقد تم اختبارها على 15 نوعاً بكتيريا مرضاً، ونوعين من الخمائر، و5 أنواع من الفطريات الممرضة للنبات وذلك باتباع طريقة الانتشار في الحفر بعد استخلاص مستقلباتها الثانوية باستعمال 3 أنواع مختلفة من المذيبات العضوية (إثيل الأستيات، ثنائي كلورو الميثان أو كلوريد الميثيلين، الهكسان)، وقد أظهرت النتائج أن تثبيط نمو الجراثيم المختبرة يختلف باختلاف النوع البكتيري، ومصدر المستخلص (داخل خلوي أو خارج خلوي) وكذا نوع المذيب العضوي المستعمل.

دلّت النتائج المحصّل عليها أن المستقلبات الثانوية خارج خلوية ذات نشاط حيوي أكثر من نضيرتها داخل خلوية، حيث بينت النتائج وجود نشاط مثبط للنمو لجميع مستخلصات المستقلبات الثانوية خارج خلوية على الأقل على كائن حي دقيق مرض أو أكثر.

لقد أظهرت مستخلصات إثيل الأستيات فعالية عالية للنشاطية ضد بيكتيرية مقارنة بالمستخلصات الأخرى، حيث قدرت أكبر منطقة تثبيط بـ 47 مم على بكتيريا *Micrococcus luteus*، تليها *Proteus mirabilis* بـ 43 مم، ثم *Escherichia coli* بـ 42 مم، و *Staphylococcus aureus* بـ 41 مم أما بالنسبة للنشاطية المضادة للفطريات فقد تم تسجيل أكبر منطقة تثبيط بـ 22.5 مم على النوع الفطري الممرض للنباتات *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* بينما أصغر منطقة تثبيط كانت ضد النوع الفطري *Aspergillus flavus* و قدرت بـ 8.5 مم.

الكلمات المفتاحية:

Santolina rosmarinifolia L. (الجعدة)، الفطريات الداخلية للنباتات، النشاطية الإنزيمية، المستقلبات الثانوية (داخل وخارج خلوية) النشاطية المضادة للميكروبات.

Sommaire

Introduction.....	01
-------------------	----

Partie 1. Synthèse bibliographique

CHAPITRE I. Généralités sur les champignons endophytes

I.1. Historique.....	03
I.2. Définition	03
I.3. Les caractéristiques des champignons endophytes	03
I.4. L'importance des champignons endophytes	04
I.5. La biologie et la diversité écologique	04
I.6. Les modes de transmission des champignons endophytes.....	05
I.6.1. Transmission verticale	05
I.6.2. Transmission horizontale	05
I.7.Reproduction des champignons endophytes	06
I.7.1. Reproduction interne	06
I.7.2. Reproduction externe	06
I.8.Interaction endophyte-hôte	06
I.8.1.Spécificité de l'hôte	06
I.9.Rôle et application des mycoendophytes	07
I.9.1.Rôle des champignons endophytes dans la plante hôte	07
I.9.1.1. La phytostimulation.....	07
I.9.1.2. Rôle dans la croissance (production des phytohormones).....	07
I.9.1.3. Rôle dans la capacité photosynthétique	08
I.9.2. Rôle physiologique des champignons endophytes	09
I.9.2.1. Rôle des endophytes dans la tolérance de l'hôte aux stress abiotiques	09
I.9.3 Rôle écologique des champignons endophytes	10
I.9.3.1. les interactions entre les champignons endophytes et les communautés souterraines.....	10
I.9.3. 2. Bioremédiation/Biodégradation.....	10
I.9.4 Des agents de lutte biologiques (Bio-contrôle)	10
I.10. Les mycoendophytes comme producteurs de métabolites biologiquement actifs	12
I.10.1. Les enzymes produites par les endophytes.....	12
I.10.2. Les champignons endophytes comme source de substances antivirales.....	13
I.10.3. Les champignons endophytes comme source de substances antifongiques	14
I.10.4. Les champignons endophytes comme source de substances antibactériennes.....	14
I.10.5. Les champignons endophytes comme source de substances anticancéreuses.....	15
I.10.6. Les champignons endophytes comme source de substances antioxydantes.....	16

Partie 2. Etude expérimentale

CHAPITRE I : Matériel et méthodes

I. Matériel.....	18
I.1. Matériel végétal.....	18
I.2. Matériel microbien.....	19
II. Méthodes expérimentales	20
II.1 L'activité enzymatique.....	20
II.1.1 Amylase.....	20
II.1.2.laccase.....	20

Sommaire

II.1.3 Lipase	20
II.1.4.Esterase	21
II.1.5.Protease	21
II.2.Fermentation et extraction des métabolites secondaires	21
II.2.1 Fermentation.....	21
II.2.2 Extraction des métabolites extracellulaires.....	21
II.2.2 Extraction des métabolites intracellulaires.....	22
II.3.Activité antimicrobienne.....	23
II.3.2. Méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits)	24
II.4. Analyse statistique.....	24

CHAPITRE II : Résultats et discussions

I .1 Analyse de l'activité enzymatique des souches endophytes	26
I .2 Pouvoir antagoniste <i>in vitro</i> des souches endophytes	31
I.2.1. Activité antimicrobienne des métabolites secondaires extracellulaires.....	31
I.2.1.1 Activité antibactérienne	31
I.2.1.2 Activité antifongique	43
I.2.1.3 Choix du solvant pour l'activité antibactérienne et antifongique.....	47
I.2.2 Activité antimicrobienne des métabolites secondaires intracellulaires.....	50
Conclusion.....	53
Références bibliographiques	
Annexes	

Tableau 01 : Tableau de synthèse de quelques champignons endophytes producteurs de métabolites secondaires dans la plante hôte.....	17
Tableau 02 : Abréviations utilisées et lieux d'isolement des souches endophytes de <i>santolina rosmarinifolia</i> L.....	19
Tableau 03 : Résultats des souches productrices d'enzymes.....	26
Tableau 04 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche <i>Penicillium</i> sp. (Métabolites secondaires extracellulaires).....	32
Tableau 05 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche <i>Phomopsis</i> sp. 2 (Métabolites secondaires extracellulaires.....	33
Tableau 06 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche <i>Phomopsis</i> sp. 1 (Métabolites secondaires extracellulaires.....	34
Tableau 07 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche <i>Cladosporium</i> sp. (Métabolites secondaires extracellulaires	35
Tableau 08 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche <i>Phoma</i> sp. (Métabolites secondaires extracellulaires.....	36
Tableau 09 : Meilleures zones d'inhibition selon le solvant utilisé.....	36
Tableau 10 : Résultats de l'activité antifongique de la souche <i>Penicillium</i> sp. (Métabolites secondaires extracellulaires.....	43
Tableau 11 : Résultats de l'activité antifongique de la souche <i>Phomopsis</i> sp. 1 (Métabolites secondaires extracellulaires.....	44
Tableau 12 : Résultats de l'activité antifongique de la souche <i>Phomopsis</i> sp. 2 (Métabolites secondaires extracellulaires.....	44
Tableau 13 : Résultats de l'activité antifongique de la souche <i>Phoma</i> sp. (Métabolites secondaires extracellulaires... ..	45

Tableau 14 : Moyennes des zones d'inhibition des métabolites intracellulaires des champignons endophytes contre les bactéries pathogènes.....	50
Tableau 15 : Moyennes des zones d'inhibition des métabolites intracellulaires des champignons endophytes contre les champignons pathogènes.....	51

Figure 01 : Cycle de vie et modes de transmission (horizontale et verticale) du champignon endophyte systémique <i>Neotyphodium</i> (anamorphe de <i>Epichloë</i>) sur son hôte <i>Festuca arundinacea</i>	05
Figure 02 : <i>Santolina rosmarinifolia</i> L.	18
Figure 03 : La procédure de décantation.....	22
Figure 04 : Les étapes d'extraction des métabolites secondaires.....	23
Figure 05 : Résultats de l'activité enzymatique des souches mycoendophytes	27
Figure 06 : Résultats de l'activité enzymatique	28 et 29
Figure 07 : Quelques zones d'inhibition de différents extraits fongiques.....	39 et 40
Figure 08 : Activité antagoniste des bactéries à Gram positif et à Gram négatif	41
Figure 09 : Comparaison entre les activités dirigées des deux groupes de bactéries à Gram+ et à Gram-.....	42
Figure 10 : Exemple des zones d'inhibition de trois extraits fongiques	47
Figure 11 : Résultats de l'activité antimicrobienne selon les solvants utilisés.....	48
Figure 12 : Les zones d'inhibition pour les métabolites secondaires intracellulaires	52

- **CFU** : Unité Formant Colonies
- **CYA** : Czapek Yeast extract Agar
- **D** : Diamètre de zone d'inhibition
- **DMSO** : Dimethylsulfoxyde
- **EI** : Index enzymatique
- **Gn** : Gélose nutritive
- **GYP** : Glucose Yeast extract Peptone
- **h** : heure
- **MEA** : Malt Extract Agar
- **MEB** : Malt Extract Broth
- **MH** : Mueller-Hinton
- **PDA** Potato Dextrose Agar
- **PDB** Potato Dextrose Broth
- **pH** : Potentiel d'Hydrogène
- **SAS** : Système de l'Analyse Statistique
- ***Staphylococcus aureus* rm** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

Les plantes médicinales ont été reconnues comme un niche de champignons endophytes avec de nouveaux métabolites de très grande importance pharmaceutique. Les mycoendophytes envahissent les tissus des plantes et résident dans les tissus entre les cellules végétales vivantes sans les endommager **(Prathyusha et al., 2015)**.

Les endophytes représentent une grande diversité des adaptations microbiennes, ils se sont développés et isolés dans des environnements particuliers. Leur diversité et leur habitation spécialisée font d'eux un champ d'études très passionnant dans la recherche de nouveaux médicaments. Jusqu'à ce jour, des différents types de champignons endophytes ont été isolés à partir de plusieurs plantes. Ces endophytes protègent leur hôte de différents agents infectieux et fournissent la force pour survivre aux diverses conditions défavorables **(Akanksha et Pavan, 2014)**.

Ces derniers temps, il y avait une demande très importante pour les produits provenant de sources plus soutenables et d'éviter des produits de synthèse **(Katoch et al., 2014)**. Les mycoendophytes ont la capacité de produire de nombreuses molécules bioactives représentent une grande diversité et offrent un énorme potentiel d'exploitation dans les utilisations thérapeutiques contre de très nombreuses maladies humaines et végétales **(Frohlich et al., 2000 ; Huang et al., 2008 ; Zhang et al., 2006)**.

La recherche des plantes supérieures qui ont la capacité d'interagir dans leurs habitats respectifs avec des organismes différents. **(Katoch et al., 2014)**. Et l'apparition du phénomène de résistance chez les microorganismes pathogènes aux médicaments, ont poussé les chercheurs à explorer des différentes sources naturelles pour obtenir des nouvelles molécules bioactives pour relever les défis du monde développé **(Akanksha et Pavan, 2014)**.

Dans le cadre de la recherche des métabolites secondaires issus des champignons endophytes notre étude a été entreprise en vue d'extraire les métabolites secondaires de neuf souches mycoendophytes qui ont été isolées auparavant par notre promoteur à partir de la plante médicinale *Santolina rosmarinifolia* L. (djaada) pendant le printemps de 2015 dans la région de Bordj Bou Arreridj.

L'objectif de notre étude est d'extraire les différents métabolites secondaires de ces souches fongiques afin de faire une évaluation de leurs différentes activités biologiques (enzymatique, antibactérienne, antifongique).

La présentation de ce travail s'articule autour de deux parties. Une première partie est une synthèse bibliographique elle est composée par d'un seul chapitre qui sera consacrée à des généralités sur les champignons endophytes. La deuxième partie sera consacrée à l'étude expérimentale qui expose le matériel, les méthodes d'une part, les résultats et la discussion d'autre part.

Synthèse

Bibliographique



I.1. Historique

En traduction littérale, le mot endophyte est dérivé du mot grec : « Endo » ou « Endon » c'est-à-dire « intérieur », et « phyte » ou « phyton » c'est-à-dire « plante » (Pirttilä, 2001 ; Schulz et Boyle, 2006).

Le terme « champignons endophytes » fut utilisé pour la première fois par (De Bary, 1866) in (Wilson, 1997) pour décrire les champignons isolés à partir des tissus du végétal.

Selon Carroll, (1986) l'endophyte est un organisme qui cause des infections asymptomatiques du tissu végétal. Ainsi, (Petrini, 1991) in (Wilson, 1997) développa cette définition en incluant l'ensemble des microorganismes occupant les organes du végétal pour une période de son cycle de vie et pouvant coloniser les tissus internes de l'hôte sans apparition de symptômes.

Selon Hawksworth et al., (1995) dans the Dictionary of the Fungi, le mot « endophyte » désigne : « organisme qui vit dans la plante » (Pirttilä et al., 2000 ; Pirttilä, 2001).

I.2. Définition

Les champignons endophytes sont les microorganismes les plus fréquemment isolés (Strobel et al., 2004), ils sont présents dans les tissus vivants des plantes supérieures (racines, fruits, tiges, graines, feuilles etc.) (Sandhu et al., 2014) d'une façon intra et/ou intercellulaire (Pimentel et al., 2011) sous la couche des cellules épidermiques (Moricca et Ragazzi, 2008).

Les champignons endophytes établissent des relations mutuelles avec leurs plantes hôtes sans y causer de symptômes (Sandhu et al., 2014). Ils protègent leurs plantes contre les agents infectieux et dans les conditions défavorables en sécrétant des métabolites secondaires bioactifs. (Strobel, 2002).

Il s'agit donc d'un type particulier d'infection dite « asymptomatique » entre les deux partenaires fongique et végétal c'est l'une des images de la symbiose mutuelle établies dans l'environnement (Benssaci, 2006).

I.3. Les caractéristiques des champignons endophytes

La plupart des champignons endophytes appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota* ; cependant certains appartiennent à d'autres taxons tels que les *Deuteromycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* et les *Oomycota* (Saar et al., 2001).

I.4. L'importance des champignons endophytes

L'importance des champignons endophytes a été démontrée sur une longue période comme étant des sources potentielles à utiliser à des fins pharmaceutiques. Beaucoup de champignons endophytes ont été signalés pour produire de nouveaux métabolites bioactifs à activité antimicrobienne, anticancéreuse, et des agents antiviraux. La découverte du taxol, extrait à partir des endophytes a augmenté l'importance de ces champignons et a relancé la recherche des produits naturels à partir des champignons endophytes (**Suffness, 1995**).

Les métabolites fongiques sont, cependant, pas seulement indispensables pour la médecine, mais sont également importants pour la protection des plantes comme il a été démontré par la découverte des strobilurines, qui ont d'abord été isolées à partir de *Strobilurus* sp. et qui sont des meilleures alternatives pour les fongicides synthétiques (**Tan et Zou, 2001**).

La demande de nouveaux agents agricoles naturels très efficaces pour lutter contre les ravageurs agricoles et des agents pathogènes est énorme, et provient en partie de l'élimination des composés synthétiques du marché en raison de leur toxicité envers l'environnement, mais aussi des besoins croissants de nourriture en raison d'une croissance de la population (**Julia, 2009**).

I.5. La biologie et la diversité écologique

Les traits biologiques et écologiques des champignons endophytes sont encore mal élucidés ; « la diversité, la distribution, les cycles biologiques et les interactions des champignons endophytes avec leurs plantes-hôtes et les autres groupes microbiens, ainsi que leurs actions chimiques, physiologiques et écologiques viennent juste d'être étudiées et appréciées » (**Arlond et Herre, 2003**).

Les champignons endophytes représentent un groupe très diversifié (**Zabalgoitia, 2008**) avec une estimation de 1.5 millions d'espèces (**Fernandes et al., 2009**) et une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante, dont les multiples couches des tissus sont utilisées comme habitats, Ils ont été isolés à partir de toutes les plantes étudiées à ce jour, des plantes, des grands arbres (**Oses et al., 2008**), des palmiers (**Frohlich et al., 2000**), des graminées marines (**Alva et al., 2002**) et même à partir des lichens (**Li et al., 2007**). Et aussi, à partir des plantes poussant dans les forêts aussi bien tropicales, tempérées que boréales (**Stone et al., 2004**).

Selon **Shipunov et al., (2008)**, des estimations ont démontré que plus de 90% d'espèces de champignons endophytes ne sont pas décrites, et seulement 80.000 à 100.000 espèces ont été décrites en 2008 (**Huang et al., 2008**). Seulement, l'utilisation de l'identification moléculaire peut faire la distinction entre les cultures stériles isolées au laboratoire ainsi que l'exploration de nouveaux environnements (**Zabalgoeazcoa, 2008**) telles que les forêts tropicales qui pourraient révéler une grande diversité d'endophytes (**Saar et al., 2001**) et vont permettre l'identification de nouvelles espèces (**Zabalgoeazcoa, 2008**).

I.6. Les modes de transmission des champignons endophytes

I.6.1. Transmission verticale

Les champignons endophytes se transmettent à partir de la plante-hôte vers la descendance. Les semences du végétal portent elles-mêmes leur propre inoculum d'endophytes. La transmission est effectuée généralement via les formes végétatives du champignon. (**Faeth, 2002**), comme il est montré dans la figure.1.

La transmission verticale est le principal mode de transmission des champignons endophytes (**Saikkonen et al., 2010**).

I.6.2. Transmission horizontale

Elle s'effectue entre les plantes de la même espèce ou d'espèces différentes via les spores. Ces spores sont déposées sur les différentes parties du végétal, en particulier les feuilles. (**Arnold et al., 2001**). (Figure.1).

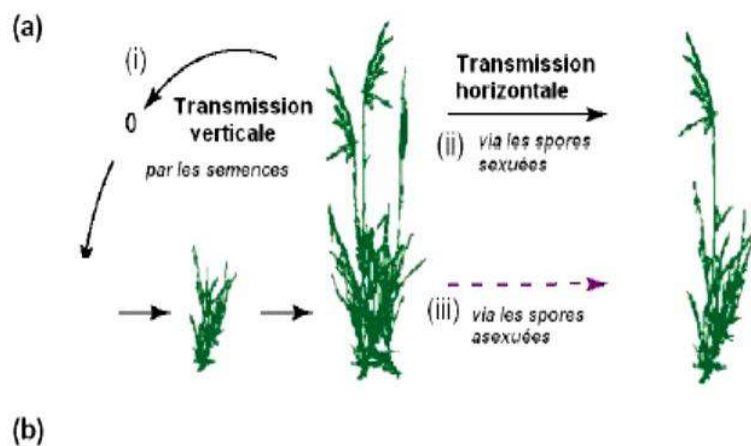


Figure 1 : Cycle de vie et modes de transmission (horizontale et verticale) du champignon endophyte systémique *Neotyphodium* (anamorphe de *Epichloë*) sur son hôte *Festuca arundinacea*. (**Saikkonen et al., 2004a**).

I.7. Reproduction des champignons endophytes

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction :

I.7.1. Reproduction interne

Elle se fait par la croissance végétative des hyphes qui est complètement interne (Selosse et Schardl, 2007) ; et les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les graines (Rezwana Khan, 2007).

I.7.2. Reproduction externe

Elle se fait via les spores (Clay, 1986) soit par les spores sexuées ou asexuées (Saikkonen *et al.*, 2004b) certains champignons peuvent produire soit des spores sexuées soit asexuées et puisque la reproduction sexuée nécessite des spores sexuées, elle est donc toujours horizontale, contrairement à la reproduction asexuée qui peut se faire verticalement via les graines ou horizontalement par les spores ou éventuellement les hyphes (Saikkonen *et al.*, 2004c).

I.8. Interaction endophyte-hôte

Les endophytes possèdent différents modes de vie, donnant des différentes interactions (Zabalgoeazcoa, 2008) complexes (Selim *et al.*, 2012) et variables d'un endophyte à un autre et d'un hôte à un autre (Zabalgoeazcoa, 2008) selon les dispositions génétiques des deux partenaires, leur stade de développement et leurs statuts nutritionnels, mais aussi selon des facteurs exogènes (Selim *et al.*, 2012).

➤ Le mutualisme :

Cette relation s'est établie si la transmission est verticale par croissance dans les graines et sera plus hostile (Saikkonen *et al.*, 1998).

➤ L'antagonisme :

Cette interaction s'est effectuée si le champignon a été transmis horizontalement par les spores (Saikkonen *et al.*, 1998), à cause de l'arrêt de production des semences de l'hôte provoqué par l'endophyte antagoniste (Schardl *et al.*, 2004).

I.8.1. Spécificité de l'hôte

Beaucoup d'endophytes infectent localement des parties de la plante, étant limitées à une petite zone de tissu. Ceci est soutenu par le fait que souvent, plusieurs espèces d'endophytes sont récupérées à partir de différents fragments de la même plante. En revanche, les espèces de *Neotyphodium* et *Epichloë* infectent systématiquement l'espace intercellulaire des feuilles, des tiges reproductrices, et des graines de leurs hôtes (Zabalgoeazcoa, 2008).

Ces endophytes systémiques peuvent être isolés à partir de plusieurs fragments de la même plante. La spécificité de tissus et d'organes apparaît également, et quelques endophytes peuvent être trouvés dans des parties spécifiques de la plante tels que les racines, les feuilles, ou les brindilles, alors que d'autres peuvent infecter plusieurs de ces parties (Stone et al., 2004).

Par exemple, les endophytes *Neotyphodium* ont une gamme d'hôtes étroite, se limitant à un ou deux espèces de plantes. D'autres champignons endophytes tels que *Alternaria*, *Penicillium*, ou *Piriformospora* ont de larges gammes d'hôtes, englobant des espèces dans différents genres ou familles des plantes (Stone et al., 2004 ; Waller et al., 2005).

I.9. Rôle et application des mycoendophytes

I.9.1. Rôle des champignons endophytes dans la plante hôte

I.9.1.1. La phytostimulation

Les plantes ont besoin de 16 éléments essentiels tels que le carbone, l'hydrogène, l'azote, l'oxygène, le phosphore et 11 de plus. Ces éléments essentiels sont disponibles pour les plantes pour leur croissance et leur développement sous forme chimique, qu'ils obtiennent de l'atmosphère, le sol, l'eau et la matière organique. (Malinowski et al., 2000).

L'une des fonctions potentielles des champignons endophytes, surtout les champignons mycorhiziens est de faciliter à la plante l'absorption des éléments nutritifs qui conduit à la stimulation de la croissance. L'amélioration de la nutrition et de la croissance peuvent avoir des effets positifs indirects sur les autres fonctions bien connues, comme la grande tolérance au stress ou la résistance aux agents pathogènes (Kageyama et al., 2008).

Barrow et Osuna, (2002) ont montré que l'*Atriplex canescens* inoculé avec le champignon endophyte *Aspergillus ustus* peut avoir l'accès au phosphate contrairement aux plantes non inoculées. Un basidiomycète endophyte, *Piriformospora indica* peut servir comme un système modèle pour élucider les mécanismes de l'absorption des nutriments et la croissance de l'hôte. Ces hyménomycètes colonisent les racines inter- et intracellulaires et forment des enroulements et des branches dans le cortex sans aucune colonisation de la stèle de l'hôte.

I.9.1.2. Rôle dans la croissance (production des phytohormones).

Les champignons endophytes ont été connus comme une source importante de divers types de métabolites secondaires bioactifs. Il a été connu récemment que certaines souches de champignons endophytes peuvent produire des hormones végétales, qui sont des molécules

essentielles pour la croissance, le développement et la défense des plantes. L'association de la plante avec ces phytohormones produites par les endophytes a également été utile dans l'atténuation des stress abiotiques et biotiques (**Khan et al., 2012 a ; Waqas et al., 2014a ; 2014b**).

Les gibbérellines (GAs) avec d'autres hormones végétales comme l'acide indole acétique (IAA) sécrétées par des champignons endophytes peuvent améliorer la croissance des plantes et le rendement des cultures (**Khan et al., 2012b**).

Les espèces fongiques comme *Gibberella fujikuroi*, *Sphaceloma manihoticola*, *Phaeosphaeria* sp., *Neurospora crassa*, *Sesamum indicum*, *Phaeosphaeria* sp. L487, *Penicillium citrinum*, *Chrysosporium pseudomerdarium*, *Scolecobasidium tshawytschae*, *Aspergillus fumigatus* et *Penicillium funiculosum* ont été rapportées en tant que productrices de GAs. (**Khan et al., 2012b**).

Plusieurs études suggèrent que les plantes cultivées en association avec certains champignons endophytes ont un rendement très élevé, et une résistance accrue aux agents pathogènes (**Stovall et Clay, 1988 ; Clay et al., 1989 ; Ghimire et al., 2011**).

Le champignon endophyte *Phialocephala fortinii* induit une augmentation dans la pousse du *Larix decidua* et dans la biomasse de la racine (**Rommert et al., 2002**).

La promotion de la croissance était attribuable à l'IAA car le champignon a synthétisé l'hormone in vitro. Un effet similaire a également été observé avec *Piriformospora indica*. (**Selim et al., 2012**).

I.9.1.3. Rôle dans la capacité photosynthétique

Les endophytes peuvent affecter la photosynthèse dans les plantes tropicales, mais les effets n'ont pas toujours été significatifs (**Bailey et al., 2006**).

Un nouveau point de vue considère les endophytes comme des agents importants, dont le partenariat avec les plantes photosynthétiques a été déterminant pour l'évolution de la flore terrestre. Les effets des endophytes sur la photosynthèse ont été démontrés mais ils ne sont pas toujours significatifs par exemple *Colletotrichum musae* dans le bananier a diminué la capacité photochimique comparativement aux plantes sans endophyte (**Pinto et al., 2000**).

I.9.2. Rôle physiologique des champignons endophytes

I.9.2.1. Rôle des endophytes dans la tolérance de l'hôte aux stress abiotiques

Les endophytes sont également impliqués dans la protection des plantes contre divers stress abiotiques comme la sécheresse, la température, le pH, les métaux lourds, etc. **(Rodriguez et al., 2004)**.

La capacité de la plante à survivre aux stress, dépend de son aptitude à s'y adapter. Cette adaptation nécessite la mise en œuvre des mécanismes morphologiques, physiologiques et biochimiques qui assurent aussi la continuité des fonctions cellulaires sous stress et la reprise de la croissance dès la fin du stress **(Malinowski et Belesky, 2000)**.

Dans des conditions de sécheresse, la teneur en eau de la fétuque élevée associée à l'endophyte, et cultivée en plein champ peut être maintenue à des niveaux plus élevés que ceux des plantes indemnes d'endophytes **(Elbersen et West, 1996 ; Buck et al., 1997)**. Ce phénomène peut être expliqué par une forte accumulation de solutés dans les tissus des plantes liées aux endophytes par rapport aux plantes sans endophytes, ou par la conductivité foliaire réduite et un ralentissement du flux de transpiration, ou en raison d'une formation d'une cuticule plus épaisse **(Malinowski et Belesky, 2000)**.

Dichanthelium lanuginosum, est une plante herbacée qui vit dans des régions où les températures du sol peuvent atteindre 57 ° C, la présence des endophytes peut améliorer les conditions physiques de cette plante, comme les plantes avec le champignon endophyte *Curvularia* sp. ont survécu la température élevée du sol ainsi que le stress hydrique mieux que les plantes indemnes d'endophytes **(Redman et al., 2002)**.

Waller et al., (2005) ont signalé le potentiel du *Piriformospora indica* pour induire la résistance aux maladies fongiques et la tolérance au stress salin chez l'orge.

L'effet bénéfique sur l'état de défense a été détecté dans les feuilles distales, ce qui montre une induction de la tolérance systémique et de la résistance par un champignon endophyte des racines. Cette tolérance a été associée à une augmentation de la capacité antioxydante due à une activation du cycle de glutathione ascorbate et aboutit à une augmentation globale du rendement en grain. Par conséquent, ces symbioses sont d'une grande importance, car elles peuvent aider les plantes à s'adapter au changement climatique mondial **(Rodriguez et al., 2004)**.

I.9.3. Rôle écologique des champignons endophytes

I.9.3.1. Des interactions réciproques entre les champignons endophytes et les communautés souterraines.

Les réponses des communautés microbiennes dans des sols traités par les plantes de l'herbe annuelle *Lolium multiflorum* avec des niveaux contrastés de colonisation par l'endophyte *Neotyphodium occultans* ont été explorées (Casas, 2011). Le traitement du sol par des plantes très infectées a touché les profils cataboliques du sol et a tendance à augmenter son l'activité fongique (Nair et Padmavathy, 2014).

Un changement dans les structures de la communauté bactérienne a été détecté tandis qu'aucun changement n'a été observé pour les champignons. Les réponses du sol sont devenues évidentes même sans changements de biomasse de la plante hôte ni du carbone organique du sol ou de la teneur totale en azote, ce qui suggère que l'endophyte a modifié les dépôts de rhizome de l'hôte au cours de la phase de traitement (Nair et Padmavathy, 2014).

Quelques chercheurs ont signalé des changements dans la chimie de la rhizosphère et l'activité enzymatique atténuée par la présence de l'endophyte dans les herbes hôtes vivaces (Malinowski et al., 1998 ; Van Hecke et al., 2005).

I.9.3. 2. Bioremédiation/Biodégradation

Les endophytes ont une capacité puissante pour la dégradation des composés complexes. La bioremédiation est une méthode d'élimination des polluants et des déchets dans l'environnement par l'utilisation des microorganismes. Ceci est rendu possible en raison de la grande diversité microbienne (Nair et Padmavathy, 2014).

Pour explorer la diversité endophytique pour la dégradation du plastique, plusieurs dizaines de mycoendophytes ont été examinés pour leur capacité à dégrader le polymère synthétique « polyester polyuréthane » (PUR) (Russell et al., 2011).

Bien que plusieurs organismes ont démontré la capacité de dégrader efficacement le PUR dans les deux suspensions solide et liquide, une forte activité a été observée chez plusieurs isolats du genre *Pestalotiopsis* (Nair et Padmavathy, 2014).

Deux isolats de *Pestalotiopsis microspora* étaient capables de se développer uniquement sur PUR comme une seule source de carbone dans les deux conditions d'aérobie et d'anaérobie. La caractérisation moléculaire de cette activité a suggéré que l'enzyme sérine hydrolase est la responsable de la dégradation de PUR (Russell et al., 2011).

I.9.4. Des agents de lutte biologiques (Bio-contrôle)

Les mycoendophytes peuvent protéger leurs plantes hôtes contre les agents pathogènes et contre les parasites (Arnold et al., 2003 ; Akello et al., 2007).

Les endophytes systémiques et foliaires peuvent réduire les herbivores en produisant des alcaloïdes toxiques pour les insectes et aux vertébrés (Schardl, 2001).

Les champignons endophytes ont été décrits pour jouer un rôle important dans le contrôle de l'herbivorisme des insectes non seulement dans les herbes (Clay, 1990), mais aussi dans les conifères (Posada et Vega, 2006).

Un champignon endophyte *Beauveria bassiana* connu comme un entomopathogène a été trouvé pour contrôler l'insecte scolyte dans les plants de café et du sorgho (Tefera et Vidal, 2009 ; Posada et Vega, 2006).

Certains endophytes protègent leur hôte contre les insectes en produisant des métabolites bioactifs (Rezwana, 2007).

Le champignon endophyte *Phomopsis oblonga* protège les arbres d'orme contre le dendroctone *Physocnemum brevilineu*. Ce champignon produit ou induit la plante à produire certains métabolites qui contrôlent le vecteur *P. brevilineum*, responsable de la propagation d'un agent pathogène de la maladie hollandaise de l'orme *Ceratocystis ulmi*. (Rezwana, 2007)

Diedhiou et al., (2003) ont démontré l'activité nématocide réussie d'un champignon mycorrhizien arbusculaire *Glomus coronatum*, et un champignon endophyte, *F. oxysporum*, contre le *Meloidogyne incognito* dans la plante de tomate.

Plusieurs champignons endophytes isolés à partir des organes de surface de la plante ont produit l'acide 3-hydroxypropionique (HPA) par le fractionnement bioguidé des extraits, ils ont montré une activité nématocide sélective contre le nématode parasite de plantes, *M. incognita*, avec les valeurs de la DL50 de 12.5–15 µg/ml (Schwarz et al., 2004).

Il existe au moins trois principaux mécanismes par lesquels les endophytes peuvent améliorer la résistance de l'hôte aux agents pathogènes (Mandyam et Jumpponen, 2005) :

✚ La concurrence entre les endophytes et les agents pathogènes

Elle est basée sur la concurrence entre les endophytes et des agents pathogènes sur les mêmes ressources (Lockwood, 1992). Cela est clair dans un système de *Fusarium oxysporum*. La souche non pathogène *F. oxysporum* Fo47 inhibe la souche pathogène *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* et réduit les symptômes de la pourriture des racines de la tomate (Bolwerk et al., 2005).

✚ La production des phytoalexines

Ce mécanisme possible pour lutter contre les agents pathogènes peut être lié à la capacité des endophytes à stimuler l'hôte pour produire les phytoalexines, et / ou les composés biocides, ou la capacité de l'endophyte lui-même à produire des fumigants et autres agents antimicrobiens. Comme dans le cas de *Spilanthes calva* une fois inoculé avec *Piriformospora indica*, il produit une gamme de composés antifongiques, car les plantes inoculées avec *P. indica* produisent des extraits inhibiteurs des agents pathogènes transmis par le sol (*F.oxysporum* et *Trichophyton mentagrophytes*) suggérant l'induction de la production chimique antifongique dans l'hôte (Rai et al., 2002).

✚ L'amélioration de la résistance de l'hôte

Ce mécanisme induit des réponses de défense chez l'hôte par les endophytes localisés. Il est souvent rencontré chez les plantes mycorhizées où une faible résistance est induite localement ou transitoirement au début de la colonisation mycorhizienne.

Les modifications et l'induction structurales de la signalisation de la défense peuvent pareillement résulter de la colonisation endophyte (Koide et Schreiner, 1992 ; Gianinazzi et al., 1996).

I.10. Les mycoendophytes comme producteurs des métabolites biologiquement actifs

I.10.1. Les enzymes produites par les endophytes

Beaucoup d'enzymes commercialement importantes sont produites par plusieurs micro-organismes du sol. La recherche pour d'autres sources potentielles avait conduit à la découverte de quelques enzymes essentielles produites par des endophytes. (Nair et Padmavathy, 2014)

La capacité des champignons endophytes à produire des enzymes pour la dégradation de la cellulose et de la lignine est une stratégie probable qui permet à certains endophytes de désintégrer les tissus en persistant comme saprobes après la sénescence de l'hôte (Bettucci et Tiscornia, 2013 ; Promputtha et al., 2005), pour changer leur mode de vie d'un endophyte à saprophyte ou pathogène (Sunitha et al., 2013). En outre 60% des enzymes utilisées dans les procédés industriels sont produites par quelques genres de champignons répartis dans le monde entier (Prathyusha et al., 2015).

Les champignons endophytes comme *Acremonium terricola*, *Aspergillus japonicas*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium lateritium*,

Monodictys castaneae, *Nigrospora sphaerica*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium glandicola*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Phoma tropica*, *Phomopsis archeri*, *Tetraploa aristata*, et *Xylaria* sp. et beaucoup d'autres espèces non identifiées dans la plante *Opuntia ficus-indica* mill ont indiqué leur potentiel prometteur pour le déploiement dans les processus biotechnologiques impliquant production des pectinases, des cellulases, des xylanases, et des protéases (Bezerra et al., 2012).

Un endophyte, *Acremonium zeae*, isolé à partir du maïs produit l'hémicellulase qui est une enzyme extracellulaire (Bischoff et al., 2009). Cette enzyme hydrolytique de *A. zeae* peut être appropriée pour une application dans la bioconversion de la biomasse lignocellulosique en sucres fermentescibles (Nair et Padmavathy, 2014).

1.10.2. Les champignons endophytes comme source de substances antivirales

L'utilisation attractive des produits antibiotiques des mycoendophytes est l'inhibition de la croissance virale (Mishra et al., 2014). Les acides cytoniques A ($C_{32}H_{36}O_{10}$) et B ($C_{32}H_{36}O_{10}$) sont deux nouveaux inhibiteurs de la protéase de cytomégalo virus humain (HCMV). Ils ont été isolés du champignon endophyte *Cytonaema* sp. (Akanksha et Pavan, 2014). Ils ont été élucidés par spectrométrie de masse et des méthodes RMN comme des isomères de *p*-tridepside (Sanjana et al., 2012) et ils ont trouvé efficaces contre la croissance de virus (Mishra et al., 2014). Quelques métabolites des champignons endophytes des plantes désertiques servent comme une source viable pour identifier les inhibiteurs efficaces de la réplication du VIH-1 (Wellensiek et al., 2013).

L'hinnuliquinone ($C_{32}H_{30}N_2O_4$) déclaré, comme un inhibiteur efficace de la protéase du VIH-1, est un composé antiviral, issu des champignons endophytes qui habitent les feuilles des arbres de chêne (*Quercus coccifera*) (Sanjana Kaul et al., 2012).

Quatre nouveaux composés ont été isolés à partir d'un mycoendophyte *Pullularia* sp. BCC 8613. L'élucidation de la structure de ces composés a été réalisée par spectrométrie de masse et analyse par spectroscopie RMN. Les composés isolés étaient Pullularins A–D (86) (cyclohexadepsipeptides). En dehors de ces composés, Pullularin a montré des activités contre le virus *Herpes simplex* de type 1 et également contre le parasite du paludisme (malaria) *Plasmodium falciparum* K1. (Isaka et al., 2007).

Un composé antiviral important Pestalothol-C a été isolé à partir d'un mycoendophyte *Pestalotiopsis theae* d'un arbre non identifié sur la montagne de Jianfeng, en Chine. Le composé isolé a montré des propriétés anti-VIH (Sanjana Kaul et al., 2012).

Garcinia dulcis, produit des nouveaux métabolites comme le phomoenamides et le phomonitroester qui inhibent *Mycobacterium tuberculosis* (Rukachaisirikul et al., 2008).

Diaporthe sp. isolé à partir des feuilles de *Pandanus amaryllifolius* a produit deux nouveaux benzopyranones diaportheone A et B. Les deux composés inhibent la croissance des souches virulentes de *Mycobacterium tuberculosis* (Sanjana Kaul et al., 2012).

I.10.3. Les champignons endophytes comme source de substances antifongiques

Les champignons ont été étudiés en tant que source d'antibiotiques depuis la découverte de la pénicilline. Les mycoendophytes sont également capables de produire des métabolites antimicrobiens. La cryptocandine, un peptide unique isolé du champignon *Cryptosporiopsis cf. quercina* qui est un mycoendophyte de *Tripterigeum wilfordii* (une plante médicinale originaire d'Eurasie (Strobel et al., 1999).

Le métabolite jesterone est un autre composé antifongique qui a été isolé à partir du champignon *Pestalotiopsis jesteri*. Il produit également hydroxyprogestérone. (Li et Stroble, 2001).

Un autre composé cryptocoin antifongique, est l'acide tétramique isolé de *C. cf. quercina*. Ce composé est signalé comme étant actif contre les champignons pathogènes des plantes *Pyricularia oryzae* (Rezwana khan, 2007).

Le composé pestalosite, un P-glucoside aromatique, et deux pyrones : pestalopyrone et hydroxypestalopyrone isolés à partir du champignon *Pestalotiopsis microspora*, sont signalés comme des agents antifongiques. Ce champignon a été isolé à partir de la plante *Torreya taxifolia* (Lee et al., 1995). Un autre composé antifongique, phomopsilactone a été isolé à partir de *Phomopsis cassiae*, qui est un endophyte de l'arbre *Cassia spectabilis* (Silva, et al., 2005).

I.10.4. Les champignons endophytes comme source de substances antibactériennes

La diversité génétique des champignons endophytes peut être un facteur majeur dans la découverte de nouveaux composés bioactifs (Gunatilaka, 2006). Le vrai potentiel de ces endophytes est encore être emprisonné. (Deshmukh et al., 2015).

Le genre *Pestalotiopsis* existe en tant qu'endophyte dans la plupart des forêts tropicales du monde, il est extrêmement biochimiquement diversifié (Deshmukh et al., 2015).

Quelques exemples des produits de ce groupe sont l'acide Ambuique et son dérivé ont été isolés à partir de *Pestalotiopsis* sp. du lichen *Clavarioid* sp. et sont actifs contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (Ding et al., 2009).

Un nouveau composé phénolique, le 4- (2, 4, 7-trioxa-bicyclo [4.1.0] heptan-3-yl) phénol a été isolé à partir de *Pestalotiopsis mangiferae* associé à *Mangifera indica*. Le composé présente une activité contre les bactéries *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, et *Pseudomonas aeruginosa* (Deshmukh et al., 2015).

Phomopsis, un autre genre important existe comme endophyte dans la plupart des plantes, il est également très diversifié biochimiquement. Des exemples de métabolites bioactifs à partir de cet endophyte sont les Dicerandrol A, Dicerandrol B Dicerandrol C, Deacetylphomoxanthone B et Fusaristatin A ont été isolés à partir de *Phomopsis longicolla* S1B4 d'un échantillon d'une plante provenant de Hadong-gun, Kyungnam Province, Corée du Sud. Tous les composés ci-dessus montrent des activités antibactériennes modérées à basses contre *Xanthomonas oryzae* KACC 10331 (Deshmukh et al., 2015).

Les hyphomycètes forment une classe de champignons qui produisent des spores asexuées. Les producteurs des antibiotiques tels que les pénicillines et les céphalosporines appartiennent à cette classe. Autres antibactériens de cette classe sont l'acide helvolique, monomethylsulochrin, ergostérol et le 3 β -hydroxy-5 α , 8 α -epidioxy-ergosta-6, 22-diène ont été isolés à partir d'un endophyte *Aspergillus* sp. CY725 de *Cynodon dactylon* (Poaceae). Ces composés sont actifs contre *Helicobacter pylori*. L'acide helvolique est actif contre *Sarcina lutea* et *S. aureus* (Li et al., 2005).

Pseurotin A a été isolé à partir de *Penicillium Janczewski* du gymnosperme chilien *Prumnopitys Andina*. Le composé présente une activité modérée contre les bactéries phytopathogènes *Erwinia carotovora* et *Pseudomonas syringae*, (Schmeda-Hirschmann et al., 2008).

Il existe aussi plusieurs composés antibactériens produits à partir mycoendophytes non identifiés (Deshmukh et al., 2015).

I.10.5. Les champignons endophytes comme source de substances anticancéreuses :

Paclitaxel et certains de ses dérivés représentent le premier groupe important d'agents anticancéreux produits par les endophytes. Le mode d'action du paclitaxel est d'empêcher les molécules de tubuline de la dépolymérisation au cours des processus de la division cellulaire.

C'est le premier médicament anticancéreux dans le monde, et utilisé pour traiter un certain nombre de maladies de prolifération des tissus humains. Le mycoendophyte *Taxomyces andreanae* offre une alternative pour la production de taxol par fermentation (Mishra et al., 2014).

L'acide torreyanic représente un autre agent anticancéreux, est un dimère cytotoxique de quinone produit à partir de l'endophyte *Pestalotiopsis microsporum* isolé de la plante *Torreya taxifolia* (Mishra et al., 2014).

Des études récentes ont montré que les nouveaux mycoendophyte *Hypocrea lixii* isolés à partir de la plante *Cajanus cajan*, ont produit le cajanol qui est un agent anticancéreux (Zhao et al., 2013).

Le mycoendophyte *Mucor fragilis* peut produire ces métabolites bioactifs à savoir, le podophyllotoxin et le kaempferol (Huang et al., 2014). En outre, les diterpénoïdes de guanacastane ont rapporté dans le champignon endophyte *Cercospora* sp. (Feng et al., 2014).

I.10.6. Les champignons endophytes comme source de substances antioxydantes

Les composés antioxydants naturels sont généralement trouvés dans les plantes médicinales, les fruits et les légumes. Cependant, il est rapporté que les métabolites produits par les endophytes peuvent être une cause possible de nouveaux produits naturellement antioxydants (Akanksha et Pavan, 2014).

Les polysaccharides produits à partir des plantes et des micro-organismes qui ont été intensivement étudiés et considérés comme des antioxydants normaux (Akanksha et Pavan, 2014).

Les champignons endophytes associés aux végétaux supérieurs semblent être une bonne source de nouveaux antioxydants aussi bien que des plantes. Les métabolites Pestacine et isopestacine montrent une activité antioxydante efficace et ils ont été obtenus à partir de la culture du champignon endophyte *pestalotiopsis microspora* isolé à partir de la plante hôte *Terminalia morobensis* (Selim et al., 2012).

Tableau n°1 : Tableau de synthèse de quelques champignons endophytes producteurs de métabolites secondaires dans la plante hôte (Sachin et al., 2013).

Mycoendophyte	Plante hôte	Métabolites
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Taxol
<i>Entrophospora infrequens</i>	<i>Nothapodytes foetida</i>	Camptothecin
<i>Fusarium solani</i>	<i>Apodytes dimidiata</i>	Camptothecin
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	Podophyllotoxin
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Sabina recurva</i>	Podophyllotoxin
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Catharanthus roseus</i>	Vinblastine
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Vinblastine
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin
<i>Cephalosporium</i> sp.	<i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	Diosgenin
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Huperzia serrata</i>	Huperzine A
<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Dysoxylum binectariferum</i>	Rohitukine
<i>Eupenicillium parvum</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Azadirachtin

Etude

Expérimentale



Cette partie représente les protocoles utilisés et la démarche choisie. L'intégralité de ce travail a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie à l'université de Bordj Bou Arreridj.

I. Matériel

Le matériel, l'appareillage, les réactifs et produits chimiques utilisés dans la présente étude sont cités dans l'annexe I. Les milieux de culture ainsi que leurs compositions sont décrits dans l'annexe II.

I.1. Matériel végétal

Les champignons ont été isolés à partir de la plante médicinale *Santolina rosmarinifolia* L. (Djaàda), collectée au niveau du djebel El Mansoura de la wilaya de Bordj Bou Arreridj. Avril 2015.



Figure 02 : *Santolina rosmarinifolia* L. (photo personnelle)

I.2. Matériel microbien

✚ Champignons endophytes :

Les champignons endophytes isolés à partir de *Santolina rosmarinifolia* L. sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Abréviations utilisées et compartiment d'isolement des souches endophytes de *Santolina rosmarinifolia* L.

Les isolats mycoendophytes			
Plante hôte	Souches endophytes	Abréviation	Compartiment d'isolement
<i>Santolina rosmarinifolia</i> L. (Djaàda)	<i>Penicillium</i> sp.	TR22	Racine
	<i>Colletotrichum</i> sp.	TR3	Racine
	<i>Phomopsis</i> sp1.	DR17	Racine
	<i>Fusarium</i> sp.	ZR7	Racine
	<i>Chaetomium</i> sp.	CAR10	Racine
	<i>Aspergillus</i> sp.	DT6	Tige
	<i>Cladosporium</i> sp.	DT10	Tige
	<i>Phoma</i> sp.	DT12	Tige
	<i>Phomopsis</i> sp2.	DF4	Feuille

✚ Micro-organismes cibles

Tous les isolats mycoendophytes ont été examinés pour leur pouvoir antibactérien et antifongique. En utilisant les bactéries indicatrices incluent *Citrobacter freundii* (1), *Bacillus cereus* (2), *Enterococcus faecalis* (3), *Proteus mirabilis* (4), *Salmonella typhimurium* (7), *Pseudomonas aeruginosa* (8), *Escherichia coli* (9), *Staphylococcus aureus* (10), *Salmonella enterica* (Sal (as)), *listeria monocytogenes* (listi), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *vibrio cholerae* (Vibrio), *Bacillus subtilis* (17), *Micrococcus Luteus* (19). Aussi, deux levures indicatrices, à savoir, *Candida glabrata* (24), et *Candida albicans* (11). Et cinq champignons phytopathogènes comprenant *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (1), *Phytophthora infestans* (2), *Fusarium solani* var. *coeruleum* (3), *Aspergillus niger* (AN), et *Aspergillus flavus* (AF), obtenus à partir du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université Ferhat Abbas à Sétif.

II. Méthodes

II.1 L'activité enzymatique

La production des enzymes extracellulaires par les mycoendophytes a été déterminée par la digestion du substrat en suspension ou dissous dans des plaques d'agar après inoculation des champignons endophytes (**Maria et al., 2005**) et l'incubation pendant 3-5 jours selon les taux de croissance des champignons endophytes à 28 °C, l'aspect de la zone claire entourant la colonie fongique a été mesuré après avoir ajouté le réactif spécifique comme indicateur des activités enzymatiques extracellulaires. Tous les tests ont été exécutés en triplicata. (**Fouda et al., 2015**). L'indice enzymatique (EI) est exprimé par le rapport entre le diamètre moyen du halo de dégradation et le diamètre moyen de la croissance des colonies. (**Carrim et al., 2006**).

$$\text{EI} = \frac{\text{Le diamètre du halo}}{\text{Le diamètre de la colonie}}$$

II.1.1 Amylase

L'activité enzymatique de l'amylase a été évaluée par l'inoculation des champignons sur le milieu GYP (glucose yeast extract peptone) contenant 1% d'amidon soluble. Après 5 jours d'incubation, les boîtes ont été inondées avec la solution iodique (1% d'iode, 2% d'iodure de potassium). L'apparition de la zone claire entourant la colonie a été considérée comme positive pour l'amylase (**Benghalensis et al., 2013**).

II.1.2 Laccase

L'activité de la laccase est observée par l'inoculation des isolats sur milieu GYP contenant 1-naphtol, (0.005%). L'oxydation du 1-naphtol par la laccase produite par les isolats provoque le changement de la couleur claire du milieu vers le bleu à violet (**Amirita et al., 2012**).

II. 1.3 Lipase

L'activité lipolytique a été déterminée en cultivant les souches sur le milieu peptone agar contenant 1 ml de Tween 20 pour 100 du milieu utilisé comme source principale de carbone. L'apparition des cristaux précipités d'acides gras autour de la colonie est considérée comme un résultat positif pour la lipase (**Abdel-Raheem et Shearer, 2002**).

II.1.4 Estérase

Selon **Sierra, (1957)** le milieu utilisé pour évaluer l'activité estérasique est le peptone agar contenant le Tween 80, (1 %) précédemment autoclavé. Après l'inoculation et l'incubation des boîtes, l'apparition des zones claires autour des colonies révèle le test positif pour l'activité estérasique (**Jalgaonwala et Mahajan, 2011**).

II.1.5 Protéase

L'activité de la protéase a été déterminée en inoculant les souches fongiques sur le GYP supplémenté soit 0.4% de la gélatine. (**Maria et al., 2005**), ou bien 1% du lait écrémé (**Katoch et al., 2014**). Après 48 h à 30°C, les halos autour des colonies ont été mesurés. (**Molina et al., 2012**).

II.2 Fermentation et extraction des métabolites secondaires

II.2.1 Fermentation

Les champignons endophytes TR22, DT10, DT6, ZR7 et TR3 sont inoculés pour la fermentation en milieu liquide, pour cela 6 disques (6 mm de diamètre) de chaque endophyte préalablement ensemencé sur PDA pendant 7-14 jours ont été transférés dans des Erlenmeyer de 250 ml (**Sharma et Vijaya Kumar, 2013**) contenant 100 ml de PDB (Potato Dextrose Broth) et MEB (Malt Extract Broth). (**Sardul Singh Sandhu et al., 2014**).

Les Erlenmeyer ont été incubées à 28 ± 1 ° C pendant 21 jours (**Sardul Singh Sandhu et al., 2014**) avec une agitation manuelle périodique chaque 3 jours (**Barik et al., 2010 ; Mohanta et al., 2008**). Les flacons ont été examinés périodiquement pour confirmer non contamination des cultures. (**Rezwana, 2007**), en revanche les champignons CAR 10, DT12, DR17, et DF4 ont subis une fermentation en milieu solide (MEA).

II.2.2 Extraction des métabolites extracellulaires

Les cultures ont été récupérées et filtrées à l'aide d'un papier filtre Whatman (numéro 1) pour donner un filtrat clair qui a été exposé au processus d'extraction (**Sardul Singh Sandhu et al., 2014**).

Le filtrat a été extrait à l'aide des solvants organiques de polarité croissante : l'hexane, le dichlorométhane, et l'acétate d'éthyle. Les extraits organiques ont été évaporés sous pression réduite pour obtenir des résidus solides. (**Rezwana, 2007**).

Le résidu d'extraction a été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et conservé à 4 °C pour être utilisé comme solution mère pour le test antimicrobien. (Ananda et al., 2012).



Figure 03 : La procédure de décantation

II.2.3 Extraction des métabolites intracellulaires

L'extraction des métabolites secondaires intracellulaires a été effectuée en utilisant la méthode de **Celton, (2011)** légèrement modifiée.

Les mycéliums obtenus après la filtration ont été séchés à l'air libre ensuite ils ont été rincés avec l'eau distillée pour éliminer tous les résidus des métabolites extracellulaires puis ils ont subi un séchage pour une deuxième fois.

La biomasse obtenue a été trempée dans le méthanol pur pendant 24h afin de bloquer le métabolisme des champignons endophytes ensuite cette biomasse a été passée dans un sonicateur pour provoquer la lyse des cellules.

Les échantillons ont été équilibrés soigneusement dans des tubes et centrifugés à 2000 G pendant 5 minutes afin de séparer les cellules de la phase organique. La force centrifuge va séparer les constituants du mélange selon leur densité ; les débris cellulaires s'accumulent au fond du tube en un culot, et la solution contenant les métabolites intracellulaires dissous forme le surnageant.

Après la récupération du surnageant suivie par une évaporation on a obtenu des résidus secs qui ont été dissous par la suite dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et conservé à 4 °C pour être utilisé comme solution mère pour le test antimicrobien.

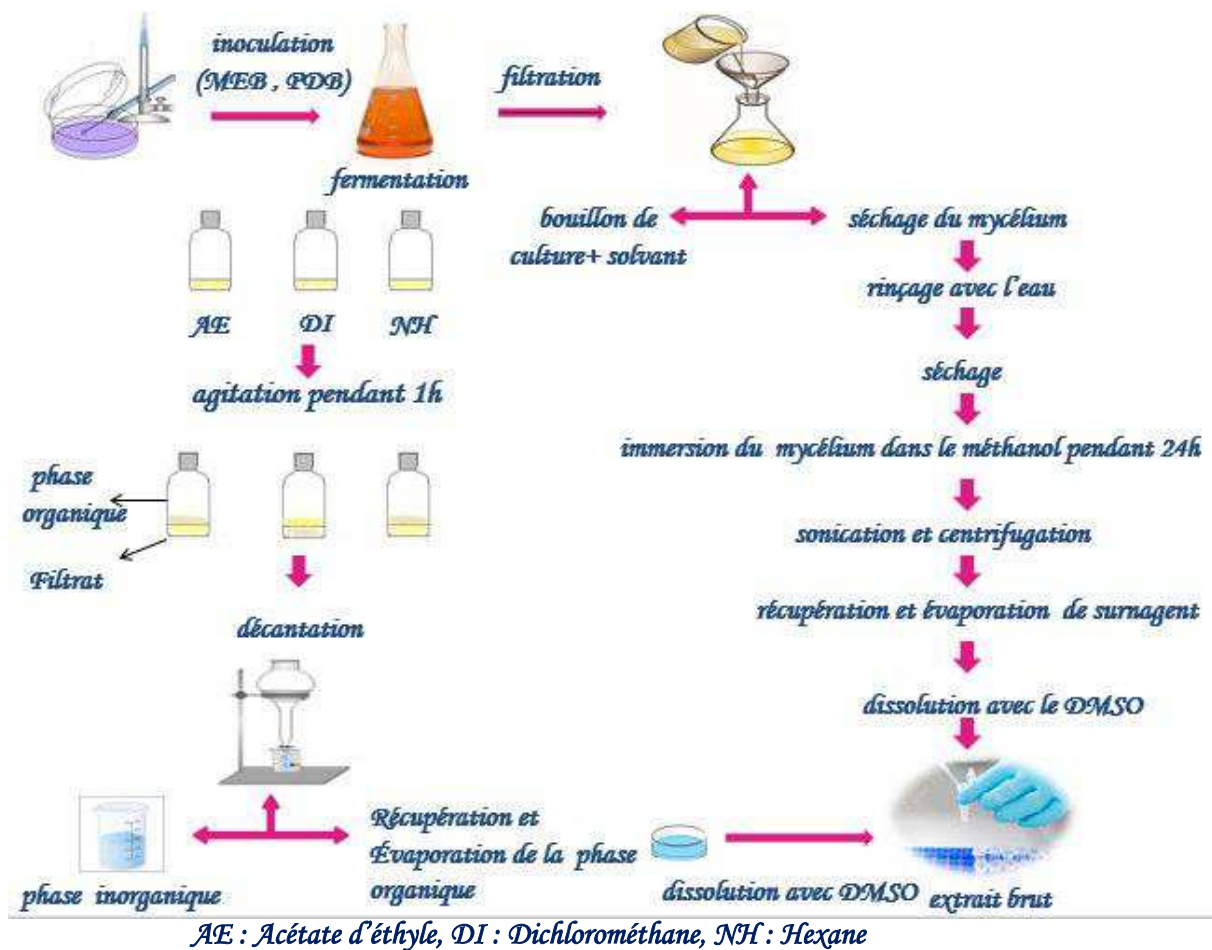


Figure 04 : Les étapes d'extraction des métabolites secondaires

II.3 Activité antimicrobienne

II.3.1. Réactivation des microorganismes pathogènes

Les souches bactériennes utilisées pour ce test, ont été réactivées avant leur utilisation par des transferts dans le bouillon nutritif, puis incubées à 37°C pendant 24h jusqu'à l'obtention d'une suspension bactérienne contenant environ $10^8 - 10^9$ CFU/ml (unité de formation de colonies) par ml, cette dernière a été conservée dans un réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leur utilisation. (Al Mahi et al., 2013).

Les champignons phytopathogènes ont été ensemencés sur PDA pendant 7 jours, puis une suspension sporale a été préparée à partir de ces cultures.

II.3.2 Méthode de diffusion sur gélose (méthode des puits)

Selon le protocole décrit par **Ela et al., (1996)** modifié, la méthode des puits, est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antimicrobien.

Cette technique a été réalisée par l'écouvillonnage de la suspension bactérienne en surface du milieu Mueller Hinton (MH) ou de la gélose nutritive (GN) et sur PDA pour les suspensions sporales des champignons phytopathogènes, préalablement coulés dans des boîtes de Pétri à l'aide d'un écouvillon stérile, préalablement trempé dans la suspension bactérienne ou fongique, et déchargé au maximum, sur la totalité de la surface gélosée en stries serrées. L'opération a été répétée deux à trois fois, en tournant la boîte à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Après 15 min, des puits ont été découpés à l'aide de pipettes Pasteur. Le fond des puits est obturé par une goutte de gélose molle pour limiter la diffusion des extraits sous la gélose. Ensuite, 25 µl de l'extrait sont distribués dans chaque puits. Les boîtes sont mises à incuber dans une étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48 h pour les levures, et à 28°C pendant 72h pour les champignons filamenteux.

Des essais témoins sont effectués *in vitro* pour le DMSO pur vis-à-vis de chaque type de souche microbienne.

L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Un extrait est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm.

II.4 Analyse statistique

L'étude statistique a été faite en utilisant le logiciel SAS/STAT® 9.2,

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont été analysés statistiquement par le test de (two-way ANOVA) suivi de celui de Student-Newman-Keuls multip-rang test afin de comparer les moyennes des zones d'inhibition des extraits fongiques. Contrairement aux résultats de l'activité enzymatique où l'analyse a été faite par le test de (One-Way ANOVA) suivi par le test de Student-Newman-Keuls multip-rang, pour comparer les pourcentages d'inhibition des extraits fongique, et les moyennes des zones de dégradation de chaque enzyme par les champignons pour l'activité enzymatique.

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD et les mesures ont été répétées deux fois (n=2), La différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est ≤ 0.05 , les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

I.1 Analyse de l'activité enzymatique des souches endophytes

Dans notre présente étude, neuf isolats des mycoendophytes ont été examinés pour la production des enzymes extracellulaires tels que l'amylase, la laccase, la lipase et la protéase.

La souche qui a enregistré les meilleures activités enzymatiques est *Phomopsis* sp.1 avec les meilleures valeurs pour la protéase (gélatinase et le lait écrémé), la lipase, et la laccase, mais elle a été non productrice de l'estérase.

En second et en troisième lieu viennent les souches *Phomopsis* sp.2 et *Phoma* sp. produisant toutes les enzymes testées sauf l'estérase.

La gélatinase a été l'enzyme la plus synthétisée par tous les champignons endophytes suivit par la lipase.

Les souches qui ont montré une activité positive pour l'estérase ont été négatives pour la laccase sauf *Fusarium* sp. qui a démontré une activité positive pour les deux enzymes. Alors que *Colletotrichum* sp. et *Chaetomium* sp. ont montré une activité négative pour les deux enzymes précédentes.

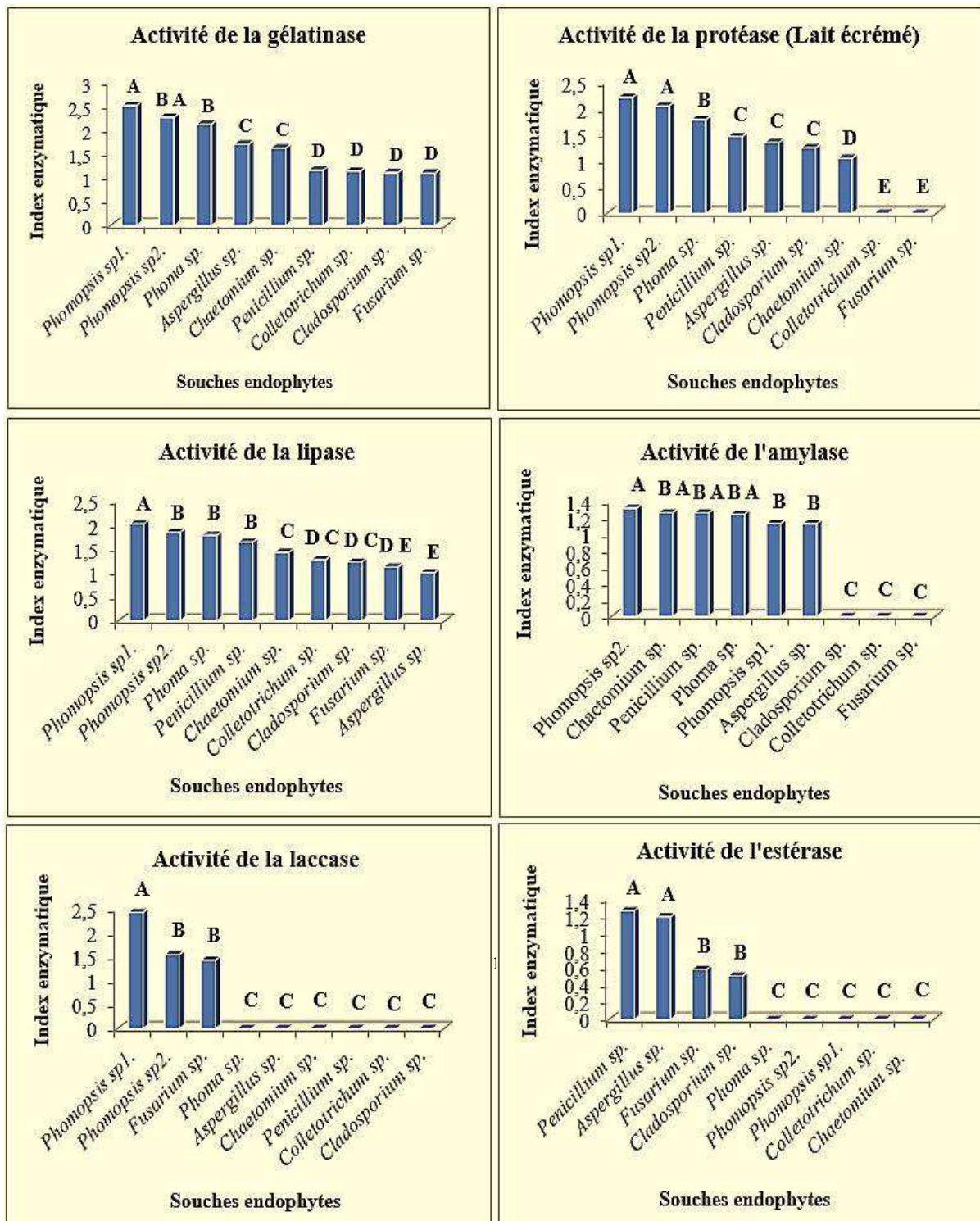
La souche la plus faible pour la production des enzymes était *Colletotrichum* sp. parce qu'elle ne produisait que la lipase et la gélatinase, suivit par la souche *Fusarium* sp.

Les résultats des souches productrices des enzymes sont regroupés dans le tableau 03

Tableau 03 : Résultats des souches productrices d'enzymes

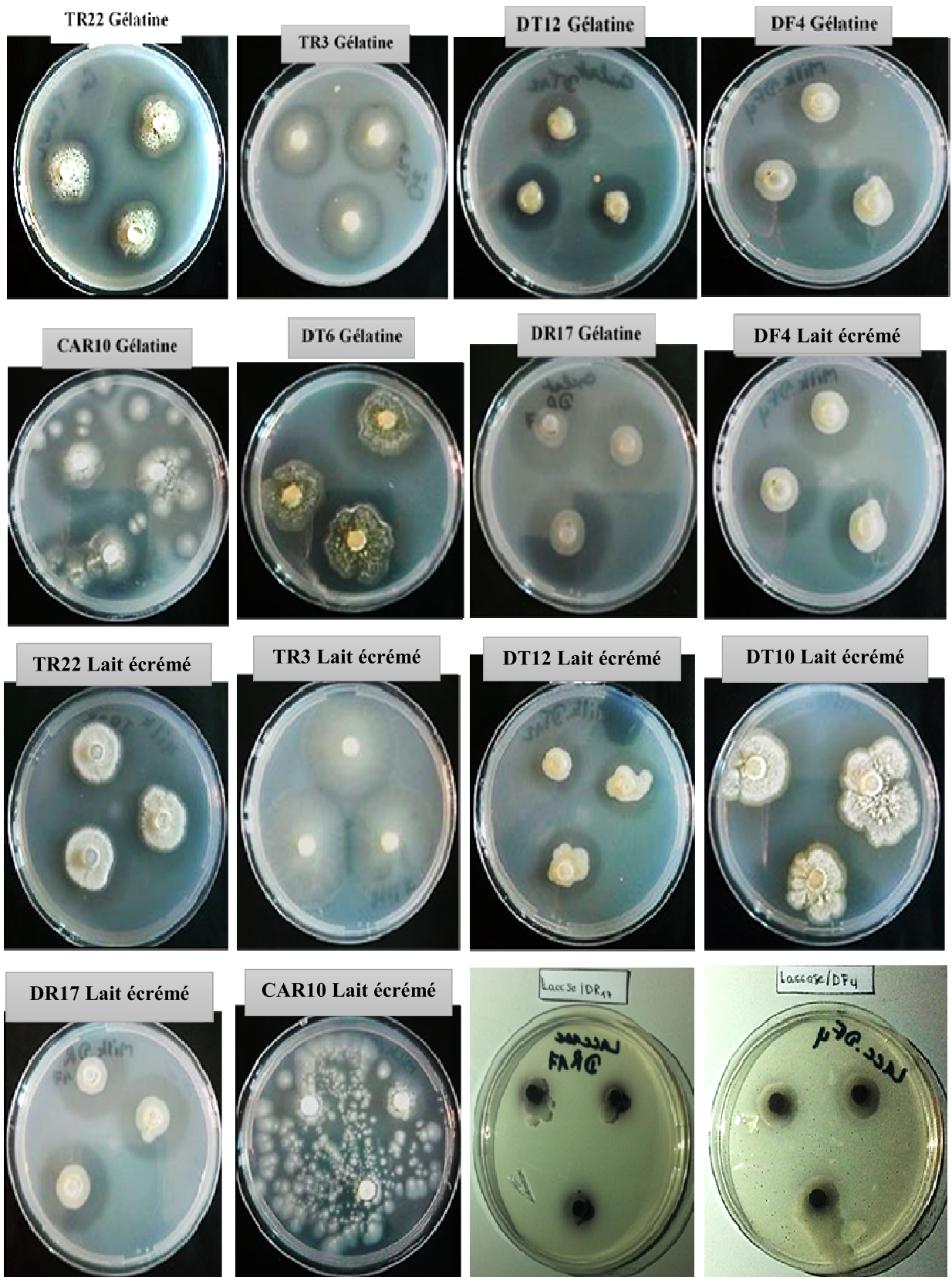
Activité enzymatique	Meilleure souche productrice	EI	Faible souche productrice	EI
Gélatinase	<i>Phomopsis</i> sp.1	2.60	<i>Fusarium</i> sp.	1.07
Lait écrémé	<i>Phomopsis</i> sp.1	2.35	<i>Chaetomium</i> sp.	1.04
Lipase	<i>Phomopsis</i> sp.1	2.08	<i>Aspergillus</i> sp.	1.0
Estérase	<i>Penicillium</i> sp.	1.30	<i>Cladosporium</i> sp.	0.40
Amylase	<i>Phomopsis</i> sp.2	1.33	<i>Cladosporium</i> sp.	0.0
Laccase	<i>Phomopsis</i> sp.1	1.71	<i>Fusarium</i> sp.	1.33

La capacité de biosynthèse d'enzymes fongiques a été donnée sous forme des graphes dans la figure 5 où les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes, ainsi sur quelques photos représentées par la figure 6. Les valeurs de l'index enzymatique (EI) ont montré clairement qu'il y a eu une variation dans la production de différentes enzymes extracellulaires par les champignons endophytes.



Les index enzymatiques qui ont la même lettre ne sont pas significativement différents

Figure 5 : Résultats de l'activité enzymatique des souches mycoendophytes.



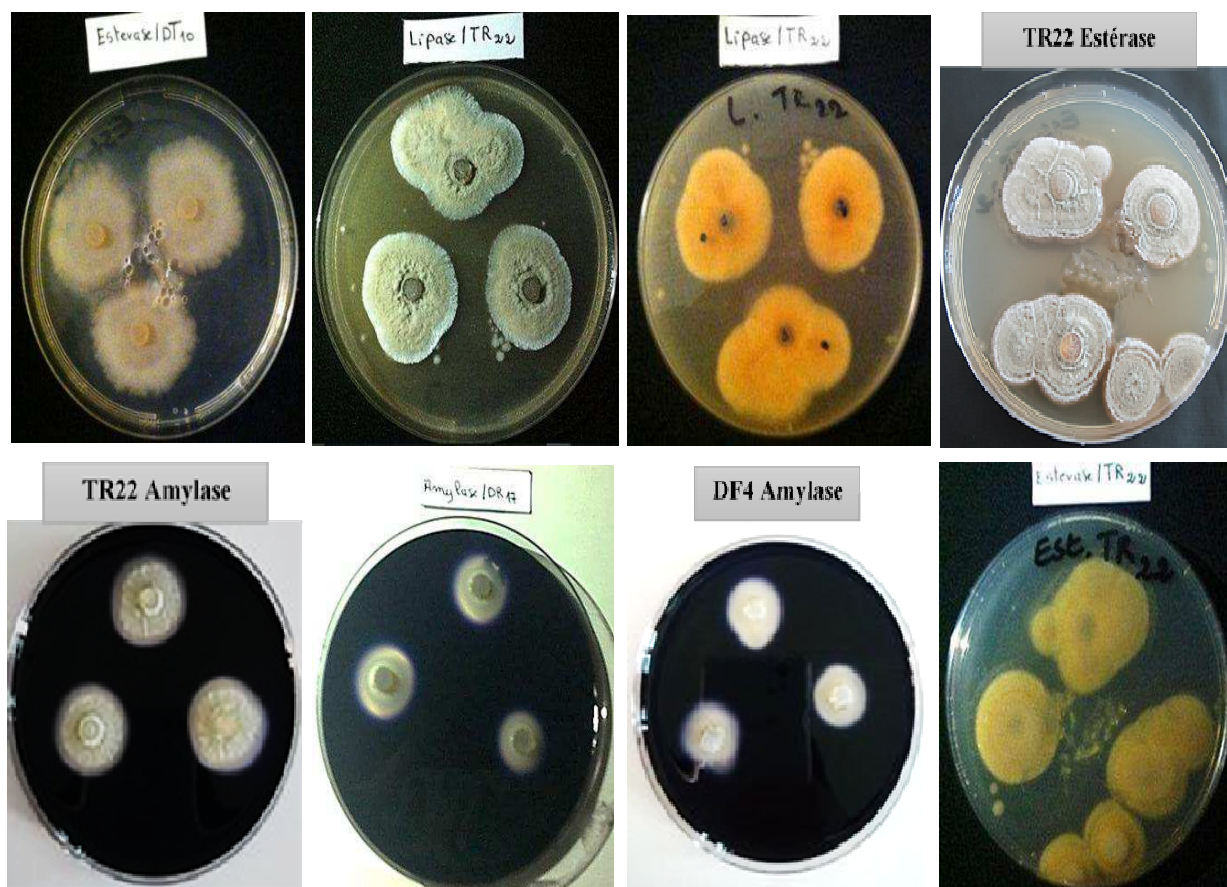


Figure 6 : Résultats de l'activité enzymatique.

Les enzymes fongiques possèdent une grande importance dans l'agriculture, l'industrie et la santé humaine, grâce à leurs stabilités face à des hautes températures et aux extrêmes pH mieux que les enzymes dérivées des plantes et des animaux (Maria *et al.*, 2005).

Les enzymes fongiques sont utilisées dans la fabrication des denrées alimentaires, les boissons, les confiseries, le textile et le cuir (Maria *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus ont confirmé le phénomène d'association entre les micro-organismes et la plante hôte comme était indiqué par McNory et Kloepper, (1995) ; Costa *et al.*, (2001) et Hallmann *et al.*, (1995). Les champignons endophytes ont la capacité d'employer les protéines, les lipides, l'amidon, la cellulose et la chitine comme sources d'énergie.

La production des enzymes extracellulaires par les endophytes peuvent impliquer une stratégie de résistance de la plante hôte contre les micro-organismes pathogènes, et d'un autre côté pour améliorer l'état nutritionnel de la plante (Choi *et al.*, 2005).

Selon **Amirita et al., (2012)**, 72% d'endophytes isolés à partir de quelques plantes médicinales sont considérés comme des bons producteurs de l'amylase et de la protéase.

L'activité enzymatique extracellulaire des endophytes joue un rôle potentiel dans la dégradation des polysaccharides et des protéines au cours de la sénescence de la plante. Cette propriété peut être exploitée dans le domaine biotechnologique pour la biodégradation des polysaccharides et des protéines. (**Fouda et al., 2015**)

L'activité élevée de la lipase suggère leur capacité d'employer des lipides comme source d'énergie. (**Maria et al., 2005**).

Selon **Tan et al., (2004)**, le Tween est considéré comme un substrat approprié pour le dosage de la lipase.

Les isolats des mycoendophytes ont pu produire la lipase, et sont donc considérés comme des agents de bio-contrôle. (**Maria et al., 2005**).

Pour l'estérase l'addition du tween 80 augmente leur activité estérasique et les souches qui ont montré une activité positive ayant la capacité de dégrader les lipides simples (monoacylphospholipides) et peuvent être présents sur les surfaces comme des gouttes d'eau. (**Ishida et al., 2012**) résultant des réactions des acides gras hydrolysés du Tween 80 avec les ions de calcium dans le milieu (**İnci et al., 2012**) et sont importants pour la nutrition fongique. (**Ishida et al., 2012**)

La laccase est généralement produite par les champignons qui dégradent le bois elle est impliquée dans la dégradation fongique de la lignine et de ses dérivés par la dépolymérisation. L'oxydation des composés tels que l'ABTS (2,2-azino-bis- [3-ethylbenzene-6-sulfonic acid]), guaiacol, et syringaldazine incorporés dans le milieu provoque la production d'une couleur intense à côté de la colonie fongique. (**Abdel-Raheem et Shearer., 2002**)

Les résultats négatifs peuvent signifier que l'enzyme n'est pas produit, ou qu'il est produit et non clarifié à partir du mycélium, ou qu'il est produit est libéré, mais le milieu inhibe sa détection. (**Abdel-Raheem et Shearer., 2002**). Ainsi l'absence d'une réaction ne confirme absolument pas l'incapacité de l'espèce à produire une enzyme particulière il pourrait être dû à la capacité du champignon à utiliser d'autres matériaux incorporés dans le milieu plutôt que le substrat du test. (**Abdel-Raheem et Shearer., 2002**).

I. 2 Pouvoir antagoniste, *in vitro*, des souches endophytes

I. 2.1 Activité antimicrobienne des métabolites secondaires extracellulaires

L'étude des interactions entre les souches endophytes et les souches pathogènes semble être une étape primordiale. Ce type de test va mettre en évidence les caractéristiques que possèdent certaines souches de mycoendophytes à inhiber d'autres souches pathogènes.

Les résultats positifs ont montré la présence de zones d'inhibition autour des puits traduisant ainsi une activité inhibitrice des souches endophytes testées contre les souches cibles utilisées.

L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par (Mutai et al., 2009) ; ils ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance bactérienne en 5 classes :

- ✚ Très fortement inhibitrice : D = 30mm
- ✚ Fortement inhibitrice : D= 2 - 29mm
- ✚ Modérément inhibitrice ; D= 16 -20mm
- ✚ Légèrement inhibitrice : D= 11- 16 mm

I. 2.1.1 L'activité antibactérienne

Vingt-sept extraits bruts de champignons endophytes ont été testés pour leurs activités antibactériennes contre quinze souches bactériennes : *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* résistant à méticilline, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* et *Salmonella enterica*.

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-dessous où les moyennes des zones d'inhibition, sont exprimées en millimètres.

Tableau 04 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche *Penicillium* sp.
(Métabolites secondaires extracellulaires)

<i>Penicillium</i> sp.			
Bactéries	Solvants		
	Acétate d'éthyle	Dichlorométhane	Hexane
<i>Bacillus cereus</i>	31,75	26,75	16,75
<i>Enterococcus faecalis</i>	32	25,25	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	41	28	17,5
<i>Bacillus subtilis</i>	39,75	28,5	3
<i>Micrococcus luteus</i>	47	34,5	22,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	32,75	28,5	0
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à méticilline	38,5	32	19,5
<i>Citrobacter freundii</i>	36,5	31,25	21,5
<i>Proteus mirabilis</i>	43	35,25	20
<i>Salmonella typhimurium</i>	37,25	31,25	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32,25	19,5	8,75
<i>Escherichia coli</i>	42	34,75	26,5
<i>Vibrio cholerae</i>	37,75	30,5	15
<i>Salmonella enterica</i>	32,5	24	0

Tableau 05 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche *Phomopsis* sp. 2
(Métabolites secondaires extracellulaires)

<i>Phomopsis</i> sp .2			
Bactéries	Solvants		
	Acétate d'éthyle	Dichloro-méthane	Hexane
<i>Bacillus cereus</i>	18,5	19	17
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	19,5	20	22
<i>Bacillus subtilis</i>	25,5	23,5	21,5
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	22,5	19
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à méticilline	23	20,5	19
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	34,5	35	32,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	22,5	23	21
<i>Salmonella enterica</i>	0	0	0

Tableau 06 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche *Phomopsis* sp .1
(Métabolites secondaires extracellulaires)

<i>Phomopsis</i> sp .1			
Bactéries	Solvants		
	Acétate d'éthyle	Dichloro-méthane	Hexane
<i>Bacillus cereus</i>	25	21,5	22,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	31,5	30,5	30
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	23	27,5	24
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à métricilline	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	0	0	0
<i>Salmonella enterica</i>	0	0	0

Tableau 07 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche *Cladosporium* sp.
(Métabolites secondaires extracellulaires)

<i>Cladosporium</i> sp.			
Bactéries	Solvants		
	Acétate d'éthyle	Dichloro-méthane	Hexane
<i>Bacillus cereus</i>	12,25	10,25	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	17	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	17	0
<i>Micrococcus luteus</i>	20,5	29	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à métricilline	14,5	14	0
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	15	15,75	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	14,5	15,75	0
<i>Salmonella enterica</i>	0	0	0

Tableau 08 : Résultats de l'activité antibactérienne de la souche *Phoma* sp.
(Métabolites secondaires extracellulaires)

<i>Phoma</i> sp.			
Bactéries	Solvants		
	Acétate d'éthyle	Dichlorométhane	Hexane
<i>Bacillus cereus</i>	12,25	10,25	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	17	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	17	0
<i>Micrococcus luteus</i>	20,5	29	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à métricilline	29,5	30,5	29
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	42	40	23,5
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	28	35	29
<i>Salmonella enterica</i>	0	0	0

Tableau 09 : Meilleures zones d'inhibition selon le solvant utilisé

Solvant	Meilleure zone d'inhibition (mm)	Champignon endophyte / bactérie pathogène
Acétate d'éthyle	47	<i>Penicillium</i> sp. / <i>Micrococcus luteus</i>
Dichlorométhane	35,25	<i>Penicillium</i> sp / <i>Proteus mirabilis</i>
Hexane	32,5	<i>Phomopsis</i> sp .2 / <i>Proteus mirabilis</i>

En analysant ces résultats, nous pouvons constater que presque 66.66 % des souches endophytes testées exercent un effet inhibiteur contre les bactéries pathogènes. L'exemple le plus significatif de l'inhibition est celui du champignon *Penicillium* sp. qui exerce une activité inhibitrice à l'encontre de toutes les souches testées. Toutefois, cette souche a montré une activité inhibitrice la plus remarquable vis-à-vis les espèces : *Micrococcus luteus* (47 mm), *Proteus mirabilis* (43 mm), *Escherichia coli* (42mm), *Staphylococcus aureus* (41mm).

Il est à noter que quatre champignons endophytes *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., et *Chaetomium* sp., avec les trois solvants l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'hexane n'ont pas eu aucune activité contre les espèces cibles.

Les souches indicatrices *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline, ont révélé une grande sensibilité avec des zones d'inhibition très importantes (*Proteus mirabilis* 42 mm et *Staphylococcus aureus* résistant à pénicilline 30,5mm) vis à vis l'espèce fongique *Phoma* sp., alors que la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité vis-à-vis la souche fongique *Phomopsis* sp.1 avec une zone d'inhibition de (31,5 mm).

Concernant l'activité inhibitrice de la souche fongique *Cladosporium* sp. elle a été importante contre la bactérie *Micrococcus luteus* avec une zone d'inhibition de 29 mm

Pour la souche *Phomopsis* sp .2, la zone d'inhibition la plus remarquable était de 35mm a été observé contre *Proteus mirabilis*.

Il en ressort des tableaux cinq, six, sept, et huit que les souches endophytes : *Phomopsis* sp.2, *Phomopsis* sp.1, *Cladosporium* sp., *Phoma* sp. présentaient une activité inhibitrice plus au moins prononcée vis-à-vis des souches bactériennes à Gram négatif.

Les résultats de l'activité antibactérienne des deux souches fongiques *Penicillium* sp. et *Phomopsis* sp.2 contre les deux bactéries *Micrococcus luteus*, et *Proteus mirabilis* sont mentionnés au niveau du tableau 09.

Les résultats dans les figures et les chiffres dans les tableaux montrent clairement la production de métabolites secondaires antimicrobiens par les endophytes.

La découverte des champignons endophytes dans les tissus végétaux a ouvert de nouvelles possibilités dans la recherche de composés métaboliquement actifs **Cuomo et al., (1995)** ont examiné un grand nombre d'isolats fongiques terrestres et marins et ont trouvé un nombre très élevé d'espèces antimicrobiennes actives parmi les isolats marins.

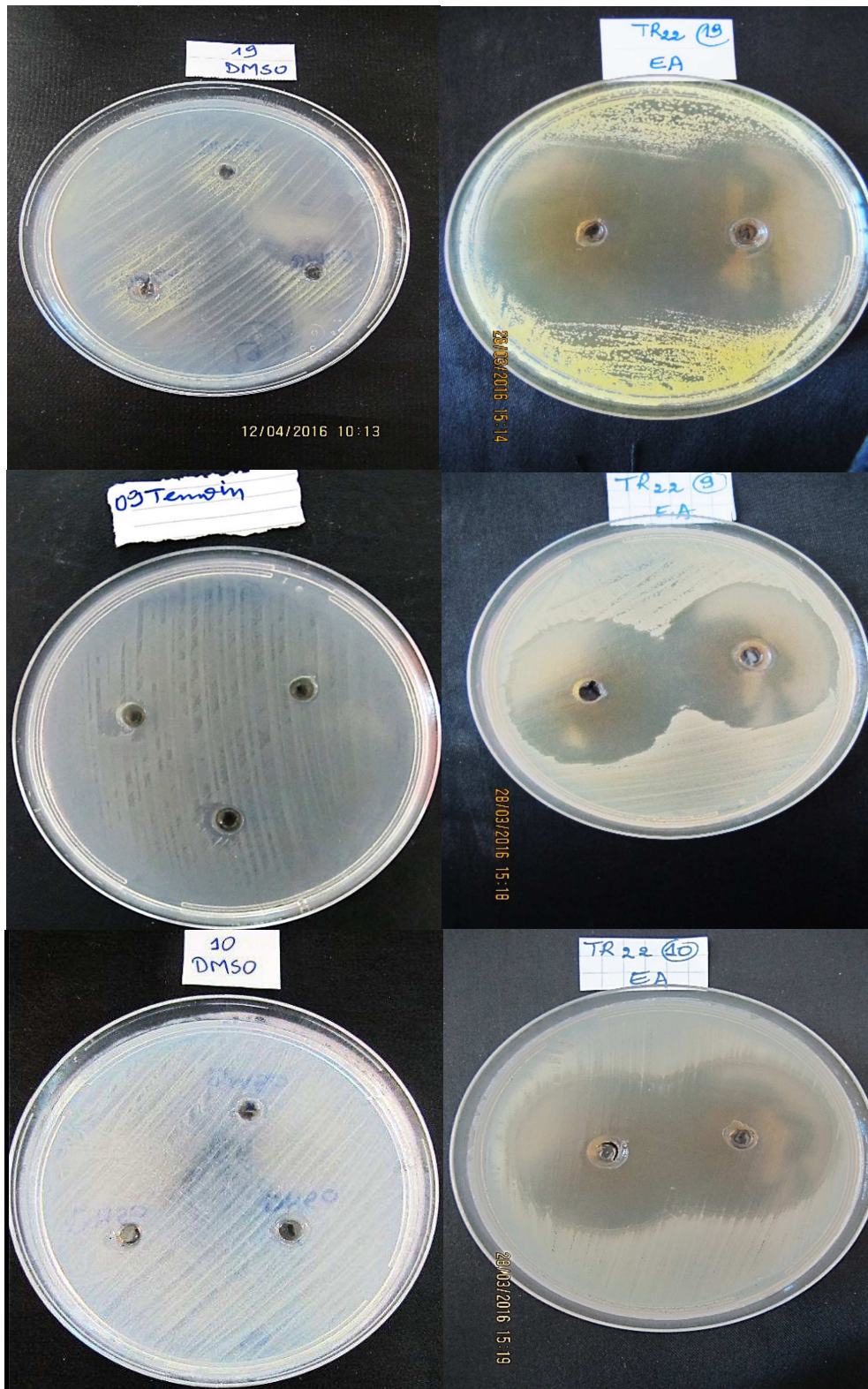
Selon **Dreyfuss et Chapela, (1994)**, environ 4000 métabolites secondaires d'origine fongique ont été décrits comme étant biologiquement actifs.

Selon **Abdalla et Matasyoh, (2014)**, les métabolites cyclo-(Pro-Thr) et cyclo- (Pro-Tyr) ont été produits lors de la fermentation du champignon endophyte *Penicillium* sp. isolé à partir de la plante *Acrostichum aureum* (la mangrove). Les deux composés ont montré une activité contre *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* ce qui confirme nos résultats, où on a trouvé que la souche fongique *Penicillium* sp. exerce une excellente activité antibactérienne (41mm) contre la bactérie *Staphylococcus aureus*.

Les résultats trouvés par **Poorani Kandasamy et al., (2015)** ont montré que la souche fongique *Phoma* sp. n'exerce aucune activité inhibitrice contre la bactérie *Escherichia coli* ce qui corrèle avec nos résultats. Et pour la bactérie *Bacillus subtilis* ils ont aussi signalé que la souche *Phoma* sp. n'a aucune activité inhibitrice contre cette bactérie, par contre notre résultat montre que l'extrait de dichlorométhane exerce une activité inhibitrice contre cette dernière (17mm), mais les extraits d'acétate d'éthyle et d'hexane n'ont pas aucune activité inhibitrice contre la bactérie *Bacillus subtilis*.

Ding et al., (2008) ont trouvé que le champignon endophyte *Cladosporium* sp. a exercé une activité inhibitrice contre la bactérie *Staphylococcus aureus* ATCC25923 avec une zone d'inhibition de 15 mm, alors que nous avons trouvé des zones d'inhibition plus grandes chez cette souche fongique contre la bactérie *Staphylococcus aureus* (17mm avec l'extrait de dichlorométhane et 16mm d'acétate d'éthyle). Les résultats trouvés de l'activité antibactérienne de la souche fongique *Cladosporium* sp. contre la souche bactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922 ont montré des zones d'inhibition de 13mm et 24mm alors que notre résultat a été négatif.

Selon **Tang et al., (2014)**, la souche mycoendophyte *Phomopsis* sp. ED2 a montré une activité antimicrobienne contre les bactéries *Proteus mirabilis* et *Bacillus subtilis*, ces résultats sont en accord avec notre résultat pour la souche fongique *Phomopsis* sp.2 contre ces deux bactéries.



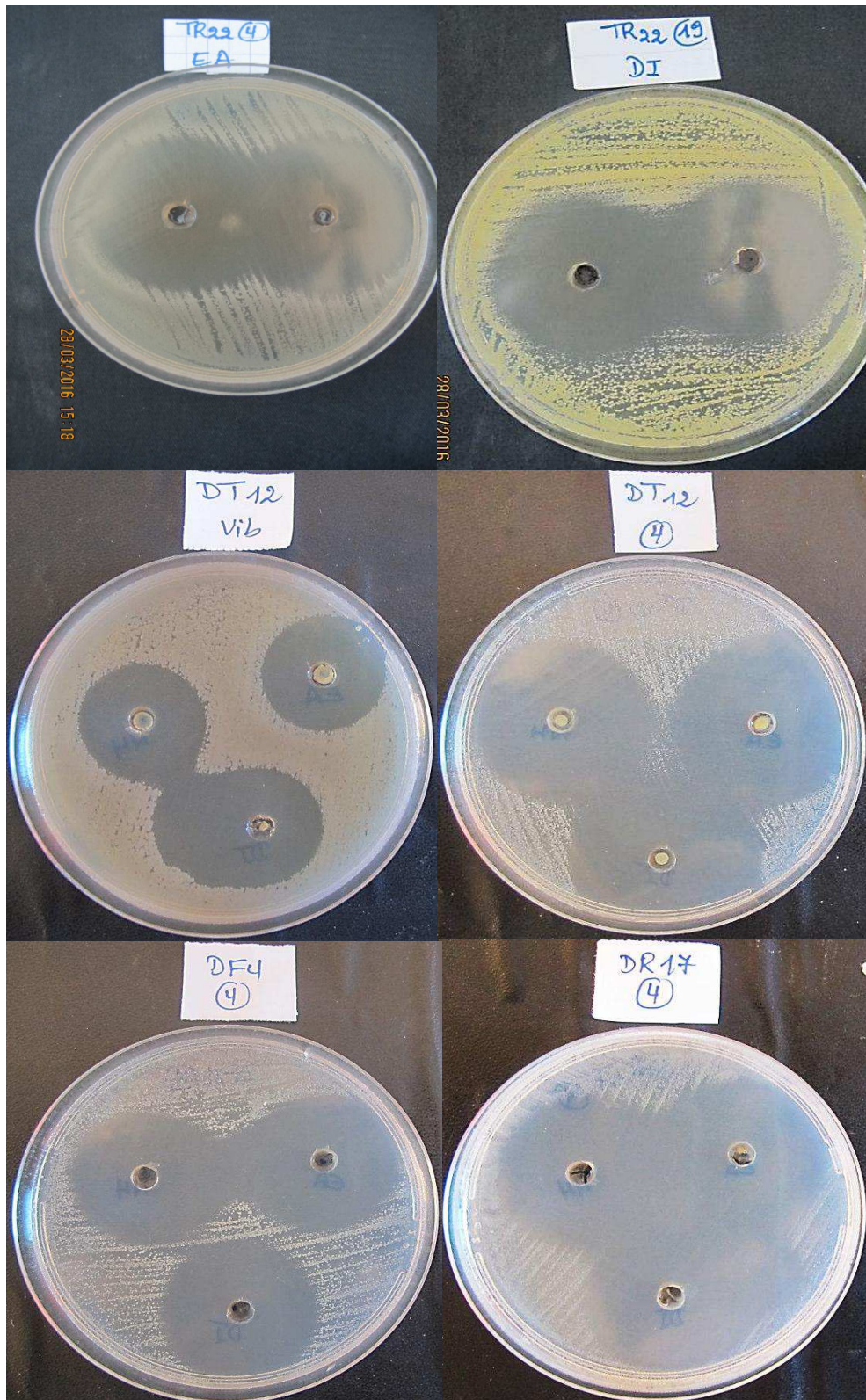
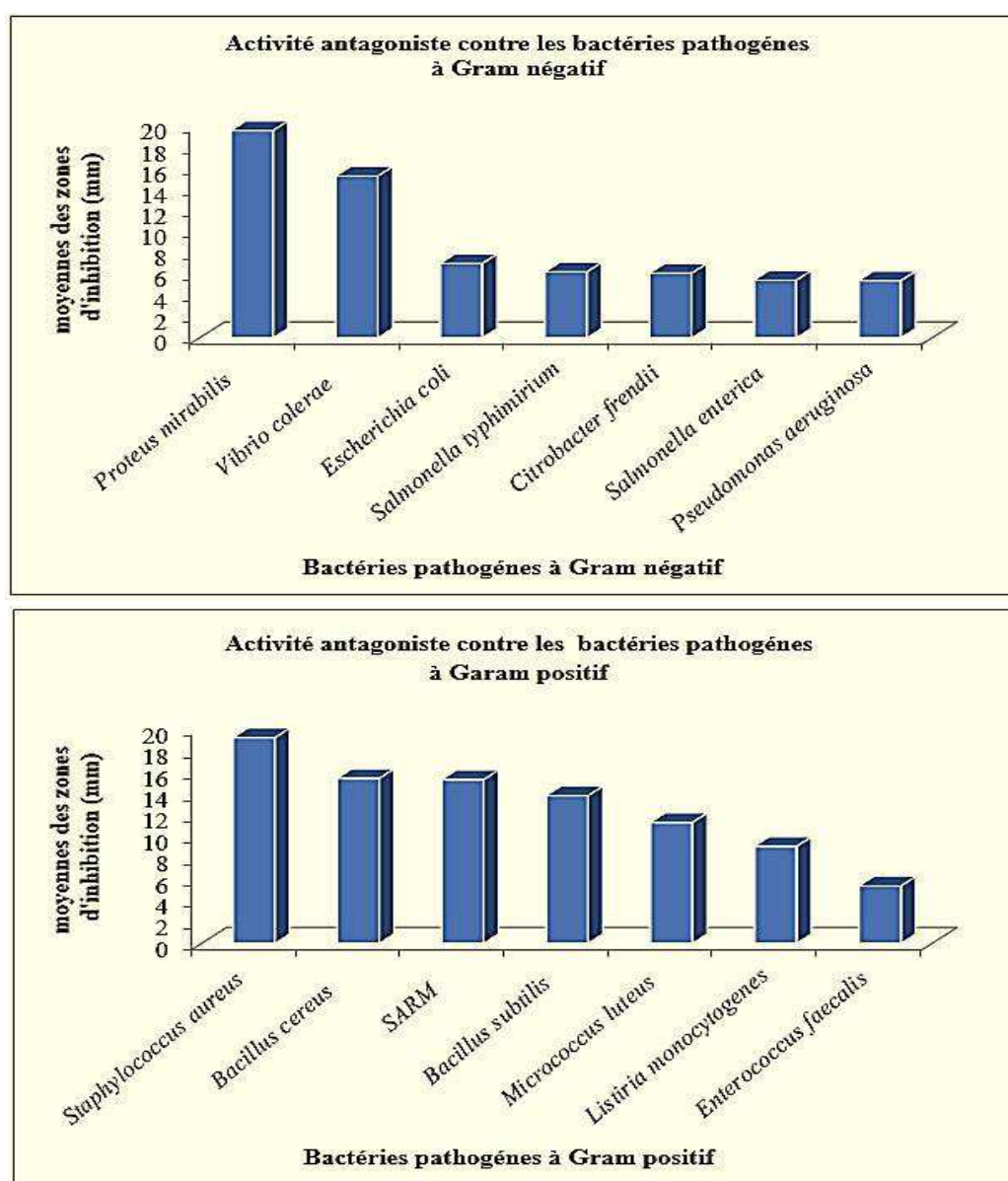


Figure 7 : Quelques zones d'inhibition de différents extraits fongiques.

D'après tous ces résultats, il en ressort que la majorité de nos souches ont exhibé une activité inhibitrice contre quelques souches cibles. Cependant, ce pouvoir antimicrobien diffère d'une souche endophyte à l'autre. De plus, Nous avons constaté que cet effet est significativement différent selon le type de Gram, il est plus important contre les souches indicatrices à Gram positif.

Il est à noter que les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensibles que celles à Gram négatif et ceci s'adapte aux nos résultats comme il est montré sous forme des graphes dans les figures 8 et 9.



Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes

Figure 8 : Activité antagoniste contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif

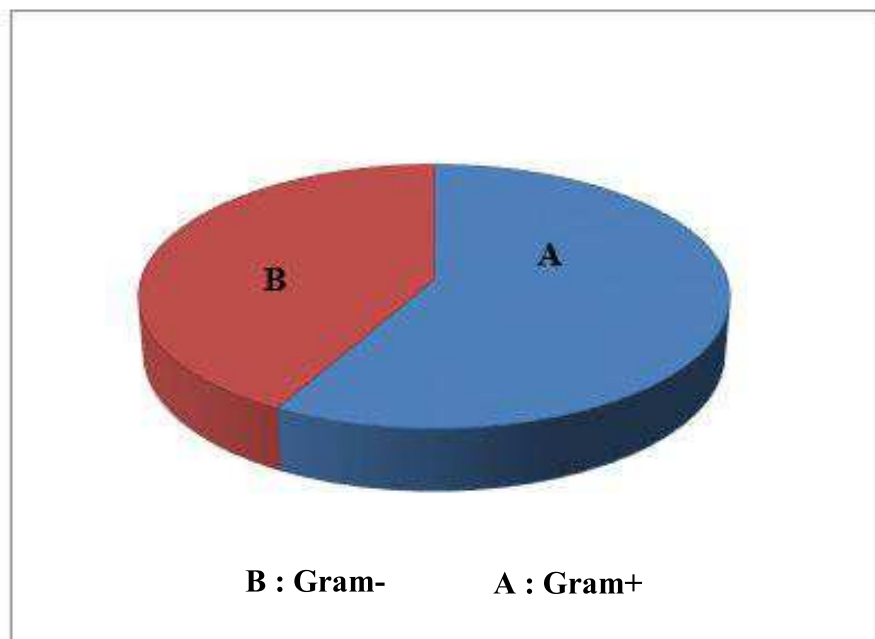


Figure 9 : Comparaison entre les activités dirigées des deux groupes de bactéries à Gram+ et à Gram-

Plusieurs travaux mettent en évidence la grande sensibilité des bactéries à Gram positif par rapport à celles à Gram négatif. Cela peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries à Gram négatif par rapport aux bactéries à Gram positif. En effet, les bactéries à Gram négatif possèdent une couche additionnelle à la membrane externe, composée de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides, formant une barrière imperméable à la plupart des molécules hydrophobes. (**Bouterfa et al., 2014**).

La sensibilité des bactéries pathogènes vis-à-vis les champignons endophytes peut être due à la production des substances inhibitrices par ces champignons selon **Powthong et al., (2013)**

De nombreux travaux effectués sur les composés bioactifs antimicrobiens des champignons endophytes ont classés ces composés comme des alcaloïdes, terpénoïdes stéroïdes, quinones, lignanes, les phénols.

Les analyses phytochimiques ont été effectuées précédemment par **Benghalensis et al., (2013)** sur les métabolites des champignons endophytes ont montré la présence des saponines, stéroïdes, flavonoïdes, tannins, et terpénoïdes.

Les métabolites antimicrobiens produits par les endophytes présentent de nombreux avantages pour l'humanité, ils pourraient être les futurs antibiotiques. (**Ananda et al., 2012, Katoch et al., 2014**).

I.2.1.2 L'activité antifongique

Le Test de l'activité antifongique consiste à rechercher l'effet de vingt- sept extraits de champignons endophytes sur le développement de quatre champignons phytopathogènes filamenteux *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* var. *coeruleum* , *Aspergillus niger*, et *Aspergillus flavus* et deux levures *Candida albicans* et *Candida glabrata* .

L'activité antifongique évaluée sur les souches testées par l'apparition des zones d'inhibition, les tableaux ci-dessous représentent les moyennes des zones d'inhibition exprimées en mm.

Tableau 10 : Résultats de l'activité antifongique de la souche *Penicillium* sp.
(Métabolites secondaires extracellulaires)

<i>Penicillium</i> sp.			
Champignons phytopathogènes	Solvants		
	Acétate d'éthyle	Dichloro méthane	Hexane
<i>Candida albicans</i>	20,75	14	0
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	22,5	13,5	0
<i>Phytophthora infestans</i>	14,5	10,5	0
<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	15,5	10	0
<i>Aspergillus niger</i>	10	9	0
<i>Aspergillus flavus</i>	9,5	8,5	0

Tableau 11 : Résultats de l'activité antifongique de la souche *Phomopsis* sp.1
(Métabolites secondaires extracellulaires)

<i>Phomopsis</i> sp.1			
Champignons phytopathogènes	Solvants		
	Acétate d'éthyle	Dichloro méthane	Hexane
<i>Candida albicans</i>	0	0	0
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	18	20	14,5
<i>Phytophthora infestans</i>	0	0	0
<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	17	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0

Tableau 12 : Résultats de l'activité antifongique de la souche *Phomopsis* sp.2
(Métabolites secondaires extracellulaires)

<i>Phomopsis</i> sp.2			
Champignons phytopathogènes	Solvants		
	Acétate d'éthyle	Dichloro méthane	Hexane
<i>Candida albicans</i>	0	0	0
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	0	0	0
<i>Phytophthora infestans</i>	10	0	9
<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	12.5	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0

Tableau 13 : Résultats de l'activité antifongique de la souche *Phoma* sp.
(Métabolites secondaires extracellulaires)

<i>Phoma</i> sp.			
Champignons phytopathogènes	Solvants		
	Acétate d'éthyle	Dichloro méthane	Hexane
<i>Candida albicans</i>	0	0	0
<i>Candida glabrata</i>	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	15	19	22
<i>Phytophthora infestans</i>	0	0	0
<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	9,5	19,5	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	0

Les résultats obtenus montrent que presque 44.44 % des souches endophytes testées exercent un effet inhibiteur contre les champignons phytopathogènes et les levures. L'exemple le plus significatif de l'inhibition est celui du champignon *Penicillium* sp. qui exerce une activité inhibitrice à l'encontre de toutes les souches testées sauf sur la levure *Candida glabrata*. Toutefois, cette souche a montré une activité inhibitrice la plus remarquable vis-à-vis l'espèce : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (22.5 mm), et la zone la plus faible contre l'espèce *Aspergillus flavus* (8.5mm)

La levure *Candida glabrata* n'a montré aucune activité antifongique sauf avec le champignon endophyte *Penicillium* sp. avec une zone d'inhibition de (20.75mm), elle est considérée comme la souche la plus résistante. Tandis que le genre *Fusarium* avec ses deux espèces (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et *Fusarium solani* var. *coeruleum* est considéré comme le plus sensible.

Il est à noter que cinq champignons endophytes (*Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. ; *Chaetomium* sp. et *Cladosporium* sp.) avec les trois solvants l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'hexane n'ont pas eu aucune activité contre les espèces cibles.

Nous avons constaté l'apparition d'une zone d'inhibition plus ou moins différente selon les antagonistes étudiés.

Le genre *Penicillium* comprend plus de 200 espèces qui produisent une large gamme de métabolites secondaires bioactifs (Frisvad et Samson, 2004). Il a été également montré

que les *Penicillium* endophytes sont capables de synthétiser des métabolites antifongiques qui sont actifs contre un certain nombre de champignons phytopathogènes (**Becker et al., 2012 ; Nicoletti et al., 2004 ; Nicoletti et al., 2007 ; Wang et al., 2007**).

Cui et al., (2008) ont démontré que le genre *Penicillium* qui a été isolé à partir de *Acrostichum aureum*, il est une source de peptides qui ont permis d'inhiber *Candida albicans* qui est identique à nos résultats.

L'espèce *Phomopsis* sp.2 démontrait une activité positive contre *Fusarium solani* var. *coeruleum* (12.5mm) avec l'acétate d'éthyle alors que l'espèce *Phomopsis* sp1. A montré une activité plus élevée (17mm) contre cette souche fongique.

Selon **Arnold et al., (2000)**, la différence entre les résultats obtenus par des mêmes genres des champignons endophytes contre les différentes espèces des champignons phytopathogènes appartenant au même genre, peut être expliquée par la spécificité des champignons endophytes vis-à-vis des champignons phytopathogènes, c'est-à-dire que les métabolites secondaires produits par l'endophyte sont spécifiques au niveau de l'espèce.

Nos résultats suggèrent que les champignons endophytes résidants dans la plante (**Abdel Motaal et al., 2010**) et établissent une relation symbiotique (**Katoch et al., 2014**).

Bikash Baral et al., (2011) la présence des endophytes dans les tissus végétaux possède un but bien défini ; les endophytes aident la plante par la sécrétion des différents métabolites de défense contre les parasites tandis que l'hôte fournit la nourriture et un mécanisme de protection aux endophytes.

Ces métabolites peuvent être des composés antifongiques (**Abdel Motaal et al., 2010**) contribuent à la protection de la plante hôte contre les agents pathogènes (**Katoch et al., 2014**) et empêchent leurs invasions (**Recco Pimentel et al., 2010**) ou les suppriment directement en produisant des enzymes antimicrobiens ou lytiques (**Abdel Motaal et al., 2010**) et d'après **Selim et al., (2012)**, Les champignons endophytes sont capables d'induire la résistance de la plante hôte contre diverses maladies.

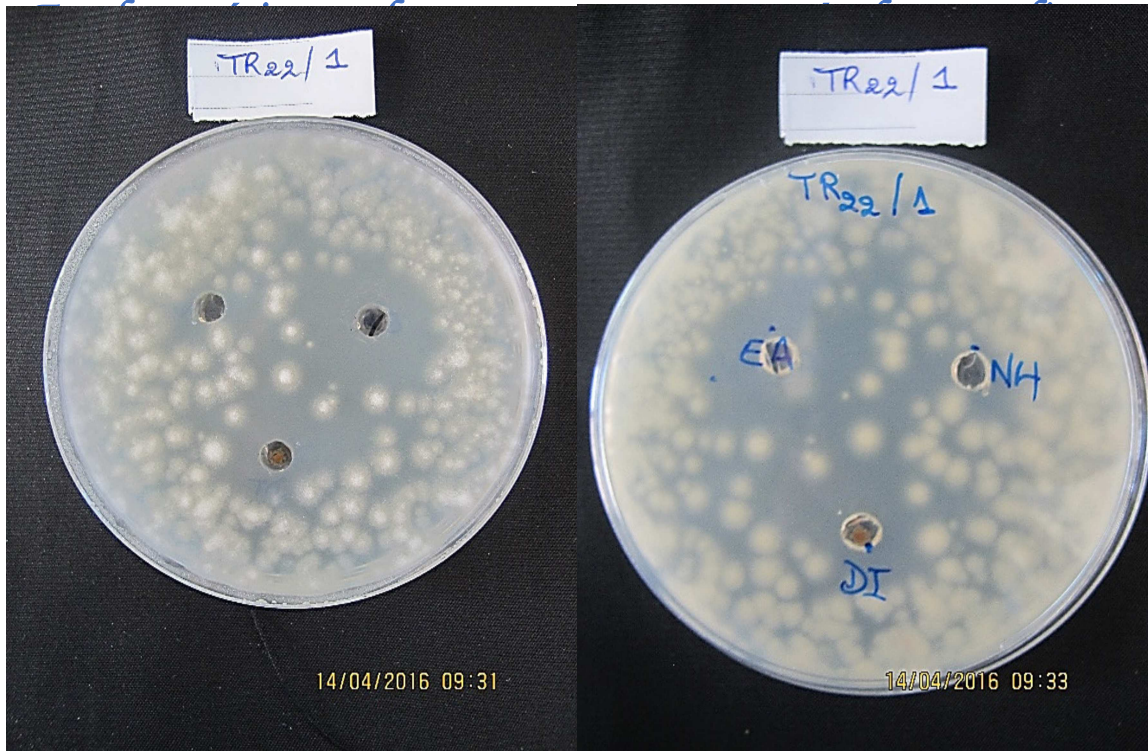
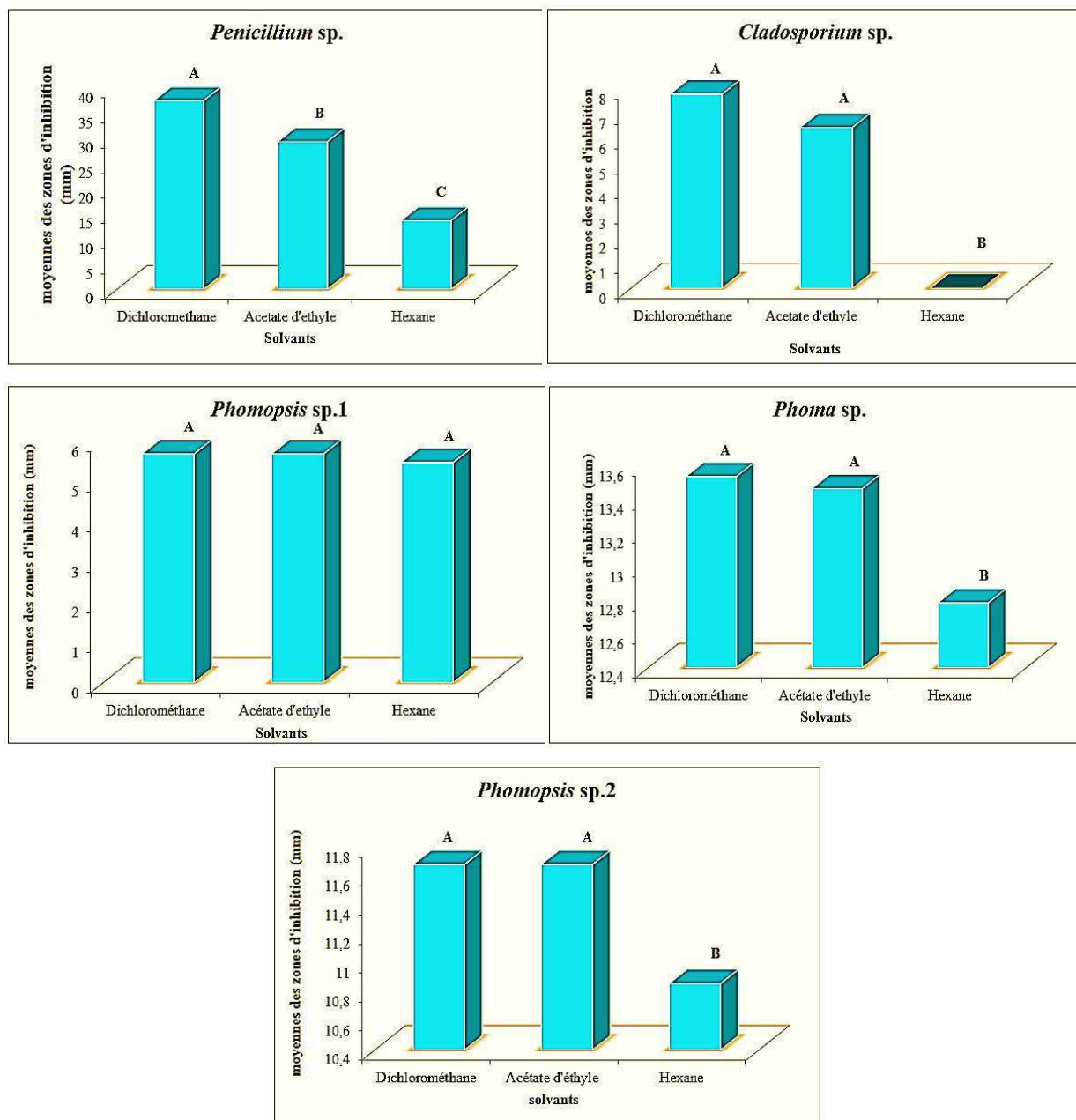


Figure 10 : Exemple des zones d'inhibition de trois extraits fongiques.

I.2.1.3 Choix du solvant pour l'activité antibactérienne et antifongique

Les extraits fongiques ont été préparés avec des trois solvants, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'hexane possédant des polarités différentes, afin de permettre l'extraction d'un large spectre de composés.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme des graphes dans la figure 11



Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Figure 11 : Résultats de l'activité antimicrobienne selon les solvants utilisés.

Les résultats obtenus ont montré que les solvants ont réagi différemment avec les souches fongiques. La faible moyenne d'inhibition a été enregistrée avec l'hexane, tandis que l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane ont eu les meilleures moyennes d'inhibition avec une priorité à l'acétate d'éthyle.

Selon **De Marco et al., (2007)**, l'utilisation de l'hexane permet d'éliminer la fraction lipidique de l'extrait, cela signifie que la présence de lipides dans nos extraits a été faible. Et

selon **El Mannoubi et al., (2008)**, les composés terpéniques sont présents uniquement dans les extraits à l'hexane en quantités considérables ainsi que dans l'extrait au dichlorométhane, ce dernier est responsable de l'extraction des composés apolaires (**Judith Webb et al., 2005**)

En effet, **Fki et al., (2005)** ont démontré que l'acétate d'éthyle est plus efficace que les autres solvants d'extraction avec un taux d'extraction élevé, c'est le solvant le plus souvent utilisé pour l'extraction des polyphénols (**Naczk et Shahidi, 2004**), et cela peut indiquer que nos extraits sont composés par des taux élevés de polyphénols

Il a été démontré par **Feknous et al., (2014)** que l'addition de 3x30 ml d'acétate d'éthyle permet d'éliminer les monosides et entraîne la majorité des hétérosides flavoniques.

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (**Gee et Johnson, 2001**).

De nombreuses études *in vitro* menées sur les composés phénoliques ont confirmé que ces derniers sont des agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes, avec des spectres d'activités variables (**Scalbert, 1992**). En effet certaines quinones présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif mais pas vis à vis des bactéries à Gram négatif (**Riffel et al., 2002**). Les acides-phénols ont des propriétés antiseptiques urinaires, antifongiques et antibactériennes (**Bruneton, 1999**). Et ont un grand potentiel antibactérien (**Alan et Miller, 1996**) en se complexant avec des composants des parois avec inhibition de la croissance microbienne (**Rojas et al., 1992 ; Perret et al., 1995**) ; en perturbant leurs métabolismes énergétiques (**Jones et al., 1994**).

L'activité antimicrobienne des extraits fongiques et les tests de sensibilité réalisés permettent de classer les solvants selon leurs effets. EA et DI sont les extraits les plus actifs puisqu'ils induisent chez les souches microbiennes des taux de sensibilité très élevés. (**Bouterfas et al., 2014**)

Enfin, il est à noter que les différences trouvées dans l'évaluation du pouvoir antibactérien et antifongique des différents extraits peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que la nature de l'espèce, les conditions ambiantes, les facteurs écologiques, les variations saisonnières, les méthodes d'extraction, la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, la sensibilité des bactéries, la concentration de l'extrait et l'organe de la plante utilisé (**Bouterfas et al., 2014**).

I.2.2. Activité antimicrobienne des métabolites secondaires intracellulaires

L'activité antimicrobienne des composés intracellulaires de cinq champignons endopyhtes *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. a été évaluée en observant le pouvoir inhibiteur de nos extraits sur 21 souches microbiennes de références (quinze souches bactériennes et six souches fongiques).

Les résultats sont regroupés dans les tableaux 14 et 15.

Tableau 14 : Moyennes des zones d'inhibition des métabolites intracellulaires des champignons endopyhtes contre les bactéries pathogènes.

Bactéries	Moyennes des zones d'inhibition des champignons (mm)				
	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
<i>Bacillus cereus</i>	0	11.5	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	19.5	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	13 .5	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	17	15.5	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus rm</i>	0	19	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	9	15	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	15	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	16.5	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	18	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	21	0	0	0
<i>Vibrio cholerae</i>	0	0	12	16.5	9 .5
<i>Salmonella enterica</i>	0	14	0	0	0

Tableau 15 : Moyennes des zones d'inhibition des métabolites intracellulaires des champignons endophytes contre les champignons phytopathogènes.

Champignons	Moyennes des zones d'inhibition des champignons (mm)	
	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Phoma</i> sp.
<i>Candida albicans</i>	39.5	0
<i>Candida glabrata</i>	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>	0	11
<i>Phytophthora infestans</i>	0	0
<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	21.5	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0

Pour l'activité antibactérienne les résultats rapportés dans le tableau 14 révèlent que la plupart des souches ont une activité nulle vis-à-vis des bactéries pathogènes sauf l'espèce *Aspergillus* sp. qui a montré un effet inhibiteur considérable, mais elle est inactive sur *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio cholerae*.

La souche *Vibrio cholerae* se manifeste comme la souche la plus sensible avec des zones d'inhibition faibles tandis que la bactérie *Micrococcus luteus* considérée comme la souche la plus résistante, les résultats n'ont démontré aucune zone d'inhibition autour des puits et cela traduit l'absence d'activité dans ces extraits contre *Micrococcus luteus*.

La souche *Cladosporium* sp. exerce une activité inhibitrice sur *Listeria monocytogenes* et une faible activité sur *Citrobacter freundii*.

Pour l'activité antifongique la plupart des extraits ont réagi négativement vis-à-vis de toutes les souches phytopathogènes ; aucune zone d'inhibition n'a été observée.

Par contre la souche *Cladosporium* sp. présente une zone d'inhibition très importante contre *Candida albicans* (39.5mm) ainsi que contre *Fusarium solani* var. *coeruleum* (21mm)

En remarquant aussi que la souche *phomas* sp. présente une zone d'inhibition très légère contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (11mm).

Selon **Wicklow et al., (2005)** les métabolites extracellulaires des champignons endophytes étaient plus efficaces que les métabolites intercellulaires ; ce qui indique que les composés antifongiques ont produit par les champignons endophytes sont sécrétés à l'extérieur.

Hosseyni Moghaddam *et al.*, (2013) ont trouvé que les métabolites intracellulaires les plus efficaces du genre *Penicillium* exercent leur bioactivité à des concentrations inférieures à celles des métabolites extracellulaires, et cela confirme nos résultats.

Premjanu *et al.*, (2016) ont démontré que l'espèce *Colletotrichum gloeosporioides* a enregistré une zone d'inhibition significative (21.13 mm) contre *Candida albicans*. Par contre on a trouvé que l'espèce *Colletotrichum* sp. qu'on a utilisé n'a exercé aucune activité contre cette levure, et cela confirme que les métabolites secondaires produits par l'endophyte sont spécifiques au niveau de l'espèce.

Selon Awad, (2005) les producteurs les plus importants des métabolites secondaires intracellulaires, étaient *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus wentii* et cela confirme l'activité d'*Aspergillus* sp. contre les bactéries qu'on a testées.

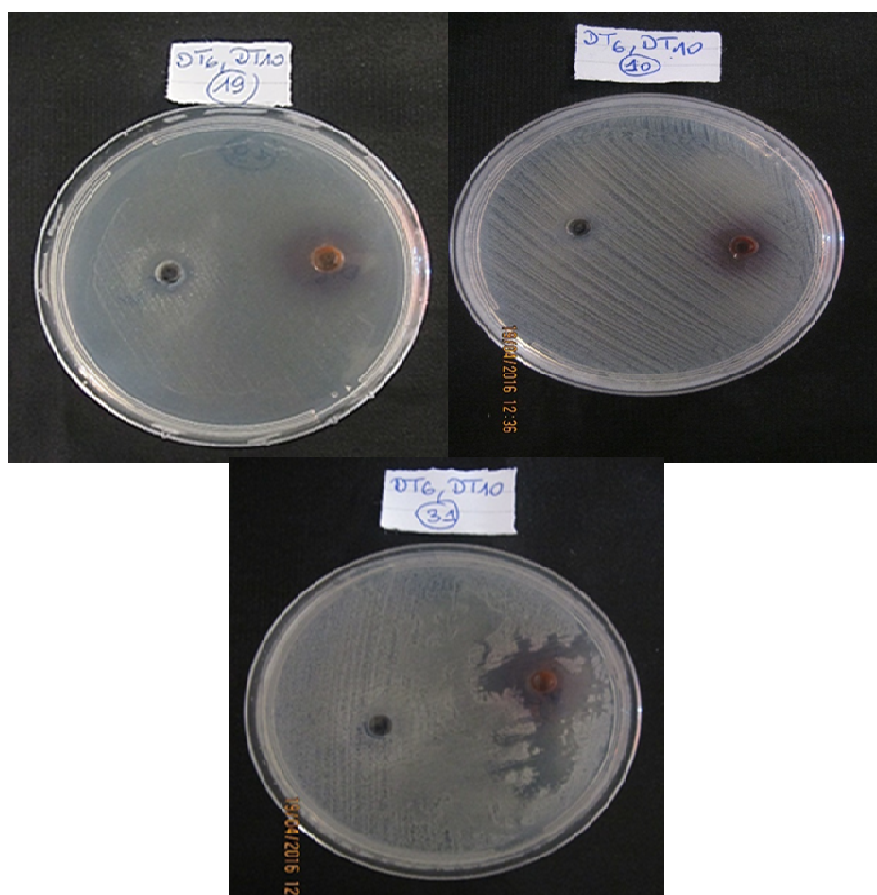


Figure 12 : Les zones d'inhibition pour les métabolites secondaires intracellulaires

La découverte des champignons endophytes dans les tissus végétaux a ouvert de nouvelles possibilités dans la recherche de composés bioactifs. Les champignons endophytes représentent une source immense des substances bioactives avec la réponse immunostimulante rendre des suppléments naturels très puissants dans le traitement des maladies. Les activités des différentes espèces de mycoendophytes méritent des recherches profondes afin d'établir des composés bioactifs très efficaces.

Les mycoendophytes ont la capacité de produire de nombreuses molécules bioactives dont certaines possèdent des propriétés thérapeutiques utilisables contre de très nombreuses maladies.

Dans l'ensemble de notre étude, après une étape de fermentation qui a duré 21 jours nous avons extrait les métabolites secondaires extra et intracellulaires de neuf souches de mycoendophytes qui ont été isolées auparavant par notre promoteur à partir de la plante médicinale *Santolina rosmarinifolia* L. (djaàda) pendant le printemps de 2015 dans la région de Bordj Bou Arreridj. Vingt-sept extraits ont été utilisés pour évaluer les activités biologiques de ces champignons endophytes (activité enzymatique, activité antibactérienne, et activité antifongique).

Les résultats obtenus ont démontré la capacité de ces champignons endophytes pour produire diverses enzymes extracellulaires où 66.66 % d'entre eux ont une activité amylolytique, 100% une activité lipolytique, 44.44 % une activité estérasique, 77.77% une activité proteasique (lait écrémé), 100% activité de la gélatinase, et 33.33% activité de la laccase.

D'autre part, les tests de l'activité antimicrobienne ont démontré la capacité de tous les métabolites secondaires extracellulaires de ces champignons endophytes à inhiber au minimum un ou plusieurs microorganismes pathogènes où les résultats ont varié selon les types de bactéries et les solvants utilisés.

Les bactéries à Gram positif étaient plus sensibles que celles à Gram négatif et cela revient à la différence de la composition au niveau de la paroi cellulaire de ces deux types de bactéries. Parmi les trois solvants utilisés, l'acétate d'éthyle était le solvant le plus efficace à cause de sa polarité.

En comparaison avec les plantes, les champignons endophytes présentent un faible degré de différenciation cellulaire, mais encore ils expriment un métabolisme complexe conduisant à la production d'un large éventail de métabolites secondaires.

Cette étude est une simple initiation, il est recommandé dans le futur de réaliser des études plus approfondies qui visent principalement à :

- Donner une importance à la bioprospection des mycoendophytes pour leurs vertus agrochimiques (mycopesticides, biofertilisants) et pharmaceutiques (antibiotiques, anticancéreux, immunosuppresseurs...). Les champignons endophytes représentent un capital biologique très important.
- Evaluer l'activité antimicrobienne des métabolites secondaires produits par les champignons endophytes sur des bactéries phytopathogènes.
- Identifier moléculairement les champignons endophytes.
- Faire des études biochimiques sur les métabolites secondaires produits par les champignons endophytes comprenant l'identification par les techniques chromatographiques.
- Comparer entre les métabolites secondaires produits par les champignons endophytes et ceux de la plante.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

A

- ✚ **Abdalla. M. A, Matasyoh. J. C. (2014).** Endophytes as Producers of Peptides : An Overview About the Recently Discovered Peptides from Endophytic Microbes. *Nat. Prod. Bioprospect.* 4 :257–270, DOI 10.1007/s13659-014-0038-y.
- ✚ **Abdel-Motaal F. F, Mortada S.M. Nassar, Soad A. El-Zayat, Magdi A. El-Sayed and Shin-Ichi Ito. (2010).** Antifungal activity of endophytic fungi isolated from Egyptian Henban (*Hyoscyamus muticus* L.), *Pak. J. Bot.*, 42(4) : 2883-2894.
- ✚ **Abdel-Raheem A. et Shearer.C.A. 2002.** Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity* 11 : 1-19.
- ✚ **Akanksha Bhardwaj, Pavan Agrawal. (2014)** A review Fungal endophytes : As a store house of bioactive compound. Vol 3, Issue 9, page 233.
- ✚ **Akello J, Dubois T, Gold CS, Coyne D, Nakavuma J, Paparu P. (2007)** – *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology* 96, 34–42.
- ✚ **Alan. L et Miller N.D. (1996).** antioxydant flavonoïdes, fonction and clinical usage. *Alternative Medecine, Review.* 1(2) : 4-10.
- ✚ **Alexopolous C. J., Mims C. W., et Blackwell M., 1996.** *Introductory Mycology.* 4th edition. John Wiley & Sons Inc. New York. pp: 306-307.
- ✚ **Al Mahi, I., Al-tahir, I., et Idris, E., (2013).** Antibacterial activity of endophytic fungi extracts from the medicinal plant *Kigelia africana*. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.*, 5(1) : 1-9
- ✚ **Alva P., McKenzie E. H. C., Pointing S. B., Pena-Muralla R. and Hyde K. D. (2002).** Do sea grasses harbour endophytes ? *Fungal Diversity Research Series ; 7* : 167-178.
- ✚ **Amirita, A., Sindhu, P., Swetha, J., Vasanthi, N.S et Kannan, K.P., 2012.** Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. *World Journal of Science and Technology* 2012, 2(2) :13-19 ISSN : 2231 – 2587.
- ✚ **Amr Hamza Fouda., Saad El-Din Hassan., Ahmed Mohamed Eid et Emad El-Din Ewais., 2015** Applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.) *Annals of Agricultural Science* 60(1), 95–
- ✚ **Ananda K. Pavithra N. Sathish L. (2012).** Antimicrobial and Enzyme Activity of Endophytic Fungi Isolated from Tulsi. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences JPBMS*, 16 (12). ISSN NO- 2230 – 7885. CODEN JPBSCT. India
- ✚ **Arnold A. E., Mejía L. C., Kylo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N., et Herre E. A., 2000.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Journal.* V (100), pp: 15649-15654.
- ✚ **Arnold A. E., Maynard Z. et Gilbert G. S. (2001).** Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees : patterns of abundance and diversity. *Mycological research* 108 (12) : 1502-1507.
- ✚ **Arnold A. E. et Herre E. A. (2003).** Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes : ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95 (3) : 388-398.
- ✚ **Assírio et Alvim 2010.** Flores da Arrábida - guia de campo ; - José Gomes Pedro - Isabel Silva Santos.

Références bibliographiques

- ✚ **Awad. G, 2005**, Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'Azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A, thèse de doctorat Toulouse.

B

- ✚ **Bailey M.J., Lilley A. K, Timms-Wilson T.M, P.T.N. (2006)**. Spencer-Phillips. Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces, ISBN-10 : 184593 0614 ISBN-13 : 978 1 84593 061 5. © CAB International. Page 46.
- ✚ **Barrow JR, Osuna P. (2002)** – Phosphorous solubilization and uptake by dark septate fungi in four wing saltbush, *Artiplex canescens* (Prush) Nutt. *Arid environ journal* 51, 449–451.
- ✚ **Barik B. P., Tayung K., Jagadev P. N. et Dutta S. K. 2010**. Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *European Journal of Biological Sciences* ; 2 : 8-16.
- ✚ **Becker, J., Liermann, J. C., Opatz, T., Anke, H. and Thines, E. (2012)**. GKK1032A, a secondary metabolite from *Penicillium* sp. IBWF-029-96, inhibits conidial germination in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Antibiotics*, 65 : 99-102.
- ✚ **Benghalensis. G., Sekar. R., Kuru Suresh.s., Balamurugan. 2013** photochemical screening enzyme and antibacterial activity analysis of endophytic fungi *Botrytis* sp. *Pharmaceutical research and bio paper* Volume 2(4) : 264.
- ✚ **Bessaci Oussama. (2006)**. La Mycoflore Endophyte du Cèdre de l'Atlas. (*Cedrus atlantica* Man.) dans le Massif de Bélezma (Aurès) : Etude Initiale. Mémoire de Magister Université El-Hadj Lakhdar – Batna, Algérie.
- ✚ **Bérdy J., 2005**. Bioactive microbial metabolites : a personal view. *Journal of Antibiotics*. V (58), pp: 1–26.
- ✚ **Bettucci L., Simeto S., Alonso R. and Lupo S. (2004)**. Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. *Sydowia* ; 56 : 8-23.
- ✚ **Bezerra J. D. P, Santos M. G. S, Svedese V. M. et al.,** “Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, no. 5, pp. 1989–1995, 2012.
- ✚ **Bikash Baral, Prabina Rana et Bijaya Laxmi Maharjan. (2011)**. Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting *Rhododendron anthopogon* D. Don, Nepal Academy of Science and Technology (NAST) Khumaltar, Lalitpur, *ECOPRINT* 18 : 39-44, ISSN 1024-8668 Ecological Society (ECOS).
- ✚ **Bischoff K. M, Wicklow D. T. Jordan D. B et al., (2009)**. “Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *Acremonium zeae*,” *Current Microbiology*, vol. 58, no. 5, pp. 499–503.
- ✚ **Bolwerk A, Lagopodi AL, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. (2005)** – Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 710–721.
- ✚ **Bouterfas. K, Mehdadi. Z., Latreche. A, Aouad. L. (2014)**. Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. En provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie* 12 :6-14 © Springer-Verlag France 2014. DOI 10.1007/s10298-014-0830-6.

Références bibliographiques

- ✚ **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 3e Ed : Lavoisier ; Paris. P.1120
- ✚ **Buck, G.W., West, C.P. and Elbersen, H.W. (1997).** Endophyte effect on drought tolerance in diverse Festuca species. In : Bacon, C.W. and Hill, N.S. (eds) Neotyphodium/Grass Interactions. Plenum Press, New York, pp. 141–143.
- ✚ **Bungihan ME, Tan MA, Kitajima M, Kogure N, Franzblau SG, Cruz TEE, Takayama H, Nonato MG. (2011).** Bioactive metabolites of Diaporthe sp. P133, an endophytic fungus isolated from Pandanus amaryllifolius. J Nat Med 65 : 606–609.

C

- ✚ **Carrim A. J. I., Edweis Cândida Barbosa, and José Daniel GonçalvesVieira. (2006).** Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of Jacaranda decurrens Cham. (Carobinha-do-campo) Vol.49, n. 3 : pp. 353-359. ISSN 1516-8913. Brazilian archives of biology and technology.
- ✚ **Carroll G. C. (1986).** The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In Fokkema N. J. et Van den Heuvel J (Eds.). Microbiology of the phyllosphere. Cambridge University Press. pp 205-222.
- ✚ **Casas. C, Omacini. M, Montecchia. M. S, and O. S. Correa. (2011).** “Soil microbial community responses to the fungal endophyte Neotyphodium in Italian ryegrass,” Plant and Soil, vol. 340, no.1, pp. 347–355.
- ✚ **Celton. M. (2011).** Etude de la réponse de Saccharomyces cerevisiae à une perturbation NADPH par une approche de biologie des systèmes, thèse de doctorat. Montpellier.
- ✚ **Choi, Y.W., Hodgkiss, I.J et Hyde, K.D., (2005).** Enzyme production by endophytes of Brucea javanica. J. Agric. Technol. 1, 55–66.
- ✚ **Clay K. (1986).** Grass endophytes. In : Fokkema N. J. and Van Den Heuvel J.(eds). Microbiology of the phyllosphere, Cambridge, UK : Cambridge University Press ; pp. 188-204.
- ✚ **Clay, K, Cheplick, G.P., Marks, S. (1989).** Impact of fungus Balansia henningsiana on Panicum agrostoides : frequency of infection, plant growth and reproduction, and resistance to pests. Oecologia 80 : 374–380
- ✚ **Clay K. (1990).** “Fungal endophytes of grasses,” Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, vol. 21, pp. 275–295.
- ✚ **Cohen SD. (2006)** - Host selectivity and genetic variation of Discula umbrinella isolates from two oak species : analyses of intergenic spacer region sequences of ribosomal DNA. Microbial Ecology 52, pp. 463–469.
- ✚ **Costa, J.L., Paulsrud, P., Rikkinen, J. et Lindblad, P. (2001).** Genetic diversity Nostoc symbionts endophytically associated with two bryophyte species, Applied Environmental Microbiology 67 :4393-4396.
- ✚ **Cuomo V, Palomba I, Perretti A, Guerriero A, Ambrosio MD, Pietra F. (1995).** Antimicrobial activities from marine fungi. J. Mar. Biotechnol. 2 :199-204.

D

- ✚ **De Marco E., Maria S., Antonello P. and Raffaele S. (2007).** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. Food Chem., 104 : 858–867.

Références bibliographiques

- ✚ **Deshmukh Sunil K., Verekar Shilpa A. et Bhave Sarita V. (2014).** Endophytic fungi : a reservoir of antibacterials Department of Natural Products, Piramal Enterprises Limited, Mumbai, India review article published : 08 January 2015 doi : 10.3389/fmicb.2014.00715 *frontiers in microbiology*
- ✚ **Diedhiou, P.M., Hallmann, J., Oerke, E.C. and Dehne, H.W. (2003).** Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation on tomato. *Mycorrhiza* 13, 199–204.
- ✚ **Ding, L, Qin, S, Li, F, Chi, X, Laatsch, H. (2008).** Isolation, Antimicrobial Activity, and Metabolites of Fungus *Cladosporium* sp. Associated with Red Alga *Porphyra yezoensis*. *Curr Microbiol* 56 :229–235. DOI 10.1007/s00284-007-9063-y.
- ✚ **Ding, G., Li, Y., Fu, S., Liu, S., Wei, J., and Che, Y. (2009).** Ambuic acid and torreyanic acid derivatives from the endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp. *J. Nat. Prod.* 72, 182–186. doi : 10.1021/np800733y.
- ✚ **Dreyfuss, M.M. and Chapela, I.H. (1994).** Potential of fungi in the discovery of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. In : *The discovery of Natural Products with therapeutic Potential* (ed Gullo, V.P.). Butterworth-Heinemann, Boston : 49-80.

E

- ✚ **Ela M.A., El-Shaer N.S. et Ghanem N.B. (1996)** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie* ; 51 pp.993-995.
- ✚ **Elbersen, H.W. and West, C.P. (1996).** Growth and water relations of field-grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Science* 51, 333–342.
- ✚ **El Mannoubi S. Barrek, T. Skanji H. Zarrouk. (2008).** Etude de la composition de la fraction volatile des graines du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*), *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 2008, 10, 61-67.

F

- ✚ **Faeth S. H. (2002).** Are endophytic fungi defensive plant mutualists ? *OIKOS* 98 : 25-36.
- ✚ **Feknous, S, Saidi, F, Mohamed Said, R. (2014).** Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.), *Nature & Technology*.
- ✚ **Feng Y, Ren F, Niu S, Wang L, Li L, et al. (2014).** Guanacastane diterpenoids from the plant endophytic fungus *Cercospora* sp. *J Nat Prod* 77 : 873-881.
- ✚ **Fernandes M. R. V., Costa e Silva T. A., Pfenning L. H., Da Costa-Neto C. M., Heinrich T. A., De Alencar S. M., De Lima M. A. and Kegaki M. (2009).** Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* ; 45 : 678-685.
- ✚ **Fki, I., Allouche, N. and Sayadi, S. (2005).** The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils : a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chem.*, 93 : 197-204.

Références bibliographiques

- ✚ **Fouda A. H, Hassan S, Eid A M, Ewais E. (2015).** Biotechnological application of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals of Agricultural Science* (2015) 60(1), 95–104.
- ✚ **Frisvald, J. C. and Samson, R. A. (2004).** Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49 : 1-174.
- ✚ **Fröhlich J., Hyde K. D. and Petrini O. (2000).** Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* ; 104 : 1202-1212.

G

- ✚ **Gee J.M., et Johnson I.T. (2001).** Polyphenolic compounds : interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 8 : 1-182.
- ✚ **Gianinazzi PV, Dumas-Gaudot E, Golotte A, Tahiri-Alaoui A, Gianinazzi S. (1996)** –Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 133, 45–47.
- ✚ **Ghimire, S.R., Charlton, N.D., Bell, J.D., Krishnamurthy, Y.L., et Craven, K.D. (2011).** Biodiversity of (*Panicum virgatum* L.) fungal endophyte communities inhabiting switch grass growing in the native tall grass prairie of northern Oklahoma. *Fungal Diversity* 47 :19–27.
- ✚ **Gunatilaka, A. A. L. (2006).** Natural products from plant-associated microorganisms : distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* 69, 509–526. doi : 10.1021/np058128n.

H

- ✚ **Hallmann, J., Quad-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Klopper, J.W. (1995).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology* 43 :895-914.
- ✚ **Hamilton, C.E., Gundel, P.E., Helander, M., et Saikkonen, K. (2012).** Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants : a review. *Fungal Diversity* 54 : 1–10.
- ✚ **Hawksworth D.L., Kirk P. M., Sutton B., Pegler D.N. (1995).** *Dictionnaire of the fungi*, 8th ed. CAB. International Walling Ford. United Kingdom.
- ✚ **Hosseyini Moghaddam M. S, Jalal Soltani, Freydoun Babalhvaeji, Javad Hamzei, Sonbol Nazeri et Soheila Mirzaei. (2013).** Bioactivities of endophytic *Penicillia* from Cupressaceae, *J. Crop Prot.*, 2 (4) : 421-433
- ✚ **Huang W. Y., Cai Y. Z., Hyde K. D., Corke H. and Sun M. (2008).** Biodiversity of endophytic fungi with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* ; 33 : 61-75.
- ✚ **Huang WY., Cai YZ., Hyde KD., Corke H., et Sun M. (2008)** – Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33, pp.61–75.
- ✚ **Huang JX, Zhang J, Zhang XR, Zhang K, Zhang X, et al. (2014).** *Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol. *Pharm Biol* 52 : 1237-1243.

Références bibliographiques

I

- ✚ **İnci. M, Atalay. A M, Koç A.N., Yula. E, Evirgen. Ö., Durmaz.S, Demir. G. (2012).** Investigating virulence factors of clinical *Candida* isolates in relation to atmospheric conditions and genotype, *Turk J Med Sci* ; 42 ((Sup.2) : 1476-1483 © TÜBİTAK.
- ✚ **Isaka M, Berkaew P, Intereya K, Komwijit S, Sathitkunanon T (2007)** Antiplasmodial and antiviral cyclohexadepsipeptides from the endophytic fungus *Pullularia* sp. BCC 8613. *Tetrahedron* 63(29) :6855–6860.
- ✚ **Ishida. K., Alviano.D.S., Silva. B.G., Guerra. C.R., Costa A.S., Nucci, M., Alviano. C.S and. Rozental S. (2012).** Negative correlation between phospholipase and esterase activity produced by *Fusarium* isolates *Braz J Med Biol Res*, 45(5) 411-416

J

- ✚ **Jalgaonwala R.E et Mahajan R.T (2011)** Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from some indigenous medicinal plants *Journal of Agricultural Technology* Vol. 7(6) : 1733-1741. India.
- ✚ **Jones.G., Allister. I et Cheng.K. 1994.** Effect of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) Condensed Tannins on Growth And Proteolysis by four Satains of Rumminal Bacteriat. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (4) : 1374-1378.
- ✚ **Judith Webb. K, Nicolas Rispaill, Robert Nash. (2005).** Chapter 7.4 SECONDARY METABOLITE PROFILING, A.J. Márquez (Editorial Director). *Lotus japonicus Handbook*. pp. 341-348. UK
- ✚ **Julia K. (2009)** - New Natural Products from Endophytic Fungi from Mangrove Plants – Structure Elucidation and Biological Screening, 173 p.
- ✚ **Jurc D., JureM., Sieber T.N and Bojovic S. (2000).** Endophytic *Cenangium ferruginosum* (Ascomycota) as a reservoir for an epidemic of *Cenangium Dieback* in Austrian pine. *Phyton (Austria)* 40 (4) : 103-108.

K

- ✚ **Kageyama, SA, Mandyam, KG, Jumpponen A. (2008)** – Diversity, Function and Potential Applications of the RootAssociated Endophytes, in : *Mycorrhiza – State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics* (Varma A.3rd edition).
- ✚ **Katoch M, Salgotra A et Singh G. (2014).** Endophytic Fungi Found in Association with *Bacopa monnieri* As Potential Producers of Industrial Enzymes and Antimicrobial Bioactive Compounds. *Brazilian archives of biology and technology*
- ✚ **Khan, A.L., Hamayun, M., Radhakrishnan, R., et al., (2012).** Mutualistic association of *Paecilomyces formosus* LHL10 offers thermotolerance to *Cucumis sativus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(2) :267-279. [Doi :10.1007/s10482-011-9630-x] a
- ✚ **Khan Abdul Latif, Muhammad Hamayun, Sang-Mo Kang, Yoon-Ha Kim, Hee-Young Jung, Joong-Hwan Lee and In-Jung Lee. (2012).** Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress : an example of *Paecilomyces formosus* LHL10 b.

Références bibliographiques

- ✚ **Koide RT, Schreiner RP. (1992)** – Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43,557–581.

L

- ✚ **Lee, J. C., Strobel, G. A., Lobkovsky, E., and Clardy, J. C. (1995).** Subglutin A and B : Immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. Journal of Organic Chemistry. 60 : 7076-7077,
- ✚ **Li W. C., Zhou J., Guo S. Y. and Guo L. D. (2007).** Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. Fungal Diversity ; 25 : 69-80.
- ✚ **Li, J. Y, and Strobel, G. A. (2001).** Jestrone and hydroxyl-jestrone antioomycetes cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. Phytochemistry. 57 : 261-265.
- ✚ **Lina Bettucci, Susana Tiscornia. (2013).** International journal of sciences, vol.2-Nov.2013 (11).
- ✚ **Li, Y., Song, Y. C., Liu, J. Y., Ma, Y. M., and Tan, R. X. (2005).** Anti-*Helicobacter pylori* substances from fungal cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 21,553–558. Doi : 10.1007/s11274-004-3273-2.
- ✚ **Lockwood JL. (1992)** – Exploitation competition. In : The fungal community– its organization and role in the ecosystem (Carroll GC, Wicklow DT, eds.) : 243–263 Dekker, New York.

M

- ✚ **McInory, J.A. and Kloepper, J.W. (1995).** Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn., Plant and soil 173 :337-342.
- ✚ **Malinowski D. P., Alloush G. A., and Belesky D. P., (1998).** “Evidence for chemical changes on the root surface of fall fescue in response to infection with the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum*,” Plant and Soil, vol. 205, no. 1, pp. 1–12,
- ✚ **Malinowski, D.P. and Belesky, D.P. (2000).** Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses : mechanisms of drought and mineral stress tolerance. Crop Science 40, 923–940.
- ✚ **Mandyam K, Jumpponen A. (2005)** – Seeking the elusive functions of the rootcolonizing dark septate endophytic fungi. Studies in Mycology 53 :173-189.
- ✚ **Maria, G.L., Sridhar, K.R. and Raviraja, N.S. (2005).** Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. Journal of Agricultural Technology
- ✚ **Mariana Recco Pimentel, Gustavo Molina, Ana Paula Dionisio, Mário Roberto Maróstica Junior, and Gláucia Maria Pastore,** The use of Endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process, SAGE - Hindawi Access to Research Biotechnology Research Internatioal Volume 2011, Article I D 576286, 11 pages doi :10.4061/2011/576286.
- ✚ **McInory, J.A. and Kloepper, J.W. (1995).** Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn., Plant and soil 173 :337-342.
- ✚ **Meenu Katoch., Aseem Salgotra and Gurpreet Singh. (2014).** Endophytic Fungi Found in Association with *Bacopa monnieri* As Potential Producers of Industrial Enzymes and Antimicrobial Bioactive Compounds September-October Journal Road ; Jammu – India Vol.57, n.5: pp. 714-722,
- ✚ **Melek I, Mustafa A., Ayşe N., Erkan Y., Omer E., Suleyman D., Gonca D. (2012)** ; Investigating virulence factors of clinical *Candida* isolates in relation to atmospheric conditions and genotype 1476-1483.

Références bibliographiques

- ✚ **Mishra, Y, Abhijeet Singh, Amla Batra and Madan Mohan Sharma. (2014).** Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi : A Review, page5
- ✚ **Mohanta J., Tayung K. and Mohapatra U. (2008).** Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology* ; 5(2).
- ✚ **Molina, G, Mariana R. Pimentel, Thayse C. P. Bertucci, Glaucia M. Pastore. (2012).** Application of fungal endophytes in biotechnological processes. *Chemical engineering transactions* vol. 27, 2012 Guest Editors : Enrico Bardone, Alberto Brucato, Tajalli Keshavarz Copyright ©, AIDIC Servizi S.r.l., I S B N 978-88-95608-18-1 ; ISSN 1974-9791.
- ✚ **Mutai C., Christine Bii, Constantinos Vagias, Dennis Abatis, Vassilios Roussis. (2009).** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology* 143–148.

N

- ✚ **Nair D. N. et Padmavathy. S. ; (2014).** Review Article Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans, p05.
- ✚ **Nalawadea, P., Mukherjee, P., Sudhir, K. (2014).** Biosynthesis, characterization and antibacterial studies of silver nanoparticles using pods extract of *Acacia auriculiformis*. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 129 : 121–124.
- ✚ **Nacz M and Shahidi F. (2004b).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of naturally occurring in vegetable wastes. Curr. Top. Phytochem., Res. Trends*, 1 : 145-156.
- ✚ **Nicoletti, R., De Stefano, M., De Stefano, S., Trincone, A. and Marziano F. (2004).** Antagonism against *Rhizoctonia solani* and fungitoxic metabolite production by some *Penicillium* isolates. *Mycopathologia*, 158 : 465-74.
- ✚ **Nicoletti, R., Lopez-Gresa, M. P., Manzo, E., Carella, A. and Ciavatta, M. L. (2007).** Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia*, 163 : 295-301.

O

- ✚ **Oses R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E. and Rodriguez J. (2008).** Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity* ; 33 : 77-86.

P

- ✚ **Perrett S., Whitfield P.J., Sanderson L., Bartelert A. (1995).** The plant molluscide *Milletia rhortningii* (leguminosae) as a topical antischistosomal agent. *Journal of Ethnopharmacology*. 47 : 49-54.
- ✚ **Petrini O. (1991).** Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews J. et Hirano S. (eds.) *Microbial Ecology of Leaves*. Springer Verlag. pp 179-197.
- ✚ **Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. et Hyde, K.D., (2001)** - Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* 105 : pp. 1508-1513.

Références bibliographiques

- ✚ **Pinto RCLS, Azevedo JL, Pereira JO, Carneiro Vieira ML, Labate CA. (2000)** – Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. *New Phytologist* 147, 609–615.
- ✚ **Pirttilä A. M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R. et Hohtola A. (2000).** Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7): 3073-3077.
- ✚ **Pirttilä A.M. (2001).** Endophytes in the buds of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Thèse Doctorat en Sciences. Department of Biology and Biochemistry, University of Oulu (Finlande) 52 pp.
- ✚ **Poorani Kandasamy, Senthamarai Manogaran, Madhankumar Dhakshinamoorthy and Kilavan Packiam Kannan. (2015).** Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from *Bauhinia racemosa* Lam and *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(9) :366-379, ISSN : 0975-7384 CODEN(USA) : JCPRC5.
- ✚ **Posada F. et Vega F. E. (2006).** “Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota : Hypocreales),” *Mycoscience*, vol. 47, no. 5, pp. 284–289,
- ✚ **Powthong P, Jantrapanukorn B, Thongmee A. and Suntornthiticharoen P. (2013)** Screening of Antimicrobial Activities of the Endophytic Fungi Isolated from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Agr. Sci. Tech.* Vol. 15 : 1513-1522 1513
- ✚ **Prathyusha P., Rajitha Sri A. B. and Satya Prasad K. (2015).** Diversity and enzymatic activity of foliar endophytic fungi isolated from medicinal plants of Indian dry deciduous forest. *Mycology and Plant Pathology Laboratory, Department of Botany, Osmania University, Hyderabad, A. P., India Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre*, 2015, 7 (8) :244-251.p 244.
- ✚ **Premjanu.N, Jaynthy C, Diviya S. (2016).** Antifungal activity of endophytic fungi isolated from *lannea coromandelica*-an insilico approach, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ISSN- 0975-1491 Vol 8, Issue 5.
- ✚ **Promptuttha I, Jeewon R, Lumyong S, McKenzie EHC, Hyde KD. (2005).** *Microbial Ecology*, 53, 579-590.

R

- ✚ **Rai MK, Varma A, Pandey AK. (2002)** –Antifungal potential of *Spilanthes calva* after inoculation of *Piriformospora indica*. *Mycoses* 47, 479–481.
- ✚ **Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM. (2002)** –Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. *Science* 298,1581.
- ✚ **Rezwana Khan. (2007).** Isolation, Identification and Cultivation of Endophytic Fungi from Medicinal Plants for the Production and Characterization of Bioactive Fungal Metabolites. A thesis submitted to the University of Karachi for the degree of Doctor Of Philosophy. Pakistan.
- ✚ **Riffel A, Medina L-F, Stefani V, Santos R-C, Bizani, Brandelle (2002).** In vitro antibacterial Activity of a new series of 1, 4- naphthaquinones. *Brazilian journal of medical and biological research*. 35(7). 811-818
- ✚ **Robin Sharma B.S. et Vijaya Kumar., 2013** Isolation characterization and antioxidant potential of endophytic fungi of *Ocimum sanctum* Linn. (Lamiaceae) Isolation characterization and antioxidant

Références bibliographiques

- potential of endophytic fungi of *Ocimum sanctum* Linn. (Lamiaceae) Volume : 3 Issue :7 ISSN - 2249-555X
- ✚ **Rodriguez, R.J., Redman, R.S. and Henson, J.M. (2004).** The role of fungal symbiosis in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 9,261–272.
- ✚ **Rojas A., Hernandez L., Perrada-Mirrada R., Matg R., (1992).** Screening for antibacterial activity of crude drug extract and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 35 : 275-283.
- ✚ **Rommert AK, Oros-Sichler M, Aust H-J, Lange T, Schulz B. (2002).** Growth promoting effects of endophytic colonization of the roots of larch (*Larix decidua*) with *Cryptosporiopsis* sp. And *Phialophora* sp. 7th International Mycological Congress, Oslo, Norway, p 309. In Schulz B, Boyle C (2005) *The endophytic continuum*. *Mycological Research* 109 :661–686.
- ✚ **Rukachaisirikul V, Sommart U, Phongpaichit S, Sakayaroj J, Kirtikara K. (2008).** Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry* 69 :783–787
- ✚ **Russell J. R., Huang J, Anand.P et al., (2011).** “Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 17, pp. 6076–6084.
- S**
- ✚ **Saar D. E., Polans N. O., Sorensen P. D. and Duvall M. R. (2001).** Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi : Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter* ; 19 : 249-260.
- ✚ **Sachin N., Manjunatha B.L., KumaraP.M., Ravikanth G., Shweta S., Suryanarayanan T.S., Ganeshiah K.N., Uma Shaanker R. (2013).** Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary metabolites ? *Current Science*.Vol (104) n°2 : 178-182.
- ✚ **Saikkonen K., Wali P., Helander M. et Faeth S. H. (2004a).** Evolution of endophyte-plant symbiosis. *Trends in Plant Science* 19 (6) : 275-280.
- ✚ **Saikkonen K., Wali P., Helander M. and Faeth S. H. (2004b)** Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* ; 9 : 275-280.
- ✚ **Saikkonen K., Helander M. and Faeth S. H. (2004c).** Fungal endophytes : hich- hikers of the green world. In : Gillings M. and Holmes A. J.(eds). *Plant microbiology*. Garland Science ; pp. 81 -101.
- ✚ **Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M. and Sullivan T. J. (1998).** Fungal endophytes : A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* ; 29 : 319-343.
- ✚ **Saikkonen K., Wali P. R. and Helander M. (2010).** Genetic compatibility determines endophytegrass combinations. *PLoS One* ; 5(6) : e11395. doi : 10.1371/journal.pone.0011395.
- ✚ **Sardul Singh Sandhu, Sujit Kumar, Ravindra Prasad Aharwal, Suneel Kumar. (2014).** Isolation and detection of anti-bacterial activity of endophytic fungi from *Bombex cebia* and *Argemone mexicana*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(11) :95-100. ISSN : 0975-7384. CODEN(USA) : JCPRC5.
- ✚ **Sardul Singh Sandhu, Suneel Kumar and Ravindra Prasad Aharwal. (2014).** Isolation and identification of endophytic fungi from *Ricinus communis*linn. And their antibacterial activity. *IJRPC*, 4(3), 611-618 ISSN : 2231-2781. *International journal of research in pharmacy and chemistry*. India.

Références bibliographiques

- ✚ **Sanjana Kaul. Suruchi Gupta. Maroof Ahmed. Manoj K. Dhar. (2012).** Endophytic fungi from medicinal plants : a treasure hunt for bioactive metabolites, page 13,
- ✚ **Scalbert, A., 1992.** Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: Hemingway, R.W., Laks, P.E. (Eds.), *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*. Plenum Press, New York.
- ✚ **Schardl CL. (2001)** – *Epichloe festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal Genetics and Biology* 33, 69–82.
- ✚ **Schardl C. L., Leuchtman A. and Spiering M. J. (2004).** Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* ; 55 : 315-340.
- ✚ **Schmeda-Hirschmann, G., Hormazabal, E., Rodriguez, J. A., and Theoduloz, C. (2008).** Cycloaspeptide A and Pseurotin A from the Endophytic Fungus *Penicillium janczewskii*. *Z. Naturforsch.* 63C, 383–388.
- ✚ **Schwarz, M., Kopcke, B., Weber, R.W.S., Sterner, O. and Anke, H. (2004)** 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. *Phytochemistry* 65, 2239–2245.
- ✚ **Schulz B., Boyle C. (2006).** What are Endophytes ? Technical University of Braunschweig, Spilmannstr, Germany. 01 pp.
- ✚ **Selim K., El-Beih A., AbdEl-Rahman et El-Diwany, (2012)** - Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental and Applied Mycology* 2(1), pp. 31–82.
- ✚ **Selosse M. A. and Schardl C. L. (2007).** Fungal endophytes of grasses : hybrids rescued by vertical transmission ? An evolutionary perspective. *New Phytologist* ; 173 : 452-458.
- ✚ **Sharma. R, Vijaya Kumar. B.S. (2013).** Isolation characterization and antioxidant potential of endophytic fungi of *Ocimum sanctum* Linn. (Lamiaceae). *ReseaRch PaPeR Botany Volume : 3 | Issue : 7 | July 2013 | ISSN - 2249-555X.india*.
- ✚ **Shipunov A., Newcombe G., Raghavendra A. K. H. and Anderson C. L. (2008).** Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. *American Journal of Botany* ; 95 : 1096-1108.
- ✚ **Sieber T. N., Helander M. L., Petrini O. et Neuvonen S. (1994).** Endophytic fungi in Scot's pine needles : spatial variation and consequences of simulated acid rain. *Canadian Journal of Botany* 72 :1108-1113.
- ✚ **Sierra, G.A. 1957.** Simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and observation of the influence of the contact between cells and fatty substrates., *Antonine Van Leeuwenhoeck* 28 : 15-22.
- ✚ **Silva, G., Teles, H., Trevisan, H., Bolzani, V., Young, M. C. M., Pfenning, L., Egerlin, M., Haddad, R., Costa-Ncto, C., and Araujo, A. (2005).** New bioactive metabolices produced by *Phomopsis cassias*, an endophytic fungus in *Cassia spectabllis*. *Journal of Brazilian Chemical Society.* 16 (6) : 1463-1466.
- ✚ **Stone J.k., Polishook J.D., White J.F. (2004).** Endophytic fungi. In Mueller G. M., Bills G. F. et Foster M. S. (eds.) *Biodiversity of Fungi : inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press. pp 241-269.
- ✚ **Stovall M.E., et Clay, K., 1988.** The effect of the fungus, *Balansia cyperi* on growth and reproduction of purple nutsedge, *Cyperus rotundus*. *New Phytol* 109 : 351–359.

Références bibliographiques

- ✚ **Strobel, G. A., Miller R. V., Miller, C., Condrón, M, Tcplow, D. B. H., and Hess, W. M. (1999).** Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology*. 145 : 1919-1926.
- ✚ **Strobel GA. (2002).** Microbial gifts from rain forests. *Can J Plant Pathol.* ;24 :14-20.
- ✚ **Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J. (2004).** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* ; 67 : 257-268.
- ✚ **Suffness M., (1995)** - *Taxol Science and Applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- ✚ **Sunitha VH, Nirmala Devi D, Srinivas D. (2013).** *World Journal of Agricultural Sciences*, 9 (1), 01-09.
- ✚ **Suryanarayanan T. S. and Kumaresan V. (2000).** Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. *Mycological Research* ; 104 : 1465-1467.

T

- ✚ **Tan, R.X., et Zou, W.X., (2001)** -Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18 : pp. 448-459.
- ✚ **Tan, T., Zhang, M., Xu, J., Zhang, J., (2004).** ,Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Proc'. Biochem*, 39 ;1495-1502.
- ✚ **Tang X.Y., Pan Y., Li S., He B.F., 2008,** Screening and Isolation of an Organic Solvent-tolerant Bacterium for High-yield Production of Organic Solvent-stable Protease, *Biores. Technol.*, 99, 7388-7392.
- ✚ **Tefera T. et Vidal S. (2009).** “Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*,” *BioControl*, vol.54, no. 5, pp. 663–669.
- ✚ **Tong. W. Y, Nurul Zaadah, Nurhaida. J, Tan. W. N, Melati. K, Latiffah. Z, and Darah. I. (2014).** Antimicrobial Activity of *Phomopsis* sp. ED2 Residing in Medicinal Plant *Orthosiphon stamineus* Benth. *Annual Research & Review in Biology*. 4(9) : 1490-1501, SCIENCEDOMAIN international.

V

- ✚ **Van Hecke M. M., Treonis A. M., et Kaufman J. R., (2005).** “How does the fungal endophyte *Neotyphodium coenophialum* affect tall fescue (*Festuca arundinacea*) rhizodeposition and soil microorganisms ?” *Plant and Soil*, vol. 275, no. 1-2, pp. 101–109,

W

- ✚ **Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P, Kogel KH. (2005)** – The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS USA Journal* 102, 13386–13391.
- ✚ **Wang, T., Zhang, Y., Wang, Y. and Pei, Y. H. (2007).** Anti-tumor effects of Rubratoxin B on cell toxicity, inhibition of cell proliferation, cytotoxic activity and matrix metalloproteinase-2, 9. *Toxicology In Vitro*, 21 : 646-50.
- ✚ **Waqas, M., Khan, A.L., Lee, I.J., (2014a).** Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. *J. Plant Inter.*, 9(1) :478-487. [doi :10.1080/17429145.2013.860562]

Références bibliographiques

- 🌱 **Waqas, M., Khan, A.L., Kang, S.M., et al., (2014b).** Phytohormone-producing fungal endophytes and hardwood-derived biochar interact to ameliorate heavy metal stress in soybeans. *Biol. Fert. Soils*, 50(7) :1155-1167. [doi :10.1007/s00374-014-0937-4]
- 🌱 **Wellensiek BP, Ramakrishnan R, Bashyal BP, Eason Y, Gunatilaka AA, et al. (2013)** Inhibition of HIV-1 Replication by Secondary Metabolites From Endophytic Fungi of Desert Plants. *Open Virol J* 7 : 72-80.
- 🌱 **Wicklow, D.T., S. Roth, S.T. Deyrup and J.B. Gloer. (2005).** A protective endophyte of maize : *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycol. Res.*, 109 : 610-618.
- 🌱 **Wilson R. (1997).** Endophytic fungi from four tree species in New Brunswick and a comparison of two methods of identification of *Leptostroma* isolates of *Pinus resinosa* : Morphology and molecular probing. Thèse Philosophia Doctor (PhD.). University of New Brunswick (Canada). 131 pp.
- Z**
- 🌱 **Zabalgozcoa I. (2008).** Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* ; 6 : 138-146.
- 🌱 **Zhou D. and Hyde K. D. (2001).** Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research* ; 105 : 1449-1457.
- 🌱 **Zhang G., Sun S., Zhu T, Lin Z., Gu J., Li D., et Gu Q., (2011)** – Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry* 72, pp. 1436–1442.
- 🌱 **Zhao J, Li C, Wang W, Zhao C, Luo M, et al. (2013).** *Hypocrea lixii*, novel endophytic fungi producing anticancer agent cajanol, isolated from pigeon pea (*Cajanus cajan* [L.] Millsp.). *J Appl Microbiol* 115 : 102-113.

Annexes

Annexe I

Matériel

1-Matériel lourd

Tout le matériel lourd utilisé durant cette étude est présenté dans le tableau suivant :

Matériel	Référence
Agitateur magnétique Plaque chauffante	AGIMATIC-E
Agitateur va et vient	Edmund Bühler
Agitateur vortex	Fisher Scientific FB 15024
Autoclave	SANOCLAV LaM-3-20-ECZ-J
Bec bunsen électrique	INTEGRA Biosciences®, model FIREBOY eco, becbenzène
Bain marie	memmert (Germany)
Balance analytique	KERN ALS 220-4N (Germany)
Balance de précision	KERN et SohnGmbH (Germany)
Centrifugeuse	SIGMA 2-6 E (Germany)
Distillateur	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Germany)
Etuve	memmert (Germany)
Four Pasteur	memmert (Germany)
Hotte chimique	EQUEIP LABO
Hotte microbiologique	STERIL-GEMINI (Italy)
Agitateur magnétique Plaque chauffante	AGIMATIC-E
Réfrigérateur / Congélateur	CONDOR®, Algérie
Sonicateur	

Annexe I

2-Matériel léger et accessoires

Les accessoires, matériels légers, produits chimiques et réactifs utilisés sont présentés dans le tableau suivant :

Accessoires	Verrerie	Solvants	Sels et tampons	Colorants et réactifs
micropipette anses de platine boîtes de Pétri distributeur pinces, pissette, portoirs, spatule rubans du parafilm ecouvillons embouts jaune et bleu ependorfs.	béchers entonnoirs éprouvette graduée erlenmeyers fiolle jaugée flacons pipettes graduées pipettes pasteur tubes à centrifuger tubes à essais	acétate d'éthyle acide Chlorhydrique méthanol dichlorométhane diméthylsulfoxyde hexane n naphtol	chlorure de mercure iode potassim diode	tween 20 et 80 lait écrémé amidon Bleu de lumièreLa gélatine

3- Quelques photos de matériel utilisé



Milieux de culture

➤ Milieux solides

✚ Glucose yeast extract peptone

Glucose.....	1 g
Extrait de levure.....	0.1g
Peptone.....	0.5g
Agar.....	16 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH 6

✚ Potato dextrose agar (PDA)

Pomme de terre épluchées et coupées.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH 5.6

✚ Malt extract agar (MEA)

Poudre d'extrait de malt.....	20g
Peptone.....	1g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

✚ Czapek yeast extract agar (CYA)

K ₂ HPO ₄	1g
Czapek concentré.....	10ml
Extrait de levure en poudre.....	5g
Sucrose.....	30g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

✚ Mueller Hinton

Hydrolysate acide de caséine.....	17,5g
Extrait de viande.....	03g
Amidon.....	1.5g
Agar.....	16g

Ph = 7,3

✚ Gélose Nutritive (GN)

Peptone.....	05g
Extrait de viande.....	03g
Agar.....	15g

pH = 7,0

Annexe II

Géluse molle

Agar.....	07g
L'eau distillée.....	1000ml

➤ Milieux liquides :

Potato dextrose broth (PDB)

Pomme de terre épluchées et coupées.....	200 g
Glucose.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH 5.6	

Malt extract (MEB)

Poudre d'extrait de malt.....	20g
Peptone.....	1g
Glucose.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

L'eau peptone :

Peptone.....	10,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Phosphate disodique anhydre3,5g Dihydrogénophosphate de potassium.....	1,5g
pH 7,2	

L'eau physiologique :

NaCl	9g
L'eau distillée.....	1000ml

تم عزل 9 أنواع من الفطريات الداخلية للنباتات انطلاقا من النبتة الطبية *Santolina rosmarinifolia* L. (الجعدة) والتي تم جمع عيناتها من طرف الأستاذ المؤطر في فصل الربيع لسنة 2015 من منطقة جبل المنصورة (ولاية برج بوعرييج، الجزائر). تعتمد هذه الدراسة على استخلاص المستقلبات الثانوية (داخل وخارج خلوية) لهذه الفطريات واختبار بعض نشاطاتها البيولوجية (النشاط المضاد للميكروبات والفطريات والنشاط الإنزيمي).

أظهرت نتائج اختبار قدرة هذه العزلات على إنتاج الإنزيمات خارج خلوية أن 66.66 % من بين هذه العزلات قد أنتجت إنزيم الأميلاز، و 100 % أنتجت إنزيم الليباز، في حين أن 44.44 % أنتجت إنزيم الإستيراز، و 77.77 % أنتجت إنزيم البروتياز، بينما 100 % أنتجت إنزيم الجيلاتيناز، و 33.33 % أنتجت إنزيم اللاكاز. بالنسبة للنشاطية المضادة للميكروبات لـ 27 مستخلاصا فطريا فقد تم اختبارها على 15 نوعا بكتيريا ممرضا، ونوعين من الخمائر، و 5 أنواع من الفطريات الممرضة للنبات وذلك باتباع طريقة الانتشار في الحفر بعد استخلاص مستقلباتها الثانوية باستعمال 3 أنواع مختلفة من المذيبات العضوية (إثيل الأستيات، ثنائي كلورو الميثان أو كلوريد الميثيلين، الهكسان)، وقد أظهرت النتائج أن تثبيط نمو الجراثيم المختبرة يختلف باختلاف النوع البكتيري، ومصدر المستخلص (داخل خلوي أو خارج خلوي) وكذا نوع المذيب العضوي المستعمل.

دلّت النتائج المحصّل عليها أن المستقلبات الثانوية خارج خلوية ذات نشاط حيوي أكثر من نضيرتها داخل خلوية، حيث بينت النتائج وجود نشاط مثبط للنمو لجميع مستخلصات المستقلبات الثانوية خارج خلوية على الأقل على كائن حي دقيق ممرض أو أكثر.

لقد أظهرت مستخلصات إثيل الأستيات فعالية عالية للنشاطية ضد بكتيرية مقارنة بالمستخلصات الأخرى، حيث قدرت أكبر منطقة تثبيط بـ 47 مم على بكتيريا *Micrococcus luteus*، تليها *Proteus mirabilis* بـ 43 مم، ثم *Escherichia coli* بـ 42 مم، و *Staphylococcus aureus* بـ 41 مم أما بالنسبة للنشاطية المضادة للفطريات فقد تم تسجيل أكبر منطقة تثبيط بـ 22.5 مم على النوع الفطري الممرض للتبساتات *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* بينما أصغر منطقة تثبيط كانت ضد النوع الفطري *Aspergillus flavus* و قدرت بـ 8.5 مم.

الكلمات المفتاحية:

Santolina rosmarinifolia L. (الجعدة)، الفطريات الداخلية للنباتات، النشاطية الإنزيمية، المستقلبات الثانوية (داخل وخارج خلوية) النشاطية المضادة للميكروبات.

Résumé

Un total de neuf mycoendophytes ont été isolés à partir de la plante médicinale *Santolina rosmarinifolia* L. (Djaàda) collectée par notre promoteur dans la région de Bordj Bou Arreridj (Djebel El Mansoura, Algérie) pendant le printemps de 2015. Cette présente étude est basée sur l'extraction des métabolites secondaires extra et intracellulaires de ces champignons endophytes et d'évaluer les différentes activités biologiques (enzymatique, antibactérienne, et antifongique) de ces endophytes.

L'évaluation de la production d'enzymes extracellulaires par ces champignons endophytes a démontré que 66.66 % d'entre eux ont une activité amylolytique, 100% une activité lipolytique, 44.44 % activité estérasique et 77.77% activité proteasique (lait écrémé), 100% activité de la gélatinase, 33.33% activité de la laccase.

D'autre part, l'activité antimicrobienne a été déterminée par les extraits bruts d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane et d'hexane en utilisant la méthode de diffusion en puits. Vingt-sept extraits ont été testés sur quinze bactéries pathogènes pour l'être humain, cinq champignons phytopathogènes et deux levures. Il en ressort que l'inhibition de la croissance des microorganismes testés varie en fonction de l'espèce microbien, de l'origine de l'extrait (intracellulaire ou bien extracellulaire) et selon le type du solvant utilisé. Les résultats obtenus ont démontré que les métabolites secondaires extracellulaires ont apparu plus bioactifs que les métabolites intracellulaires. De sorte que tous les extraits extracellulaires ont montré une activité inhibitrice sur au moins un ou plusieurs microorganismes pathogènes.

Les effets antimicrobiens les plus efficaces des métabolites extracellulaires ont été observés avec les extraits d'acétate d'éthyle, où la plus grande zone d'inhibition pour l'activité antibactérienne (47 mm) a été observée contre la bactérie *Micrococcus luteus* suivit par *Proteus mirabilis* (43 mm), *Escherichia coli* (42mm), *Staphylococcus aureus* (41mm). Et pour l'activité antifongique la zone d'inhibition la plus grande (22.5 mm) a été observée contre le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* tandis que la zone la plus faible a été observée contre l'espèce *Aspergillus flavus* (8.5mm).

Mots clés : *Santolina rosmarinifolia* L., Champignons endophytes, activité enzymatique, métabolites secondaires (extra et intracellulaires), activité antimicrobienne.

Abstract

A total of nine endophytic fungal strain were isolated from the medicinal plant *Santolina rosmarinifolia* L. (Djaàda) collected by our promoter in the region of Bordj Bou Arreridj (Djebel El Mansoura, Algeria) during the spring of 2015.

The present study is carried out by the extraction of the extracellular and intracellular secondary metabolites of these endophytic fungi and evaluation of the different biological activities (enzymatic, antibacterial, and antifungal) of these endophytes. Screening of these fungal isolates for different extracellular enzymes showed that 66.66% of them have an amylolytic activity, 100% lipolytic activity, 44.44% esterase activity, 77.77% protease activity (skimmed milk), 100% gelatinase activity, 33.33% of laccase activity. The antimicrobial activity was determined by the crude extracts of ethyl acetate, dichloromethane, and hexane using agar well diffusion method. Twenty-seven extracts were tested against 15 human pathogenic bacterial strains, 5 phytopathogenic fungi and 2 yeasts.

It shows that the inhibition of the growth of microorganisms tested varies depending on the microbial species, origin of the extract (intracellular or extracellular) and the type of solvent used. This reveals that the growth inhibition of the microorganisms tested varies according to the microbial species, to the extract origin (intracellular or extracellular) and according to the type of solvent. The results showed that extracellular secondary metabolites have appeared more bioactive than intracellular metabolites. Where all the extracellular extracts showed inhibitory activity on at least one or more pathogenic microorganisms. The most effective antimicrobial effects of extracellular metabolites have been observed with the ethyl acetate extracts, where the largest zone of inhibition for the antibacterial activity was observed (47 mm) against *Micrococcus luteus* followed by *Proteus mirabilis* (43 mm), *Escherichia coli* (42mm), and *Staphylococcus aureus* (41mm). For the antifungal activity, the largest zone of inhibition was observed (22.5 mm) against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* while the lowest zone was observed against *Aspergillus flavus* (8.5mm).

Keywords : *Santolina rosmarinifolia* L., Endophytic fungi, enzymatic activity, secondary metabolites, antimicrobial activity.