



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 الإبراهيمي برج بوعريريج

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 **Biologique**



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : science biologique

Spécialité : Microbiologie appliquée

Intitulé

**Activités biologiques d'un champignon endophyte
Penicillium sp. isolé à partir d'une plante médicinale
de la région Bordj Bou Arreridj**

Présenté par : ALLAL Kenza
HAMMA Loubna

Soutenu le: Juillet 2019

Devant le jury :

Président :	M ^r MERIBAI Abdelmalek	M.C.B. Université de BBA
Encadrant :	M ^r SADRATI Nouari	M.A.A. Université de BBA
Examineur :	Mme IRATNI Nadjat	M.A.A. Université de BBA

Année universitaire : 2018/2019



Remerciements

Tous nos remerciements vont d'abords à nôtre DIEU le tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience.

Nous tenons a exprimer notre grande gratitude à nos encadreur SADRATI Nouari et Madame ZERROUG Amina.

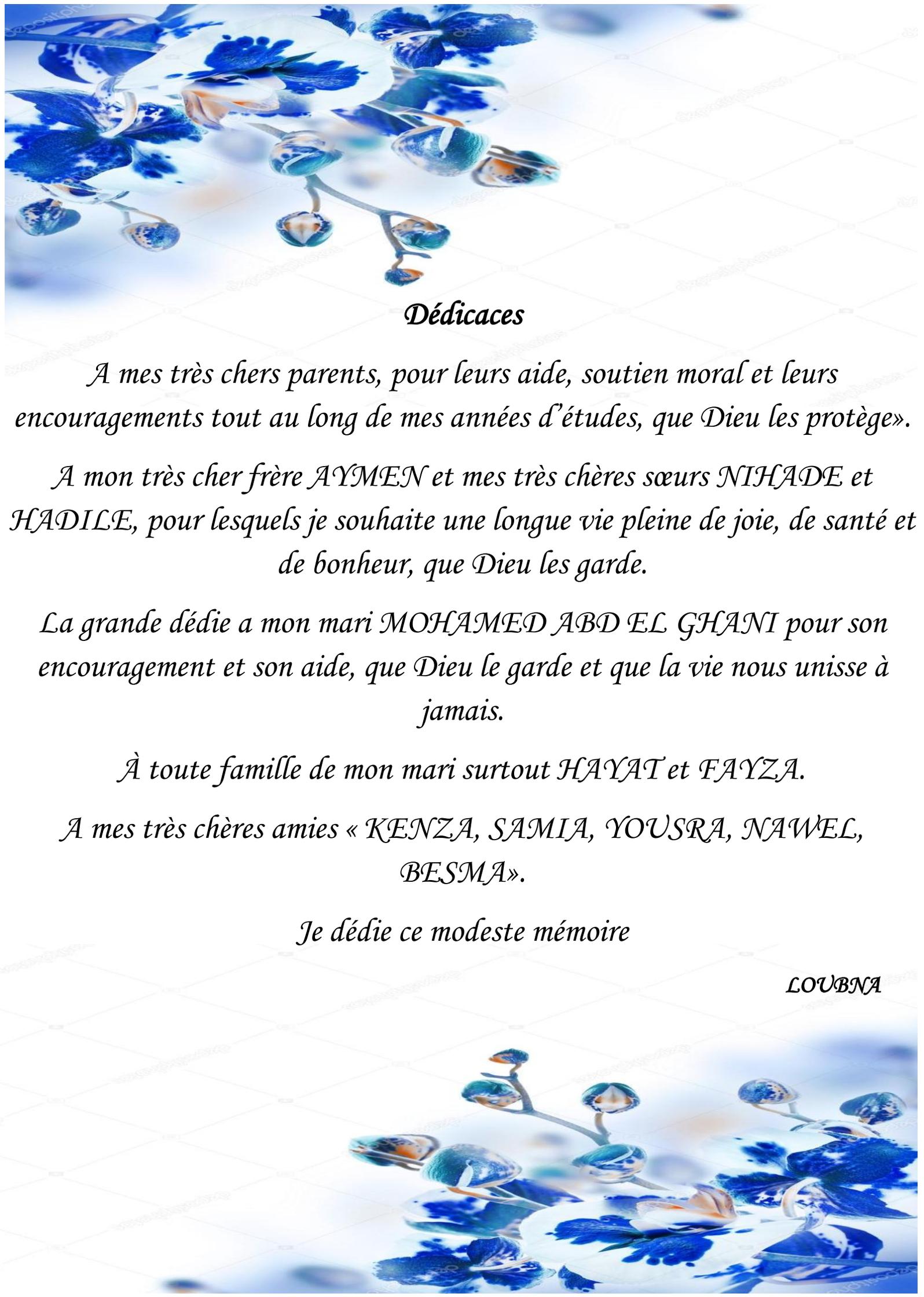
Nous remercions infiniment l'ingénieur du laboratoire de phytopathologie monsieur KHALIL, et Madame WAHIBA ingénieur du laboratoire de microbiologie.

Nous souhaitons également adresser nos sincères remerciements aux Messieurs les membres du Jury;

A monsieur MERIBAI Abdelmalek de nous avoir honoré de présidé le jury

A Madame IRATNI Nadjet d'avoir accepté d'être notre examinateur

Et nous remercions tous les personnes qui nous on aider d'une façon ou d'une autre.



Dédicaces

À mes très chers parents, pour leurs aide, soutien moral et leurs encouragements tout au long de mes années d'études, que Dieu les protège».

À mon très cher frère AYMEN et mes très chères sœurs NIHADE et HADILE, pour lesquels je souhaite une longue vie pleine de joie, de santé et de bonheur, que Dieu les garde.

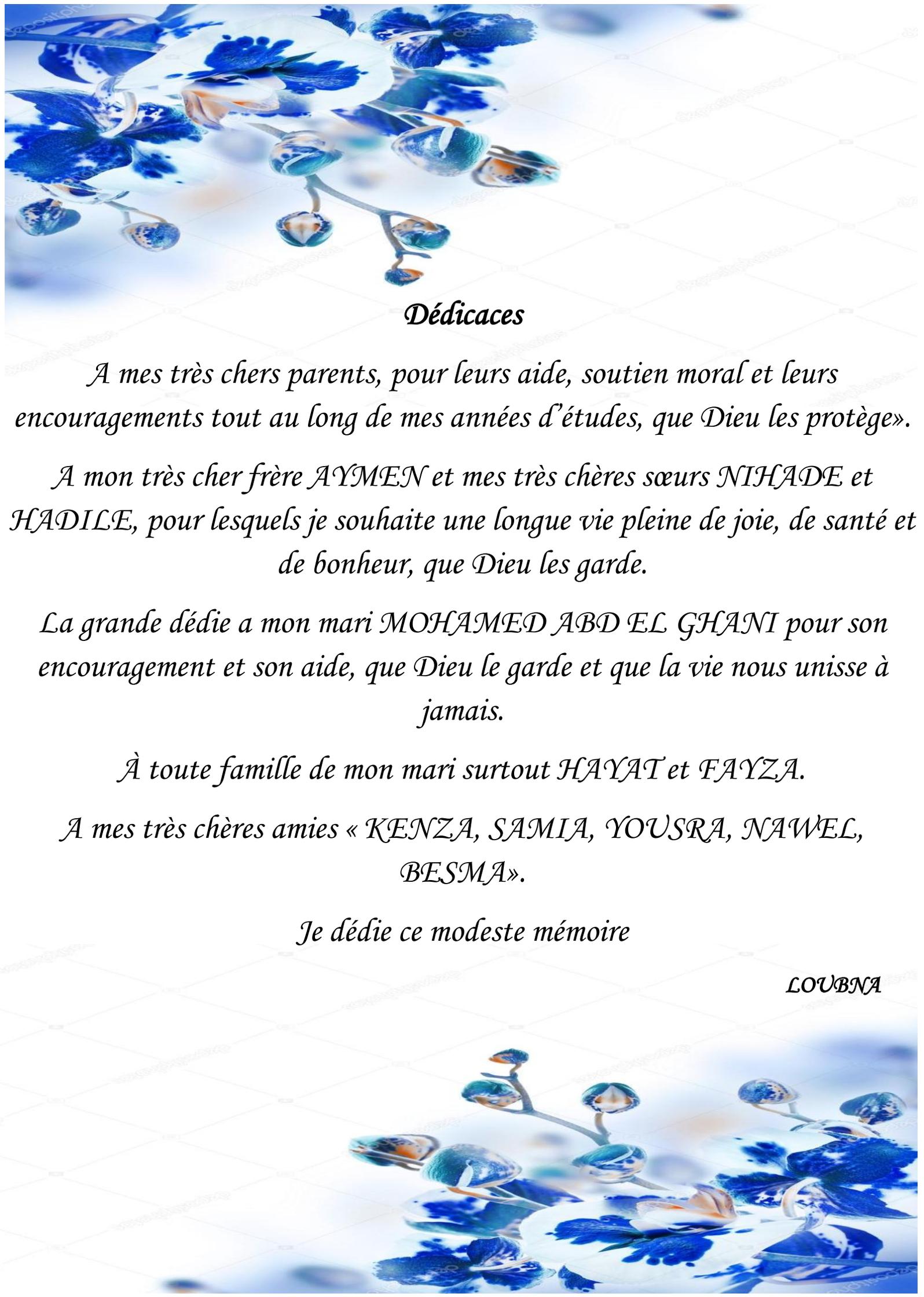
La grande dédie à mon mari MOHAMED ABD EL GHANI pour son encouragement et son aide, que Dieu le garde et que la vie nous unisse à jamais.

À toute famille de mon mari surtout HAYAT et FAYZA.

À mes très chères amies « KENZA, SAMIA, YOUSRA, NAWEL, BESMA».

Je dédie ce modeste mémoire

LOUBNA





Dédicaces

*Au nom du Dieu clément et miséricordieux et que le salut du Dieu soit sur son prophète
MOHAMMED*

Je dédie ce Modest travail A tout qui sont les plus chère au monde :

*«A mes très chers **parents**, pour leurs aide, soutien moral et leurs
encouragements tout au long de mes années d'études, que Dieu les
protège».*

*A mes très chers frères **Akram** avec sa femme **Nawal**, **Omar**, **Halim** avec sa femme **Zohra** et ses
enfants **Hocine** et **Sabrina** et mes très chères sœurs **Fatima** , **Rahma**, **Warda** Avec leurs maris et
leurs enfants, pour lesquels je*

souhaite une longue vie pleine de joie, de santé et de bonheur, que Dieu les garde.

À toute ma famille et à tous ceux qui m'ont soutenu dans ma carrière universitaire

*À mes chers amis Souhaila Loubna Yousra Samia Basma Nawal et sa famille et tous mes
collègues de spécialité microbiologie appliquée*

KENZA



المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى دراسة النشاط المضاد للميكروبات والنشاط الإنزيمي للفطر *Penicillium sp.* الذي تم عزله وجمعه من منطقة برج بوعريريج (الجزائر). تم تنفيذ النشاط المضاد للميكروبات على 12 من البكتيريا المسببة للأمراض للإنسان؛ ستة أنواع من البكتيريا إيجابية الغرام، وستة من البكتيريا سلبية الغرام، نوع من الخمائر وثلاثة أنواع من الفطريات المسببة للأمراض النباتية. تم العثور على MEA كأفضل وسط لتحقيق أقصى إنتاج للمركبات النشطة المضادة للبكتيريا بمتوسط مناطق تثبيط (24.5 مم) مقارنة بالوسائط الصلبة الأخرى نخالة الأرز (4.16 مم) ونخالة القمح (0 مم) بعد التخمير والاستخلاص باستعمال ثلاثة مذيبات ن-هكسان والكلوروفورم و إيثيل أسيتات، تم الحصول على أكبر تثبط بواسطة إيثيل أسيتات مقارنة مع ن-هكسان والكلوروفورم مع متوسط تثبيط (13.83 مم) (وفقا لنتائج النشاط المضاد للفطريات، فإن مستخلص إيثيل الأسيتات يثبط بقوة *Fusarium oxysporium fs. Albedinis* تليها *Aspergillus niger* ، *Alternaria sp.* والخميرة *C. albicans* مع مناطق تثبط 54 و 20 و 15 و 14 ملم على التوالي. كانت *Escherichia coli* هي أكثر أنواع البكتيريا حساسية (35مم) ، في حين كانت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* الأكثر مقاومة (10 ملم). أظهرت النتائج أن *Penicillium sp.* له نشاط مضاد للجراثيم واسع الطيف وهو فعال ضد البكتيريا موجبة الغرام بمتوسط منطقة تثبيط (28.91 مم) مقارنة مع البكتيريا سالبة الغرام (25.41 ملم). الفطر الداخلي *Penicillium sp.* أظهر نشاط انزيمي هام للليباز والإستراز، حيث كانت المؤشرات الأنزيمية 4.14 و 3.32 على التوالي. من ناحية أخرى، تم الحصول على نشاط متوسط للسليولوز والبروتياز بمؤشر انزيمي 2.79 و 1.50 على التوالي. النتائج المحصل عليها تشير إلى أن الفطر الداخلي *Penicillium sp.* يمكن أن يكون مصدرا واعداداً للمركبات النشطة بيولوجيا ضد مسببات الأمراض و إنتاج الإنزيمات التي يمكن أن تساعد في اكتشاف أدوية جديدة وجزيئات أخرى ذات أهمية بيوتكنولوجية.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية، البنسيليوم، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط الأنزيمي، الجزيئات النشطة بيولوجيا.

Résumé

La présente étude a pour but d'étudier l'activité antimicrobienne et enzymatique d'un champignon endophyte *Penicillium* sp. qui a été isolé d'une plante médicinale collectée de la région de Bordj Bou Arréridj (Algérie). L'activité antimicrobienne a été effectuée contre 12 bactéries pathogènes pour l'homme; six à Gram positif et six à Gram négatif, une levure et trois espèces fongiques phytopathogènes. Le MEA était le meilleur milieu donnant une production maximale des composés bioactifs antibactériens avec une moyenne des zones d'inhibition de 24.5 mm par rapport aux autres milieux solides à base de son de riz (4.16 mm) et son de blé (0 mm). Après la fermentation et l'extraction par trois solvants de différentes polarités, n-hexane, chloroforme et acétate d'éthyle, l'effet antibactérien le plus grand a été obtenu par l'extrait d'acétate d'éthyle avec une moyenne d'inhibition de 13,83 mm. Selon les résultats de l'activité antifongique, l'extrait d'acétate d'éthyle a inhiber fortement *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis* avec une moyenne des zones d'inhibition de 54 mm suivie par *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp. et la levure *Candida albicans* avec des zones d'inhibition de 20,15 et 14 mm respectivement. *Escherichia coli* était la bactérie la plus sensible (35 mm), tandis que *Pseudomonas aeruginosa* était la plus résistante (10 mm). Les résultats ont montré que *Penicillium* sp. a une activité antibactérienne plus efficace contre les bactéries à Gram positif avec une moyenne des zone d'inhibition de 28.91 mm par apport aux bactéries à Gram négatif (25.41 mm). Le champignon endophyte *Penicillium* sp. a montré des activités enzymatiques significatives de la lipase et de l'estérase, où les indices enzymatiques (IE) étaient respectivement de 4,14 et 3,32. Par contre, les activités cellulosiques et protéolytiques étaient modérées avec un IE de 2,79 et 1,50, respectivement. Nos résultats suggèrent que le champignon endophyte *Penicillium* sp. peut offrir une source prometteuse pour la production des composés bioactifs contre les agents pathogènes et les enzymes qui pourraient aider à la découverte des nouveaux médicaments et autres molécules d'intérêt biotechnologique.

Mots clés: champignons endophytes, *Penicillium* sp., activité antimicrobienne, activité enzymatique, molécules bioactives

Abstract

The present study aims to study the antimicrobial and enzymatic activity of the endophytic fungus *Penicillium* sp. which has been isolated and collected from the Bordj Bou Arréridj region (Algeria). The antimicrobial activity was carried out on 12 pathogenic bacteria for humans; six gram-positive, six gram-negative, one yeast and three phytopathogenic fungal species. MEA was found to be the best medium for maximum production of antibacterial bioactive compounds with an average of inhibition zones (24.5 mm) compared to other solid media, rice bran (4.16 mm) and wheat bran (0 mm). After fermentation and extraction with three solvents n-hexane, chloroform and ethyl acetate, the largest effect of the solvents was obtained by ethyl acetate than n-hexane and chloroform. with a mean of inhibition (13.83 mm). According to the results of the antifungal activity, the ethyl acetate extract strongly inhibited *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis* followed by *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp. and *Candida albicans* with inhibitory zones of 54, 20, 15 and 14 mm, respectively. *Escherichia coli* was found the most sensitive bacterium (35 mm), while *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant (10 mm). The results showed that *Penicillium* sp. has broad-spectrum antibacterial activity and is effective against Gram-positive bacteria with an average of the inhibition zone (28.91 mm) compared to the Gram-negative bacteria (25.41 mm). Endophytic fungus *Penicillium* sp. showed significant enzymatic activities of lipase and esterase, where the enzymatic indices (IE) were 4.14 and 3.32 respectively. On the other hand, cellulosic and proteolytic activities were weak with an IE of 2.79 and 1.50, respectively. Our results suggest that the endophytic fungus *Penicillium* sp. can offer a promising source for the production of bioactive compounds against pathogens and enzymes that could help to discover new drugs and other molecules of biotechnological interest.

Key words: endophytic fungi, *Penicillium* sp., Antimicrobial activity, enzymatic activity, bioactive molecules.

TABLE DES MATIER

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: Synthèse bibliographique	
I.1. Les champignons endophytes.....	2
I.1.1. Endophyte: l'origine, l'évolution d'un terme et clarification de son utilisation et de sa définition.....	2
I.1.2. La biologie et la diversité écologique des champignons endophytes.....	2
I.1.3. Mode de reproduction et de transmission.....	4
I.1.3.1. Croissance végétative des hyphes.....	4
I.1.3.2. Croissance par biais des spores.....	4
I.1.4. Spécificité de l'hôte.....	5
I.1.5. Spécificité des tissus.....	6
I.1.6. La nature de l'interaction plante/champignons endophytes.....	7
I.1.6.1. Généralité du mutualisme endophytes.....	8
I.1.7. Rôles des champignons endophytes et plante hôte.....	8
I.1.7.1. Rôles physiologiques des endophytes.....	9
I.1.7.1.1. Facilité d'accès aux nutriments.....	9
I.1.7.1.2. Rôles dans la protection des plantes hôtes contre leurs ennemis naturels.....	9
I.1.7.1.2.1. La protection contre les agents phytopathogènes.....	9
I.1.7.1.2.2. La protection contre les insectes.....	10
I.1.7.2. Rôles des endophytes dans la tolérance de l'hôte aux stress biotique et abiotiques.....	10
I.1.7.3. Rôles écologiques des endophytes.....	11
I.1.8. Endophytes source de métabolites bioactifs.....	12
I.1.8.1. Champignons endophytes comme source de substance antibactérienne.....	12
I.1.8.2. Champignons endophytes comme source de substance antifongique.....	13
I.1.8.3. Champignons endophytes comme source de substance antivirale.....	14
I.1.8.4. Champignons endophytes comme source de substance anticancéreuse.....	14
I.1.8.5. Champignons endophytes comme source de substance antioxydant.....	15

I.1.8.6. Les enzymes produites par les endophytes.....	16
--	----

CHAPITRE II: Matériel et méthodes

II.1 Matériels.....	17
II.1.1 Matériel microbien.....	17
II.1.2 Produits chimiques.....	17
II.2.Méthodes.....	18
II.2.1. Echantillonnage et isolement.....	18
II.2.2 Dépistage initial de l'activité antimicrobienne.....	18
II.2.2.1 Préparation des microorganismes tests.....	18
II.2.2.2 Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne.....	18
II.2.3 Sélection de milieux de culture appropriés.....	20
II.2.4 Fermentation et extraction.....	20
II.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits bruts.....	23
II.2.6. Activité enzymatique.....	23
II.2.6.1. Activité estérasique.....	24
II.2.6. 2. Activité protéolytique.....	24
II.2.6. 3. Activité cellulolytique.....	24
II.2.6. 4. Activité lipolytique.....	24
II. 2. 7. Analyse statistique.....	24

CHAPITRE III: Résultats et discussion

III.1. Dépistage initial de l'activité antimicrobienne.....	26
III.2. Sélection de milieux de culture appropriés.....	29
III.3. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits bruts.....	31
III.4.Détermination de l'activité enzymatique.....	36
Conclusion.....	38

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau I	Critères symbiotiques utilisés pour caractériser les différentes classes d'endophytes fongiques.	03
Tableau II	Pourcentages d'inhibition de la croissance des trois champignons phytopathogènes en double culture .	27
Tableau III	Les zones d'inhibition du champignon endophyte sur les cinq milieux utilisés PDA, SDA, YES, MEA, YMEA.	31
Tableau IV	Activité antifongique de l'extrait de l'acétate d'éthyle, n-hexane et le chloroforme.	33

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Mode de transmission des champignons endophytes.	05
Figure 2	Quelques substances antimicrobiennes produites par les champignons endophytes.	13
Figure 3	Structure chimique de paclitaxel.	14
Figure 4	Isopestacine, un antioxydant produit par l'endophyte <i>Pestalotiopsis microspora</i> isolé à partir <i>Terminalia morobensis</i> .	15
Figure 5	Pestacin un antioxydant produit par l'endophyte <i>P. microsporas</i> isolé à partir <i>T. morobensis</i> .	16
Figure 6	Cultures pures de champignons endophytes cultivées sur (PDA) pendant 3 semaines.	19
Figure 7	Technique de diffusion sur gélose.	19
Figure 8	Le protocole d'extraction des métabolites secondaires du champignon endophyte en milieu solide et en milieu liquide.	22
Figure 9	Zones d'inhibition des bactéries pathogènes par le champignon endophyte.	26
Figure 10	Le dépistage de l'activité antibactérienne du champignon endophyte contre quatre bactéries pathogènes.	27
Figure 11	Activité antifongique de <i>penicillium</i> sp. sur <i>Aspergillus niger</i> .	28
Figure 12	Activité antifongique de <i>penicillium</i> sp. sur <i>Fusarium oxysporium</i> fs. <i>Albedinis</i> .	28
Figure 13	Activité antifongique de <i>penicillium</i> sp. sur <i>Alternaria</i> sp.	28
Figure 14	Les moyennes des zones d'inhibitions du champignon endophyte <i>Penicillium</i> sp. obtenus sur les cinq différents milieux PDA, SDA, YES, MEA, YMEA.	29
Figure 15	Effet des différents milieux de culture sur l'efficacité de l'activité antibactérienne de <i>Penicillium</i> sp.	30
Figure 16	Choix de type du milieu et de solvant.	32
Figure 17	Les zones d'inhibition de l'extrait de l'acétate d'éthyle contre les trois champignons phytopathogènes.	34

Figure 18	Activité antimicrobienne de l'extrait de l'acétate d'éthyle contre les... bactéries et la levure pathogènes.	34
Figure 19	Comparaison de l'effet de l'extrait de l'acétate d'éthyle contre les bactéries à Gram+ et à Gram-.	35
Figure 20	La production des enzymes extracellulaires (lipase, estérase, cellulase et protéase) par l'endophyte <i>Penicillium</i> sp..	36
Figure 21	La production d'enzymes extracellulaires par l'endophyte <i>Penicillium</i> sp..	37

Liste des abbreviations

AE	Acétate d'Ethyle
CHL	Chloroforme
DMSO	Dimethylsulfoxide
GN	Gélose Nutritive
HA	Habitat-Adapted
MEA	Malt Extract Agar
MEB	Malt Extract Broth
N-H	N-Hexane
NHA	Non Habitat-Adapted
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
UFC	Unité Formant Colonie
YES	Yeast Extract Sucrose Agar
YMEA	Yeast Malt Extract Agar

INTRODUCTION

Introduction

La découverte de la pénicilline dans la première moitié du 20^{ème} siècle et tous les antibiotiques développés par la suite sans aucun doute représente l'une des réalisations les plus importantes en médecine. Ces médicaments ont sauvé des millions de vies (**González-Bello, 2017**). Malheureusement, la capacité de ces médicaments pour soigner les maladies infectieuses est maintenant en grave danger en raison de l'émergence et la propagation dans le monde entier de souches qui sont multirésistantes aux antibiotiques. Une recherche intensive des nouveaux agents antimicrobiens efficaces est nécessaire.

Les champignons endophytes sont considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (**Strobel et al., 2004**), Ces substances naturelles produites possèdent un large spectre d'activité biologique (**Zhang et al., 2006**), comprenant des composés antibiotiques, antifongiques, antiviraux, immunosuppresseurs, agents anticancéreux, antioxydants, insecticides et autres substances biologiquement actives (**Strobel et Daisy, 2003; Strobel et al., 2004**).

Les microorganismes endophytes (champignons et bactéries) sont ceux qui habitent à l'intérieur d'une plante au moins à une période de leur cycle de vie, et se retrouvent dans les tissus tels que les feuilles, les branches et les racines. Apparemment, ils ne causent aucun dommage à l'hôte, ce qui les distingue des microorganismes phytopathogènes. Leur présence impliquait une interaction symbiotique, dans toutes les plantes étudiées jusqu'à présent (**Carrim et al., 2006**).

L'objectif principal de cette étude est l'évaluation de l'activité antimicrobienne et enzymatique d'une souche fongique endophyte *Penicillium* sp. isolé à partir d'une plante médicinale collectée de la région de Bordj Bou Arréridj (Algérie).

Ce travail est structuré en 3 parties:

- La première partie est consacrée à une revue bibliographique mettant l'accent sur les champignons endophytes.
- La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisées.
- Ainsi qu'une troisième partie démontrant les résultats obtenus en ce qui concerne les différentes expériences effectuées.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Synthèse bibliographique

I.1. Les champignons endophytes

I.1.1. Endophyte: Origine, évolution et définition

De Barry (1866), est le premier qui a introduit le terme endophyte. En traduction littérale, ce mot endophyte est dérivé du grec: « Endo » ou « Endon » c'est-à-dire « intérieur », et « phytes » ou « phyton » c'est-à-dire « plante ». Dans « the dictionary of the fungi », le mot « Endophyte » désigne l'organisme qui vit dans la plante (**Pirttila, 2001; Schulz et Boyle, 2006**).

Depuis lors, le terme endophyte est devenu profondément ancré dans la littérature et différents auteurs ont proposé d'autres définitions similaires, mais plus complexes comme les définitions de **Carroll (1986), Petrini, (1991) et Wilson (1993)**. La définition la plus complète serait que les endophytes sont des bactéries ou des champignons qui, durant tout ou une partie de leur cycle de vie, envahissent les tissus vivants des plantes. Ils causent des infections inapparentes et asymptomatiques, entièrement à l'intérieur des tissus végétaux, mais ne causent aucun symptôme de maladie (**Wilson, 1995**). Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolés en tant qu'endophytes (**Strobel et al., 2004**).

L'association entre la plante et l'endophyte est, le plus souvent mutualiste. On a longtemps pensé que ces champignons n'avaient aucune fonction, ni aucun intérêt. Cependant, les recherches ont commencé à s'intéresser aux endophytes (**Moricca et Ragazzi, 2008**) qu'on considère maintenant comme des sources de beaucoup de composés d'intérêt tels les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticides, etc. (**Maheshwari, 2006**).

I.1.2. Biologie et diversité écologique des champignons endophytes

Depuis la découverte des endophytes à Darnel (*Lolium temulentum*), en Allemagne, en 1904 (**Tan et Zou, 2001**), divers chercheurs ont assimilé les endophytes de différentes manières, ce qui dépend généralement de la perspective dans laquelle les endophytes étaient isolés puis examinés. La nature asymptotique de l'occupation des endophytes dans les tissus des plantes a incité les chercheurs à s'intéresser aux relations symbiotiques ou mutualistes entre les endophytes et leurs hôtes. La biodiversité observée des endophytes suggère qu'il peut également s'agir de saprophytes agressifs ou d'agents pathogènes opportunistes.

Il s'avère que la grande majorité des plantes n'ont pas été étudiées pour leurs endophytes. Il existe donc d'énormes possibilités pour la récupération de nouvelles formes, de nouveaux taxons et biotypes fongiques. **Hawksworth et Rossman (1987)**, ont estimé qu'il

pourrait y avoir jusqu'à 1 million d'espèces fongiques différentes, mais environ 100 000 seulement ont été décrites avec une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante.

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 *Oomycota* (Saar *et al.*, 2001). Ils ont été isolés à partir de toutes les plantes étudiées à ce jour, des plantes allant des grands arbres (Oses *et al.*, 2008), palmier (Frohlich *et al.*, 2000), les graminées marines (Alva *et al.*, 2002) et même à partir des lichens (Li *et al.*, 2007).

En général, deux grands groupes des champignons endophytes ont été identifiés, reflétant des différences dans la relation évolutive, la taxonomie, les plantes hôtes et les fonctions écologiques; les endophytes clavicipitacées (endophytes C), qui infectent certaines graminées; et les endophytes non clavicipitacées (endophytes NC), qui peuvent être récupérés à partir de tissus asymptomatiques de plantes non vasculaires, de fougères, de conifères et d'angiospermes.

Comme indiqué dans le **tableau I**, les endophytes NC représentent un ensemble très diversifié de champignons divisé en trois groupes fonctionnels basés sur un éventail de caractéristiques : les tendances de colonisation des endophytes, les mécanismes de transmission entre les générations d'hôtes, les niveaux de biodiversités dans les plantes et les fonctions écologiques. Contrastant avec cette diversité, les C-endophytes constituent la classe 1 (Rodriguez *et al.*, 2009).

Tableau I: Critères symbiotiques utilisés pour caractériser les différentes classes d'endophytes fongiques (Rodriguez *et al.*, 2009).

Critères	Clavicipitacées		Non Clavicipitacées	
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Gamme d'hôtes	Etroite	Large	Large	Large
Tissu(s) colonisé(s)	Rameau et rhizome	Rameau, rhizome et racines	Rameau	Racines
Colonisation <i>in planta</i>	Etendue	Etendue	Limitée	Etendue
Biodiversité <i>in planta</i>	Faible	Faible	Importante	Inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Verticale et horizontale	Horizontale	Horizontale
Avantages pour la santé végétale	NHA	NHA et HA	NHA	NHA

I.1.3. Mode de reproduction et de transmission

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction:

I.1.3.1. Croissance végétative des hyphes

Elle est accompagnée par la transmission verticale, la croissance se fait complètement à l'intérieur des tissus de la plante hôte (**Selosse et Schardl., 2007**). Ainsi les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les graines (**Saikkonen et al., 2004a**).

Le transfert vertical par la graine a principalement été observée chez des endophytes fongiques de la famille des Clavicipitacées colonisant les poacées, les cypéracées et les juncacées mais également chez plusieurs espèces graminoides telles *Pinus* spp., *Vigna unguiculata*, *Theobroma cacao*, *Castanea* spp., *Colophospermum mopane*. Une telle transmission n'a pas été observée avec les endophytes fongiques ubiquitaires comme ceux appartenant aux genres *Alternaria* et *Cladosporium* (**Tintjer, et al., 2008**).

I.1.3.2. Croissance par biais des spores

Ce groupe de champignons se transmet horizontalement (**Saikkonen et al., 2004**), c'est-à-dire le champignon peut être transmis soit par spores sexuées ou asexuées (**Saikkonen et al., 2004b**). En général ; la transmission horizontale des endophytes est associée aux tissus photosynthétiques de la plante (la feuille) (**Higgies et al., 2007**). Ce mode de transmission nécessite la production des spores externes et leur dispersion aéroportée pour infecter d'autres plantes (**Zabalgoeazcoa, 2008**).

Les insectes phytophages peuvent également participer à la propagation des endophytes, car les spores de certaines espèces de champignons sont résistantes à la digestion intestinale, et sont présents dans leurs excréments. La transmission horizontale semble être le mécanisme prédominant de la dispersion des espèces endophytes (**Zabalgoeazcoa, 2008**) (**Figure 01**).

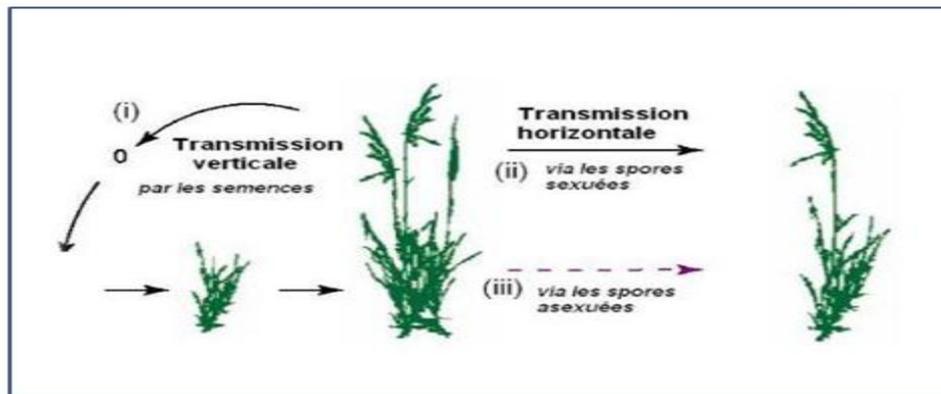


Figure1: Mode de transmission des champignons endophytes (Saikkonen *et al.*, 2004).

Epichloë, un champignon endophyte associé aux graminées provoquant une infection systémique peut être transmis soit verticalement, soit sexuellement par des spores (Saikkonen *et al.*, 1998). Le cycle asexué correspond à une transmission verticale : le mycélium du champignon endophyte présent dans l'hôte pénètre dans la graine portée par la plante. La graine est disséminée, germe et forme un nouvel individu végétal, progéniture de l'hôte primaire qui est colonisé à son tour par le champignon. Le cycle sexué correspond à une transmission horizontale, le champignon endophyte présent dans l'hôte, après plasmogamie et caryogamie, forme un stroma sur lequel se développent les organes de reproduction sexuée. Les ascospores sont dispersées et permettent la colonisation de l'inflorescence d'une plante voisine. Le mycélium passe dans la graine nouvellement formée qui va être disséminée et germe.

Contrairement à *Neotyphodium*, un autre genre d'endophyte systémique des graminées qui lui, a totalement perdu sa capacité de propagation contagieuse et sa transmission est strictement verticale (Saikkonen *et al.*, 2004b). Les graines produites par les graminées verticalement infectées par ces champignons donneront toutes des plantes asymptomatiquement infectées (Zabalgogezcoa, 2008).

Pour les endophytes non systémiques des plantes ligneuses, la transmission se fait horizontalement provoquant généralement des infections locales très limitées, mais ils peuvent être trouvés aussi dans les graines et les glets (Wilson et Carroll, 1994) mais la transmission verticale est rare (Saikkonen *et al.*, 1998).

I.1.4. Spécificité de l'hôte

La spécificité de l'hôte est une relation dans laquelle un micro-organisme est limité à un seul hôte ou un groupe d'espèces apparentées, cette spécificité implique qu'une interaction

biochimique complexe se produit entre l'hôte et ses endophytes associés (**Holliday, 1998; Strobel, 2003; Strobel et Daisy, 2003**).

Certains champignons auraient une large gamme d'hôtes, tels que *Alternaria*, *Penicillium* et *Periformospora*, qui ont des hôtes appartenant à des genres ou des familles de plantes différents, contrairement à d'autres endophytes comme par exemple *Neotyphodium* qui est un champignon endophyte ayant une gamme d'hôtes restreinte, elle est limitée à une ou deux espèces végétales (**Zabalgogezcoa., 2008**).

Les relations d'endophytes fongiques avec une ou plusieurs plantes hôtes sont souvent décrites en termes de spécificité d'hôte, exclusivité d'hôte, récurrence et / ou sélectivité d'hôte. La spécificité d'hôte décrit la relation spécifique à un hôte unique ou un groupe d'espèces apparentées et qui ne se produit pas avec des plantes non apparentées dans le même habitat. L'exclusivité d'hôte est l'apparition exclusive d'un événement strictement Champignon saprobique sur un hôte particulier ou sur un nombre restreint de plantes hôtes apparentées. La fréquence de l'apparition d'un endophyte sur un hôte particulier ou la gamme d'hôtes de plantes est souvent définie comme une récurrence d'hôte. Ce terme prend en compte le fait que l'endophyte peut également se produire sur d'autres plantes hôtes dans le même habitat (**Petrini, 1991; Stone et al., 2000; Zhou et al., 2001**). Une seule espèce d'endophyte fongique peut également établir des relations avec deux espèces de plantes apparentées, mais démontrer une préférence pour l'une des espèces, cette relation est appelée sélectivité d'hôte.

Nombreuses sont les études qui permettent de dire que les facteurs environnementaux, tels que l'application d'engrais, le stress hydrique et des régimes d'humidité saisonnière, en plus de l'identité de l'espèce de l'hôte, peuvent avoir un effet sur les communautés de champignons endophytes (**Suryanarayanan et al., 2002; Seghers et al., 2004; Gonthier et al., 2006; Fujimura et al., 2008**). L'interaction de ces deux facteurs peut aussi avoir un impact significatif sur la composition endophytique; (**Hoffman et Arnold 2008**) ont constaté qu'il y'avait une similitude relativement faible entre les communautés d'endophytes de différentes espèces de la famille des *Cupressaceae* qui se trouvaient dans la même localité, et entre celles de la même espèce hôte dans différentes localités, contrairement à ce qu'ils ont trouvé pour la même espèce hôte dans la même localité où ils ont observé une grande similitude.

I.1.5. Spécificité des tissus

Beaucoup d'endophytes infectent localement des parties de la plante, se limitant à une petite zone du tissu (**Zabalgogezcoa., 2008**). Certains endophytes peuvent être trouvés dans

des parties de plantes spécifiques telles que les racines, feuilles, tiges et d'autres peuvent infecter plusieurs de ces pièces, comme les espèces systémiques *Neotyphodium* et *Epichloë* infectant les espaces intercellulaires des feuilles, les tiges et les graines de leurs hôtes, ils peuvent être isolés à partir de différentes parties de la même plante (Zabalgoitia, 2008).

Parfois, les composés chimiques de certains tissus peuvent altérer la colonisation de différents champignons endophytes, cependant certains de ces endophytes peuvent tolérer certaines toxines produites par l'hôte, ce qui influe sur l'abondance, la diversité et la composition en espèces des communautés fongiques (Hammerschmidt, 1999, Osbourn, 1999, Vanetten et al., 2001 ; Osbourn et al., 2003;). Il y a aussi l'âge de l'hôte ; avec le temps, les tissus âgés de la plante hôte accumulent de plus en plus d'endophytes contrairement aux tissus jeunes (Zabalgoitia, 2008).

I.1.6. La nature de l'interaction plante/champignons endophytes

Les associations plante-champignon sont le plus souvent assez stables tout au long de la vie de la plante. Elles sont souvent considérées comme mutualistes même si trois types d'interactions peuvent être constatées (Repussard et al., 2013):

- Type I. Antagoniste

La phase de reproduction sexuée de la plante est supprimée par la formation de stromas épiphytes sur les inflorescences en développement. Ceci permet la transmission horizontale du champignon endophyte via une phase de reproduction sexuée et la libération d'ascospores. Les symptômes sont typiques et connus sous le nom de « quenouille » en français ou « choke » (étrangleur) en anglais. Quelques exemples de ce genre d'association sont *Epichloe typhina* et *Dactylis glomerata* L., *E. glyceriae* et *Glyceria striata*.

- Type II. Pleïotropique

Les stromas se forment sur certaines thalles alors que sur d'autres le champignon se développe dans l'inflorescence qui produit des graines infectées. Cette association, intermédiaire entre les types I et III, est assez fréquente, c'est le cas de *Epichloe festucae* et *Festuca rubra*, *Epichloe amarillans* et *Agrostis hiemalis*.

- Type III. Mutualiste

Le champignon endophyte croît dans l'ovule en développement au sein d'une inflorescence et « infecte » les semences. Tout au long du développement de la plante, le mycélium est sous une forme strictement endophyte, sa reproduction est asexuée. Ce type de

d'interaction se retrouve chez *Neotyphodium coenophialum* et *Lolium arundinaceum*, *Neotyphodium lolii* et *Lolium perenne*.

Certaines de ces associations peuvent conduire à la synthèse de mycotoxines. La production dans la plante hôte est sous l'influence de différents facteurs tel le génotype de la graminée, le type d'association hôte-endophyte et des facteurs externes tels que le pédoclimat, les apports minéraux ou encore hydriques (**Repussard et al., 2013**).

I.1.6.1. Généralité du mutualisme endophytes

Les caractéristiques qui pourraient signaler une relation mutualiste entre l'endophyte et son hôte sont (**George, 1998**):

- 1) L'endophyte est omniprésent chez un hôte donné sur une vaste étendue géographique et provoque des symptômes minimes de maladie chez la plante hôte.
- 2) La transmission verticale du champignon se produit à travers la graine hôte ou les propagules végétatifs. Si la transmission des semences ne se produit pas, la transmission horizontale doit être efficace.
- 3) Le champignon se développe dans les tissus de l'hôte. Si les unités de la section sont dispersées, elles doivent être nombreuses ; si confiné à un organe particulier, une proportion élevée des organes devrait être infectée.
- 4) Le champignon produit des métabolites secondaires de nature antibiotique ou toxique.
- 5) L'endophyte est taxonomiquement apparenté à des antagonistes connus des herbivores ou des agents pathogènes (*Acremonium*, *Phomopsis*, *Lophodermium*).

I.1.7. Rôles des champignons endophytes et plante hôte

Les champignons endophytes jouent des rôles vitaux dans divers aspects de vie qui varient de ses effets sur les plantes-hôtes à ses effets sur l'environnement et la vie humaine (**Selim et al., 2012**). Une telle interaction bénéfique pourrait être présentée sous trois aspects différents :

Tout d'abord, certains champignons endophytes pourraient produire différentes hormones végétales pour améliorer la croissance de leurs plantes hôtes. Par exemple, la croissance du blé (*Triticum aestivum* L.) pourrait être renforcée par *Azospirillum* sp. sous stress de sécheresse.

Deuxièmement, certains champignons endophytes produiraient différents composés bioactifs, tels que les alcaloïdes, les diterpènes, les flavonoïdes et les isoflavonoïdes, pour augmenter la résistance aux stress biotiques et stress abiotiques de leurs plantes hôtes.

Troisièmement, certains champignons endophytes pourraient favoriser l'accumulation de métabolites secondaires par les plantes (**Beatriz et Taidés, 2017**).

I.1.7.1. Rôles physiologiques des endophytes

Grâce aux interactions avec la plante hôte, les champignons endophytes jouent plusieurs rôles bénéfiques qui contribuent à la santé de l'hôte et directement ou indirectement induisent une augmentation de la productivité des plantes, telle que la protection contre les micro-organismes pathogènes, les herbivores, la promotion de la croissance des plantes et la production de métabolites secondaires qui augmentent la résistance de la plante aux stress biotiques et abiotiques (**Beatriz et Taidés, 2017**).

I.1.7.1.1. Facilité d'accès aux nutriments

Les résultats ont montré que certains champignons endophytes pourraient augmenter la forme et la croissance des plantes hôtes en augmentant le taux d'hormones telles que l'acide indole-3-acétique, l'indole-3-acétonitrile et les cytokinines. Les champignons endophytes pourraient également favoriser la croissance de leur plante hôte en obtenant des éléments nutritifs tels que l'azote et le phosphore utile pour les plantes. *Mycena dendrobii* pourrait par exemple promouvoir la germination des graines et la croissance de la plante hôte *Gastrodia elata* en sécrétant de l'acide indole acétique. De plus, *Metarhizium robertsii* a transféré l'azote directement des insectes à ses plantes hôtes en passant par les hyphes. Fait intéressant, les résultats ont montré que la plupart des hormones ont été produites par des champignons endophytes isolés des racines des plantes hôtes. Quelques références ont également signalé que certaines champignons endophytes pourraient favoriser la croissance et la forme de la plantes hôtes en activant l'expression de certaines enzymes et des gènes. Par exemple, *Piriformospora indica* a augmenté la croissance des racines du tabac en stimulant l'expression de la nitrate réductase et de l'enzyme dégradant l'amidon (glucan-eau dikinase) (**Min et al., 2016**).

I.1.7.1.2. Rôles dans la protection des plantes hôtes contre leurs ennemis naturels

I.1.7.1.2.1. La protection contre les agents phytopathogènes

Plusieurs mécanismes peuvent être utilisés par les endophytes pour protéger la plante contre les agents pathogènes, telles que la compétition avec les agents pathogènes pour les

sites de colonisation et les nutriments, la production d'antibiotiques, l'induction de résistance dans la plante hôte (**Beatriz et Taidés, 2017**).

Le contrôle biologique des phytopathogènes implique l'utilisation de microorganismes qui réduisent l'activité ou la survie des agents pathogènes chez les plantes. Les mécanismes de biocontrôle les plus couramment décrits sont l'antibiothérapie, la compétition pour l'espace, la compétition pour le fer et d'autres nutriments, le parasitisme et l'induction de résistance chez l'hôte (**Beatriz et Taidés, 2017**).

I.1.7.1.2.2. La protection contre les insectes

La capacité des champignons endophytes à repousser les insectes, induire une perte de poids et de croissance, réduire le développement et même d'augmenter le taux de mortalité des organismes nuisibles, était corrélée avec la production de toxines.

Les champignons endophytes (*Clavicipitaceae*, Ascomycetes) synthétisent des alcaloïdes au cours de l'infection des plantes, réduisant la survie et le développement de *Spodoptera frugiperda* chez Graminae et Cyperaceae.

L'expression de la résistance des insectes peut être affectée par plusieurs facteurs, tels que les quantités actives d'allélochimiques, le génotype de la plante, la concentration des endophytes, la fertilité du sol et le génotype de l'endophyte. Le stress hydrique, la température, le pH du sol, les insectes nuisibles et d'autres facteurs peuvent également affecter la production et la concentration de toxines produites par l'endophyte (**Rodriguez et al, 2009**).

I.1.7.2. Rôles des endophytes dans la tolérance de l'hôte aux stress biotique et abiotiques

Les stress abiotiques, tels que la sécheresse, la salinité, températures extrêmes (chaleur et froid), toxicité des métaux lourds et le stress oxydatif sont des menaces sérieuses pour l'agriculture et entraîner une détérioration de l'environnement. Le stress abiotique est la principale cause de perte des cultures dans le monde, réduisant les moyens de rendements de plus de 50% pour la plupart des plantes cultivées (**Monika et Rohit, 2014**).

Les recherches ont montré que certains champignons endophytes pouvaient renforcer la résistance des plantes hôtes aux stress biotiques et abiotiques en produisant des composés bioactifs. Les champignons endophytes ont été considérés agir comme un type de déclencheur biologique qui active le système de défense de leur hôte. Par exemple, l'inoculation des

plantes cultivées par les champignons endophytes améliore la résistance et le rendement des cultures, et une certaine résistance aux agents pathogènes (Min et al., 2016).

I.1.7.3. Rôles écologiques des endophytes

Les endophytes fongiques font partie intégrante des communautés microbiennes communément associés aux plantes. Ils ont de nombreux rôles écologiques différents qui incluent le mutualisme, commensalisme et parasitisme (Carroll, 1988; Arnold, 2007; Saikkonen, 2007; Sieber, 2007). Ils se produisent également sur une variété d'hôtes comprenant des arbres, des arbustes, des herbes, mousses, fougères et lichens (Stone et al., 2000; Zhang et al., 2006). Bien qu'il y ait beaucoup de preuves des effets positifs que les endophytes confèrent à certains hôtes tels que les graminées, il existe peu d'informations sur le rôle écologique que jouent les endophytes sur d'autres hôtes tels que les arbres.

La plupart des travaux sur les endophytes fongiques de plantes ont été effectués sur des graminées, notamment hautes herbes de fétuque et en se concentrant sur les espèces *Acremonium* ou *Epichloë*. Ces champignons sont importants pour la survie de l'hôte et de nombreuses données probantes appuient ce point de vue (Siegel, 1993; Siegel et al., 1987; Clay 1988, 1990; Funk et al., 1993; Saikkonen et al., 1998). Cependant, il a été proposé que cette association dépende des conditions environnementales et nutritionnelles disponibles (Müller et Krauss, 2005).

Si les ressources nutritionnelles sont limitées, L'association endophyte-hôte peut changer de mutualisme à commensalisme et même à l'antagonisme ou parasitisme. Par exemple, des performances améliorées ont été observées chez les plantes de *Festuca pratensis* infectés par les endophytes par rapport aux plantes non infectées sur un sol fortement fertilisé et arrosé. Au contraire, dans des conditions de manque d'eau et de nutriments, peu de tiges, de racines inférieures et diminution de la biomasse totale ont été observées chez *F. pratensis* infecté par des endophytes. Dans des conditions de stress, les endophytes sont supposés agir en tant que commensalistes ou antagonistes (Stanosz et al., 2001; Desprez-Loustau et al., 2006; Slippers et Wingfield, 2007).

Le génotype de l'hôte joue un rôle important dans l'association endophyte-hôte. Un endophyte pourrait ainsi agir en tant que mutualiste, antagoniste ou commensale selon le génotype de l'hôte. Par exemple, Redman et al. (2001) ont démontré que des espèces phytopathogènes bien connus dans le genre *Colletotrichum*, à savoir *C. magna*, *C. coccodes*, *C. orbiculare*, *C. musae*, *C. lindemuthianum*, *C. gaminicola*, *C. gliosporiodes* et *C.*

acutatum, ont un mode de vie mutualisme avec les cultivars de tomate et de poivron, et qui étaient connus pour ne pas être susceptibles à ces agents pathogènes.

I.1.8. Endophytes source de métabolites bioactifs

Les champignons endophytes produisent une variété de métabolites secondaires qui, contrairement aux métabolites primaires, jouent un rôle important dans les processus physiologiques de micro-organismes.

Ces composés sont produits pour des raisons spécifiques, telles que la les stresses ou de la prédation, et sont donc liés à l'écologie du producteur organismes. Les métabolites secondaires produits par les champignons endophytes sont également une source potentielle de nouveaux produits naturels bioactifs pouvant avoir des applications dans différents domaines (**Beatriz et Taidés, 2017**).

Les recherches sur les endophytes ont mené à la découverte de nouveaux médicaments utilisables en thérapeutique, directement ou indirectement, avec des propriétés antibactériennes, antivirales, anti-oxydantes, anti-neurodégénératives et immunosuppressives (**Staniek et al., 2008**). Ces produits présentent une grete diversité structurale comprenant des alcaloïdes, stéroïdes, peptides, polykétones, cytochalasines, polykétides, quinols, phénols, flavonoïdes, dérivés des terpenoïdes et autres types de structure (**Nisa et al., 2015**).

I.1.8.1. Champignons endophytes comme source de substance antibactérienne

Les problèmes de santé dans le monde causés par des bactéries résistantes aux médicaments et les champignons sont en augmentation. Des nouvelles recherches intensives et de nouveaux agents antimicrobiens efficaces sont nécessaires. Les champignons endophytes ont été reconnus comme sources prometteuse pour avoir des métabolites secondaires bioactifs. Une récente étude approfondie a indiqué que 51% des substances biologiquement actives isolées des champignons endophytes étaient avant inconnu. (**Souwalak et al., 2006**).

Les antibiotiques sont considérés comme des produits naturels organiques de faible poids moléculaire synthétisés par certains microorganismes à faible concentration contre d'autres microorganismes. Les endophytes sont souvent une source de ces antibiotiques. Il a été observé que les produits naturels provenant de microbes endophytes inhibent ou tuent une grete variété d'agents pathogènes, notamment les phytopathogènes, ainsi que les bactéries, les

champignons, les virus et les protozoaires affectant les êtres humains et les animaux (**Strobel et Daisy, 2003**).

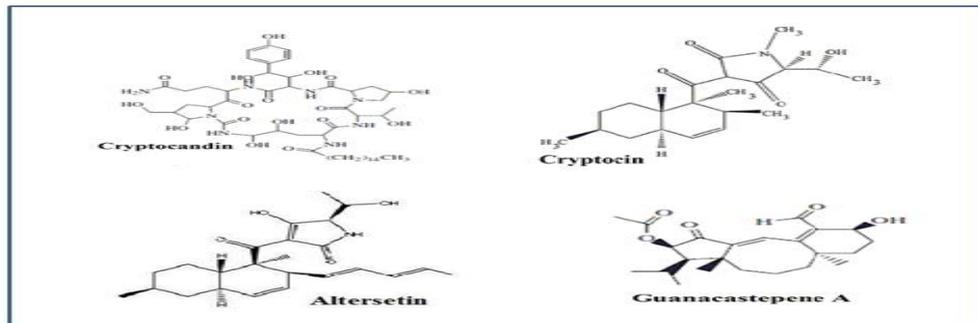


Figure 2: Quelques substances antimicrobiennes produites par les champignons endophytes (**Selim et al., 2012**).

I.1.8.2. Champignons endophytes comme source de substance antifongique

La griséofulvine est le seul antifongique largement utilisé contre les champignons pathogènes. L'origine de cet antifongique est l'espèce *Penicillium griseofulvum*. La griséofulvine est fongistatique plutôt que fongicide. Il est utilisé pour le traitement des dermatophytes, car il s'accumule dans les cheveux et la peau.

Des recherches continues pour avoir de nouveaux antibiotiques pour diverses applications, ont été observé que certains champignons endophytes produisaient un mélange de composés organiques volatils mortels pour une variété de champignons et de bactéries pathogènes pour l'homme et les plantes (**Monika et Rohit, 2014**).

Le premier de ces champignons endophytes, *Muscodor albus*, a été isolé de *Cinnamomum zeylanicum* pousse dans les forêts tropicales humides du Honduras. D'autres espèces telles que *M. vitigenus* et *M. roseus* possédaient également un spectre large d'activité antimicrobienne. *M. albus* isolé de petits membres d'un certain nombre d'arbres et d'espèces de vigne dans le Territoire du Nord de l'Australie capable de produire de l'acide propanoïque, et du naphthalène. Ces isolats ont des applications potentielles comme le traitement de diverses graines, fruits et fleurs coupées, pour réduire ou éliminer les microorganismes nuisibles et pathogènes ou peuvent être utilisés en tant qu'alternative à la fumigation du sol par le bromure de méthyle pour contrôler les agents pathogènes des plantes transmis par le sol (**Monika et Rohit, 2014**).

Sur des boîtes de Pétri, *Cryptosporiopsis quercina*, a démontré une excellente activité antifongique contre certains agents pathogènes fongiques pour comme *Cetida albicans* et *Trichophyton* spp. Ce dernier a été trouvé produire un peptide antifongique, appelé

cryptocetine. La cryptocetine est également active contre un certain nombre de champignons phytopathogènes, notamment *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea*. La cryptocetine et ses composés apparentés sont actuellement à l'étude pour lutter contre un certain nombre de champignons causant des maladies de la peau et des ongles (Strobel, 2002).

I.1.8.3. Champignons endophytes comme source de substance antivirale

Une autre utilisation importante des métabolites secondaires des champignons endophytes est le traitement des maladies d'origine virales. Deux molécules inhibitrices de cytomégalovirus, l'acides cétoniques A et B, ont été isolés après fermentation à l'état solide du champignon endophyte *Cytonaema sp.* (Strobel et Daisy, 2003).

I.1.8.4. Champignons endophytes comme source de substance anticancéreuse

Le taxol ou le paclitaxel et certains de ses dérivés constituent le premier groupe majeur d'agents anticancéreux produits par les endophytes (Figure 3). Le paclitaxel a pour mode d'empêcher les molécules de tubuline de se dépolymériser au cours des processus de division cellulaire. Ce composé est le premier médicament anticancéreux au monde. Il est également utilisé pour traiter un certain nombre d'autres maladies liées à la prolifération des tissus humains (Strobel et Daisy, 2003).

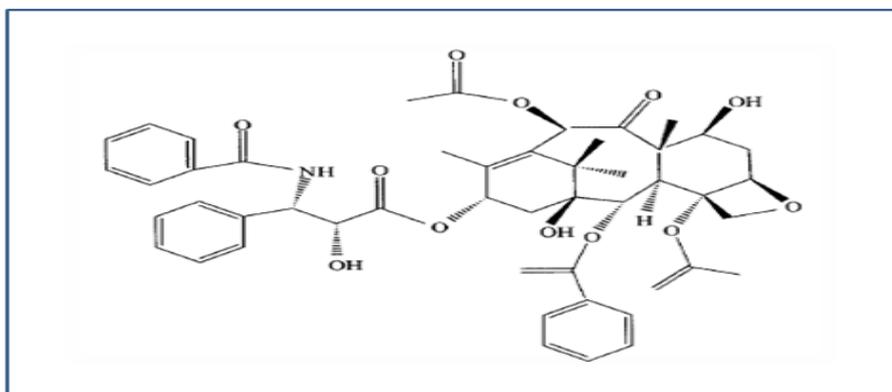


Figure 3: Structure chimique de paclitaxel (Strobel et Daisy, 2003).

Il est important de noter que le taxol se trouve à une très faible concentration dans l'écorce de certaines espèces du genre *Taxus*, espèces en voie de disparition qui se développe très lentement. En conséquence, l'extraction du taxol par les méthodes traditionnelles à partir de l'écorce de ces espèces est inadéquate et coûteuse pour l'environnement. Par exemple, la production de 1 kg de Taxol, suffisante pour traiter cinq cents patients, nécessite 10 tonnes d'écorce provenant de 300 arbres. Pour protéger les ressources limitées en if et réduire le coût

du traitement médicamenteux, la recherche de nouvelles sources de Taxol est toujours utile. Plusieurs nouvelles méthodes ont été utilisées pour la production de Taxol via la synthèse, la semi-synthèse, la culture de cellules de tissu végétal et la fermentation microbienne. En particulier, la fermentation microbienne a montré que l'isolement et l'identification des champignons endophytes producteurs de Taxol seraient une méthode très prospective et un moyen adéquat pour la production d'une grande quantité de Taxol.

Les souches de différents champignons tels que *Taxomyces etrenae*, *Pestalotiopsis microspora*, *Alternaria* sp., *Fusarium lateritium*, *F. solani*, *F. mairie*, *Periconia* sp., *Papulaspor* sp., *Cephalosporium* sp., *Ectostroma* sp. et *Botryodiplodia theobromae*, sont reconnues par leur potentielle de production du Taxol (El-Maali et al., 2018).

I.1.8.5. Champignons endophytes comme source de substance antioxydant

La pestacine et l'isopestacine ont été trouvés possédant des activités antioxydantes mais également antimicrobienne. La structure de l'isopestacine est similaire avec les flavonoïdes qui sont très reconnues par leurs activités antioxydantes (Figure 4). Le composé est capable de piéger les radicaux superoxydes et hydroxyles en solution.

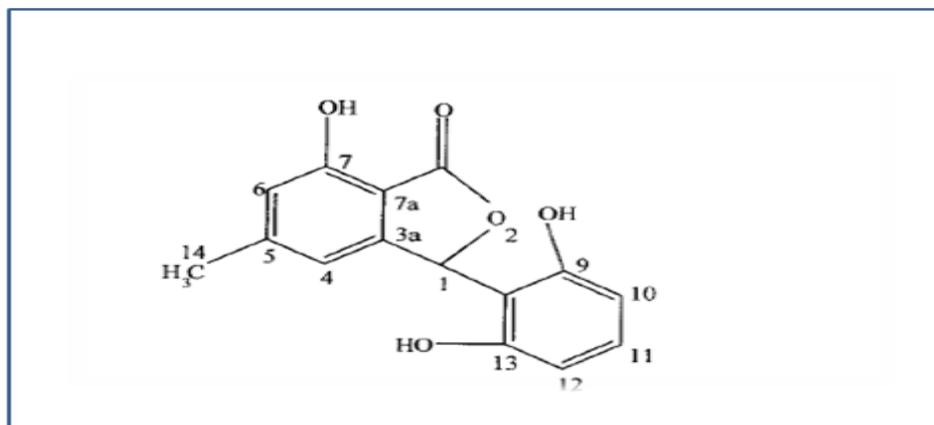


Figure 4: Isopestacine, un antioxydant produit par l'endophyte *Pestalotiopsis microspora* isolé à partir *Terminalia morobensis* (Strobel et Daisy, 2003).

La pestacine a été décrite plus tard à partir du même liquide de culture, se produisant naturellement et possédant également une activité antioxydante puissante (Figure 5). L'activité antioxydante de la pestacine est supérieure d'au moins une fois à celui du trolox, vitamine E comme molécule de référence (Strobel et Daisy, 2003).

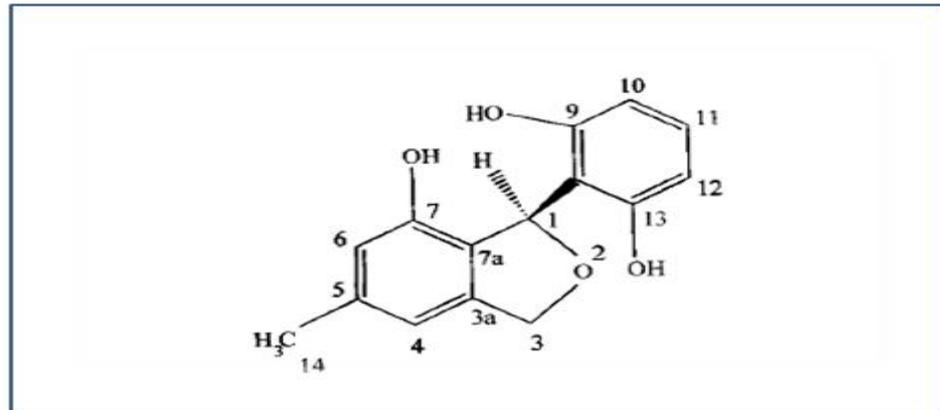


Figure 5: Pestacin un antioxydant produit par l'endophyte *P.microsporas* isolé à partir *T. morobensis* (Strobel et Daisy, 2003).

I.1.8.6. Les enzymes produites par les endophytes

Les champignons endophytes ont la capacité de produire des enzymes extracellulaires ; comme pectinase, cellulase, lipase, amylase, laccase et protéinases. Ces enzymes fongiques jouent un rôle dans la biodégradation et les processus d'hydrolyses qui sont des mécanismes importantes contre les infections et pour aboutir leur besoin nutritionnel de la plante hôte. (Sunitha *et al.*, 2013). Ils sont donc un intérêt biotechnologique élevé tels que dans le traitement des aliments, la fabrication de détergents, textiles, produits pharmaceutiques, traitement médical et en biologie moléculaire, comme par exemple les *Penicillium* (Maria *et al.*, 2005).

Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel microbien

Le matériel microbien comprend des bactéries pathogènes provenant de l'hôpital universitaire de Sétif et des champignons phytopathogènes ainsi qu'une levure provenant du laboratoire de microbiologie de l'université de Bordj Bou Arréridj.

Six bactéries à Gram positif: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis*, *Microbacterium yannicii*, six à Gram négatif: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae* et une levure *Candida albicans*.

Les champignons phytopathogènes: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis*, *Alternaria* sp..

II.1.2. Produits chimiques

- KH_2PO_4 , MgSO_4 , Na_2HPO_4 , NH_4Cl .
- Tween 80, Tween 20.
- Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Agar, Chlorure de sodium (NaCl).
- Amidon ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) n, Sucrose.
- Peptone, l'eau peptonée.
- Extrait de levure, extrait de malt.
- Les milieux de culture solides: Gélose nutritive (GN), Sabouraud dextrose agar (SDA).
- Les solvants: N-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle.
- Diméthylsulfoxyde (DMSO).

II.2. Méthodes

II.2.1. Echantillonnage et isolement

L'isolement du champignon endophyte *penicillium* sp. a été réalisé par Mr. SADRATI Nouari.

II.2.2. Dépistage initial de l'activité antimicrobienne

II.2.2. 1.Préparation des microorganismes tests

Le dépistage de l'activité antibactérienne du champignon endophyte *Penicillium* sp. a été réalisé en utilisant quatre bactéries pathogènes, deux à Gram positif: *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et deux à Gram négatif: *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Pour tester l'activité antifongique de ce champignon endophyte, trois espèces fongiques ont été utilisées: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis*, *Alternaria* sp..

Chaque bactérie a été cultivée sur gélose nutritive à 37°C pendant 24 h et diluée jusqu'à ce que la concentration atteigne les 10⁸ UFC / ml par spectrophotométrie (DO = 0,08-0,1 à 625 nm) (Sadrati et al., 2013). Les champignons ont été mis à croître sur du PDA pendant une dizaine de jours (Zerroug et al., 2018).

II.2.2.2. Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne du champignon endophyte, deux méthodes ont été utilisées. La première est la technique de diffusion sur gélose pour l'activité antibactérienne, et la deuxième technique est celle de la double culture pour l'activité antifongique.

L'activité antibactérienne du champignon endophyte (**Figure 7**) a été réalisée selon le protocole expliqué par (Powthong et al., 2013), avec quelques modifications. En bref, des cultures pures du champignon endophyte ont été cultivées à la surface du Potato dextrose agar (PDA) (Extrait de 200 g de pomme de terre Glucose 20 g, Agar 15 g, Eau distillée 1000 ml/ pH 5.6) à 28 ° C pendant 3 semaines (**Figure 6**).

Un petit disque de colonie fongique a ensuite été découpé (diamètre 6 mm) stérilement et placé sur la gélose nutritive préalablement inoculée par les bactéries pathogènes. Un disque

de PDA sans champignons a été utilisé comme contrôle négatif. Les boîtes de Pétri ont été mises ensuite dans le réfrigérateur à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion complète des composés antibactériens dans la gélose, puis ces boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant les zones d'inhibition produites par les disques du champignon endophyte *Penicillium* sp. .



Figure 6: Culture pure du champignon endophyte cultivé sur (PDA) pendant 3 semaines.



Figure 7: Technique de diffusion sur gélose.

Pour le dépistage de l'activité antifongique, nous avons utilisé la technique de la double culture décrite par (Rahul et al., 2015). Elle consiste à mettre un disque de 6 mm de diamètre du champignon endophyte *Penicillium* sp. provenant d'une culture de 7 jours sur une boîte de Pétri contenant du PDA, ensuite un autre disque du même diamètre du champignon pathogène est mis à l'autre extrémité de la boîte avec une distance de 50 mm entre les deux disques. Chaque boîte ainsi que la boîte contrôle qui ne contient pas l'endophyte ont été

incubés à 28°C. Après sept jours d'incubation, le rayon de chaque champignon pathogène est mesuré dans le sens du champignon endophyte, ainsi que dans les boîtes contrôles (Nuangmek et al., 2008; Orole et Adejumo, 2009; Ting et al., 2009). Le pourcentage d'inhibition est ensuite calculé par la formule suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

Où :

R1: La croissance radiale de l'agent pathogène dans le contrôle

R2: La croissance radiale de l'agent pathogène en double culture

II.2.3. Sélection du milieu de culture approprié

Pour sélectionner le meilleur milieu permettant une meilleure production et une activité antimicrobienne maximale, le champignon endophyte a été cultivé sur la surface de différents milieux de culture PDA, Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Yeast Extract Sucrose Agar (YES), Malt Extract Agar (MEA), et Yeast Malt Extract Agar (YMEA) puis incubé à 28°C pendant 3 semaines (Zerroug et al., 2018).

La méthode de diffusion sur gélose a été réalisée comme décrit ci-dessus contre quatre bactéries pathogènes, deux à Gram positif: *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et deux à Gram négatif: *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

II.2.4. Fermentation et extraction

Le champignon endophyte a été cultivé sur le milieu liquide sélectionné (MEB) et deux milieux de culture solide, au son de riz et au son de blé, en inoculant deux disques d'agar (6 mm) de la culture fongique pure en croissance active dans des Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu liquide MEB, ou du milieu solide au son de riz (2g) ou au son de blé (2g) humidifiés par 7ml d'eau distillée. Tous les Erlenmeyer ont été incubés ensuite pendant 21 jours à 28 ± 2°C.

Pour le MEB, le mycélium fongique a été séparés du filtrat à l'aide d'un papier filtre Whatman (Zerroug1 et al., 2018).

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction, trois solvants organiques ont été utilisés, le n-hexane, le chloroforme et l'acétate d'éthyle. La méthode d'extraction a été réalisée en utilisant la méthode expliquée par (**Saraswaty et al., 2013**) avec quelques modifications. En bref, le filtrat obtenu après fermentation liquide a été extrait avec un volume égal de l'acétate d'éthyle. La solution a ensuite été agitée pendant 30 min. La phase de l'acétate d'éthyle a ensuite été séparée par décantation. La phase aqueuse restante a été ré-extraite à nouveau par les autres solvants en utilisant la même méthode.

En milieu solide (son de riz et son de blé), la méthode d'extraction a été réalisée sur la base de la méthode expliquée par (**Dos Santos et al., 2015**) avec quelques modifications. Les milieux solides ont été mélangés avec un 100 ml d'acétate d'éthyle, après agitation pendant 1h, la phase organique a été récupérée par filtration. La phase solide restante a été extraite à nouveau par les autres solvants de la même manière. Toutes les phases organiques ont été séchées sous la hotte et redissoutes dans le DMSO et maintenues à 4 ° C.

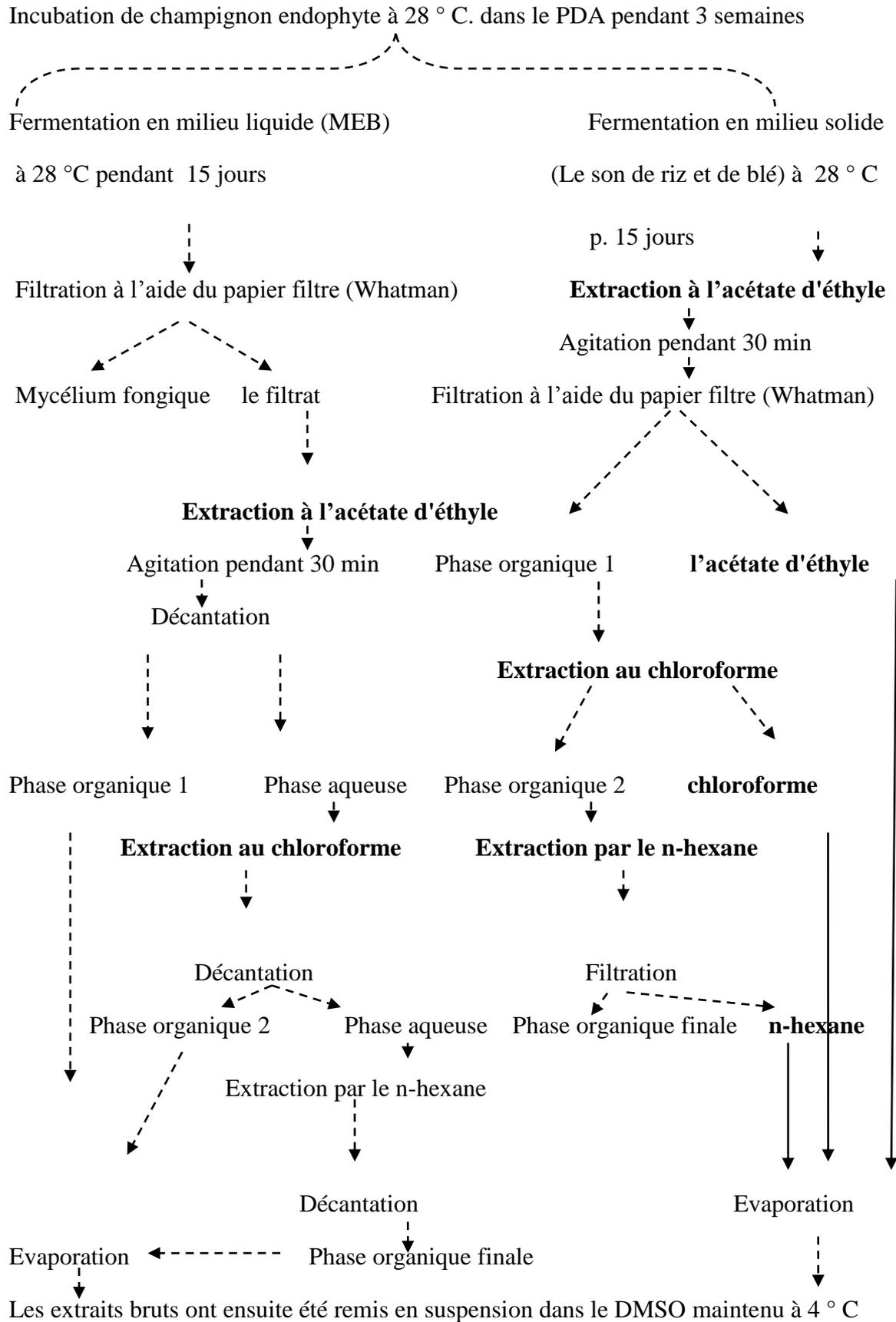


Figure 8: Le protocole d'extraction des métabolites secondaires du champignon endophyte en milieu solide et en milieu liquide.

II.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits bruts

- **Méthode des puits**

Les extraits ont été testés afin d'évaluer leur activité antimicrobienne en utilisant la méthode des puits (**Fatima et al. 2016**) contre quatre bactéries; *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* et trois champignons phytopathogènes; *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis*, *Alternaria* sp. .

Après une analyse statistique, le solvant donnant la meilleure activité a été testé contre 12 bactéries pathogènes pour l'homme: *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, (SARM) *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Microbacterium yannicii*, la levure *Candida albicans* et trois champignons phytopathogènes *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis*, *Alternaria* sp. .

Les suspensions bactériennes, de levure et sporales ont été normalisées pour avoir une charge d'environ 10^8 UFC/ml, pour les bactéries et de 10^4 UFC/ ml pour la levure et 10^6 spore/ ml pour les champignons filamenteux à l'aide du spectrophotomètre (**Devaraju et Satish, 2011**).

Les bactéries, la levure et les champignons filamenteux ont ensuite été inoculées sur la surface de GN, SDA et PDA respectivement. 30 µl de chaque extrait a été versé dans des puits préalablement formés dans la gélose de chaque milieu (diamètre de 6 mm). Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif. Après une incubation à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et 48 heures pour la levure et à 28°C pendant 72 heures pour les champignons filamenteux, le diamètre de chaque zone a été mesuré et utilisée comme indicateur d'activité antimicrobienne (**Zerroug et al., 2018**).

II.2.6. Activité enzymatique

La production des enzymes extracellulaires par le champignon endophyte a été évaluée en se basant sur la digestion du substrat d'enzyme dissout dans la couche gélosée des milieux. Les diamètres des zones de l'activité enzymatique entourant la colonie et ceux des colonies fongiques ont été mesurés après une incubation à 28°C pendant 24 à 96 heures.

L'index enzymatique (IE) s'exprimant par la relation entre le diamètre moyen du halo de dégradation et le diamètre moyen de la colonie a été calculé (Maria *et al.*, 2005 ; Carrim *et al.*, 2006).

II.2.6.1. Activité estérasiques

Pour tester l'activité estérasiques, le milieu utilisé est le PAM (Peptone Agar Medium) contenant du Tween 80 (Annexe 1) comme substrat ajouté au milieu à raison de 1 ml pour 100 ml du milieu. L'activité estérasiques est déterminée par la présence d'une zone claire autour de la colonie (Ananda *et al.*, 2012).

II.2.6. 2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique de la souche fongique *Penicillium* sp. a été effectuée sur le milieu de culture qui contient: l'extrait de levure 2.5 g /l; glucose 1g/l et agar 15g/l, PH 7 et autoclavée pendant 20 min à 121°C, supplémenté de 100 ml de solution de lait écrémé à 5% stérilisée séparément à 110°C pendant 10 min. Après 48 h à 30°C, les halos claires autour des colonies ont été mesurés (Sunitha *et al.*, 2013).

II.2.6. 3. Activité cellulolytique

La présence de la cellulase est révélée par le repiquage *Penicillium* sp. sur le milieu de carder (1986) contenant: KH_2PO_4 3g/l, Na_2HPO_4 6 g/l, NH_4Cl 1g/l, NaCl 0.5g/l, extrait de levure 3g/l, cellulose 7g/l, agar 15g/l. La suspension sporale a étéensemencée par la méthode des spots. Après la fin de l'incubation, une solution de lugol (Annexe 2) a été dispersée sur toute la surface du milieu. Après 5 min, l'activité cellulolytique est déterminée par la présence d'une zone claire autour de la colonie.

II.2.6. 4. Activité lipolytique

La même méthodologie décrite déjà précédemment pour évaluer l'activité estérasiques a été utilisée pour déterminer l'activité lipolytique. Cependant, pour cette activité, le Tween 80 a été remplacé par le Tween 20. La présence d'un halo claire autour des colonies est l'indice de la présence de cette activité (Carrim *et al.*, 2006).

II.2.7 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 (one-way ANOVA) suivie de celui de Student-Newman-Keulsmultip-rang test afin de comparer les moyennes des zones d'inhibition et les index enzymatiques.

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD, (n=3), La différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est ≤ 0.05 .

Résultats et discussion

III.1. Dépistage initial de l'activité antimicrobienne

Le champignon endophyte a été dépisté pour son pouvoir antimicrobien, pour cela deux méthodes ont été utilisées. La première est la technique de diffusion sur gélose pour l'activité antibactérienne, et la deuxième est la technique de la double culture pour l'activité antifongique.

Pour la première, L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant les zones d'inhibition produites par le champignon endophyte après 24 heures d'incubation (**Figure 10**) et les moyennes de celles-ci figurent dans la **figure 9**.

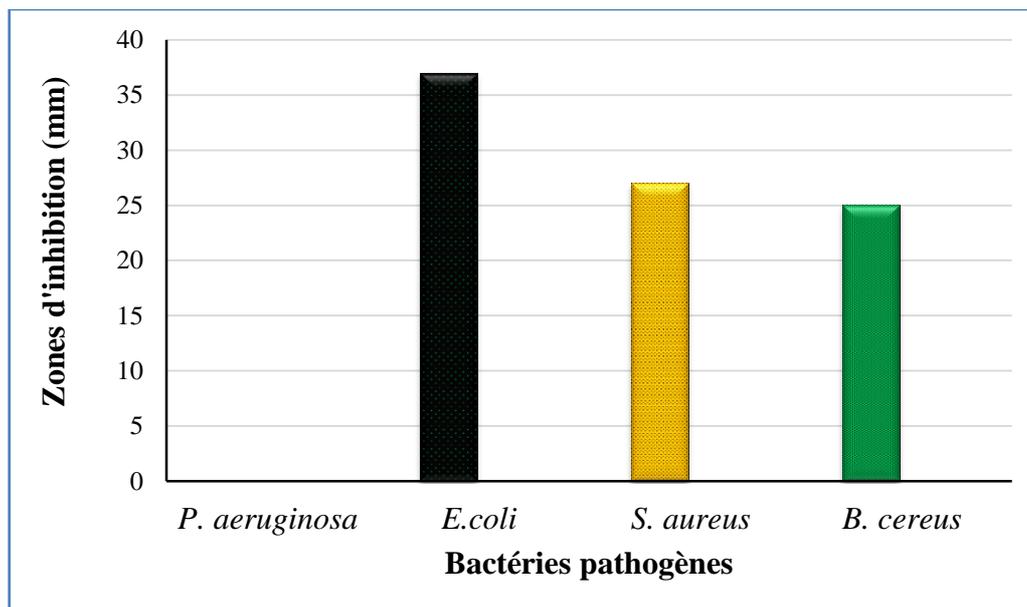


Figure 9: Zones d'inhibition des bactéries pathogènes par le champignon endophyte.

P: *Pseudomonas*; *E:* *Escherichia*; *S:* *Staphylococcus*; *B:* *Bacillus*.

Selon les résultats de ce dépistage, le champignon endophyte *penicillium* sp. a montré une activité maximale contre *E. coli* ATCC 25922 avec une zone d'inhibition de 37 mm suivi par *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 10876 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec des zones d'inhibition de 27, 26 et 0 mm respectivement.

Escherichia coli était la bactérie la plus sensible, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* était la plus résistante.

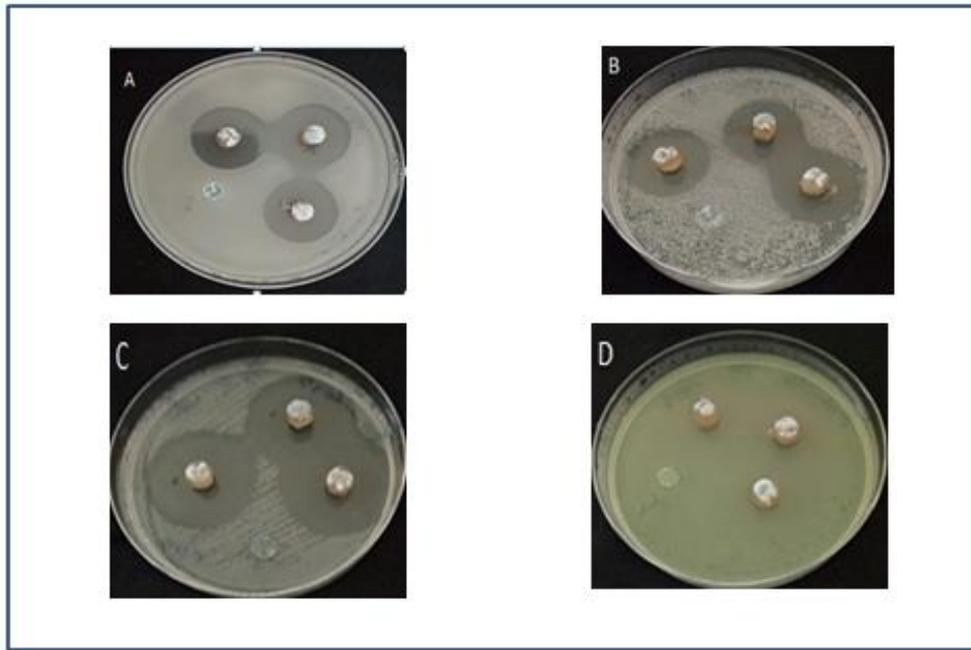


Figure 10: Le dépistage de l'activité antibactérienne du champignon endophyte contre quatre bactéries pathogènes. **A:** *Bacillus cereus* ATCC 10876 et **B:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et deux bactéries à Gram négatif: **C:** *Escherichia coli* ATCC 25922 et **D:** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Pour l'activité antifongique, après 8 jours d'incubation le rayon de chaque champignon pathogène est mesuré dans le sens du champignon endophyte, ainsi que dans les boîtes contrôles

Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant les moyennes des rayons des champignons phytopathogènes, les résultats figurent dans **le tableau II.**

Tableau II: Pourcentages d'inhibition de la croissance des trois champignons phytopathogènes en double culture.

Endophyte	Pourcentage d'inhibition (%)		
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium oxysporium</i> fs. <i>Albedinis</i>	<i>Alternaria</i> sp.
	23,53	25	46,85

D'après les résultats obtenus, on constate que le *Penicillium* sp. a montré des faibles pourcentages d'inhibition contre les deux champignons pathogènes *Aspergillus niger* (23,53%) et *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis* (12.5 %). Par contre le pourcentage d'inhibition d'*Alternaria* sp. était modéré (46,85 %) (**Figure 11, 12, 13**).

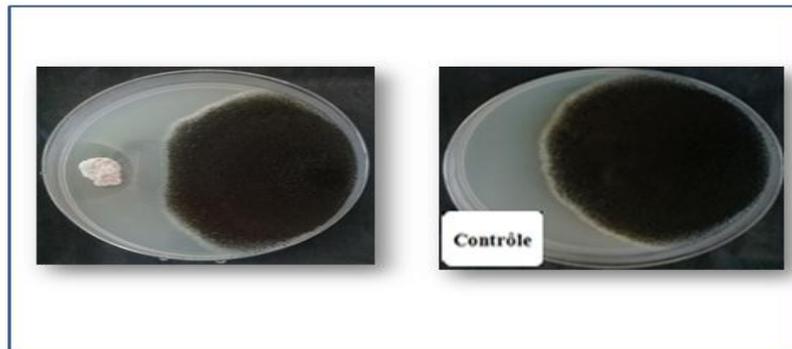


Figure 11: Activité antifongique de *Penicillium* sp. contre *Aspergillus niger*.

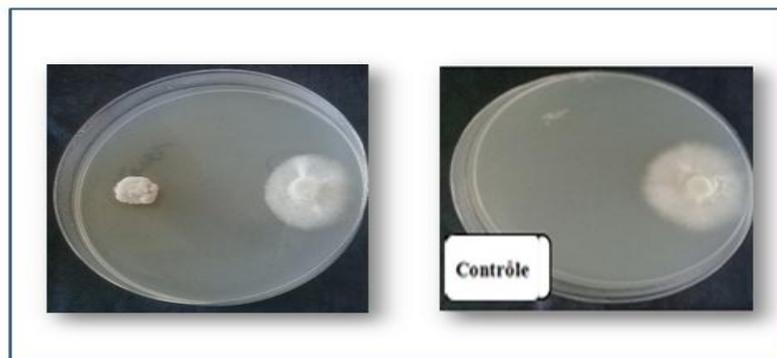


Figure 12: Activité antifongique de *Penicillium* sp. contre *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis*.



Figure 13: Activité antifongique de *Penicillium* sp. contre *Alternaria* sp..

Ces résultats concordent avec ceux obtenus antérieurement par (Strobel *et al.*, 2004; Pimentel *et al.*, 2011). Selon lesquels les champignons endophytes isolés de différentes plantes peuvent avoir une activité antimicrobienne, ils inhibent une grande variété de microorganismes nocifs pour l'homme, les animaux et les plantes par la production de métabolites secondaires.

Le champignon endophyte *Penicillium* sp. a montré une activité antimicrobienne contre les espèces bactériennes et les champignons utilisés, cette activité peut être due à la sécrétion par ce dernier des molécules actives dans le milieu de culture.

III.2. Sélection du milieu de culture approprié

Pour l'optimisation de la production des molécules bioactives du champignon endophyte *Penicillium* sp., cinq milieux différents PDA, SDA, YES, MEA, YMEA ont été utilisés. D'après l'analyse statistique des résultats obtenus (Figure 14), le MEA était le meilleur milieu donnant une production maximale des composés bioactifs antibactériens avec une moyenne des zones d'inhibition de 24.5 mm suivie par le PDA et le YMEA avec des moyennes des zones d'inhibition de 22.5 mm et 22.25 mm respectivement. Le milieu YES vient en troisième position (7.75 mm). Par contre pour le SDA, aucune zone n'a été remarquée. La meilleure activité a été observé contre *Escherichia coli* ATCC 25922 pour les quatre milieux (PDA, SDA, YES, MEA) avec des zones d'inhibition de 35, 33, 37, 34, et 17.9 mm respectivement, par contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 était toujours la plus résistante (Figure 15).

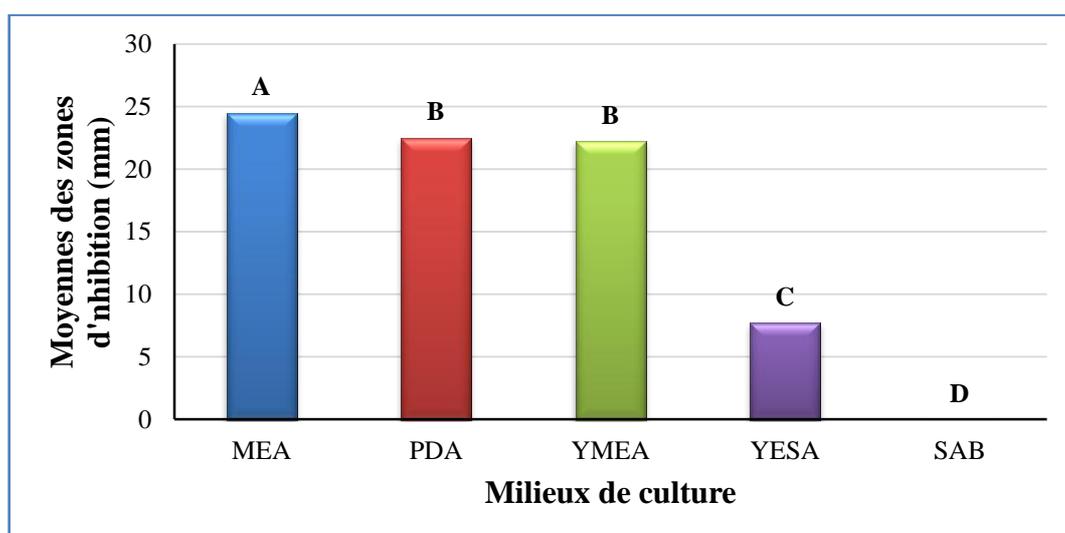


Figure 14: Les moyennes des zones d'inhibitions du champignon endophyte *Penicillium* sp. obtenus sur les cinq milieux différents PDA, SDA, YES, MEA, YMEA.

Les données sont présentées en moyenne \pm SD, les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes.

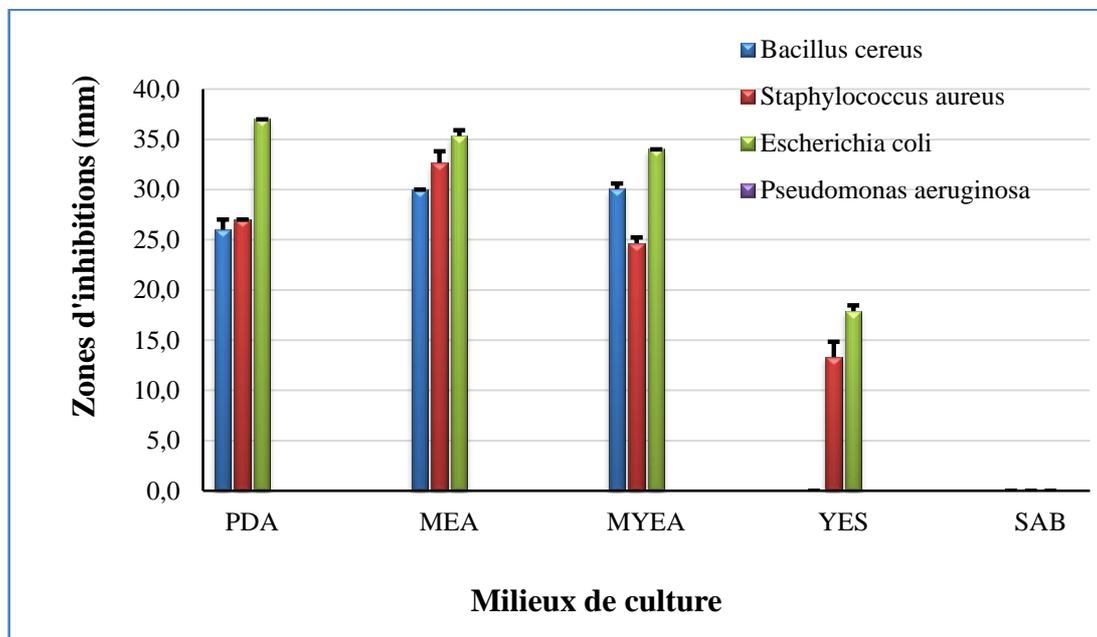


Figure 15: Effet des différents milieux de culture sur l'efficacité de l'activité antibactérienne de *Penicillium* sp. .

Anwar et Iqbal (2017), ont étudié l'effet de la croissance sur la production et l'activité antibactérienne. Ils ont suggéré que les métabolites secondaires sont fortement affectés par la composition du milieu de croissance et que l'amidon était la source de carbone permettant au champignon endophyte la production de la plus grande quantité de molécules bioactives suivie par le glucose. Ces résultats expliquent ce qu'on a obtenu avec le MEA et le PDA qui contiennent des concentrations importantes de glucose et d'amidon nécessaires à la production des molécules actives. Les mêmes résultats ont été obtenus avec (**Mathan et al., 2013**).

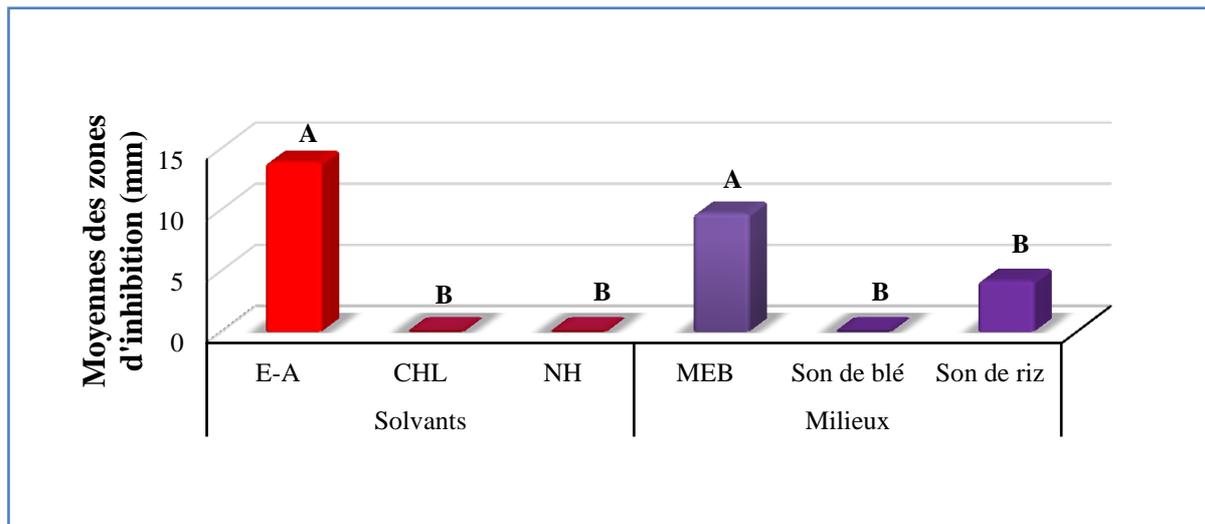
La nature du milieu de culture, la composition chimique ainsi que d'autres facteurs comme la température, le pH, la durée d'incubation, etc. influencent aussi la quantité et la qualité des molécules bioactives synthétisés par les champignons (**Nancy et Geoffrey, 2012**).

Tableau III: Les zones d'inhibition du champignon endophyte sur les cinq milieux utilisés PDA, SDA, YES, MEA, YMEA.

	PDA	MEA	YMEA	YES	SAB
<i>Bacillus cereus</i>					
<i>Staphylococcus aureus</i>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
<i>Escherichia coli</i>					

III.3. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits bruts

Après la fermentation et l'extraction à l'aide du n-hexane, chloroforme et acétate



d'éthyle. Les extraits ont été testés pour leur activité antimicrobienne en utilisant la méthode des puits contre quatre bactéries: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* et trois champignons phytopathogènes, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis* et *Alternaria* sp.. Les moyennes d'inhibition sont résumées dans la **figure 16 et le tableau IV**

Figure 16: Choix de type du milieu et du solvant.

Selon les résultats de la **Figure 16**, les extraits ont présenté différents degrés d'activité antimicrobienne contre les agents pathogènes testés. L'activité antibactérienne a montré que le milieu liquide MEB était le meilleur milieu de fermentation par rapport aux autres milieux solides (son de riz et son de blé), avec une moyenne d'inhibition de 9,66 mm indiquant une bonne production des métabolites secondaires. L'acétate d'éthyle était le meilleur solvant d'extraction permettant l'extraction des molécules bioactives produites par le champignon (une moyenne d'inhibition de 13,83 mm) par rapport à l'n-hexane et le chloroforme. Ceci peut être expliqué par le fait que les molécules bioactives produites par ce champignon sont mieux extraites par l'acétate d'éthyle et donc sont plus polaires.

Ces résultats correspondent à ceux obtenus par (**Tong et al., 2014**) où les composés antimicrobiens de *Phomopsis* sp., le champignon endophyte de la plante médicinale *Orthosiphon stamineus* étaient principalement présents dans l'extrait d'acétate d'éthyle. Une autre étude a montré que les extraits de l'acétate d'éthyle de deux champignons endophytes

isolés de *Ocimum citriodorum* Vis. ont une meilleure activité que les autres extraits (Mu'azzam et al., 2015).

Tableau IV: Activité antifongique de l'extrait de l'acétate d'éthyle, n-hexane et le chloroforme.

Milieux de culture	Solvants	Zones d'inhibition (mm)		
		<i>Fusarium oxysporium</i> fs. <i>Albedinis</i>	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>
MEB	Acétate d'éthyle	54	15	20
	Chloroforme	0	0	0
	n-hexane	0	0	0
	DMSO	0	0	0
Son de riz	Acétate d'éthyle	0	26	0
	Chloroforme	0	0	0
	n-hexane	0	0	0
	DMSO	0	0	0
Son de blé	Acétate d'éthyle	0	0	0
	Chloroforme	0	0	0
	n-hexane	0	0	0
	DMSO	0	0	0

Selon les résultats du **tableau IV**, l'extrait d'éthyle acétate a inhibé fortement le *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis* avec une zone d'inhibition de 54 mm suivie de *Aspergillus niger* et *Alternaria* sp. avec des zones d'inhibition de 20 mm et 15 mm respectivement sur le milieu liquide MEB, et 26 mm contre *Alternaria* sp. pour le milieu solide au son de riz, par contre aucun effet sur le milieu son de blé a été remarqué, pour les extraits chloroformiques et de l'n-hexane aucun effet sur la croissance des trois champignons phytopathogènes.

Plusieurs études signalent que des champignons endophytes isolés de différentes plantes peuvent avoir une activité antimicrobienne, ils inhibent une grande variété de microorganismes nocifs pour l'homme, les animaux et les plantes par la production des métabolites secondaires (Strobel et al., 2004; Pimentel et al., 2011). C'est le cas pour les 40% et 50% d'endophytes isolé a partir de *Acanthus ilicifolius* L. et *Acrostichum aureum* L. Maria et al. (2005), ont montré une activité contre des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et même contre des champignons pathogènes. Park et al. (2005), ont aussi montré l'activité antifongique des endophytes isolés à partir de plusieurs plantes de Corée.

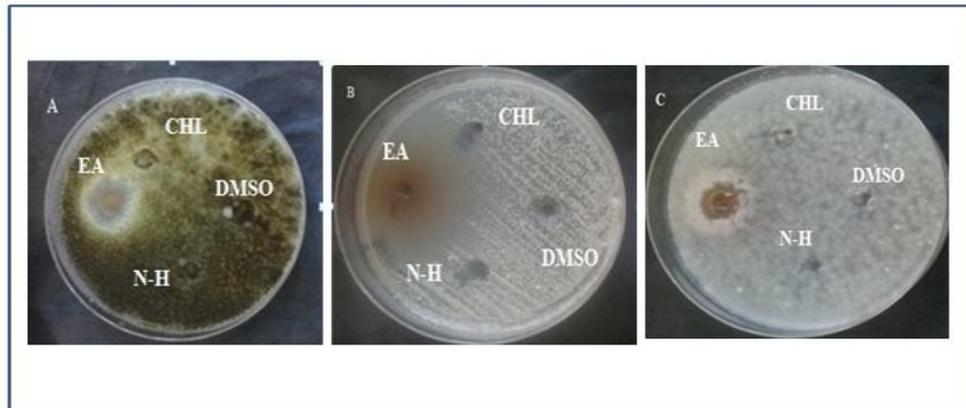


Figure 17: Les zones d'inhibition de l'extrait de l'acétate d'éthyle contre les trois champignons phytopathogènes: **A:** *Aspergillus niger*, **B:** *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis* et **C:** *Alternaria* sp..

L'activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle (**Figure 18**) a été examinée in vitro contre 12 bactéries *C. freundii*, *A. baumannii*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus*, SARM, *Micrococcus luteus*, *E. faecalis*, *M. yannicii*, une levure *C. albicans*.

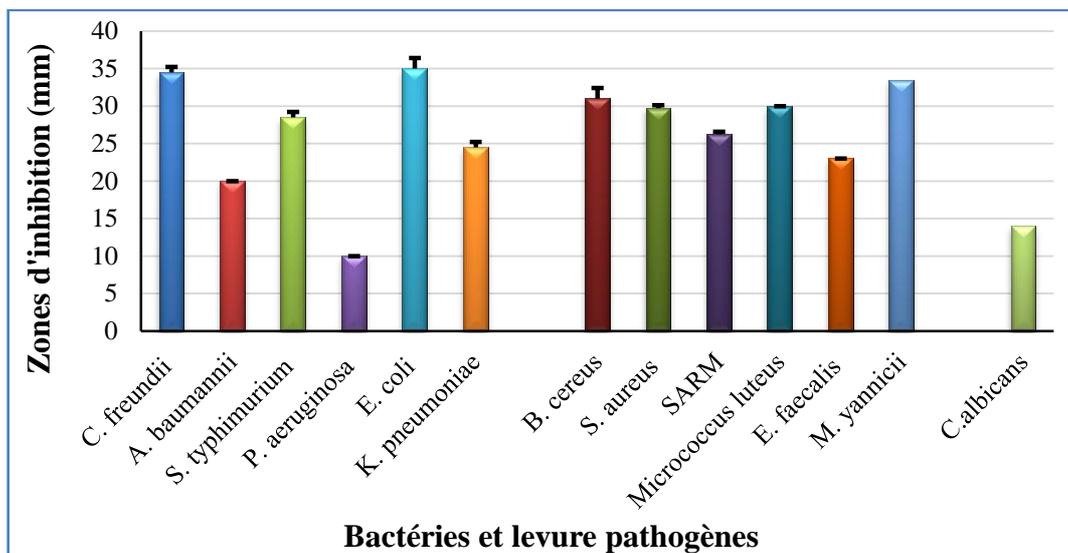


Figure 18: Activité antimicrobienne de l'extrait de l'acétate d'éthyle contre les bactéries et la levure pathogènes: **C:** *Citrobacter*; **A:** *baumannii*; **S:** *Salmonell*; **P:** *Pseudomonas*, **E:** *Escherichia*; **K:** *Klebsiella*; **B:** *Bacillus*; **S:** *Staphylococcus*; **SARM**: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline; *Micrococcus luteus*; **E:** *faecalis*; **M:** *Microbacterium*; **C:** *Candida*.

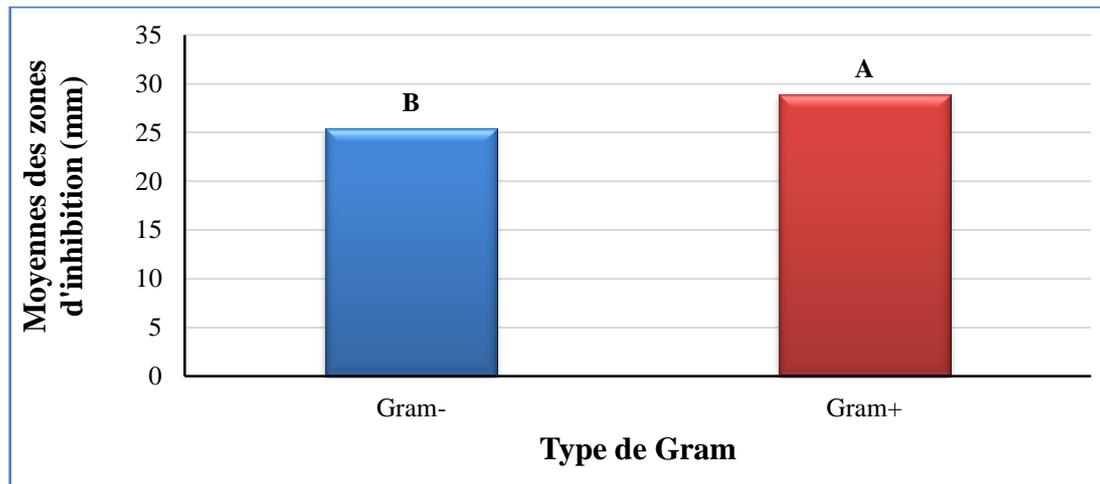


Figure 19: Comparaison de l'effet de l'extrait de l'acétate d'éthyle contre les bactéries à Gram+ et à Gram-.

L'extrait brut d'éthyle acétate de *Penicillium* sp. a montré une meilleure activité contre les bactéries à Gram positif, avec une moyenne d'inhibition de 28.91 mm par rapport aux bactéries à Gram négatif (25.41 mm) (**Figure 19**).

Pour les bactéries à Gram négatif, l'extrait d'acétate d'éthyle a inhibé fortement *E. coli* et *C. freundii* (aucune différence significative avec des zones d'inhibition de 35 mm et 34.5 mm respectivement), suivie de *S. typhimurium*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa*. avec des moyennes des zones de 28.5, 24.5, 20 et 10 mm, respectivement (**Figure 18**).

Pour les bactéries à Gram positif, l'extrait d'acétate d'éthyle a inhibé fortement la bactéries *M. yannicii* avec une zone d'inhibition de 33.5 mm, suivie par *B. cereus* (31 mm) et *S. aureus*, *M. luteus* (aucune différence significative avec des zones d'inhibition de 29.75 mm et 30 mm, respectivement), enfin SARM, *E. faecalis* et la levure *C. albicans* avec des zones d'inhibition 26.25, 23 et 14 mm respectivement (**Figure 18**).

Nos résultats ont montré que les activités antibactériennes variaient selon les espèces bactériennes. Cette variation peut être due aux différences génétiques entre les bactéries (**Jouda et al., 2016**), et à la différence morphologique, car les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharide portant les composant structurel lipopolysaccharides, ceci rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif, qui sont plus sensibles car ils ont

seulement une couche de peptidoglycane extérieure qui n'est pas une barrière de perméabilité efficace (Kumara *et al.*, 2010).

III.4. Détermination de l'activité enzymatique

Après la durée d'incubation, les résultats (Figure 20) ont montré que les index enzymatiques (IE) du champignon endophyte *Penicillium* sp. pour l'activité lipolytique et l'activité estérasique sont trop élevés (4,14 et 3,32) respectivement. Par contre les activités de cellulase et protéase étaient modérées avec un IE de 2,79 et 1,50 respectivement.

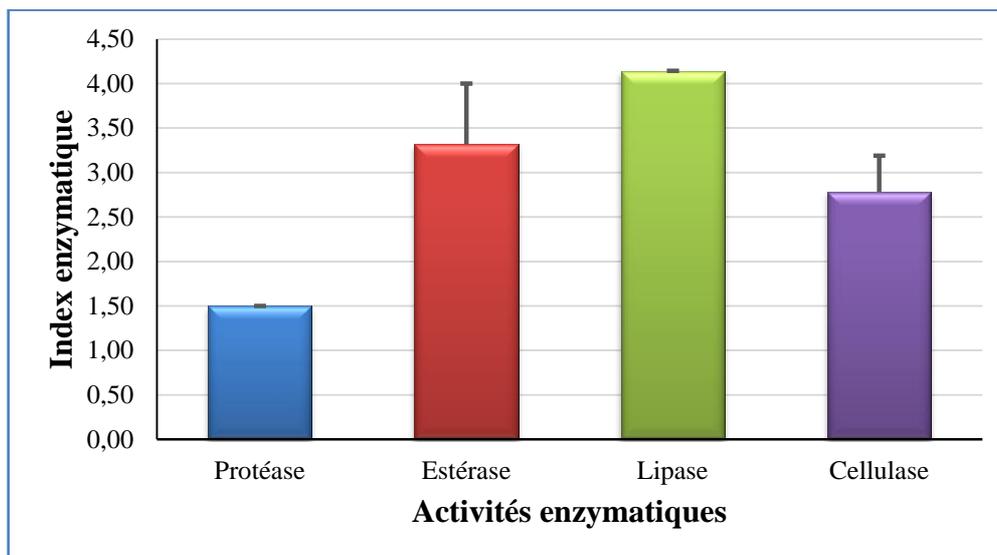


Figure 20: La production des enzymes extracellulaires (lipase, estérase, cellulase et protéase) par l'endophyte *Penicillium* sp..

La production d'enzymes diffère en fonction des champignons et correspond souvent à des exigences de son habitat. Cela peut être dû à de nombreux facteurs changeants dans l'hôte comme l'âge, les facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques et la situation géographique pouvant influencer la biologie des champignons (Sunitha *et al.*, 2013).

Les enzymes microbiennes ont un intérêt biotechnologique élevé, dans le traitement des aliments, la fabrication de détergents, textiles, produits pharmaceutiques, traitement médical et en biologie moléculaire (Maria *et al.*, 2005).

Selon les travaux de Choi *et al.* (2005); Sunitha *et al.* (2013) et Selim *et al.* (2012), les champignons endophytes sont parmi les microorganismes qui produisent des hydrolases extracellulaires pour résister à l'invasion des pathogènes et pour assurer la nutrition de l'hôte.

Ces enzymes sont essentielles au système métabolique de ces champignons endophytes car elles leur permettent d'envahir et de coloniser les tissus végétaux.

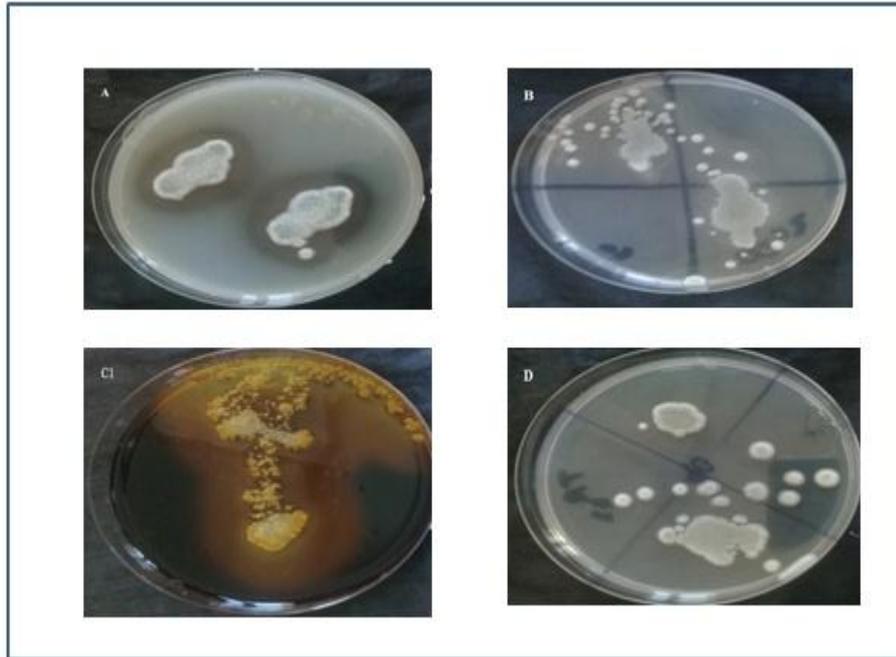


Figure 21: La production d'enzymes extracellulaires par l'endophyte *Penicillium* sp. **A:**Activité protéolytique, **B:** Activité estérasique, **C1:** Activité cellulolytique après révélation au lugol, **D:** Activité lipolytique.

Conclusion

Conclusion

Les endophytes sont un groupe de microorganismes qui représente une source abondante de nouveaux produits naturels bioactifs pouvant être exploités dans une grande variété de domaines médical, agricole et industriel.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'activité antimicrobienne et enzymatique du champignon endophyte *Penicillium* sp. isolé à partir d'une plante médicinale.

Lors du dépistage préliminaire, le champignon endophyte *Penicillium* sp. a été sélectionné car il a présenté une bonne activité antimicrobienne. Cette dernière a été confirmée après fermentation et extraction, et où le milieu liquide MEB était le meilleur milieu donnant une meilleure activité par rapport aux milieux solides (son de riz et son de blé), avec une moyenne d'inhibition de 9,66 mm montrant une bonne production des métabolites secondaires.

L'acétate d'éthyle était le meilleur solvant pour l'extraction des substances bioactives avec une moyenne d'inhibition de 13,83 mm. L'extrait de ce solvant avait une activité inhibitrice sur tous les microorganismes pathogènes testés, avec une plus grande activité observée contre les bactéries à Gram positif par rapport à celle obtenue contre les bactéries à Gram négatif, due à leurs différences génétiques et morphologique au niveau de leur paroi cellulaire.

L'étude de l'activité enzymatique du champignon endophyte étudié a montré la capacité de ce dernier à produire des enzymes extracellulaires, avec une plus grande activité lipolytique et estérasique que les activités cellulase et protéolytique.

Il est recommandé dans les futures études de réaliser des travaux plus approfondis qui auront pour objectifs:

- La recherche de l'activité antimicrobienne de l'endophyte sur d'autres souches pathogènes référencées et multirésistants.
- La purification des molécules produites par le champignon endophyte.
- La détermination de la structure des composés actifs.
- Optimisation de la production enzymatique et les molécules antimicrobiennes par ce champignon endophyte.

Références

Références

- **Alva. P., Mckenzie. E. H. C, Pointing. S. B, Pena-Muralla, Hyde.R. K. D. (2002).** Do sea grasses harbor endophytes?. *Fungal Diversity Research Series* **7**, 167-178.
- **Ananda. K, Sathish.L, Pavithral. N. (2012).** Antimicrobial and Enzyme Activity of Endophytic Fungi Isolated from Tulsi **16**,12.
- **Anwar J, Iqbal Z. (2017).** Effect of growth conditions on antibacterial activity of *Trichoderma harzianum* against selected pathogenic bacteria. *Sarhad Journal of Agriculture* **33(4)**, 501-510.
- **Arnold AE. (2007).** Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* **21**, 51–66.
- **Beatriz d S. S., Taidés T. d. S. (2017).** Endophytic fungi in economically important plants: ecological aspects, diversity and potential biotechnological applications. *J. Bioen. Food Sci.* **v.4, n.2**, 113-126.
- **Carrim A. J. I., Barbosa E. C. and Vieira J. D. G. (2006).** Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**, 353-359.
- **Carroll, G. C. (1986).** The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. - In: Fokkema, N.J. and van den Heuvel, J. (eds), *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 205- 222.
- **Carroll G. (1988).** Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **69**, 2–9.
- **Choi. Y. W, Hodgkiss. I. J And Hyde. K. D. (2005).** Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology* **1**, 55-66.
- **Clay K. (1988).** Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**, 10–16.
- **Clay K. (1990).** Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecological Systematics* **21**, 275–297.
- **De Barry, A. (1866).** Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten. **Vol. II**, - Hofmeister's Hand- book of Physiological Botany, Leipzig.

- **Desprez-Loustau M-L, Marcais B, Nageleisen L-M, Piou D, Vannini A. (2006).** Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annual Review of Forest Science* **63**, 597–612.
- **Devaraju R. and Satish S. (2011).** Endophytic fungi: 'Trapped' or 'hidden' store houses of bioactive compounds within plants. Review. *Journal of Pharmacy Research* **3**, 2986-2989.
- **Dos Santos I.P., da Silva L.C., da Silva M.V., de Araújo J.M., Cavalcanti Mda.S., Lima V.L. (2015).** Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). *Front. Microbiol* **6**, 350.
- **El-Maali NA, Mohrram AM, El-Kashef H, Gamal K. (2018).** Novel resources of Taxol from endophytic and entomopathogenic fungi: Isolation, characterization and LC-Triple mass spectrometric quantification **1, 190**, 466-474.
- **Fatima N, Mukhtar U, Ul-Haq I, Qazi MA, Jadoon M, Ahmed S. (2016).** Biological evaluation of endophytic fungus *Chaetomium* sp. NF15 of *Justicia adhatoda* L. A potential candidate for drug discovery. *Jundishapur Journal of Microbiology* **9**, e29978.
- **Frohlich. J, Hyde. K. D and Petrini. O. (2000).** Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* **104**, 1202-1212.
- **Fujimura K. E., Egger K. N. and Henry G. H. (2008).** The effect of experimental warming on the root-associated fungal community of *Salix arctica*. *International Society for Microbial Ecology Journal* **2**, 105-114.
- **Funk CR, White RH, Breen JP. (1993).** Importance of *Acremonium* endophytes in turfgrass breeding and management. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **44**, 215–232.
- **Gary A. Strobel (2002).** Rainforest Endophytes and Bioactive Products. *Critical Reviews in Biotechnology* **22(4)**, 315–333.
- **Gary Strobel and Bryn Daisy (2003).** Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 4491-502.
- **George C. (1998).** Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology* **69**, 2-9.
- **Gonthier P., Gennaro M. and Nicolotti G. (2006).** Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity* **21**, 69-80.

- **González-Bello C. (2017).** Antibiotic Adjuvants – A Strategy to Unlock Bacterial Resistance to Antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.027> .
- **Hammerschmidt R. (1999).** Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Annual Review of Phytopathology* **37**, 285-306.
- **Hawksworth, D. C., and A. Y. Rossman (1987).** Where are the undescribed *Phytopathology* **87**, 888-891.
- **Higgins.K.L., Arnold.A.E., Miadlikouska.J., Sarvate.S.D., Nlutzoni.F. (2007).** Phylogenetic relationships, host affinity and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Mol.phyl.and Evol.* **42**, 543-555.
- **Hoffman M. T. and Arnold A. E. (2008).** Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research* **112**, 331-344.
- **Holliday P. (1998).** A Dictionary of plant pathology Cambridge University Press, Cambridge, U. K. **Book : A dictionary of plant pathology.** 1998 No.Ed. 2 pp.xxiv + 536 pp.
- **Jouda J-B., Tamokou J-d-D., Mbazoa CD., Sarkar P., Bag PK., Wandji J. (2016).** Anticancer and antibacterial secondary metabolites from the endophytic fungus *Penicillium* sp. CAM64 against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Afri Health, Sci* **16(3)**,734-743.
- **Kumara C. G., Mongollaa P., Josepha J., Nageswara Y. V. D. and Kamal A., (2010).** Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India . *Journal of Medical Mycology* **20**, 283-289.
- **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.
- **Maheshwari R. (2006).** What is an endophytic fungus. *Current Science* **90**, 1039.
- **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* **1**, 67-80.
- **Mathan S., Subramanian V., Nagamony S. (2013).** Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. *European Journal of Experimental Biology* **3(4)**, 138-144.

- **Min J., Ling C., Hai L., Cheng J. Z., Khalid R., Ting H. and Lu-Ping Q. A. (2016).** Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants. *Front. Microbiol* **7**, 906.
- **Monika S., and Rohit S. (2014).** Drugs and drug intermediates from fungi: Striving for greener processes. *Crit Rev Microbiol*, 1–17.
- **Moricca S. and Ragazzi A. (2008).** Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* **98**, 380-386.
- **Mu'azzam Kaar, Taufiq Mmj, Darah I. (2015).** Isolation and screening of antibacterial activity of endophytic fungi isolates from *Ocimum citriodorum* Vis. leaves. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **9(28)**, 155-161.
- **Müller CB and Krauss J. (2005).** Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 450–456.
- **Nancy P. Keller and Geoffrey Turner (2012).** *Fungal Secondary Metabolism. Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* **944**, DOI 10.1007/978-1-62703-122-6-3.
- **Nisa H., Kamili A. N., Nawchoo I. A., Shafi S., Shameem N. et Bandh S. A. (mai 2015).** Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review ». *Microb. Pathog.* **82**, 50-59.
- **Nuangmek. W., Mckenzie. E. H. C and Lumyong. S. (2008).** Endophytic fungi from wild banana (*Musa acuminata* Colla) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*. *Research Journal of Microbiology* **3**, 368-374.
- **Orole. O. And Adejumo. T. O. (2009).** Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research* **3**, 969-973.
- **Osbourn. A. E. (1999).** Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens, a commentary. *Fungal Genet Biol* **26**, 163-168.
- **Osbourn. A. E., Qi X., Townsend. B. And Qin. B. (2003).** Dissecting plant secondary metabolism constitutive chemical defenses in cereals. *New Phytologist* **159**, 101-108.
- **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.
- **park j. h., choi g. j., lee h. b., kim k. m., jung h. s., lee s. w., jang k. s. and cho k. y. (2005).** Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, and endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **15**, 112-117.

- **Petrini O. (1991).** Fungal endophytes of tree leaves. Andrews JA, Hirano SS (eds): In “Microbial Ecology of Leaves.” *New York: Springer Verlag*, pp 179-197.

- **Pimentel M. R., Molina G., Dionisio A. P., Marostica Junior M. R. and Pastore G. M. (2011).** The use of endophytes to obtain bioactive compound and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int*, doi:10.4061/2011/ 576286.

- **Pirttila A.M., 2001 -** Endopytes in the buds of scots pine (*pinus sylvestris L.*). thèse doctorat en sciences. Département of Biology and Biochemistry. *university of Oulu (Finlande)*, 52PP.

- **Powthong P., Jantrapanukorn B., Thongmee A., Suntornthiticharoen P. (2013).** Screening of antimicrobial activities of the endophytic fungi isolated from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Journal of Agricultural Science and Technology* **15(20)**, 1513-1522.

- **Rahul. Y, Ajay. V, Singh., Samiksha. J and Manish K. (2015).** Antifungal and enzyme activity of endophytic fungi isolated from *Ocimum sanctum* and *Aloe vera* **9**, 1783-1788.

- **Redman RS, Dunigan DD, Rodrigues RJ. (2001).** Fungal symbiosis from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader?. *New Phytologists* **151**, 705–716.

- **Repussard C., Zbib N., Tardieu D.and Guerre P. (2013).** Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines : généralités et problématique française. *Revue Méd.* **164, 12**, 583-606.

- **Rodriguez R. J., J. E White J. E., Arnold A. E. and Redman R. S. (2009).** Fungal endophytes diversity and functional roles. *New Phytologist* **182**, 314-330.

- **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.

- **Sadrati N, Harzallah D, Zerroug A, Dahamna S, Bouharati S. (2013).** Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). *Journal of Plant Protection Research* **53(2)**, 128-136.

- **Saikkonen K. (2007).** Fungal structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews* **21**, 67–74.

- **Saikkonen K., Faeth SH., Helander M., Sullivan TJ. (1998).** Fungal endophytes, a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 319–343.

- **Saikkonen K., Helander M. and Faeth S. H. (2004a).** Fungal endophytes: high- hikers of the green world. In: Gillings M. and Holmes A. J. (eds). Plant microbiology. *Garland Science*, 81-101.
- **Saikkonen K., Wälli P., Helander M., Faeth SH. (2004b).** Evolution of endophyte-plant symbiosis, *Trends in Plant Science* **9**, 275–280.
- **Saikkonen K., Wali P. R. and Helander M. (2010).** Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PLoS One* **5(6)**, e11395. doi:10.1371/journal.pone.0011395.
- **Saraswaty V, Srikandace Y, Simbiyani NA, Jasmansyah, SetiyantoH, Udin Z. (2013).** Antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungus *Fennellia nivea* NRRL 5504. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **16(22)**, 1574-1578.
- **Schulz B., Boyle C. (2006).** The endophytic continuum. Technical University of Braunschweig, Spilmannstr. Germany **64pp**.
- **Seghers D., Wittebolle L., Top E. M., Verstraete W. and Siciliano S. D. (2004).** Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 1475-1482.
- **Selim K. A., El-Beih A. A., Abdel-Rahman T. M. & El-Diwany A. I. (2012).** Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* **2 (1)**, 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.
- **Sieber T. (2007).** Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. *Fungal Biology Reviews* **21**, 75–89.
- **Siegel MR., Latch GCM., Johnson MC. (1987).** Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Phytopathology* **25**, 293–315.
- **Siegel MR. (1993).** Acremonium endophytes, our current state of knowledge and future directions for research. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **44**, 301–321.
- **Slippers B, Wingfield MJ. (2007).** Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* **21**, 90–106.
- **Souwalak P., Nattawut R., Vatcharin R. and Jariya (2006).** S.Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunol Med Microbiol* **48**, 367–372.

- **Staniek, H. J. Woerdenbag, et O. Kayser (juin 2008).** « Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery ». *J. Plant Interact* **3**, no **2**, 75-93.
- **Stanosz GR, Blodgett JT, Smith DR, Kruger EL. (2001).** Water stress and Sphaeropsis sapinea as a latent pathogen of red pine seedlings. *New Phytologist* **149**, 531–538.
- **Stone, JK., Bacon, CW, White, JF Jr. (2000).** An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon, CW, White, JF Jr (Eds.) *Microbial Endophytes. Marcel Dekker, Inc., New York*, 3–29.
- **Strobel G. A.(2002a).** Microbial gifts from rain forests. *Can J Plant Phenol* **24**, 14-20.
- **Strobel A. (2003).** Endophytes as sources of bioactive products *Microbes and infection* **5**, 535- 544.
- **Strobel G., Daisy B. (2003).** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology. Reviews* **67**, 491-502.
- **Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J. (2004).** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* **67**, 257-268.
- **Sunitha V.H., Nirmala Devi D. and Srinivas C. (2013).** **Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants.** *World J. Agric. Sci.* **9** (1), 01-09.
- **Suryanarayanan T. S., Murali T. S. and Venkatesan G. (2002).** Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany* **80**, 818-826.
- **Tan, R. X., and W. X. Zou. (2001).** Endophytes: a rich source of functional. transmission of the endophyte *Epichloë elymi* infecting the grass *Elymus hystrix*. *New use and definition, Oikos* **73**, 274-276.
- **Ting. A. S. Y, Mah. S. W and Tee. C. S. (2009).** Prevalence of Endophytes Antagonistic Towards *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Cubense* Race 4 in Various Plants. *Am - Eurasian J Sustain Agric* **3**, 399-406.
- **Tintjer T., Leuchtmann A., et Clay K. (2008).** Variation in horizontal and vertical. [*Marine Geology* **239**, \(3– 4\)](#), 163-172.
- **Tong Wy., Zaadah Nurul J., Nurhaida, Tan Wn., Melati K., Latiffah Z., Darah I. (2014).** Antimicrobial activity of *Phomopsis* sp. ED2 residing in medicinal plant *Orthosiphon stamineus* Benth. *Annual Research and Review in Biology* **4**,1490-1501.

- **Vanetten. H., Temporini E. and Wasmann C. (2001).** Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? . *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**, 83-93.
 - **Wilson, D. (1993).** Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind. *Oikos* **68**, 379-384.
 - **Wilson D. and Carroll G. C. (1994).** Infection studies of *Discula quercina*, and endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia* **86**, 635-647.
 - **Wilson, D. (1995).** Endophyte - The evolution of a term, and clarification of its Use and Definition. *Oikos*, **73**(2), 274-276.
 - **Zabalgogezcoa I., (2008).** Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6**, 138-146.
 - **Zerroug, Nouari SADRATI1, Rasime Demirel, Sabrina Bakli and Daoud Harzallah (2018).** Antibacterial activity of endophytic fungus, *Penicillium griseofulvum* MPR1 isolated from medicinal plant. *Mentha pulegium* **12**(48), 1056-1066.
 - **Zhang H. W., Song Y. C. and Tan R. X. (2006).** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* **23**, 753-771.
- Zhou, D., Hyde, KD. (2001).** Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycol*

Annexe1

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

Sabouraud dextrose agar (SDA)

Dextrose.....	40 g
Peptone.....	10 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
PH.....	5.6

Gélose à l'extrait de malt (MEA)

Extrait de malt	20 g / l
Dextrose.....	20 g / l
Peptone.....	6 g / l
Agar.....	15 g / l
PH.....	5, 4 ± 0,2)

Bouillon liquide d'extrait de malt (MEB)

Extrait de malt.....	20 g / l
Dextrose.....	20 g / l
peptone.....	6 g / l

PH.....5,4 ± 0,2)

Gélose nutritive (GN)

Peptone.....10 g

Extrait de levure.....5 g

NaCl.....5 g

Agar.....20g

Eau distillée.....1000ml

PH.....7,2

Peptone agar medium (PAM)

Peptone.....10 g

NaCl.....5 g

CaCl₂ 2H₂O.....0.1 g

Agar16 g

Eau distillée.....1000 ml

pH= 6

Peptone agar medium (PAM) + Tween 80

Peptone agar medium (PAM).....1000 ml

Tween 80.....1 ml

Gélose à l'extrait (YES)

Extrait de levure.....3 g / l

Sucrose.....20 g / l

KH₂PO₄.....1g / l

MgSO₄.....0,5 g / l

Agar.....15 g / l
PH7,2 ± 0,2)

Levure à gélose à l'extrait de malt (YMEA)

Extrait de levure.....3 g / l
Extrait de malt.....3 g / l
Dextrose.....10 g / l
Peptone.....5 g / l
Agar.....15 g / l
PH6,2 ± 0,2)

Gélose mol (GM)

Agar.....7 g
Eau distillée.....1000

Annexe 2

Lugol

Iode.....5g
Iodure de potassium.....10g
Eau distillée.....100ml

Eau physiologique

Nacl.....9 g
Eau distillée1000 ml

Annexe 3

Tableau I: Zones d'inhibition des bactéries pathogènes par le champignon endophyte sur PDA.

Bactéries	Zones d'inhibition (mm)
<i>P. aeruginosa</i>	0
<i>E. coli</i>	37
<i>S. aureus</i>	27
<i>B. cereus</i>	25

Tableau II: Les moyennes des zones d'inhibition du champignon endophyte après culture sur les cinq milieux de culture PDA, SDA, YES, MEA, YMEA.

Milieux de culture	MEA	PDA	MYEA	YES	SAB
Moyennes des zones d'inhibition	24,5	22,5	22,25	7,75	0

Tableau III: Activité antimicrobienne des extraits de n-hexane, chloroforme et acétate d'éthyle.

Milieux	Solvants	Bactéries			
		<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella typhimurium</i>
MEB	Acétate d'éthyle	28	27	33	28
	Chloroforme	0	0	0	0
	N-Hexane	0	0	0	0
Son de blé	Acétate d'éthyle	0	0	0	0
	Chloroforme	0	0	0	0
	N-Hexane	0	0	0	0

Son de riz	Acétate d'éthyle	20	15	0	15
	Chloroforme	0	0	0	0
	N-Hexane	0	0	0	0

Tableau IV: Choix du type du milieu et du solvant.

Moyennes des zones d'inhibition (mm)					
Solvants			Milieux de culture		
Acétate d'éthyle	Chloroforme	N-Hexane	MEB	Son de blé	Son de riz
13,83	0	0	9,66	0	4,16

Tableau V: Activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle contre plusieurs bactéries.

Bactéries	Zones d'inhibition (mm) ± SD
Bactérie à Gram -	
<i>C. freundii</i>	34,5±0,7071
<i>A. baumannii</i>	20±0
<i>S. typhimurium</i>	28,5±0,7071
<i>P. aeruginosa</i>	10±0
<i>E. coli</i>	35±1,4142
<i>K. pneumoniae</i>	24,5±0,7071
Bactérie à Gram +	
<i>B. cereus</i>	31±1,4142
<i>S. aureus</i>	29,75±0, 3536
SARM	26,25±0, 3536
<i>M. luteus</i>	30±0
<i>E. faecalis</i>	23±0
<i>M. yannicii</i>	33,5±
Levure	
<i>C.albicans</i>	14±0, 3536

Tableau VI: La production d'enzymes extracellulaires par le champignon endophyte.

Activités	Moyenne	SD
Protéase	1,50	0,00
Estérase	3, 32	0,68
Lipase	4,14	0,00
Cellulase	2,79	0,40

تهدف هذه الدراسة إلى دراسة النشاط المضاد للميكروبات والنشاط الإنزيمي للفطر *Penicillium sp.* الذي تم عزله وجمعه من منطقة برج بوعريريج (الجزائر). تم تنفيذ النشاط المضاد للميكروبات على 12 من البكتيريا المسببة للأمراض للإنسان؛ ستة أنواع من البكتيريا إيجابية الغرام، وستة من البكتيريا سلبية الغرام، نوع من الخمائر وثلاثة أنواع من الفطريات المسببة للأمراض النباتية. تم العثور على MEA كأفضل وسط لتحقيق أقصى إنتاج للمركبات النشطة المضادة للبكتيريا بمتوسط مناطق تثبيط (24.5 مم) مقارنة بالوسائط الصلبة الأخرى نخالة الأرز (4.16 مم) ونخالة القمح (0 مم) بعد التخمر والاستخلاص باستعمال ثلاثة مذيبات ن-هكسان والكوروفورم وإيثيل أسيتات، تم الحصول على أكبر تثبيط بواسطة إيثيل أسيتات مقارنة مع ن-هكسان والكوروفورم مع متوسط تثبيط (13.83 مم) (وفقا لنتائج النشاط المضاد للفطريات، فإن مستخلص إيثيل أسيتات يثبط بقوة *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis* تليها *Aspergillus niger*، و*Alternaria sp.* والخميرة *C. albicans* مع مناطق تثبط 54 و 20 و 15 و 14 ملم على التوالي. كانت *Escherichia coli* هي أكثر أنواع البكتيريا حساسية (35مم)، في حين كانت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* الأكثر مقاومة (10 ملم). أظهرت النتائج أن *Penicillium sp.* له نشاط مضاد للجراثيم واسع الطيف وهو فعال ضد البكتيريا موجبة الغرام بمتوسط منطقة تثبيط (28.91 مم) مقارنة مع البكتيريا سالبة الغرام (25.41 ملم). الفطر الداخلي *Penicillium sp.* أظهر نشاط إنزيمي هام للليباز والإستراز، حيث كانت المؤشرات الأنزيمية 4.14 و 3.32 على التوالي. من ناحية أخرى، تم الحصول على نشاط متوسط للسليولوز والبروتيناز بمؤشر الإنزيمي 2.79 و 1.50 على التوالي. النتائج المحصل عليها تشير إلى أن الفطر الداخلي *Penicillium sp.* يمكن أن يكون مصدرا واعدة للمركبات النشطة بيولوجيا ضد مسببات الأمراض و إنتاج الإنزيمات التي يمكن أن تساعد في اكتشاف أدوية جديدة وجزئيات أخرى ذات أهمية بيوتكنولوجية.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية، البنسيليوم، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط الأنزيمي، الجزئيات النشطة بيولوجيا.

Résumé

La présente étude a pour but d'étudier l'activité antimicrobienne et enzymatique d'un champignon endophyte *Penicillium sp.* qui a été isolé d'une plante médicinale collectée de la région de Bordj Bou Arréridj (Algérie). L'activité antimicrobienne a été effectuée contre 12 bactéries pathogènes pour l'homme; six à Gram positif et six à Gram négatif, une levure et trois espèces fongiques phytopathogènes. Le MEA était le meilleur milieu donnant une production maximale des composés bioactifs antibactériens avec une moyenne des zones d'inhibition de 24.5 mm par rapport aux autres milieux solides à base de son de riz (4.16 mm) et son de blé (0 mm). Après la fermentation et l'extraction par trois solvants de différentes polarités, n-hexane, chloroforme et acétate d'éthyle, l'effet antibactérien le plus grand a été obtenu par l'extrait d'acétate d'éthyle avec une moyenne d'inhibition de 13,83 mm. Selon les résultats de l'activité antifongique, l'extrait d'acétate d'éthyle a inhiber fortement *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis* avec une moyenne des zones d'inhibition de 54 mm suivie par *Aspergillus niger*, *Alternaria sp.* et la levure *Candida albicans* avec des zones d'inhibition de 20,15 et 14 mm respectivement. *Escherichia coli* était la bactérie la plus sensible (35 mm), tandis que *Pseudomonas aeruginosa* était la plus résistante (10 mm). Les résultats ont montré que *Penicillium sp.* a une activité antibactérienne plus efficace contre les bactéries à Gram positif avec une moyenne des zone d'inhibition de 28.91 mm par rapport aux bactéries à Gram négatif (25.41 mm). Le champignon endophyte *Penicillium sp.* a montré des activités enzymatiques significatives de la lipase et de l'estérase, où les indices enzymatiques (IE) étaient respectivement de 4,14 et 3,32. Par contre, les activités cellulosiques et protéolytiques étaient modérées avec un IE de 2,79 et 1,50, respectivement. Nos résultats suggèrent que le champignon endophyte *Penicillium sp.* peut offrir une source prometteuse pour la production des composés bioactifs contre les agents pathogènes et les enzymes qui pourraient aider à la découverte des nouveaux médicaments et autres molécules d'intérêt biotechnologique.

Mots clés: champignons endophytes, *Penicillium sp.*, activité antimicrobienne, activité enzymatique, molécules bioactives

Abstract

The present study aims to study the antimicrobial and enzymatic activity of the endophytic fungus *Penicillium sp.* which has been isolated and collected from the Bordj Bou Arréridj region (Algeria). The antimicrobial activity was carried out on 12 pathogenic bacteria for humans; six gram-positive, six gram-negative, one yeast and three phytopathogenic fungal species. MEA was found to be the best medium for maximum production of antibacterial bioactive compounds with an average of inhibition zones (24.5 mm) compared to other solid media, rice bran (4.16 mm) and wheat bran (0 mm). After fermentation and extraction with three solvents n-hexane, chloroform and ethyl acetate, the largest effect of the solvents was obtained by ethyl acetate than n-hexane and chloroform. with a mean of inhibition (13.83 mm). According to the results of the antifungal activity, the ethyl acetate extract strongly inhibited *Fusarium oxysporium* fs. *Albedinis* followed by *Aspergillus niger*, *Alternaria sp.* and *Candida albicans* with inhibitory zones of 54, 20, 15 and 14 mm, respectively. *Escherichia coli* was found the most sensitive bacterium (35 mm), while *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant (10 mm). The results showed that *Penicillium sp.* has broad-spectrum antibacterial activity and is effective against Gram-positive bacteria with an average of the inhibition zone (28.91 mm) compared to the Gram-negative bacteria (25.41 mm). Endophytic fungus *Penicillium sp.* showed significant enzymatic activities of lipase and esterase, where the enzymatic indices (IE) were 4.14 and 3.32 respectively. On the other hand, cellulosic and proteolytic activities were weak with an IE of 2.79 and 1.50, respectively. Our results suggest that the endophytic fungus *Penicillium sp.* can offer a promising source for the production of bioactive compounds against pathogens and enzymes that could help to discover new drugs and other molecules of biotechnological interest.

Key words: endophytic fungi, *Penicillium sp.*, Antimicrobial activity, enzymatic activity, bioactive molecules.