



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 biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé

Activités antibactérienne et enzymatique d'un
champignon endophyte *Penicillium* sp.

Présenté par : ZERIGUINE Nouara
BELAYADI Ouedjdane

Soutenu le : Juillet 2019

Devant le jury :

Président : M^r ZIAD Abdelaaziz M.A.A. Université de BBA.
Encadrant : M^{me} ZERROUG Amina M.A.A. Université de BBA.
Examineur : M^{me} BOUGUERRA Asma M.A.A. Université de BBA.

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Tous nos remerciements vont d'abord à notre « DIEU » le tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience.

Nous tenons à exprimer notre grande gratitude à Madame ZERROUG Amina maître assistant à faculté des Sciences de la Nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers de l'université Mohamed el Bachir el Ibrahimy pour son soutien et ses encouragements.

Nous remercions monsieur SADRATI Nouari maître assistant à faculté des Sciences de la Nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers de l'université Mohamed el Bachir el Ibrahimy pour ses encouragements et son aide.

Nous remercions les membres de jury, chacun à son nom, d'accepter de juger notre travail.

Nous remercions toute l'équipe du laboratoire de phytopathologie de l'université de Bordj Bou Arreridj et toutes les personnes qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*Aux deux êtres les plus chers au monde, qui ont
souffert nuit et jour*

*A mon père « ABD ARRACHID » Pour sa
patience avec moi et son encouragement.*

A ma source de bonheur, ma mère « HAYET ».

Je dédie aussi ce modeste travail

A mon époux MEHDI

*A ma sœur Lilya et son mari MOURAD et le petit
ange NAZIM*

A mes frères: HICHAM; ISSLEM

*A mes chers Amies: BESMA; MERIEM; NOUARA;
ZUINA; RANIA; FARAH; LAMIA; HADJER.*

A tous mes collègues de la promotion.

Wedjdane

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

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

Nouara

Sommaire

المخلص	I
Résumé	II
Abstract	III
Liste des figures	IV
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations	VI
Introduction générale	1

CHAPITRE I. Synthèse bibliographique

I.1 Définition des champignons endophytes.....	2
I.2 Mode transmission.....	2
I.2.1 Transmission verticale	2
I.2.2 Transmission horizontale.....	3
I.3 Interaction endophyte-plante hôte.....	3
I.4 Spécificité de l'hôte.....	4
I.5 Spécificité des tissus.....	5
I.6 Importance des endophytes	5
I.7 Rôles des champignons endophytes.	6
I.7.1 Rôle des endophytes dans la tolérance des plantes aux stress biotiques	6
I.7.1.1 Protection contre les microorganismes pathogènes et les herbivores.....	6
I.7.1.2 Protection contre les insectes.....	6
I.7.1.3 Protection contre les nématodes	7
I.7.2 Rôles des endophytes dans la tolérance des plantes aux stress abiotiques.....	7
I.7.2.1 La sécheresse.....	8
I.7.2.2 Les métaux lourds.....	8
I.7.2.3 La chaleur	8
I.7.2.4 La salinité	9
I.8 Champignons endophytes source des métabolites bioactifs.....	9
I.8.1 Les substances anticancéreuses.....	9
I.8.2 Les substances antibactériennes.....	10
I.8.3 Les substances antivirales	11
I.8.4 Les substances antifongiques	12
I.8.5 Les substances antioxydantes	13

CHAPITRE II. Matériel et méthodes

II.1 Matériel.	15
II.1.1 Matériel biologique	15
II.1.2 Milieu de culture et produits chimiques	15
II.2 Méthodes	16
II.2.1 Échantillonnage et isolement	16
II.2.2 Repiquage de la souche fongique.....	16
II.2.3 Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne	16

II.2.3.1 Préparation des bactéries pathogènes	16
II.2.3.2 Technique des cylindres d'agar (activité antibactérienne).....	17
II.2.3.3 Technique de la double culture (activité antifongique)	17
II.2.4 Choix du milieu de culture optimum.....	18
II.2.5 Fermentation et extraction.....	18
II.2.5.1 Fermentation fongique	18
II.2.5.2 Procédure de l'extraction	19
II.2.6 Dépistage secondaire	21
II.2.7 Activité enzymatique	21

CHAPITRE III. Résultats et discussion

III.1 Dépistage de l'activité antimicrobienne (Dépistage primaire)	23
III.1.1 Activité antibactérienne.....	23
III.1.2 Activité antifongique	24
III.2 Choix du milieu de culture optimum.....	25
III.3 Dépistage secondaire	27
III.4 Activité enzymatique.	32
Conclusion générale.....	34
Références bibliographiques	36
Annexes	

الملخص

أجريت هذه الدراسة لتقييم النشاط المضاد للميكروبات والنشاطية الأنزيمية للفطر *Penicillium sp.* المعزول من نبتة طبية. سمح لنا اختيار وسط التخمر والمذيب لاستخلاص المستقلبات الثانوية من هذا الفطر، باختيار الوسط السائل MEB، الذي كان الأكثر نشاطاً ضد البكتيريا بمتوسط مناطق تثبيط (8 ملم) ، والوحيد من بين الأوساط الأخرى الذي كان له نشاطية ضد الفطريات المسببة للأمراض النباتية. بالنسبة لمذيب الاستخلاص، يعتبر الأسيتات إيثل المذيب الذي استخلص أقصى قدر من الجزيئات النشطة مقارنة بالمذيبات الأخرى المستعملة بمتوسط مناطق تثبيط 12.83 مم ضد البكتيريا. أكد النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص اسيتات الإيثل ضد مجموعة واسعة من البكتيريا المسببة للأمراض، الخميرة والفطر الممرض للنبات انه يملك تثبيطاً قوياً للبكتيريا، حيث كانت البكتيريا الأكثر حساسية هي *Escherichia coli* (34.5 ملم) والأكثر مقاومة *Pseudomonas aeruginosa* (9 ملم). لوحظ أيضاً وجود نشاط متوسط ضد الخميرة الممرضة بمتوسط مناطق تثبيط 12 ملم. بالنسبة للنشاط المضاد للفطريات، لوحظ أن له تأثير أكبر علي *Fusarium oxysporium* بمنطقة تثبيط تصل إلى 70 ملم. أثبتت اختبارات النشاط الإنزيمي أن *Penicillium sp.* قادر على إنتاج بعض الإنزيمات الخارجية التي تشتمل على الليياز (IE = 1.14)، السيليلاز (IE = 1.96) ، البروتياز (IE = 1.13) والإستيراز (IE = 2.01) .

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية ، النشاط المضاد للميكروبات ، النشاط الأنزيمي ، النبات الطبي.

Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but d'évaluer l'activité antimicrobienne et enzymatique du champignon endophyte *Penicillium* sp. isolé à partir d'une plante médicinale. Un choix du milieu de fermentation et du solvant d'extraction des métabolites secondaire du champignon endophyte nous a permis de sélectionner le milieu liquide MEB qui était le plus actif contre les bactéries avec une moyenne des zones d'inhibition de 8 mm et le seul parmi les autres milieux qui était actif contre les champignons phytopathogènes. Pour le solvant d'extraction, l'acétate d'éthyle était le solvant qui a extrait le maximum de molécules bioactives par rapport aux autres solvants utilisés avec une moyenne des zones d'inhibition de 12.83mm contre les bactéries. L'activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle contre une large gamme de bactéries, de levure pathogène et de moisissures phytopathogènes a confirmé l'activité de cet extrait, qui a présenté une forte inhibition des bactéries, où la bactérie la plus sensible était *Escherichia coli* (34.5mm) et la plus résistante *Pseudomonas aeruginosa* (9 mm). Une bonne activité contre la levure a été également observée avec une moyenne des zones d'inhibition de 12 mm. Pour l'activité antifongique le plus grand effet a été observé contre *Fusarium oxysporium* avec une zone d'inhibition maximale de 70 mm. Les tests de l'activité enzymatique ont démontré que *Penicillium* sp. est doté des activités enzymatiques extracellulaires comprenant : les lipases (IE=1,14), cellulases (IE=1,96), les protéases (IE=1,13) et les estérases (IE=2,01).

Mot clés : Champignons endophytes, activité antimicrobienne, activité enzymatique, plante médicinale.

Abstract

The present study was conducted to evaluate the antimicrobial and enzymatic activity of the endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from a medicinal plant. A choice of the fermentation medium and the solvent for secondary metabolite extraction from endophytic fungus allowed us to select the liquid medium MEB, which was the most active against bacteria with a mean of inhibition zones of 8 mm, and the only one among other media that was active against phytopathogenic fungi. For the solvent of extraction, ethyl acetate was found the solvent that extracted the maximum of bioactive molecules compared to other solvents that used with an average of 12.83 mm inhibition zones against bacteria. The antimicrobial activity of the ethyl acetate extract against a wide range of pathogenic bacteria, yeast and phytopathogenic molds confirmed the activity of this extract, which exhibited a strong inhibition of bacteria, where the bacterium most sensitive was *Escherichia coli* (34.5mm) and the most resistant *Pseudomonas aeruginosa* (9mm). A good activity against pathogenic yeast was also observed with an average of inhibition zones 12 mm. For antifungal activity the greatest effect was observed against *Fusarium oxysporium* with a maximum inhibition zone of 70 mm. Enzymatic activity tests demonstrated that *Penicillium* sp. is able to produce some enzymes extracellular comprising: lipases (IE = 1.14), cellulases (IE = 1.96), proteases (IE = 1.13) and esterase (IE = 2.01).

Key words: Endophytic fungi, antimicrobial activity, enzymatic activity, medicinal plant.

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de vie des endophytes.....	3
Figure 2 : Structures de certains métabolites secondaires utilisés comme composés anticancéreux	10
Figure 3 : Structures de certains métabolites secondaires utilisés comme composés antibactériens	11
Figure 4 : Structures de l'alternariol (R = H) et de l'alternariol- (9) -méthyléther (R = CH ₃).....	12
Figure 5 : Structure du 2-phényléthyle 1H-indol-3-yl-acétate	13
Figure 6 : Structure de la cytochalasine H	13
Figure 7 : Structure de l'isopestacin (A), et de la Pestacin (B).....	14
Figure 8 : Fermentation et extraction des métabolites secondaires en milieu liquide.....	19
Figure 9 : Fermentation et extraction des métabolites secondaires en milieu solide.....	20
Figure 10 : zones d'inhibition contre les bactéries pathogènes.....	23
Figure 11 : Activité antifongique de <i>Penicillium</i> sp. contre trois champignons phytopathogènes.....	24
Figure 12 : Activité antibactérienne de <i>Penicillium</i> sp. après croissance sur les différents milieux de culture	25
Figure 13 : Zones d'inhibition de <i>Penicillium</i> sp. après croissance sur les différents milieux de culture.....	26
Figure 14 : Activité antibactérienne des extraits de <i>Penicillium</i> sp.....	28
Figure 15 : Activité antifongique des extraits de <i>Penicillium</i> sp.....	29
Figure 16 : Activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>Penicillium</i> sp.....	29
Figure 17 : Comparaison de l'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif	30
Figure 18 : Activités enzymatiques de <i>Penicillium</i> sp.....	33

Liste des tableaux

Tableau I: L'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes par <i>Penicillium</i> sp	23
Tableau II: Les pourcentages d'inhibition des champignons phytopathogènes.....	24
Tableau III: Activité antifongique des extraits de <i>Penicillium</i> sp.....	28
Tableau IV: Les moyennes de l'activité enzymatique de <i>Penicillium</i> sp.....	32

Liste des abréviations

CMC	Carboxyméthylcellulose
DMF	N, N-diméthylformamide
GN	Gélose Nutritive
GYP	Glucose Yeast Extract Peptone
MEA	Malt Extract Agar
MYEA	Malt Yeast Extract Agar
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
UFC	Unité Formant Colonie
YES	Yeast Extract Sucrose

Introduction

Compte tenu de la croissance démographique et de la nécessité de mettre en place des économies viables, il est devenu urgent d'améliorer considérablement la productivité des cultures et des autres sources de nourriture. En outre, la demande du marché en énergie, en médicaments et en autres aspects liés aux bioproduits augmente à un rythme accéléré.

Depuis la découverte de la pénicilline, les champignons sont connus pour être une bonne source de composés médicaux. Des rapports ultérieurs concernant des endophytes producteurs de taxol ont fait naître l'espoir que la biotechnologie fongique à base d'endophytes pourrait constituer un autre moyen prometteur pour produire des molécules biologiques de valeur (Lu et *al.*, 2018).

Les champignons endophytes sont les microorganismes présents dans les tissus vivants de diverses plantes, établissant des relations mutuelles sans causer aucun symptômes de maladie. Ils protégeraient la plante hôte contre des aléas de l'environnement et de leurs ennemis naturels tel que les herbivores et les microorganismes pathogènes (Santara, 2004).

Certaines espèces endophytes produisent de nouveaux agents antimicrobiens (cryptocandine à partir de *Cryptosporiopsis quercina*), des composés anticancéreux puissants (taxol à partir de *Taxomyces andreanae*), des antioxydants et des composés utilisables industriellement, telles que les enzymes et les solvants (Park et *al.*, 2003).

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont l'objectif consiste en l'étude d'un champignon endophyte isolé à partir d'une plante médicinale ainsi que ses activités antimicrobienne et enzymatique.

Notre étude est répartie en trois chapitres :

- Le premier est une recherche bibliographique qui présente des généralités sur les champignons endophytes ainsi que leurs intérêts biologiques.
 - Le second chapitre présentera les méthodes et les techniques utilisées à savoir:
 - Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne et choix du milieu de culture.
 - Fermentation et extraction par 3 solvants, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et n-hexane.
 - Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits fongiques par la méthode des puits.
 - Evaluation de l'activité enzymatique de l'isolat fongique
 - Le troisième chapitre abordera les différents résultats et leurs discussions.
- Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

I.1 Définition des champignons endophytes

Les endophytes sont des micro-organismes vivant dans les tissus internes des plantes sans causer de symptômes évidents (Lu et *al.*, 2018). Le terme «Endophyte» a été introduit par De Bary (1866) et a été initialement appliqué à tout organisme trouvé dans une plante causant des infections asymptomatiques (Meenatchi et *al.*, 2016).

Les champignons endophytes ont été décrits comme étant des champignons colonisant de manière asymptomatique des tissus végétaux sains, même s'ils peuvent, après une incubation ou une période de latence, provoquer des maladies. Diverses associations avec des plantes hôtes ont été signalées, allant des relations mutualistes, commensales et peuvent également être des agents pathogènes latents et au repos. La stabilité ou la variabilité de l'interaction asymptomatique dépend de nombreux facteurs tels que le stress environnemental, la sénescence de l'hôte, la virulence des endophytes et la réponse de défense de l'hôte (Rakotoniriana et *al.*, 2007). La plupart des endophytes isolés à ce jour sont des ascomycètes. Cependant, Rungjindamai et *al.*, 2008 ont montré que plusieurs endophytes peuvent également être des basidiomycètes.

Bien que la première découverte des endophytes remonte à 1904, ce groupe de micro-organismes n'avait au début pas reçu d'attention particulière. Cela a radicalement changé après la détection du paclitaxel produit par le champignon endophyte *Taxomyces andreanae* isolé à partir de *Taxus brevifolia*, ce dernier constitue la source originale de cet important médicament anticancéreux (Meenatchi et *al.*, 2016).

I.2 Mode de transmission

Le mode de transmission est le moyen par lequel le champignon endophyte peut coloniser un autre individu végétal à partir de l'hôte initial. Les champignons endophytes possèdent deux modes de transmission différents : verticale et horizontale. Ces modes de transmission peuvent dépendre des conditions environnementales, par exemple, l'humidité et de la bonne hydratation du sol (Tintjer et *al.*, 2008).

I.2.1 Transmission verticale

Tout d'abord, la transmission verticale se produit lorsque l'organisme reçoit du matériel génétique provenant de son ancêtre (figure 1). Elle se caractérise par la colonisation d'un nouvel hôte descendant de l'hôte primaire lui-même déjà infecté. Un hyphe d'un

endophyte fongique pénètre alors dans une graine de pollen ou dans une propagule de la plante hôte. Elle permet ainsi la contamination de la descendance de l'hôte primaire et l'endophyte fongique reste donc génétiquement identique (dissémination par reproduction asexuée) (Miral, 2018).

La transmission verticale de *Neotyphodium* peut procurer à la plante hôte plusieurs bénéfices : une résistance accrue aux herbivores, aux agents pathogènes, à la sécheresse et au stress provoqué par les inondations, et d'une capacité de compétition accrue (Saikkonen et al., 2004a).

I.2.2 Transmission horizontale

Ce second mode s'effectue via les spores (Clay et Schardl, 2002). Les champignons peuvent être transmis soit par des spores sexuées ou des spores asexuées pour infecter d'autres plantes de la même espèce ou d'espèces différentes (figure 1) (Saikkonen et al., 2004a). Ces spores peuvent être disséminées par le vent, des éclaboussures d'eau ou par un vecteur, en général des insectes.

La plupart des espèces d'endophytes, colonisant la plus grande partie des végétaux présentent ce mode de transmission. Les spores peuvent être issues de la reproduction sexuée ou asexuée du champignon (Senequier et Canard, 2016).

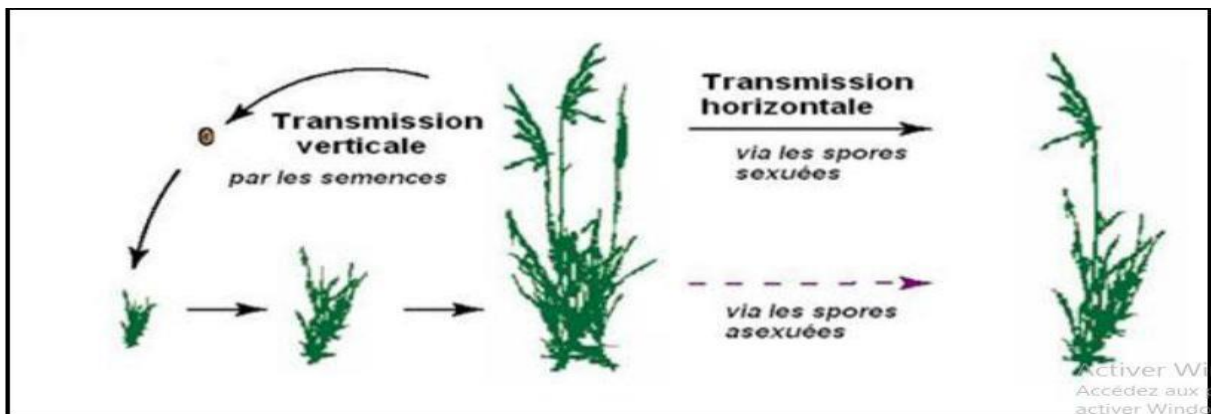


Figure1 : Cycle de vie des endophytes (Saikkonen et al., 2004a).

I.3 Interaction endophyte-plante hôte

Des études récentes suggèrent que les interactions endophyte-plante hôte sont variables et vont d'antagonistes à mutualistes.

Cette relation varie d'un hôte à l'autre et d'un endophyte à l'autre, elle dépend des facteurs abiotiques, des interactions avec d'autres espèces, de la géographie, de la phylogénie mais aussi de la façon de transmission des champignons endophytes (Saikkonen *et al.*, 1998b)

Les champignons endophytes englobent des saprophytes latents, des espèces mutualistes et des pathogènes latents

- **Les pathogènes latents** : ce sont de véritables phytopathogènes mais qui ne s'expriment que si la plante se trouve dans des conditions défavorables. Les symptômes de la maladie se manifestent dès l'apparition des stress environnementaux tels que le gel, les vents chauds ou la sécheresse, ce qui peut être considéré comme le déclencheur du stade pathogène. La phase latente de *Cydaneusma minus*, s'étend sur plus de 15 mois, ce qui pourrait expliquer sa nature «endophyte» et sa fréquence de colonisation élevée dans les aiguilles du pin. *Cenangium ferruginosum* est un agent pathogène responsable du dépérissement des pins, mais il semble également vivre comme un endophyte dans les aiguilles de *Pinus sylvestris* (Touseef, 2006).
- **Les endophytes saprophytes** : Ces champignons agissent comme des saprophytes latents, se développent d'une façon asymptomatique à l'intérieur des tissus de leurs plantes hôtes mais dans le cas de la sénescence ou la mort des tissus de l'hôte, le développement et la sporulation de ces derniers débutent (Zabalgozcoa, 2008).
- **Les endophytes mutualiste** : L'association mutualiste des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes est asymptomatique (Ting, 2014). Les endophytes reçoivent une nutrition et une protection de la part de la plante hôte, tandis que celle-ci peut bénéficier d'une amélioration des capacités de compétition et d'une résistance accrue aux herbivores, aux agents pathogènes et à divers stress abiotiques (Saikkonen *et al.*, 1998b). Par exemple, les endophytes *Epichloe* et *Neotyphodium* présents dans certaines graminées sont toxiques pour le bétail en pâturage et augmentent la résistance aux herbivores invertébrés et aux micro-organismes pathogènes (Touseef, 2006).

I.4 Spécificité de L'hôte

Les endophytes ont souvent une composition en espèces diverses et leur composition diffère généralement en fonction de l'espèce hôte, de sa répartition géographique, ainsi que des tissus ou des organes (Khondoker *et al.*, 2017). Les relations des endophytes avec une ou plusieurs plantes peuvent être décrites en 4 termes (Cohen, 2006) :

- **La spécificité de l'hôte:** Elle décrit la relation spécifique à un hôte unique ou à un groupe d'espèces apparentées qui ne se rencontre pas sur des plantes non apparentées situées dans le même habitat.
- **La récurrence de l'hôte:** La fréquence d'apparition d'un endophyte sur un hôte particulier ou une gamme d'hôtes. Ce terme prend en compte le fait que l'endophyte peut également se trouver sur d'autres plantes hôtes dans le même habitat.
- **La sélectivité de l'hôte (La préférence de l'hôte):** Une seule espèce d'endophyte fongique peut également former des relations avec deux espèces de plantes apparentées, en démontrant une préférence pour l'une des espèces.
- **L'exclusivité d'hôte:** La présence exclusive d'un champignon strictement saprophyte sur un hôte particulier ou sur un nombre restreint de plantes hôtes apparentées (Zhou et Hyde, 2001).

I.5 Spécificité des tissus

De nombreux endophytes infectent localement des parties de la plante en se limitant à une petite zone tissulaire, certains endophytes peuvent se trouver dans des parties spécifiques de la plante telles que les racines, les feuilles ou les brindilles, tandis que d'autres peuvent infecter plusieurs de ces parties, comme c'est le cas des espèces *Neotyphodium* et *Epichloë* qui infectent systématiquement l'espace intercellulaire des feuilles, des tiges reproductrices et des graines de leurs hôtes. Ces endophytes systémiques peuvent être isolés de plusieurs fragments de la même plante (Zabalgoeazcoa, 2008).

I.6 Importance des endophytes

Les champignons endophytes confèrent à la plante la capacité de résister aux stress biotiques et abiotiques et l'amélioration de l'assimilation des nutriments nécessaires à la croissance de cette dernière (Miral, 2018). Ces endophytes produisent des substances à utilisation potentielle en médecine, en agriculture ou encore en industrie (Vijeshwar et al., 2008). Les endophytes quant à eux trouvent en leurs hôtes une protection et un développement certains (Miral, 2018).

I.7 Rôle des champignons endophytes**I.7.1 Rôle des endophytes dans la tolérance des plantes aux stress biotiques**

Les Champignons endophytes améliorent la croissance des plantes tout en leur conférant une certaine protection contre toute une gamme de stress biotiques tels que les champignons, les bactéries et les virus phytopathogènes, les herbivores et les insectes.

I.7.1.1 Protection contre les microorganismes pathogènes et les herbivores

Le champignon *Aspergillus oryzae* agit non seulement comme un endophyte chez *Raphanus sativus* (radis), mais également comme un activateur de croissance des plantes et offre une certaine protection contre l'herbivore *Plutella xylostella*, qui affecte ses paramètres d'alimentation, de mortalité et de condition physique, contribuant ainsi à la suppression de la population de ravageurs (Sun et al., 2018).

Piriformospora indica contribue à stimuler les défenses naturelles des plantes contre les agents phytopathogènes du sol. Ce champignon augmente la résistance de l'orge contre la pourriture des racines causée par *Rhizoctonia solani* (Gill et al., 2016).

Des endophytes ont également été utilisés contre le virus Bunchy Top pour renforcer la résistance des variétés cultivées et ont également été étudiés pour réduire l'incidence de la maladie de Sigatoka (Andreea et al., 2016).

L'endophyte *Colletotrichum* sp. isolé à partir de *Artemisia annua* possède une activité antimicrobienne contre les bactéries *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas* sp. Ainsi que contre le champignons *Aspergillus niger* (Hong et al., 1999).

L'endophyte fongique *Penicillium* chez le bananier est capable de protéger la culture contre la maladie du Panama provoquée par l'espèce *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Andreea et al., 2016).

I.7.1.2 Protection contre les insectes

Les champignons endophytes sont considérés actuellement comme un des groupes biologiques le plus prometteur en matière de protection des plantes contre un bon nombre d'insectes ravageurs et pathogènes (Laib et al., 2015a). Ainsi, dans le domaine agricole, certains isolats fongiques endophytes ont été utilisés comme agents de contrôle biologique, comme par exemple *Fusarium* sp. isolé à partir des tiges de *Nerium oleander* (laurier-rose) utilisé pour lutter contre l'insecte *Sitophilus zeamais* (Laib et al., 2015a).

Webber (1981), a démontré la protection conférée par le champignon endophyte *Phomopsis oblonga*, qui protège les ormes contre le dendroctone *Physocnemum brevilineu*, vecteur d'un champignon pathogène qui provoque la maladie hollandaise de l'orme. Cet endophyte produit des composés toxiques qui auraient un effet répulsif contre ce vecteur. Cela a été confirmé quatre ans plus tard par Claydon et *al.* (1985), qui ont démontré que les champignons endophytes appartenant à la famille des *Xylariaceae* synthétisaient des métabolites secondaires chez les hôtes du genre *Fagus*, ces derniers affectaient les larves des coléoptères (Rabiaa, 2019). Deux autres champignons endophytes *Cladosporium* sp. isolés à partir du laurier rose *Nerium oleander* possèdent une activité insecticide vis-à-vis de la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* qui est le problème principal affectant l'haricot (*Phaseolus vulgaris*) à la fois aux champs et au stock (Laib, 2014b).

Le champignon *Aspergillus oryzae* produit de fortes concentrations de caféine, ce qui rend la plante *Theobroma cacao* L. plus tolérante aux insectes et aux agents pathogènes (Sun et *al.*, 2018).

I.7.1.3 Protection contre les nématodes

L'inoculation des bananes par des endophytes, en particulier des isolats inoffensifs de *Fusarium oxysporum*, a montré que ces souches réduisent considérablement les populations de nématodes ce qui pourrait représenter une alternative efficace à nématicides chimiques (Andreea et *al.*, 2016).

Les champignons endophytes sont reconnus en tant qu'agents très efficaces en culture maraichères pour le contrôle des nématodes (Ogou et *al.*, 2018). Le champignon endophyte de la tomate *Fusarium oxysporum*162 induit la résistance systémique contre le nématode *Meloidogyne incognita* (Laib, 2016) et *Radopholus similis* dans la banane par application combinée avec le champignon *Paecilomyces lilacinus* 251 et la bactérie *Bacillus firmus* (Mendoza et Sikora, 2008).

I.7.2 Rôles des endophytes dans la tolérance des plantes aux stress abiotiques

Les stress environnementaux, tels que la sécheresse, la salinité, la toxicité des métaux, la chaleur, ont des effets néfastes sur la croissance des plantes et la productivité des cultures.

Les facteurs abiotiques sont les principales causes de perte de récolte dans le monde, réduisant les rendements moyens de la plupart des grandes cultures de plus de 50% (Mayra et *al.*, 2005).

Plusieurs études ont démontré que les plantes associées à des champignons endophytes ont été plus tolérantes à la sécheresse, la chaleur, la toxicité des métaux et à une salinité élevée (Waller et *al.*, 2005).

I.7.2.1 La sécheresse

La présence du champignon endophyte *Acremonium coenophialum* dans la fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.) accroît la persistance de l'hôte dans les environnements exposés à la sécheresse (Elmi et West, 1995).

Elmi et West, (1995) ont rapporté que le taux de transpiration des graminées infectées par des endophytes et stressées par la sécheresse a réduit en raison d'une fermeture stomatique plus rapide que celle des plantes non infectées (Dariusz et Belesky, 2000).

I.7.2.2 Les métaux lourds

De nombreux types de champignons endophytes ont la capacité de réduire le stress imposé aux plantes par la présence de métaux lourds, Les endophytes auraient un impact sur l'absorption des métaux par la plante hôte et favoriseraient la croissance de la plante sous stress de métaux lourds (An et *al.*, 2015).

La colonisation des racines d'*Arrhenatherum elatius* par les champignons endophytes joue un rôle significatif dans l'atténuation des stress subis par la plante hôte dans les sites pollués par les métaux lourds (cadmium, plomb et zinc). Ces champignons contribuent au contrôle des teneurs en métaux lourds des parties aériennes de leur plante hôte par l'intermédiaire des hyphes et des structures de réserves telles que les vésicules et les microsclérotés (Florence, 2002).

Il en est de même pour les champignons *Fusarium* sp. qui réduit la teneur en cadmium dans le sol entourant les racines de *Salix variegata* et améliore sa croissance (An et *al.*, 2015)

I.7.2.3 La chaleur

Duchantheium lanuginosum est une plante géothermique qui est colonisée par *Curvularia protuberante*, un champignon endophyte qui lui confère une tolérance à la chaleur. Toutefois, ni le champignon ni la plante ne peuvent survivre seuls à des températures

supérieures à 38°C. En outre, seulement des souches du *C. protuberata* isolés des plantes géothermiques peuvent conférer aux plantes la tolérance à la chaleur (Rodriguez et al., 2008).

I.7.2.4 La salinité

Le milieu salin provoque de nombreux effets négatifs sur le comportement physiologique de la plante, ce qui est dû au faible potentiel osmotique du sol (stress osmotique) (Kausar et al., 2014). Le champignon endophyte *Penicillium minioluteum* atténue les effets néfastes du stress dû à la salinité et améliore la croissance du soja en influençant la biosynthèse des hormones et des flavonoïdes par la plante (Khan et al., 2011).

I.8 Champignons endophytes source des métabolites bioactifs

Les champignons endophytes sont capables de produire des molécules d'intérêt thérapeutique très diverses tant sur le plan chimique que sur le plan de leurs activités. Nous retrouvons des alcaloïdes, des polycétides, des terpènes. Ces molécules possèdent un spectre d'activité pharmacologique très large. Nous retrouvons: des anticancéreux, des antimigraineux, des antibiotiques, des antidépresseurs, des antidiabétiques, des anti-inflammatoires, des immunosuppresseurs, etc.

I.8.1 Les substances anticancéreuses

Le cancer est un groupe de maladies qui peuvent toucher divers organes du corps et se caractérise par la croissance incontrôlée de cellules anormales et l'invasion de tissus normaux. Les cellules cancéreuses peuvent également se propager à d'autres parties du corps et produire de nouvelles tumeurs. Si la propagation des cellules devient incontrôlée, cela peut entraîner la mort (Kharwar et al., 2011).

Les champignons endophytes jouent un rôle important dans le développement de plusieurs agents anticancéreux utiles sur le plan clinique. Ceux-ci incluent la vinblastine, la vincristine, la camptothécine, la podophyllotoxine et le taxol (Chandra, 2012).

- **Le taxol:** C'est un médicament diterpénoïde (figure 2), qui est largement utilisé en pratique clinique pour cibler diverses tumeurs, notamment celle du sein et l'ovaire (Lu et al., 2018). Mais également utilisé pour le traitement des cancers du poumon, de la tête, du cou, de la prostate et du colon (Chandra, 2012). Le taxol est produit par un certain nombre de genres de champignons endophytes différents on cite :

Cladosporium cladosporioides, *Paraconiothyrium* SSM001 (Lu et al., 2018)

Pestalotiopsis microspora et *Periconia* sp. (Chandra, 2012).

- **La camptothécine:** C'est un alcaloïde indole monoterpénoïde (figure 2) doté de la capacité d'inhiber l'ADN topoisomérase I. Il est appliqué en tant qu'agent anticancéreux ciblant les cancers du poumon et de l'ovaire réfractaire. La camptothécine est produite par le champignon endophyte *Fusarium solani* isolé à partir de *Camptotheca acuminata*.
- **La vincristine et la vinblastine :** Ce sont deux alcaloïdes (figure 2) naturels produits par *Fusarium oxysporum* et *Alternaria* sp. des champignons endophytes isolés à partir de *Catharanthus roseus*, Ils sont utilisés comme médicaments principaux dans le traitement du lymphome et de la leucémie (Chandra, 2012).

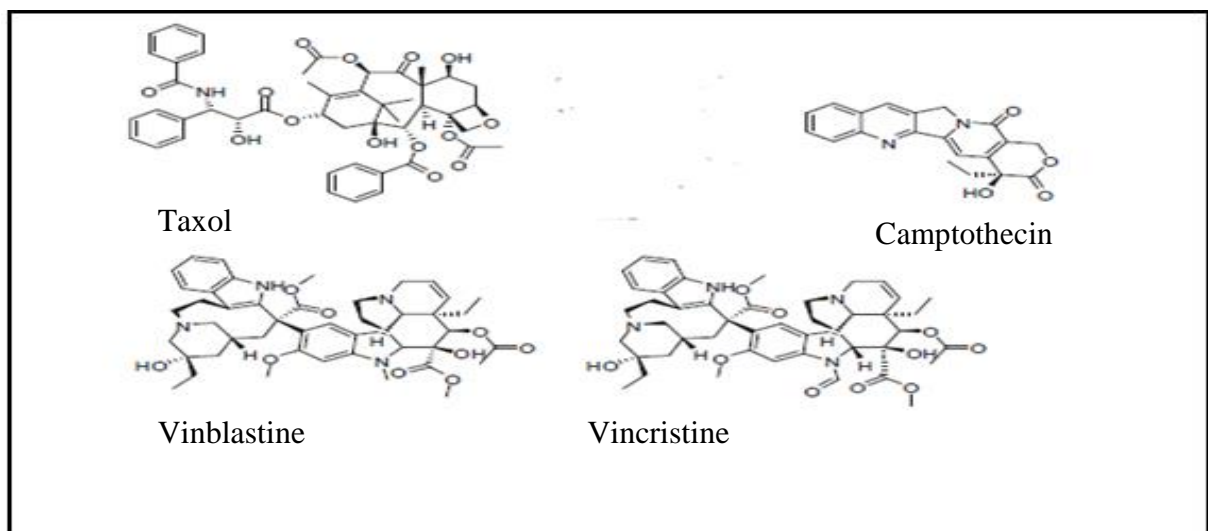


Figure 2. Structures de certains métabolites secondaires utilisés comme composés anticancéreux (Chandra, 2012).

I.8.2 Les substances antibactériennes

La nécessité de nouvelles molécules antibactériennes pour lutter contre la variété croissante d'infections devient une tâche prioritaire. Les champignons endophytes peuvent constituer une source importante de molécules biothérapeutiques (Deshmukh et al., 2015). Par exemple la Flavipucine (figure 3) a été isolée à partir de *Phoma* sp. Un champignon endophyte associé à *Salsola oppositifolia* possède une activité contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. La pestalotiopen A (figure 3) produite par *Pestalotiopsis* sp. un endophyte isolé à partir de la mangrove chinoise, *Rhizophora mucronata* a présenté une activité antimicrobienne modérée contre *Enterococcus faecalis*. D'autres endophytes appartenant aux ascomycètes sont également connus pour produire des molécules

antibactériennes, par exemple l'acide collétotrique (figure 3) produit par *Colletotrichum gloeosporioides* endophyte d'*Artemisia mongolica*, inhibe *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Sarcina lutea*.

Il ya aussi la cytoskyrine A (figure 3) produite par *Cytospora sp.* isolé à partir des branches de *Conocarpus erectus* possède une bonne activité antibactérienne *in vitro* contre *Staphylococcus aureus* ATCC 29923, *S. aureus* ATCC6538P, *S. aureus* résistant à la méticilline), *Enterococcus faecium*, *E. faecium* résistant à la vancomycine, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* (Deshmukh et al., 2015).

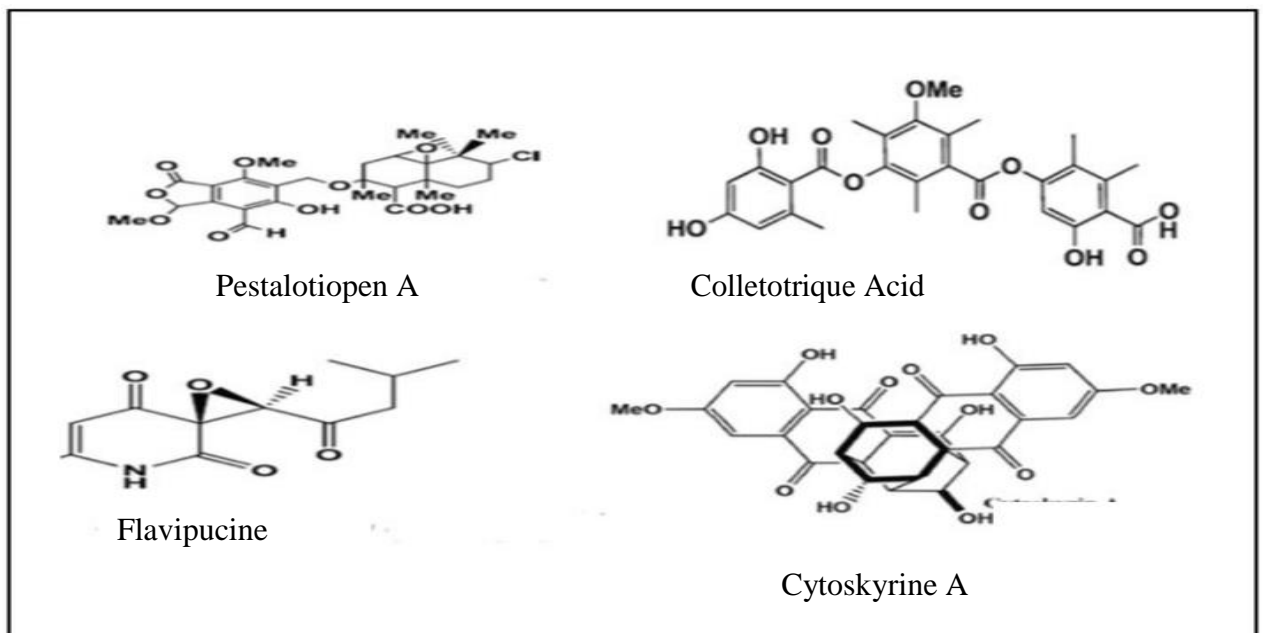


Figure 3. Structures de certains métabolites secondaires utilisés comme composés antibactériens (Deshmukh et al., 2015).

I.8.3 Les substances antivirales

Il existe un besoin mondial de nouveaux composés antiviraux pour résoudre les problèmes de résistance aux médicaments. Les champignons endophytes sont considérés comme une importante source de nouveaux métabolites antiviraux naturels destinés à être utilisés en médecine et dans l'agriculture.

Deux composés antiviraux l'alternariol et alternariol- (9) –méthyléther (figure 4) ont été isolés à partir de la culture du champignon endophyte *Pleospora tarda*, associé à la plante médicinale *Ephedra aphylla*. Ils inhibent le virus de l'herpès simplexe et le virus de la stomatite vésiculaire.

D'autres endophytes tels que *Aspergillus* sp. isolé à partir de *Galium sinaicum* sont également connus pour produire des substances antivirales actives qui arrêtent la reproduction du virus d'immunodéficience simienne (Selim et al., 2018).

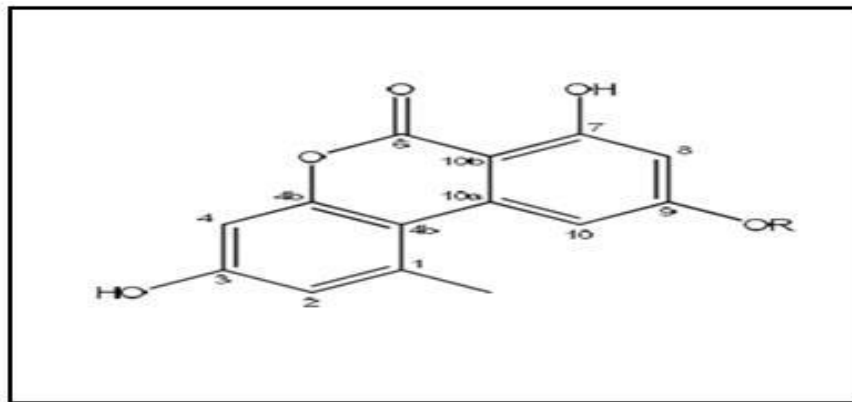


Figure 4. Structure de l'alternariol (R = H) et de l'alternariol- (9) -méthyléther (R = CH₃). (Selim et al., 2018).

I.8.4 Les substances antifongiques

Aspergillus clavatonanicus, une souche fongique endophyte de *Taxus mairei* produit le Clavatoïl et la Patuline, ces dernières possèdent une activité inhibitrice contre plusieurs champignons phytopathogènes, à savoir *Botrytis cinerea*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctone solani* et *Pythium ultimum* (Permajanu et al., 2016).

Un autre champignon endophyte *Colletotrichum gloeosporioides* associé à *Michelia champaca* était à l'origine d'un nouveau composé, le 2-phényléthyle 1H-indol-3-yl-acétate (figure 5). Ce composé analogue à la nystatine présentait une bonne activité contre *Cladosporium cladosporioides* et *C. sphaerospermum* (Deshmukh et al., 2018).

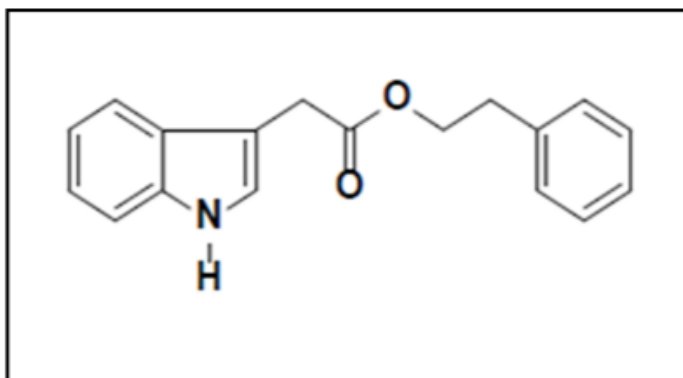


Figure 5. Structure du 2-phényléthyle 1H-indol-3-yl-acétate. (Deshmukh et al., 2018).

Le composé cytochalasine H (figure 6) produit par le champignon endophyte *Phomopsis* sp. isolé à partir de *Senna spectabilis* (Fabaceae) à montré une activité contre *Cladosporium cladosporioides* et *C. sphaerospermum* (Deshmukh et al., 2018).

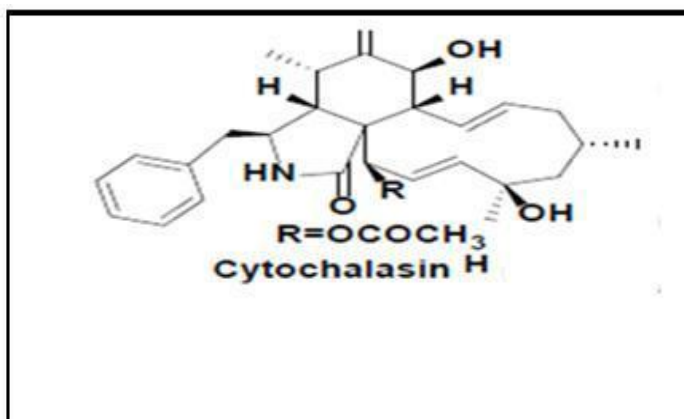


Figure 6. Structure de la cytochalasine H (Deshmukh et al., 2018).

L'extrait brut d'*Aspergillus flavus*, endophyte de *Melia azedarach*, a montré une grande activité fongicide contre *Penicillium chrysogenum* et *Fusarium oxysporum* (Jaynthy et Diviya, 2016).

I.8.5 Les substances antioxydantes

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées. Ces molécules antioxydantes suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires. Elle sont également utilisées comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Talbi1 et al., 2015).

Les champignons endophytes représentent une source abondante et fiable de nouveaux composés antioxydants naturels par exemple, le champignon endophyte *Phyllosticta* sp. isolé à partir de la plante médicinale *Guazuma tomentosa* peut être une source potentielle d'antioxydant naturel, les phénol totaux et le flavonoïdes présents dans L'extrait éthanolique de *Phyllosticta* sp., se sont révélés être de puissants antioxydants et piègeurs de radicaux libres tels que l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS) et 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) (Srinivasan et al., 2010).

Deux composés, la pestacine et l'isopestacine (figure 7), ont été obtenus à partir de la culture de *Pestalotiopsis microspora*, un endophyte isolé à partir de *Terminalia morobensis*. Les deux molécules possèdent une activité antimicrobienne et antioxydante. L'activité antioxydante de l'isopestacine était suspectée en raison de sa similarité structurelle avec les flavonoïdes, (Touseef, 2006).

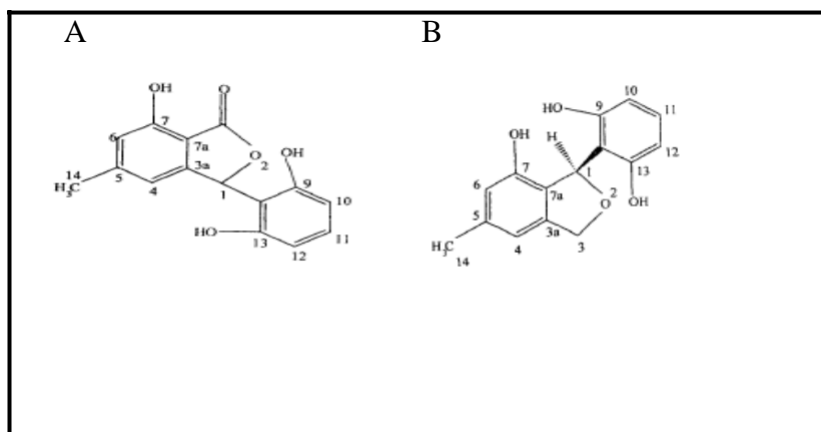


Figure 7. Structure de l'isopestacin (A), et de la Pestacin (B) (Touseef, 2006).

Le présent travail consiste à étudier l'activité antimicrobienne du champignon endophyte *Penicillium* sp. isolé à partir d'une plante médicinale de la région de Sétif (Algérie).

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel biologique

- **Champignon endophyte**

Les spores du champignon endophyte *Penicillium* sp. isolé d'une plante médicinale par M^{me} ZERROUG, Elles ont été conservées à -4°C dans des tubes contenant le bouillon Sabouraud Dextrose Agar (SDA) contenant 30% de glycérol (volume/volume).

- **Les souches microbiennes**

L'activité antimicrobienne du champignon endophyte *Penicillium* sp. a été évalué contre :

- ✓ douze souches bactériennes, six à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia* et six à Gram positif : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* Résistant à la méticilline (SARM), *Micrococcus luteus*, *Microbacterium yannicii*, *Enterococcus faecalis* et une levure : *Candida albicans* provenant toutes de laboratoire de microbiologie de l'université Ferhat Abbas de Sétif.
- ✓ Trois moisissures isolées et identifiées au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université de Bordj Bou Arreridj : *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*.

II.1.2 Milieux de culture et produits chimiques

- L'ensemencement du champignon a été fait sur le milieu PDA préparé (voir l'annexe1).
- La culture des bactéries a nécessité l'utilisation de la gélose nutritive (GN) (voir l'annexe1).
- Le choix du meilleur milieu de culture pour le champignon a nécessité l'utilisation de la gélose Sabouraud Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Yeast Extract Sucrose (YES), Malt Yeast Extract Agar (MYEA).

- La fermentation fongique a été effectuée sur trois milieux: le milieu liquide Malt Extract Broth (MEB) (Voir l'annexe 1) et les milieux solides à base de son de riz et de son de blé.
- L'étude de l'activité enzymatique a nécessité l'utilisation du milieu Glucose Yeast Extract Peptone (GYP) et le milieu Peptone Agar. (Voir l'annexe1)
- 3 solvants ont été utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le n-hexane

II.2 Méthodes

II.2.1 Échantillonnage et isolement

La collecte des échantillons de plante de la région de Sétif (Algérie), l'isolement du champignon ainsi que son identification au niveau du genre (*Penicillium* sp.) ont été réalisés par M^{me} ZERROUG.

II.2.2 Repiquage de la souche fongique

A partir du tube de conservation, les spores du champignon sont mises en culture dans des boîtes contenant le milieu PDA. Les boîtes ont ensuite été incubées à 28°C pendant 2 semaines (Selim et *al.*, 2018).

II.2.3 Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne

Un dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne du champignon endophyte *Penicillium* sp. a été réalisé en utilisant quatre bactéries pathogènes *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (à Gram Négatif), *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* (à Gram positif) et trois champignons phytopathogènes *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium*.

II.2.3.1 Préparation des bactéries pathogènes

Les souches sélectionnées ont été revivifiées dans des tubes contenant 9 ml du bouillon nutritif à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. A partir de chaque tube montrant un trouble et afin de confirmer la pureté des souches; on aensemencé par la technique des stries serrées une boîte de Pétri contenant de la gélose nutritive. Après une incubation à 37°C pendant 18 heures et à l'aide d'une anse de platine stérile, des colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées et déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne doit être bien homogénéisée

et la turbidité a ensuite été ajustée à 0.5 McFarland par spectrophotomètre (Devaraju et Satish, 2011).

II.2.3.2 Technique des cylindres d'agar (activité antibactérienne)

Des disques cylindriques (6 mm de diamètre) ont été découpés à partir d'une culture du champignon endophyte sur PDA âgée 14 jours. Les disques ont ensuite été placés sur des boîtes de Pétri inoculées préalablement avec les bactéries pathogènes. Les boîtes ont été conservées pendant 2 heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances antibactériennes existantes dans les cylindres d'agar, puis incubées pendant 24 heures à une température de 37 °C. Les zones d'inhibition claires autour des cylindres d'agar représentant l'activité antibactérienne ont été mesurées (Ramesha et Srinivas, 2014).

II.2.3.3 Technique de la double culture (activité antifongique)

Cette méthode a été utilisée pour tester l'effet inhibiteur de l'isolat de *Penicillium* sp. sur la croissance radiale de 3 champignons phytopathogènes (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporium*)(Nuangmek et al., 2008).

Deux disques de 6 mm de diamètre ont été découpés l'un à partir d'une culture de l'endophyte âgée de 10 jours; et l'autre de l'agent pathogène. Ils ont été déposés de part et d'autre de chaque boîte contenant du PDA, avec une distance d'environ 5 cm. entre les deux disques. Les boîtes contrôles ont été inoculées seulement avec les champignons phytopathogènes.

Toutes les boîtes ont ensuite été incubées à une température ambiante (25-30 °C). Au bout de 7 jours, les rayons de la colonie du champignon phytopathogène dans les boîtes contrôles et en double culture ont été mesurés. Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = (A - B / A) \times 100$$

Où :

A = Rayon de l'agent pathogène dans la boîte contrôle

B = Rayon de l'agent pathogène en double culture.

II.2.4 Choix du milieu de culture optimum

Pour choisir le meilleur milieu de culture sur lequel le champignon endophyte présente une production maximale des substances antimicrobiennes et donc une grande inhibition des microorganismes pathogènes, le champignon endophyte *Penicillium* sp. a été cultivé à la surface de différents milieux de culture, PDA, SDA, YEA, MEA et YMEA. Après une incubation à 28°C pendant 14 jours, la méthode des cylindres d'agar a été réalisée contre 2 bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) et 2 bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) (Zerroug et al., 2018). Les zones d'inhibitions obtenues sont ensuite analysées statistiquement pour déterminer le meilleur milieu de culture.

II.2.5 Fermentation et extraction**II.2.5.1 Fermentation fongique**

- **La fermentation fongique en milieu liquide**

Le champignon a été cultivé dans le milieu liquide MEB dont la composition est mentionnée dans l'annexe1, en inoculant des disques d'agar de la culture fongique pure en croissance active (6mm de diamètre) dans des flacons de 250 ml, contenant 50 ml du milieu préalablement autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. L'incubation a été faite à 28 ± 2°C pendant 21 jours avec une agitation périodique (Park et al., 2003).

- **Fermentation en milieu solide**

La fermentation en milieu solide a été réalisée selon la technique utilisée par Nwakanma et al., (2016) avec certaines modifications. En bref, 7 g du son riz ou son de blé mélangé à 10 ml d'eau ont été versés dans des flacons de 250 ml, puis autoclavé à 121°C pendant 30 minutes. Des disques de 6 mm de diamètre contenant les spores de l'endophyte cultivé précédemment sur du PDA pendant 10 jours à 28°C ont étéensemencés dans les flacons contenant le son de riz ou de blé. Tous les flacons ont ensuite été incubés à une température de 25 à 27 °C pendant 21 jours avec une agitation périodique.

II.2.5.2 Procédure de l'extraction

- **Extractions des métabolites secondaires à partir du milieu liquide**

Après 21 jours d'incubation, l'extraction a été faite par trois solvants de polarité différente: l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'n-hexane. Le contenu de chaque flacon de fermentation est filtré à travers une gaze stérile, afin de séparer le mycélium du milieu de culture. Ce dernier est mélangé au même volume de l'acétate d'éthyle (1v :1v), Une agitation de 30 min a été réalisée. La solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décanter pour séparer les deux phases. La phase organique a été récupérée et séchée à l'air, les résidus sont ensuite dilués dans du DMF et stocké à 4°C jusqu'à leur utilisation. La phase inorganique est ré-extraite par la même méthode avec les deux autres solvants pour obtenir à la fin 3 extraits bruts (Ouzid et *al.*, 2018).

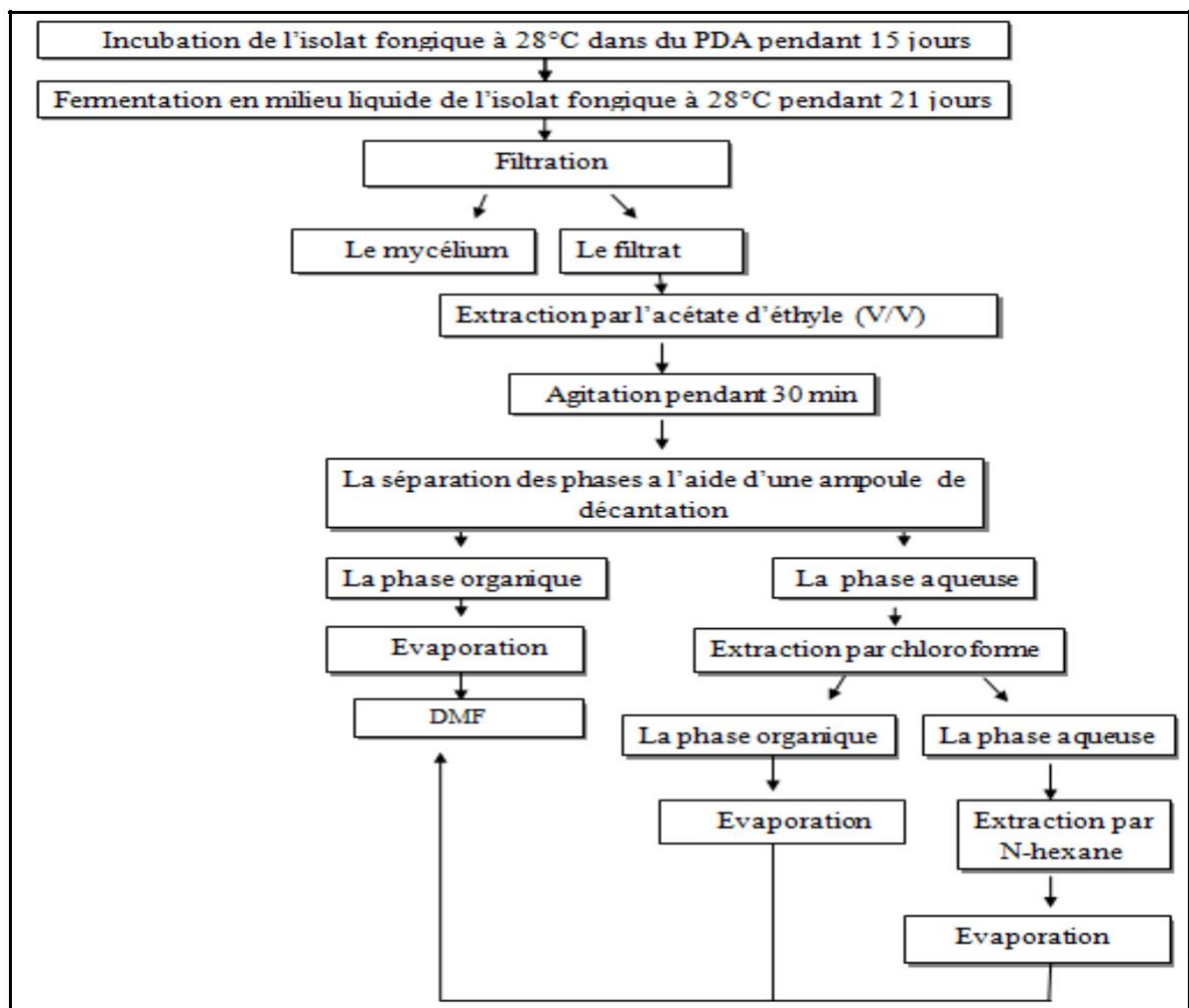


Figure 8 : Fermentation et extraction des métabolites secondaires en milieu liquide.

- **Extraction des métabolites secondaires à partir du milieu solide**

La méthode décrite par Nwakanma, et *al.*, (2016) a été utilisée avec quelques modifications. À la fin de la période de la fermentation en milieu solide, les métabolites secondaires ont été extraits par 3 solvants de polarité différente : l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'n-hexane.

Initialement, 80 ml d'acétate d'éthyle ont été versés dans les flacons contenant le son de riz ou le son de blé fermentés. Une tige de verre a été utilisée pour casser les amas formés pendant l'incubation. Au bout d'une agitation de 24 heures, le solvant a été filtré à travers du papier wattman dans un bécher. La phase solide a ensuite été ré-extraite par la suite par les deux autres solvants avec la même manière. En fin, toutes les phases organiques ont été laissés séchées à l'air, pesées et dissoutes dans le DMF, puis stockées à 4°C.

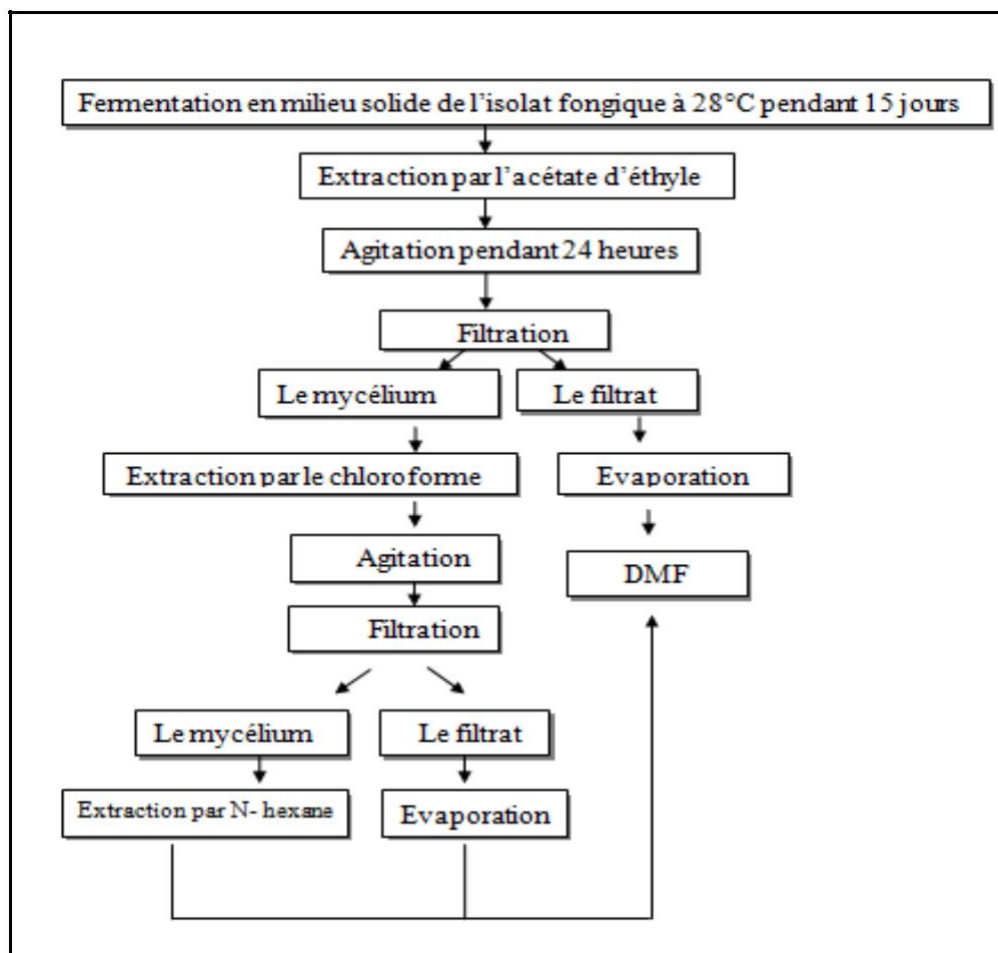


Figure 9 : Fermentation et extraction des métabolites secondaires en milieu solide.

II.2.6 Dépistage secondaire

L'activité antimicrobienne des extraits de l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'n-hexane a été testé contre 4 bactéries, 2 à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*) et 2 à Gram positif (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*) et 3 champignons phytopathogènes (*Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*) afin de confirmer l'activité antimicrobienne du champignon, choisir le meilleur milieu de fermentation et le meilleur solvant d'extraction. L'extrait donnant la meilleure activité a été testé par la suite contre une gamme élargie comprenant douze bactéries pathogènes *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *SARM*, *Micrococcus Luteus*, *Microbacterium yannici*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et une levure *Candida albicans*.

Les extraits de champignons séchés ont été dissous dans le DMF jusqu'à obtenir une concentration finale de 1 mg / ml. Des suspensions bactériennes (10^8 UFC / ml), levurienne (10^6 UFC / ml) et fongiques (10^4 spores / ml) ont été préparés et écouvillonnés sur les surfaces de GN, SDA et PDA respectivement. 20 µl de chaque extrait ont été déposés dans des puits (6 mm de diamètre) à la surface des géloses. Le DMF a été utilisé comme contrôle négatif (Tolulope et al. 2015). Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et à 28°C pendant 48 h pour la levure et à 28°C pendant 72 h pour les champignons filamenteux. L'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition en millimètre (Yamaç et Bilgili, 2006).

II.2.7 Activité enzymatique

La production de 4 enzymes extracellulaires par le champignon endophyte a été évaluée par la digestion des substrats dissous dans des boîtes de gélose après une inoculation du champignon endophyte et une incubation pendant 3-5 jours. Les zones d'activité enzymatique entourant la colonie fongique ont été mesurées (Maria et al., 2005).

L'activité protéolytique a été évaluée par l'inoculation du champignon sur le milieu gélosé GYP additionné de 5% de la solution de lait écrémé. Après 5 jours d'incubation, l'apparition d'une zone claire entourant la colonie était considérée comme positive (Sunitha et al., 2013).

Pour l'activité lipolytique, le champignon a été cultivé sur le milieu Peptone Agar, supplémenté avec 1% du Tween 20, après 5 jours d'incubation, une zone claire formée autour de la colonie active indique la présence de l'activité lipolytique (Mohini et *al.*, 2015).

Pour l'activité cellulosique, le champignon a été cultivé sur un milieu gélosé à la peptone et l'extrait de levure additionné de 0,5% de carboxyméthylcellulose (CMC). Après incubation, les boîtes ont été inondées avec du lugol's iodine. La zone claire entourant la colonie indique l'activité de la cellulase (Sunithaet *al.*, 2013).

L'activité estérasique a été déterminée en cultivant le champignon sur le milieu peptone Agar contenant du tween 80 (1%). L'apparition de la zone claire entourant la colonie a été considérée comme positive pour l'estérase (Jalgaonwala et Mahajan, 2011).

III.1. Dépistage de l'activité antimicrobienne (Dépistage primaire)

III.1.1. Activité antibactérienne

L'endophyte fongique a été dépisté pour son pouvoir antibactérien en utilisant la technique des cylindres d'agar. Le champignon a montré une activité antibactérienne plus ou moins importante, les zones d'inhibitions autour des disques fongiques ont été mesurées après 24 heures d'incubation et les moyennes de celles-ci figurent dans le tableau I.

Tableau I : L'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes par le *Penicillium* sp.

Bactéries	Zones d'inhibition (mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
<i>Escherichia coli</i>	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	15
<i>Bacillus cereus</i>	13

Les résultats obtenus dans le tableau ont révélés que le champignon endophyte a montré une activité antibactérienne maximale contre *Escherichia coli* (18 mm) suivie de *Staphylococcus aureus* (15 mm) et de *Bacillus cereus* (13 mm). Par contre, il ne présentait aucune activité contre *Pseudomonas aeruginosa* (figure 10).

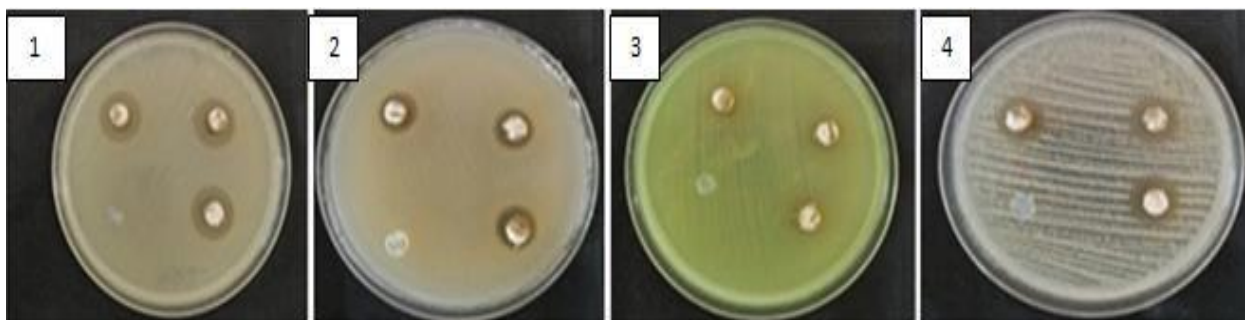


Figure 10 : Zones d'inhibition contre les bactéries pathogènes.

1 : *Escherichia coli*, **2 :** *Bacillus cereus*, **3 :** *Pseudomonas aeruginosa*, **4:** *Staphylococcus aureus*.

Cette activité antibactérienne peut être due à la production et à la sécrétion de molécules antibactériennes diffusibles dans la gélose (Sadrafi et al., 2013).

III.1.2. Activité antifongique

Pour évaluer le potentielle antagoniste du champignon endophyte, la méthode de la double culture a été utilisée contre les champignons phytopathogènes *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporium* et *Aspergillus niger* (Jinxu et al., 2018). Les pourcentages d'inhibition ont été calculés et sont présentés dans le tableau II.

Tableau II: Les pourcentages d'inhibition des champignons phytopathogènes.

Endophyte	Pourcentages d'inhibition (%)		
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>Alternaria alternata</i>
	24,82	12,5	77,5

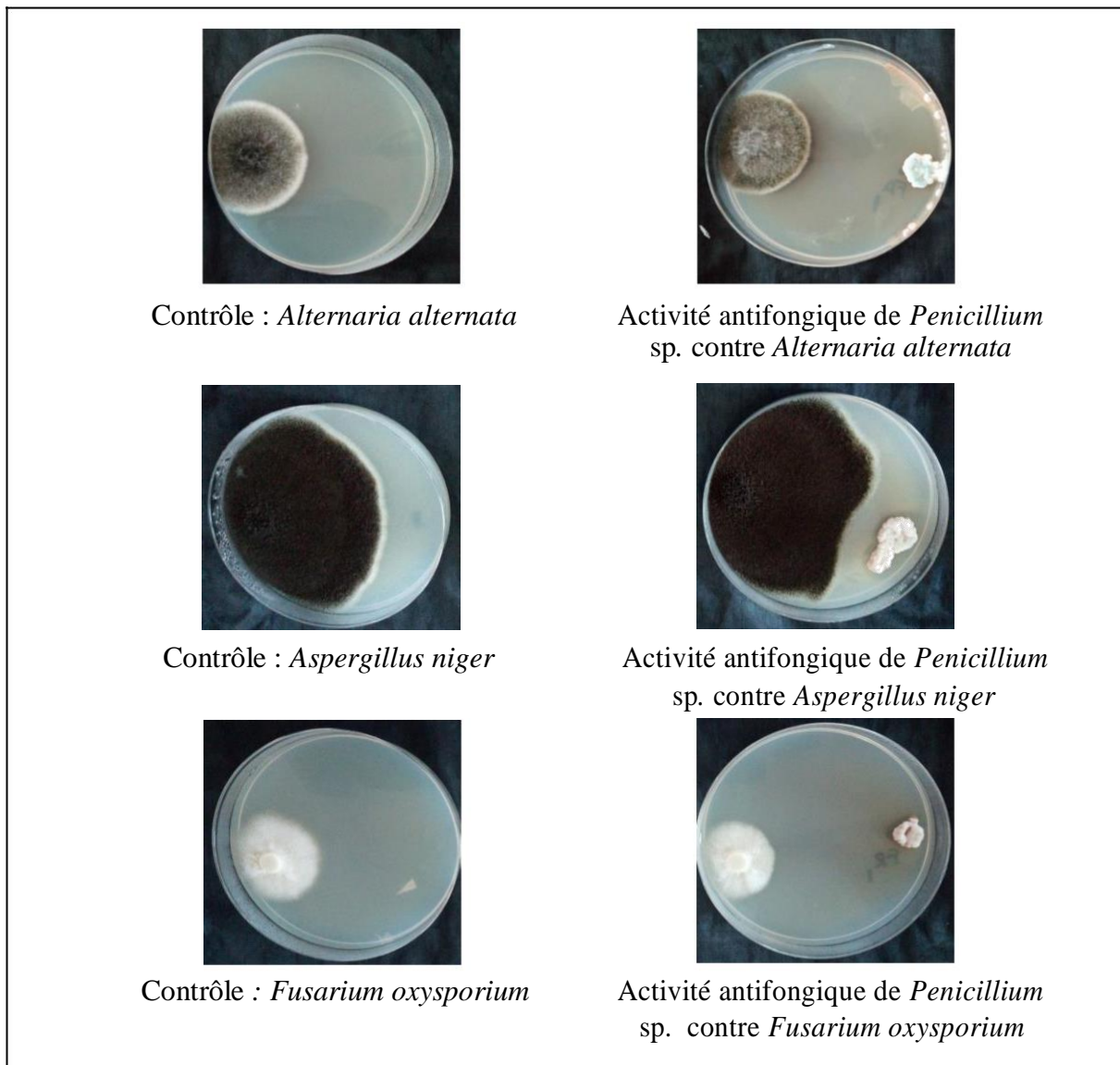


Figure 11: Activité antifongique de *Penicillium* sp. contre trois champignons phytopathogènes.

Les résultats obtenus montrent que la croissance des champignons phytopathogènes dans les boîtes contrôles est plus importante par rapport à celle obtenue dans les boîtes de double culture dans la figure 11 présenté ci-dessus. Cette étude a montré que le champignon endophyte a une activité antifongique contre les trois champignons testés avec un pourcentage d'inhibition maximal obtenu contre *Alternaria alternata* (77,5 %) suivi par *Aspergillus niger* (24,82 %) et *Fusarium oxysporium* (12,5 %). L'inhibition de la croissance des phytopathogènes en particulier *Alternaria alternata* par l'endophyte est très probablement attribuée aux composés antifongiques produits dans le milieu ou à la sécrétion des enzymes lytiques qui dégradent la paroi cellulaire des phytopathogènes (Ting *et al.*, 2009).

III.2 Choix du milieu de culture optimum

Dans un second temps, l'effet du milieu de culture sur la production des métabolites secondaires a été étudié en testant cinq différents milieux, PDA, MEA, MYEA, SDA et YES. Les conditions de culture des micro-organismes sont cruciales, cette étude permet d'optimiser les conditions de fermentation de l'endophyte afin d'augmenter le rendement en substances actives synthétisées par ce dernier et afin de réduire les coûts de la fermentation et les travaux laborieux.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 12, où le MEA était le milieu de culture donnant la meilleure activité antibactérienne avec une moyenne des zones d'inhibition de 23.92 mm suivi du PDA et MYEA avec des moyennes des zones d'inhibition de 11.67 et 8.83 mm respectivement. En ce qui concerne SDA et YES, aucune inhibition n'a été observée.

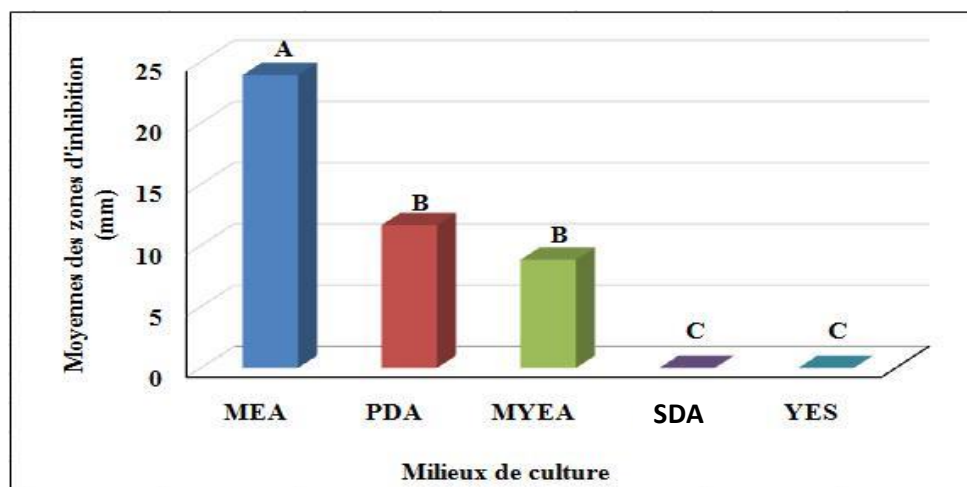


Figure 12: Activité antibactérienne de *Penicillium* sp. après croissance sur les différents milieux de culture.

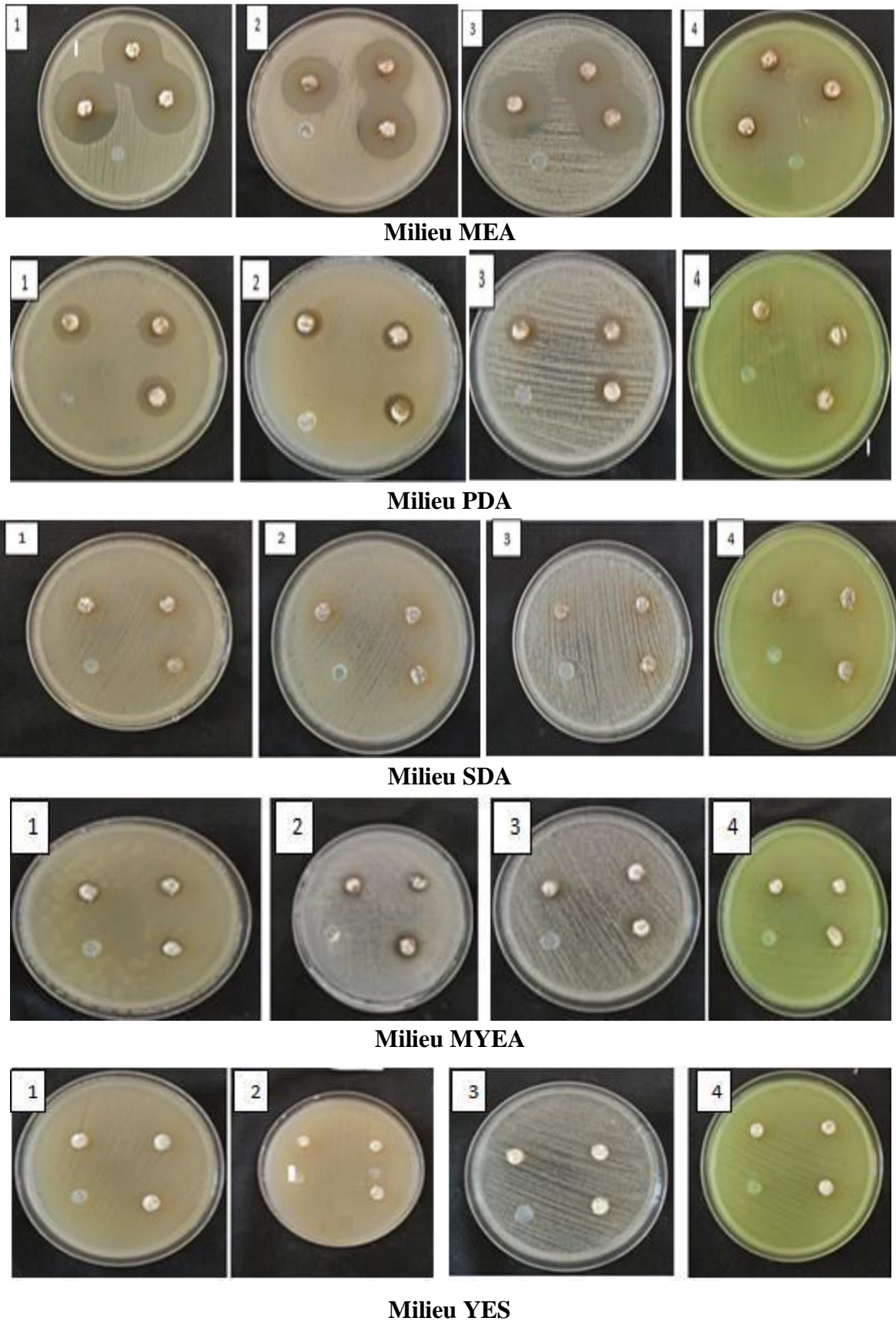


Figure 13 : Zones d'inhibition de *Penicillium* sp. après croissance sur les différents milieux de culture.

1 : *Escherichia coli*, 2 : *Bacillus cereus*, 3 : *Staphylococcus aureus*, 4 : *Pseudomonas aeruginosa*.

Un milieu approprié pour la production des composés bioactifs est très important, car il répond aux exigences du champignon endophyte pour la production des métabolites secondaires et permet la production d'une quantité importante de ces derniers (Anwar et Iqbal, 2017).

Dans cette étude, la zone d'inhibition maximale a été observée avec le milieu MEA suivi par le PDA. Il est clair que d'après ces résultats, ce champignon peut produire des composés bioactifs uniquement sur les milieux contenant du dextrose comme source de carbone, du peptone comme source d'azote et de l'extrait de malt et de pomme de terre riches en amidon et en vitamines. Ces composés nutritifs sont nécessaires à la production des molécules bioactives (Anwar et Iqbal, 2017).

Merlin et *al.*, (2013) ont montré que les champignons endophytes cultivés en milieu modifié au dextrose et à l'extrait de levure, présentaient une activité antibactérienne accrue. Ramos et Said (2011) ont montré que la composition en nutriments pouvait augmenter et améliorer l'activité antibactérienne. Vijaykumar et ses collaborateurs (2013) suggéraient également que certains milieux de croissance pouvaient entraîner la production d'une concentration élevée de composés bioactifs. Nos résultats sont en accord avec les résultats des chercheurs cités ci-dessus ayant démontré que le milieu de croissance était un facteur important pour la production des composés bioactifs fongiques.

III.3 Dépistage secondaire

Après fermentation sur un milieu liquide et deux milieux solides, l'extraction a été faite en utilisant l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le n-hexane. Les extraits fongiques ont ensuite été examinés pour leur activité antibactérienne et antifongique pour déterminer le meilleur milieu de culture ainsi que le meilleur solvant d'extraction. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 14 et le tableau III.

En ce qui concerne les milieux de culture, une différence significative a été observée entre les trois milieux contre les bactéries, la moyenne des zones d'inhibition était de 8 mm pour le MEB et de 4.83 mm pour le riz. Aucune zone d'inhibition n'a été observée avec le milieu à base de son de blé. Pour l'activité antifongique, le milieu MEB est le seul qui a donné une activité contre les champignons phytopathogènes.

Ces résultats indiquent que le milieu liquide MEB est le meilleur milieu de culture permettant une meilleure production des métabolites secondaires bioactifs.

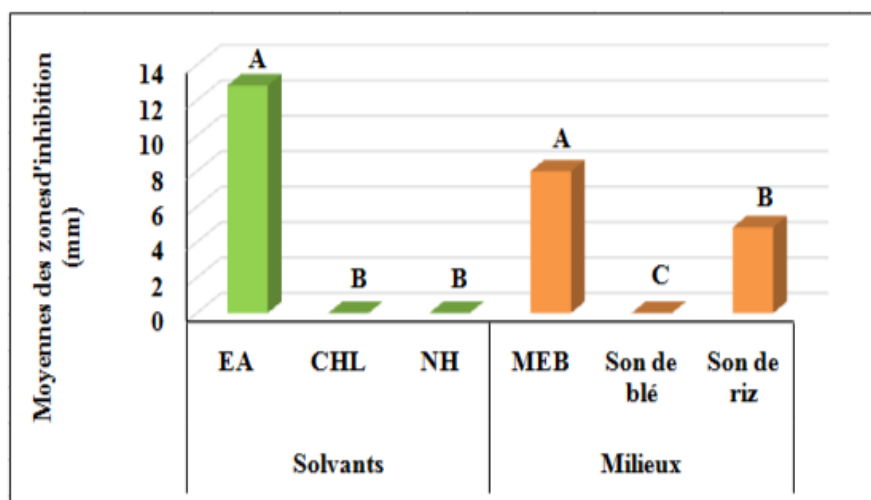


Figure 14 : Activité antibactérienne des extraits de *Penicillium* sp.

Tableau III : Activité antifongique des extraits de *Penicillium* sp.

Milieux De Culture	Solvants	Zones d'inhibition (mm)		
		<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>Aspergillus niger</i>
MEB	Acétate d'éthyle	25	70	20
	Chloroforme	0	0	0
	N-hexane	0	0	0
Son de Riz	Acétate d'éthyle	0	0	0
	Chloroforme	0	0	0
	N-hexane	0	0	0
Son de Blé	Acétate d'éthyle	0	0	0
	Chloroforme	0	0	0
	N-hexane	0	0	0

Les bactéries pathogènes testées n'ont pas été affectées ni par les extraits chloroformiques ni par les extraits du n-hexane, par contre les extraits bruts de l'acétate d'éthyle ont montré une moyenne des zones d'inhibition de 12.83 mm.

Le même résultat a été montré dans l'activité antifongique, où l'acétate d'éthyle était le seul solvant ayant montré une activité contre les champignons phytopathogènes, avec une zone d'inhibition maximale obtenue contre *Fusarium oxysporium* (70 mm) suivie par *Alternaria alternata* (25mm) et d'*Aspergillus niger* (20mm) (figure 15).

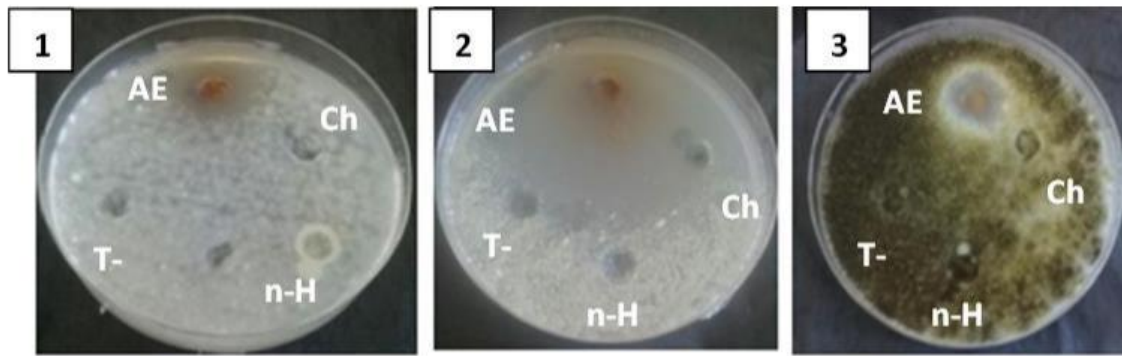


Figure 15 : Activité antifongique des extraits de *Penicillium* sp.

1: *Alternaria alternata*, **2:** *Fusarium oxysporium*, **3:** *Aspergillus niger*, **AE:** Acétate d'éthyle, **Ch:** Chloroforme, **n-H:** N-Hexane

Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Premjanu et *al.*, (2016) et Pavithra et *al.*, (2012), où l'acétate d'éthyle était le meilleur solvant d'extraction ce qui permet de conclure que les composés bioactifs sont facilement extraits par le solvant le plus polaire et que la nature de ces molécules est polaire,

Pour mieux confirmer l'activité antimicrobienne, l'extrait de l'acétate d'éthyle a été testé sur une large gamme de bactéries pathogènes et une levure. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 16.

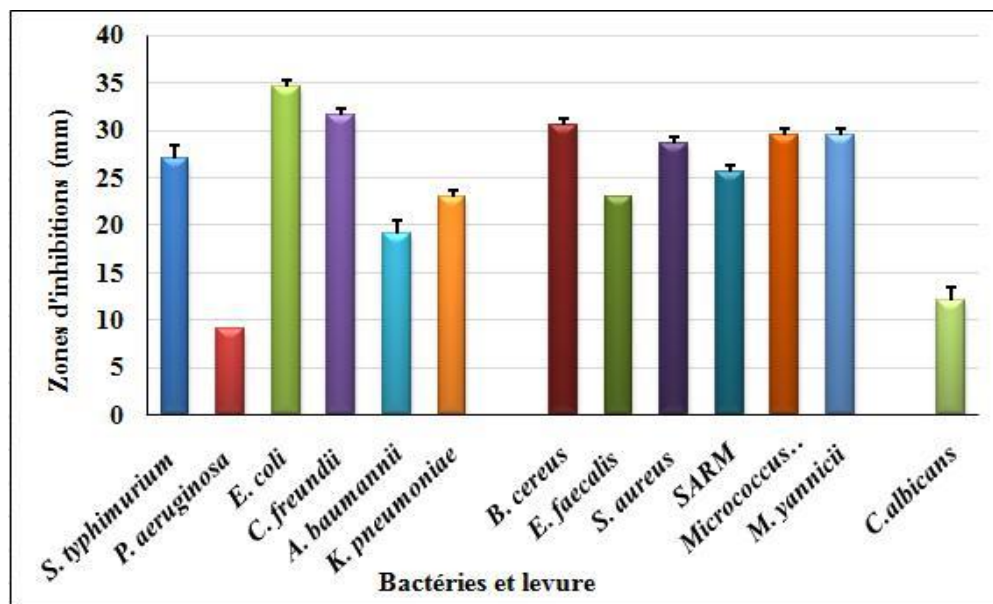


Figure 16 : Activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Penicillium* sp.

L'extrait de l'acétate d'éthyle était actif contre toutes les bactéries testées. Le plus grand effet a été observé contre les bactéries à Gram positif plus précisément contre *B. cereus* avec une zone d'inhibition de 30.5 mm, suivi de *M. luteus* et *M. yannicii* avec une moyenne de 29.5 mm. *S. aureus*, *SARM*, *E. faecalis* viennent ensuite avec des zones d'inhibition de 28.5, 25.5 et 23 mm.

Pour le groupe des bactéries à Gram négatif, l'extrait a inhibé fortement *E. coli* avec une moyenne d'inhibition atteignant les 34.5mm. Une moyenne d'inhibition de 31.5 mm a été observée contre *C. freundii*, 27 mm contre *S. typhimurium* suivie de *K. pneumoniae* et *A. baumannii* avec des moyennes de 23, 19 mm respectivement. Une faible moyenne d'inhibition de 9 mm a été observée contre *P. aeruginosa*. L'extrait a montré également une activité contre la levure *C. albicans* avec une zone d'inhibition de 12 mm.

A partir de ces résultats on conclut que l'extrait d'acétate d'éthyle inhibe de manière significative les bactéries à Gram positif, à Gram négatif et les levures. Ceci s'accorde avec les résultats obtenus par Pavithra et al.,(2012).

La comparaison de l'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle sur les deux groupes de bactéries pathogènes est représentée dans la figure 17. Il a été observé que l'extrait a une activité plus forte sur les bactéries à Gram positif (27,75 mm) par rapport aux bactéries à Gram négatif (24mm). Ces résultats concordent avec les résultats obtenus par Sadrati et al., (2013).

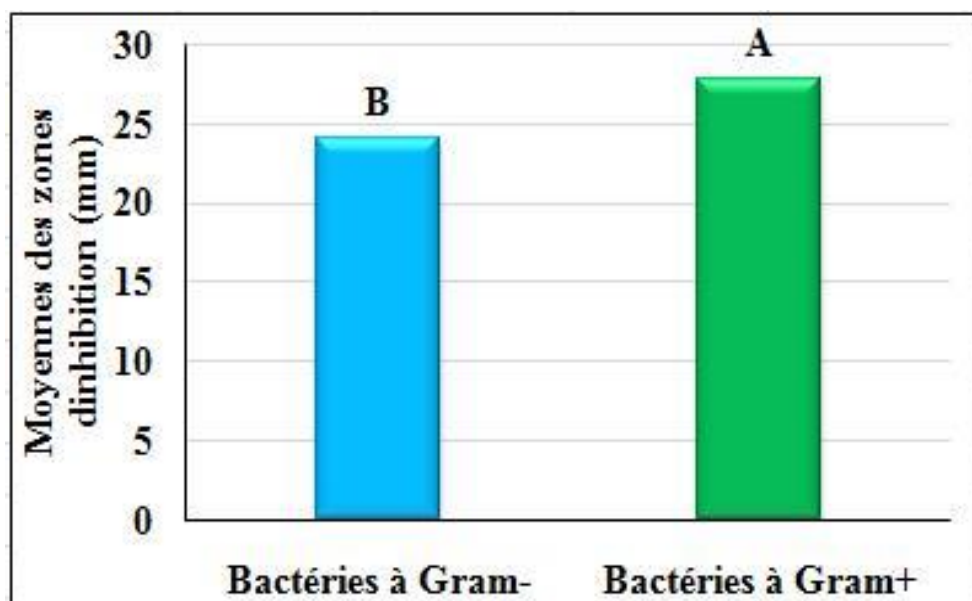


Figure 17 : Comparaison de l'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif

La raison de la différence de sensibilité entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif pourrait être attribuée aux différences morphologiques entre ces deux groupes de bactéries. Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane supplémentaire à l'extérieur de leur paroi, ce qui rend la barrière externe plus épaisse et difficile à pénétrer (Tong *et al.*, 2014), par contre les bactéries à Gram positif possèdent uniquement une couche externe de peptidoglycane qui ne constitue pas une barrière de perméabilité efficace (Sadrati *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont montré que des champignons endophytes isolés de différentes plantes peuvent avoir une activité antimicrobienne, ils résisteraient à l'invasion et inhiberaient une grande variété de microorganismes nocifs pour l'homme, animaux et plantes par la production de métabolites secondaires (Strobel *et al.*, 2004)

Certains des métabolites les plus connus sont produits par des espèces de *Penicillium*, les plus importantes étant les pénicillines produites par *Penicillium chrysogenum*, l'acide mycophénolique produit par *Penicillium brevicompactum* et les compactines produites par *Penicillium solitum* (Gharaei-Fathabad *et al.*, 2014)

Dans notre étude l'inhibition des bactéries à Gram positif peut-être due à la présence de la pénicilline dans l'extrait qui agit principalement contre les bactéries à Gram positif. Cependant, il est important de souligner l'inhibition de la bactérie à Gram négatif (*P. aeruginosa*) qui est naturellement résistante aux pénicillines naturelles, cela suggère la présence d'un autre métabolite à activité antibactérienne dans l'extrait. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Lopes *et al.*, (2012).

Le genre *Penicillium* est la source de peptides et de phénols qui ont permis d'inhiber *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (Zerroug, 2011). Il est également bien connu par sa production de composés antifongiques, parmi ceux-ci, la griséofulvine est l'un des antifongiques représentatifs. Elle a été largement utilisée contre les dermatophytes et affecte les caractéristiques de croissance de divers champignons (Mayavan et Sangeetha, 2016).

Le peptide antifongique (PAF) produit par *P. chrysogenum* est utilisé comme un antifongique pour réduire l'incidence de certaines maladies de plantes, tels que la pourriture des racines chez de nombreuses plantes provoquées par *Fusarium* sp. (Lopes *et al.*, 2012). Pohl *et al.*, (2011) ont rapporté que les acides gras produits par les espèces de *Penicillium* sont très importants en tant qu'agents antifongiques et antibactériens. Ils ont conclu que la

membrane cellulaire constituait la cible la plus importante des acides gras antifongiques et ont indiqué que l'augmentation de la fluidité de la membrane était due en partie à la présence d'acides gras, ce qui entraînait une décharge des composants intracellulaires et la mort cellulaire. Les acides gras rapportés par Pohl et *al.* (2011), comprennent notamment l'acide hexadécanoïque (palmitique), l'acide octadécanoïque (stéarique) et l'acide décaneioïque.

III.4 Activité enzymatique

Après incubation de 3 à 5 jours, L'activité enzymatique de *Penicillium* sp. se traduit par la présence d'un halo clair autour de la colonie. Les résultats sont présentés dans le tableau IV et la figure 18

Tableau IV: Les moyennes de l'activité enzymatique de *Penicillium* sp.

Activité	Index enzymatique
Estérase	2,01
Protéase	1,13
Cellulase	1,96
Lipase	1,14

D'après les résultats obtenus sur milieux gélosés, la souche *Penicillium* sp. s'est avérée performante dans la production des 4 enzymes recherchées, Avec une activité estérasique la plus élevée (IE=2.01) suivie par l'activité cellulosique (IE=1.96), lipolytique (IE=1,14) et protéolytique (IE=1,13). Cela indique l'aptitude de l'endophyte de dégrader une variété de sources de carbone.

La dégradation de la caséine et de la cellulose suggère que le champignon est capable de produire des protéases et de la cellulase. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Compaore et *al.*, (2017) qui ont prouvé que les souches de *Penicillium* sp. étaient capables de se développer et de produire des enzymes extracellulaires sur un milieu solide.

Le *Peinicillium* sp. a dégradé le tween 80 et le tween 20 par synthèse des lipases et des estérases extracellulaires. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par Zerroug (2011) qui a remarqué que les champignons endophytes pouvaient produire une panoplie d'enzymes comme les estérases, les protéases, les lipases et l'amylase. En effet plusieurs auteurs ont montré que les espèces appartenant au genre *Penicillium* sont capables de produire plusieurs enzymes extracellulaires (Compaore et *al.*, 2017)

Les enzymes fongiques gagnent en importance dans l'agriculture, l'industrie et la santé humaine, car ils sont souvent plus stables (à haute température et à un pH extrême) que les enzymes dérivées de plantes et d'animaux. Les enzymes fongiques sont utilisées dans la fabrication d'aliments, de boissons, de confiseries, de textiles et de cuirs et contribuent à la simplification du traitement des matières premières (Maria et *al.*, 2005).

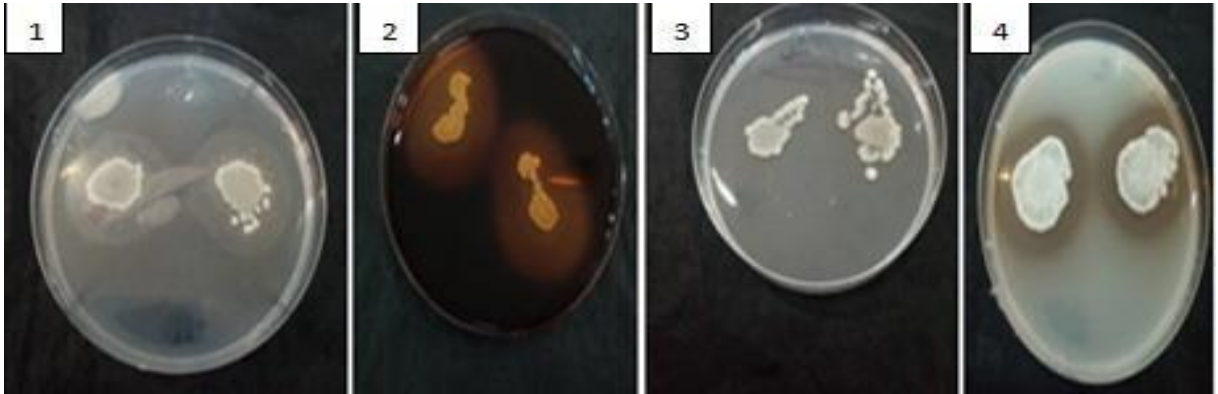


Figure 18: Activités enzymatiques de *Penicillium* sp.

1 : Activité estérasique, **2 :** Activité cellulosique, **3 :** Activité lipolytique, **4 :** Activité protéolytique.

Conclusion générale

Les endophytes sont des micro-organismes relativement peu étudiés et qui ont récemment pris de l'importance en raison de leurs différentes activités biologiques et de leurs composés bioactifs présentant un niveau élevé de diversité structurale. Ils sont considérés comme une source riche de nouveaux métabolites naturels destinés à être exploités en médecine, dans l'industrie et en agriculture.

Dans ce travail, un choix du milieu de fermentation et du solvant d'extraction des métabolites secondaire d'un champignon endophyte *Penicillium* sp. a été réalisé pour permettre une meilleure production des molécules antimicrobiennes avec une activité maximale. Ceci nous a permis de sélectionner le milieu liquide MEB comme meilleure milieu de fermentation. Pour le solvant, l'acétate d'éthyle était le solvant qui a extrait le maximum de molécules bioactives par rapport aux autres solvants utilisés.

L'évaluation de l'activité de l'extrait d'acétate d'éthyle contre une large gamme de bactéries pathogènes aussi bien à Gram positif que à Gram négatif testées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumonia*, *SARM*, *Micrococcus Luteus*, *Microbacterium yannicii*, *Enterococcus faecalis*) a montré que ce dernier possède un pouvoir antibactérien contre toutes les bactéries avec une activité plus prononcée contre les bactéries à Gram positif que contre celle à Gram négatif, due à leurs différences morphologiques. Une activité antifongique et antilevurienne a également été observée contre *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

Il apparaît aussi que l'endophyte testé présente des activités enzymatiques différentes. Son aptitude à dégrader la cellulose, la caséine et les lipides indique qu'il est doté d'un bagage enzymatique d'importance biotechnologique comprenant les lipases, les cellulases, les protéases et les estérases extracellulaires.

D'après ces résultats préliminaires, ce champignon endophyte a une grande importance médicale et biotechnologique et mérite d'autres études plus approfondies comprenant :

- Une identification moléculaire pour identifier ce champignon au niveau de l'espèce

- La cinétique et l'optimisation des paramètres physicochimiques pour une meilleure production des molécules actives
- Tester d'autres activités biologiques telles que l'activité antioxydante, anticancéreuse, etc.

Références bibliographiques

An H., Liu Y., Zhao X., Huang Q., Yuan S., Yang X., Dong J. (2015). Characterization of cadmium-resistant endophytic fungi from *Salix variegata* Franch. in Three Gorges Reservoir Region, China. *Microbiological Research* **176**, 29–37.

Andreea C., Elena T. M., Cristina G. M., Matias R., Rhiannon M. F., Raimundo A C. (2016). Endophytic Fungi Isolated from *Musa acuminata* ‘Dwarf Cavendish’ and their Activity against Phytopathogenic. *Journal of Agriculture Biotechnology* **1**, 35–43.

Anwar J, Iqbal Z. (2017). Effect of growth conditions on antibacterial activity of *Trichoderma harzianum* against selected pathogenic bacteria. *Sarhad Journal of Agriculture* **33**, 501-510.

Chandra Sh. (2012). Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**, 47–59.

Clay K., Schardl C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist*. **160**, 99-127.

Cohen S. D. (2006). Host Selectivity and Genetic Variation of *Discula umbrinella* Isolates from Two Oak Species: Analyses of Intergenic Spacer Region Sequences of Ribosomal DNA. *Microbial Ecology* **52**, 463–469.

Compaore H., Sawadogo-lingani H. , Samandoulougou S. , Guira F. , Savadogo A., Traore A. S., (2017). Aptitude de trois souches de moisissures à produire des enzymes extracellulaires en milieu solide. *Journal of Applied Biosciences* **110**, 10776-10782.

Dariusz P. M., Belesky D. P. (2000). Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses: Mechanisms of Drought and Mineral Stress Tolerance. *Crop science* **40**, 923-940.

De Bray A. (1866), Morphologie and physiologie der pilze, Flechten, and Myxomyceten. Holfmeister’s Handbook of physiological Botany **2**, 1- 334.

Deshmukh S. K., Gupta M. K., Prakash V., Saxena S. (2018). Endophytic Fungi: A Source of Potential Antifungal Compounds. *Journal of Fungi* **4**, 1-42.

Deshmukh S. K., Verekar S. A., Bhave S. V. (2015). Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. *Frontiers in microbiology* **5**, 1-34.

Devaraju R., SATISH S. (2011). Entophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L and studies on antimicrobial activity of its entophytic *Fusarium* sp. *Asian Journal of Experimental Sciences* **2**, 75-79.

Elmi A. A., West C. P. (1995). Endophyte infection effects on stomatal conductance, osmotic adjustment, and drought recovery of tall fescue. *New Phytologist* **131**, 61-67. *European Journal of Experimental Biology* **4**, 35-43.

Florence L. (2002). La tolerance aux metaux /ourds d'*Arrhenatherum elatius* (L.) Beauv. Ex J & C. Pres/. ; influence des endophytes racinaires fongiques sur le developpement vegetatif et la bioaccumulation. *Journal homepage* **149**, 123-127

Gharaci-Fathabad E., Tajick-Ghanbary M.A. , Shahrokhi N. (2014). Antimicrobial Properties of *Penicillium* Species Isolated from Agricultural Soils of Northern. *IranResearch Journal of Toxins* **6**, 1-7.

Gill, S. S., Gill, R., Trivedi, D. K., Anjum, N. A., Sharma, K. K., Ansari, M. W., Abid A. A., Ajit V., Ram P., Pereira, E. (2016). Piriformosporioides: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in microbiology* **7**, 1-20.

Hong L. , Wen X. Z. , Jun C. M. , Jun H. , Ren X. T. (1999) . New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua* .*Plant Science* **151**, 67–73.

Hyde k. D., Soyong K., (2008).The fungal endophyte dilemma.*Fungal diversity* **33**, 163-173.

Jalgaonwala R. E., Mahajan R.T. (2011). Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from some indigenous medicinal plants. *Journal of Agricultural Technology* **7**, 1733-1741.

Jinxu Y., Ying W., Zhen H., Mi L., Kaiming Z., BidaG. (2018). Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with *Camellia oleifera* .*journal of mycobiology* **46**, 85–91.

Kausar A., Ashraf M. Y.,Niaz M. (2014). Some physiological and genetic determinants of salt tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): Biomass production and nitrogen metabolism. *Pakistan Journal of Botany* **46**, 515-519.

Khan A., Hamayun M., Nadeem A., Javid H., Kang S-M., Kim Y-H., Muhammad A., Tang D-S. , Muhammad W., Ramalingam R., Hwang Y-H.,Lee I-J. (2011). Salinity Stress Resistance Offered by Endophytic Fungal Interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and *Glycine max.* L. *J Microbiol Biotechnol* **21**, 893–902.

Kharwar R.N., Ashish M., Surendra K. G.,Andrea S., Donald S. (2011). Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Journal the Royal Society of Chemistry* **28**, 1208-1228.

Khondoker M. G. D., Hua L., Krishnapillai S., Michael G. K. J.,Stephen J. W. (2017). Host Specificity of Endophytic Mycobiota of Wild *Nicotiana* Plants from Arid Regions of Northern Australia. *Fungal Microbiology* **75**, 74–87.

Laib D., (2016). Bioprospection des activités insecticides des champignons endophytes isolés à partir du laurier rose *Nerium oleander* L. (*Apocynaceae, Gentianales*) vis-à-vis des Coléoptères des denrées entreposées. 1-139.

Laib D. E., Lombarkia N., Bensaci O.Ali. (2015). Utilisation des filtrats du champignon endophyte *Fusarium* sp de *Nerium oleander* L. dans la lutte biologique contre *Sitophilus zeamais* en Algérie. *Revue Agriculture* **10**, 38 – 43.

Laib D.E. (2014).Etude de l'activité insecticide du champignon endophyte *Cladosporium* sp. isolé du Laurier rose *Nerium oleander* L.(*Apocynaceae, Gentianales*) sur la bruche des haricots *Acanthoscelides obtectus* Say (*Coleoptera, Bruchidae*).*Nature & Technologie* **10**, 39- 44.

Lopes F. C., Tichota D. M., Sauter I. P., Meira S. M. M., Segalin J., Rott, M. B. Brandelli A. (2012). Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* IFL1 growing on agro-industrial residues. *Annals of Microbiology* **63**, 771–778.

Lu Y., Haobin Z., Xixi Z., Xiaoguang X., Yichao D., Chunmei J Junling S., Dongyan S., Qingsheng H., Hui Y., Mingliang J. (2018). Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**, 6279–6298.

Maria G. L., Sridhar K. R.,Raviraja N. S. (2005). Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technol* **1**, 67-80.

Mayra R., Eduardo C., Orlando B. (2005). Molecular aspects of abiotic stress in plant. *Biotecnología aplicada* **22**, 1-10.

Mayavan A., Sangeetha D. (2016). Production of griseofulvin from marine fungi *Penicillium fellutanum*. *International Journal of Applied Research* **8**, 701-704.

Meenatchi A., Ramesh V., Bagyalakshmi, Kuralarasi R., Shanmugaiah V., Rajendran A. (2016). Diversity of endophytic fungi from the ornamental plant – *Adenium obesum*. *Studies in Fungi* **1**, 34-42.

Mendoza, A. R., Sikora R. A. (2008). Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *BioControl* **54**, 263-272.

Merlin J. N., Christudas I.V.S. N., Kumar P. P., Agastian P. (2013). Optimization of Growth and Bioactive Metabolite Production: *Fusarium Solani*. *Journal of pharmaceutical and clinical research* **6**, 98-103.

Miral A. (2018). *Helichrysum italicum* et ses micromycètes endophytes : Diversité et biotransformations. Université Toulouse III Paul Sabatier. 1-132.

Mohini G. P., Jyoti P., Sucheta N P., Amanpreet K S. (2015). Extracellular Enzymatic Activities of Endophytic Fungi Isolated from Various Medicinal Plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **4**, 1035-1042.

Nuangmek W., McKenzie E.H.C., 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.

Nwakanma C., Njoku E., Pharamat T. (2016). Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites of Fungi Isolated from Leaves of Bush Mango. *Next Generation Sequencing & Application* **3**, 1-6.

Ogou A., Tchabi A., Tounou A K., Agboka K., Sokame B M. (2018). Effet de quatre souches de champignons mycorhiziens arbusculaires sur *Meloidogyne* spp., principal nématode parasitaire du soja (*Glycine max*, L.) au Togo. *Journal of Applied Biosciences* **127**, 12758-12769.

Ouzid Y., Smail-Saadoun N., Houali K. (2018). Comparative study of in vitro antioxidant activity of foliar endophytic fungi and leaves extracts of *Peganum harmala* of dayteaiait (Laghouat, Algeria). *Algerian journal of arid environment* **8**, 115-128.

Park J., Park J. H., Choi G. J., Lee S, Kyoung S. J., Yong H. Ch., Kwang Y. Ch., Kim H. (2003). Screening for Antifungal Endophytic Fungi against Six Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology* **31**, 179-182.

Pavithra N., Sathish L., Ananda K. (2012). Antimicrobial and Enzyme Activity of Endophytic Fungi Isolated from Tulsi. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* **16**, 1-6.

Pohl CH., Johan L. F., Kock J. L. F., Thibane V. S. (2011). Antifungal free fatty acids: A Review. In: *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* **691**, 61-71.

Premjanu N., Jaynthy S., Diviya b. (2016). Antifungal Activity of Endophytic Fungi Isolated From *Lansea Coromandelica*—an In silico Approach. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **8**, 207-210.

Rabiah K. (2019). Contribution des champignons entophytes à la tolérance aux farceurs adverses (biotiques et abiotiques) des espèces cultivées : isolement des champignons endophytes et étude de leur contribution à la tolérance à la salinité ou à des polluants. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, 9.

Rakotoniriana E. F., Munaut F., Decock C., Randriamampionona D., Andriambololoniaina m., Rakotomalala T., Rakotonirina E. J., Rabemanantsoa C., Cheuk K., Ratsimamanga S. U., Mahillon J., El-jaziri M., Quetin-leclercq j., Corbisier A. M. (2007). Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek* **93**, 27-36.

Ramesha A., Srinivas C. (2014). Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts of endophytic fungi isolated from *Plumeria acuminata* L. and *Plumeria obtusifolia* L. *European Journal of Experimental Biology* **4**, 35-43.

Ramos M. H. P., Said S. (2011). Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. *Journal Bioscience and Biotechnology* **2**, 443-449.

Rodriguez R. J., Henson J., Van V. E., Hoy M., Wright L., Beckwith F., Kim Y., Redman R.S. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal* **2**, 404-416.

Rungjindamai N., Pinruan U., Choeyklin R., Hattori T., Jones E. B. G. (2008). Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis* in Thailand. *Fungal diversity* **33**, 139-161.

Sadrati N., Daoud H., Zerroug A., Dahamna S., Bouharati S. (2013). Screening Antimicrobial And Antioxidant Secondary Metabolites From Endophytic Fungi Isolated From Wheat (*Triticum Durum*). *Journal of Plants Protection Research* **53**, 129-136.

Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M., Sullivan T. J. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 319-343.

Santara R. (2004). Les endophytes de *Eugenia jambolana* Lam. (MYRTACEAE) : Un Modèle de relation plante microorganismes. Université d'Antananarivo. 1-59.

Saikkonen K., Wali P., Helander M., Faeth S.H. (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*. **9**, 275-280.

Selim K., Elkhateeb W., Tawila A., El-Beih A., Tahany A., El-Diwany A., Eman F.A. (2018). Antiviral and Antioxidant Potential of Fungal Endophytes of Egyptian Medicinal Plants. *Fermentation*. **4**, 1-11.

Senequier A., Canard B. (2016). Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécule d'intérêt thérapeutique. Université Grenoble Alpes. 1-102.

Srinivasan K., Jagadish L.K., Shenbhagaraman R., Muthumary J. (2010). Antioxidant Activity of Endophytic Fungus *sphyllosticta* sp. Isolated From *Guazuma Tomentosa*. *Journal of Phytology* **2**, 37-41.

Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* **67**: 257-268.

Sun B.T., Komivi S A., Xiao-Feng X., Jun-Hui Ch., Xin A., Yang T., Qian W., Bo-Wen F., Mark S. G., Min-Sheng Y. (2018) Endophytic effects of *Aspergillus oryzae* on radish (*Raphanus sativus*) and its herbivore *Plutellaxystella*. *Planta* **3**, 705-714.

Sunitha V.H., Nirmala D.D., Srinivas C. (2013). Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants . *World Journal of Agricultural Sciences* **1**, 01-09.

Tajick Gh. M. A., Seid M. H., Babaiezad V. (2014). Identification of some secondary metabolites produced by four *Penicillium* species . *Summer and Autumn* **1**, 107-113.

Talbi H., Boumaza A., El-mostafa K., Talbi J., Hilali A. (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L). *Mater. Environ.Sci* **6**, 1111-1117.

Ting A.S.Y. (2014). Biosourcing Endophytes as biocontrol Agents of Wilt Diseases. *Advances in Endophytic Research* **15**, 283-300.

Ting A.S.Y., Mah S.W., Tee C.S. (2009). Prevalence of Endophytes Antagonistic Towards *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Cubense* Race 4 in Various Plants. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. **3**, 399-406.

Tintjer T., Leuchtman A., Clay K. (2008). Variation in horizontal and vertical transmission of the endophyte *Epichloë elymi* infecting the grass *Elymus hystrix* . *New Phytol.* **179**, 236-246.

Tolulope R. A., Adeyemi A. I., Erute M. A., Abiodun T. S. (2015). Isolation and screening of endophytic fungi from three plants used in traditional medicine in Nigeria for antimicrobial activity. *International Journal of Green Pharmacy*. **9**, 58-62.

Tong W.Y., Ang S., N., Darah I., Latiffah Z. (2014). Antimicrobial Activity of *Penicillium Minioluteum* ED24, An Endophytic Fungus Residing In *Orthosiphon Stamineus* Benth. *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* **3**, 121-132.

Touseef A. (2006). Endophytic Fungi harbored in nothapodytes Foetida Plants. University Aligarh (India). 1-135.

Vijayakumari S. J., Sasidharannair N. K., Nambisan B., Mohandas C. (2013). Optimization of media and temperature for enhanced antimicrobial production by bacteria associated with *Rhabditis* sp. *Journal Microbiology* **5**, 136-141.

Vijeshwar V., Pankaj S., Amardeep K. (2008). Endophytes: A Novel Source for Bioactive Molecules. *Proc Indian Natn Sci Acd* **74**, 73-86.

Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., von W. D., Franken P. and Kogel K. H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 13386-13391.

Yamaç M., Bilgili F. (2006). Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. *Pharmaceutical Biology* **44**, 660-667.

Zabalgozeazcoa I. (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*. **6**, 138-146.

Zerroug A., (2011). Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk), 89.

Zerroug A., Sadrati N., Demirel R., Bakli S. et Harzallah D. (2018). Antibacterial activity of endophytic fungus, *Penicillium griseofulvum* MPR1 isolated from medicinal plant, *Menthapulegium* L. *Full Length Research Paper* **12**, 1056-1066.

Zhou D., Hyde K. D. (2001). Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research* **105**, 1449–1457.

Annexe1

Composition des milieux de culture

Potato Dextrose Agar (PDA)

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

pH 5.6

Potato Dextrose Broth (PDB)

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

pH 5.6

Malt Extract Agar (MEA)

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

PH:5.4

Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

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

pH = 5.6

Gélose Nutritive (GN)

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	5 g

NaCl.....5 g
Agar.....20g
Eau distillée.....1000ml
pH = 7,2

Nutrient broths (NB)

Peptone.....10 g
Extrait de viande sec.....5 g
NaCl.....5 g
Eau distillée.....1000 ml
pH :7,2-7,4

Yeast Extract Sucrose (YES)

Extrait de levure.....3 g
Sucrose.....2g
K₂HPO₄.....1g
MgSO₄..... 0,5 g
Agar15 g
Eau distillée..... 1000 ml
PH: 7.2

Malt Yeast Extract Agar (MYEA)

Extrait de Malt20 g
Extrait de levure.....2 g
Agar..... 15 g
Eau distillée.....1000 ml
pH: 6.2

Malt Extract Broth (MEB)

Poudre d'extrait de malt.....20g
Peptone.....1g
Glucose.....20g
Eau distillée.....1000ml
PH: 5.4

Gélose molle

Agar.....	7g
Eau distillée.....	1000ml

Glucose Yeast Extract Peptone (GYP)

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

pH= 6

Peptone Agar Medium

Peptone.....	10 g
NaCl.....	5 g
CaCl ₂ 2H ₂ O.....	0.1 g
Agar	16 g
Eau distillée.....	1000ml

Annexe 2
Solutions et réactifs

Eau physiologique

Nacl.....9 g
Eau distillée.....1000 ml

Lugol

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

L'eau peptone

Peptone10g
Chlorure de sodium.....5g
Phosphate disodique anhydre.....3,5g
Dihydrpogenophosphate de potassium.....1,5g
PH: 7.2

أجريت هذه الدراسة لتقييم النشاط المضاد للميكروبات والنشاطية الأنزيمية للفطر *Penicillium sp.* المعزول من نبتة طبية. سمح لنا اختيار وسط التخمر والمذيب لاستخلاص المستقلبات الثانوية من هذا الفطر، باختيار الوسط السائل MEB، الذي كان الأكثر نشاطاً ضد البكتيريا بمتوسط مناطق تثبيط (8 ملم) ، والوحيد من بين الأوساط الأخرى الذي كان له نشاطية ضد الفطريات المسببة للأمراض النباتية. بالنسبة لمذيب الاستخلاص، يعتبر الأسيتات إيثل المذيب الذي استخلص أقصى قدر من الجزيئات النشطة مقارنة بالمذيبات الأخرى المستعملة بمتوسط مناطق تثبيط 12.83 مم ضد البكتيريا. أكد النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص اسيتات إيثل ضد مجموعة واسعة من البكتيريا المسببة للأمراض، الخميرة والفطر الممرض للنبات انه يملك تثبيطاً قوياً للبكتيريا، حيث كانت البكتيريا الأكثر حساسية هي *Escherichia coli* (34.5 ملم) والأكثر مقاومة *Pseudomonas aeruginosa* (9 ملم). لوحظ أيضاً وجود نشاط متوسط ضد الخميرة الممرضة بمتوسط مناطق تثبيط 12 ملم. بالنسبة للنشاط المضاد للفطريات، لوحظ أن له تأثير أكبر على *Fusarium oxysporium* بمنطقة تثبيط تصل إلى 70 ملم. أثبتت اختبارات النشاط الإنزيمي أن *Penicillium sp.* قادر على إنتاج بعض الإنزيمات الخارجية التي تشمل على الليباز (IE = 1.14)، السيليلاز (IE = 1.96)، البروتياز (IE = 1.13) والإستيراز (IE = 2.01).

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط الأنزيمي، النبات الطبي.

Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but d'évaluer l'activité antimicrobienne et enzymatique du champignon endophyte *Penicillium sp.* isolé à partir d'une plante médicinale. Un choix du milieu de fermentation et du solvant d'extraction des métabolites secondaire du champignon endophyte nous a permis de sélectionner le milieu liquide MEB qui était le plus actif contre les bactéries avec une moyenne des zones d'inhibition de 8 mm et le seul parmi les autres milieux qui était actif contre les champignons phytopathogènes. Pour le solvant d'extraction, l'acétate d'éthyle était le solvant qui a extrait le maximum de molécules bioactives par rapport aux autres solvants utilisés avec une moyenne des zones d'inhibition de 12.83mm contre les bactéries. L'activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle contre une large gamme de bactéries, de levure pathogène et de moisissures phytopathogènes a confirmé l'activité de cet extrait, qui a présenté une forte inhibition des bactéries, où la bactérie la plus sensible était *Escherichia coli* (34.5mm) et la plus résistante *Pseudomonas aeruginosa* (9 mm). Une bonne activité contre la levure a été également observée avec une moyenne des zones d'inhibition de 12 mm. Pour l'activité antifongique plus grand effet a été observé contre *Fusarium oxysporium* avec une zone d'inhibition maximale de 70 mm. Les tests de l'activité enzymatique ont démontré que *Penicillium sp.* est doté des activités enzymatiques extracellulaires comprenant : les lipases (IE=1,14), cellulases (IE=1,96), les protéases (IE=1,13) et les estérases (IE=2,01).

Mot clés : Champignons endophytes, activité antimicrobienne, activité enzymatique, plante médicinale.

Abstract

The present study was conducted to evaluate the antimicrobial and enzymatic activity of the endophytic fungus *Penicillium sp.* isolated from a medicinal plant. A choice of the fermentation medium and the solvent for secondary metabolite extraction from endophytic fungus allowed us to select the liquid medium MEB, which was the most active against bacteria with a mean of inhibition zones of the 8 mm, and the only one among other media that was active against phytopathogenic fungi. For the solvent of extraction, ethyl acetate was found the solvent that extracted the maximum of bioactive molecules compared to other solvents that used with an average of 12.83 mm inhibition zones against bacteria. The antimicrobial activity of the ethyl acetate extract against a wide range of pathogenic bacteria, yeast and phytopathogenic molds confirmed the activity of this extract, which exhibited a strong inhibition of bacteria, where the bacterium most sensitive was *Escherichia coli* (34.5mm) and the most resistant *Pseudomonas aeruginosa* (9mm). A good activity against pathogenic yeast was also observed with an average of inhibition zones 12 mm. For antifungal activity the greatest effect was observed against *Fusarium oxysporium* with a maximum inhibition zone of 70 mm. Enzymatic activity tests demonstrated that *Penicillium sp.* is able to produce some enzymes extracellular comprising: lipases (IE = 1.14), cellulases (IE = 1.96), proteases (IE = 1.13) and esterase (IE = 2.01).

Key words: Endophytic fungi, antimicrobial activity, enzymatic activity, medicinal plant.

