



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 الأرض والكون

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

قسم العلوم البيولوجية

*Département des Sciences Biologiques*

## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master  
Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie*

*Filière : Sciences biologiques*

*Spécialité : Microbiologie appliquée*

### Intitulé :

**Méthodes d'étude des champignons endophytes  
et de leurs activités biologiques : Synthèse  
bibliographique.**

Présenté par :

*BENTOUMI Ahlem & SAADSAOUD Taki EL ddine*

Soutenu le 27/06/2022, Devant le Jury :

Président :	Mme. TAMINE Milouda	MCB	Faculté SNV-STU, Univ. de B.B.A
Encadrant :	Mme. ZERROUG Amina	MCB	Faculté SNV-STU, Univ. de B.B.A
Examineur :	Mme. SOUAGUI Yasmina	MCB	Faculté SNV-STU, Univ. de B.B.A

Année Universitaire 2021/2022

# *Remerciements*

Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah, le clément et le miséricordieux de nous avoir de donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

On aimerait remercier chaleureusement notre encadreur madame ZERROUG Amina pour avoir accepté de nous encadrés et pour sa disponibilité, son sérieux et ses conseils judicieux durant toute la période du projet. Également nous adressons un grand merci au jury de soutenance, d'accepter de juger notre travail.

Aussi nos sincères remerciements à l'ensemble des Enseignants de l'université de Bordj Bou Arreridj et toutes les personnes qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre.

## *Dédicaces*

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études .

A mes frères Hamza, Yaakoub , Khaled ,Mohammed et ma sœur Wafa et à leurs chers fils pour leur soutien et leurs encouragement.

A mes amis qui n'ont pas changé dans leur amitié. Enfin, je ne pourrais oublier tous les camarades de la même promotion. Leurs sincérités m'ont vraiment touchée. Ils ont contribué à cette réussite et je tiens également à leur souhaiter le meilleur.

*Saad Saoud Taki el ddine*

# *Dédicaces*

Je dédie ce mémoire

A tous ceux que j'aime. A mes chers parents : ma mère et mon père pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement.

A mes frères AbdEnnour, AbdErraouf, Abd El  
Waahabe

A ma sœur Meriem. A mes grands-parents.

A toute la famille BENTOUMI et REBBAH.

A mes amies, surtout DAHAK Meriem, et mes camarades ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail.

***BENTOUMI Ahlem***

## Sommaire

المخلص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction .....01

### **Chapitre I : Généralités sur les champignons endophytes**

I.1. Définition des champignons endophytes .....02

I.2. Biodiversité et classification des champignons endophytes.....02

I.3. Intérêt des champignons endophytes.....04

I.4. Modes de transmission des champignons endophytes..... 05

### **Chapitre II : Les techniques d'étude des champignons endophytes**

II .1. Isolement des champignons endophytes.....06

II.2. Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne .....06

    II.2.1. Technique de double culture.....06

    II.2.2. Technique des cylindres d'agar.....07

II.3. Identification des champignons endophytes..... 07

    II.3.1. Identification morphologique.....07

    II.3.2. Identification moléculaire.....08

    II.3.3. Identification par spectrophotométrie de masse au Maldi-Tof MS.....08

II.4. Fermentation et extraction.....09

II.5. Identification des molécules bioactives.....10

II.6. Activité antimicrobienne.....10

    II.6.1. Méthode de diffusion sur disque.....11

    II.6.2. Méthode des puits.....11

    II.6.3. Autobiographie.....11

    II.6.4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).....12

II.7. Activité antioxydante.....12

    II.7.1. Activité de piégeage du radical , 1-diphenyl-2-picyl-hydrazyl (DPPH).....13

    II.7.2. Test du pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power).....13

II.8. Activité antivirale.....14

II.9. Activité antiparasitaire.....15

II.10. Activité anticancéreuse.....16

Conclusion.....18

## الملخص

الهدف من هذا العمل هو معرفة الطرق المستخدمة في دراسة الفطريات بما في ذلك عزلها وتحديدتها واستخراج وتحديد مستقلباتها الثانوية النشطة بيولوجيا وكذلك تقييم الأنشطة البيولوجية الخاصة بهذه الأخيرة. قبل أي عزل للفطريات الداخلية، تعقيم سطح أجزاء النباتات المختلفة ضروري، ثم اختيار مجموعة من الفطريات الأكثر نشاطا والذي يتم غالبا باستخدام طرق المزارع المزدوجة واسطوانات "آجار". يتم تحديد النباتات الداخلية الأكثر نشاطا أولا شكليا بعد ذلك جزيئيا لمزيد من الدقة. بعد استخراج المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا التي تنتجها هذه الفطريات، يتم فصلها وتحديد هويتها بواسطة طرق مختلفة، من بينها نجد تقنية التلوين في شكل طبقة رقيقة من السائل وفق أداء مرتفع. أخيرا تحديد الأنشطة البيولوجية المختلفة للجزيئات النشطة يتم بالنسبة للنشاط الميكروبي المضاد بواسطة طريقة الانتشار على القرص، الأبار والسيرة الذاتية وتحديد الحد الأدنى من التركيزات المثبطة ومبيدات البكتيريا. فيما يتعلق بنشاط مضادات الأكسدة ومن بين أكثر الطرق استخداما نجد: نشاط الكسح الجذري 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl واختبار "القدرة المختزلة". بالنسبة لنشاط مضاد الفيروسات والسرطان، فإن قياس الألوان هو المحدد، بينما يتم تحديد مضاد الطفيليات بطريقتين، إما عن طريق استغلال قدرة الجزيئات النشطة على تثبيط gGAPDH و APRT إما باستخدام مزارع الخلايا المصابة بالطفيلي ثم قياس مستوى فعالية هذا الأخير بعد العلاج بالعناصر الفطرية.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات الداخلية، النشاط المضاد للميكروبات، مضادات الأكسدة، مضادات الفيروسات، مضادات الطفيليات، مضادات السرطان

## Résumé

L'objectif de ce travail est de connaître les méthodes utilisées pour l'étude des champignons endophytes impliquant leur isolement, leur identification, l'extraction et l'identification de leurs métabolites secondaire bioactifs ainsi que l'évaluation des activités biologiques de ces dernières. Avant tout isolement des champignons endophytes, une stérilisation de la surface des différentes parties de plantes est nécessaire, une sélection des champignons les plus actifs, est ensuite le plus souvent réalisé en utilisant les méthodes de la double culture et des cylindres d'agar. Les endophytes les plus actifs sont identifié premièrement morphologiquement ensuite moléculairement pour plus de précision. Après l'extraction des métabolites secondaire bioactifs produits par ces champignons, leurs séparation et identification, sont réalisées par différentes méthodes, telles que la chromatographie surcouche mince et en phase liquide à haute performance. Enfin la détermination des différentes activités biologiques des molécules bioactives est estimée, pour l'activité antimicrobienne parla méthode de diffusion sur disque, des puits, l'autobiographie et la détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides. Concernant l'activité antioxydante, les méthodes les plus utilisées est l'activité de piégeage du radical 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl et le test du pouvoir réducteur. Pour les activités antivirale et anticancéreuse on utilise la colorimétrie, alors que l'activité antiparasitaire est déterminée soit par la capacité des molécules actives à inhiber les gGAPDH et APRT soit en utilisant des cultures cellulaires infectées par le parasite et en mesurant le taux de viabilité de ces dernières après leur traitement par les molécules fongiques.

**Mots Clés :** Champignons endophytes, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité antivirale, activité antiparasitaire, activité anticancéreuse.

## **Abstract**

The objective of this work is to know the methods used for the study of fungi endophytic involving their isolation, identification, extraction and identification of their secondary bioactive metabolites as well as the evaluation of the biological activities of these latest. Before any isolation of endophytic fungi, sterilization of the surface of the different parts of plants is necessary, a selection of the most active fungi, is then most often carried out using the methods of double culture and cylinders of agar. The most active endophytic are identified first morphologically then molecularly for more precision. After extraction of bioactive secondary metabolites produced by these fungi, their separation and identification, are carried out by different methods, such as thin-layer and liquid chromatography at high performance. Finally the determination of the different biological activities of the bioactive molecules is estimated, for the antimicrobial activity the diffusion on disk method, wells, autobiography and determination of minimum inhibitory concentrations and bactericides. With regard to antioxidant activity, among the most widely used methods, we find: “1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl” radical scavenging activity and “reducing ability” test. For antiviral and anticancer activity, colorimetry is the determinant, while antiparasitic is determined in two ways, either by exploiting the ability of the active molecules to inhibit gGAPDH And APRT either using cell cultures infected with the parasite and then measuring the level of effectiveness of the latter after treatment with the fungal agents.

**Keywords:** Endophytic fungi, antimicrobial activity, antioxidant activity, antiviral activity, Antiparasitic activity, anticancer activity.



## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ARN** : Acideribonucléique

**AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism

**BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DPPH** : 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

**DGGE** : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

**FRAP** : Ferric Reducing Antioxidant Power

**gGAPDH** : Glycerid 3 phosphate dehydrogenase

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography

**ITS** : Internal Transcribed Spacer

**IC<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice à 50%

**LSU** : Large-subunit

**Maldi-ToFMS** : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time of Flight Mass

**MEA** : Malt Extrait Agar

**MHA** : Mueller Hinton Agar

**MTT** : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PCR-RFLP** : Restriction Length Polymorphisme

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**PDB** : Potato Dextrose Broth

**RAPD** : Random Amplified Polymorphic

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute Medium

**SDA** : Sabouraud Dextrose Agar

**SSU** : Small-subunit

**TBTZ** : 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-S-triazine

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

**UFC** : Unité Formant Colonie

## Liste des figures

<b>Figure (01) :</b> Représentation schématique de l'association des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes.....	<b>02</b>
<b>Figure (02) :</b> Principe du MALDI-TOF MS pour l'obtention d'un spectre.....	<b>08</b>
<b>Figure (03) :</b> Structure des composés antioxydants isolés à partir des champignons endophytes.....	<b>11</b>
<b>Figure (04) :</b> Réaction du test DPPH.....	<b>12</b>
<b>Figure (05) :</b> Schéma de la réaction du test FRAP.....	<b>13</b>
<b>Figure (06) :</b> Structure de l'acide cétonique A et B.....	<b>13</b>
<b>Figure (07) :</b> Structure de certaines molécules antiparasitaires produites par les champignons endophytes.....	<b>15</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau (I) :</b> Exemples de champignons endophytes isolés à partir de certaines plantes .....	<b>04</b>
<b>Tableau (II) :</b> Quelques molécules d'origine endophytes à activité anticancéreuse .....	<b>16</b>

# *Introduction*

## **Introduction**

Toutes les plantes abritent une flore fongique constituée de champignons non pathogènes dits "endophytes". Bien qu'ils soient invisibles et peu connus, leur fonction écologique apparaît de plus en plus évidente puisqu'ils participeraient activement à une meilleure adaptation des plantes à leur environnement. Ils sont d'ailleurs qualifiés de mutualistes, exerçant un pouvoir protecteur pour les plantes **(Combès et al., 2012)**.

Les micro-organismes constituent aussi une source importante avec plus de 200 000 composés biologiquement actifs. Ces dernières années, les micro-organismes associés aux plantes ainsi que les plantes elles-mêmes se sont révélées offrir des produits à fort potentiel thérapeutique, un grand intérêt a été porté aux endophytes: des micro-organismes généralement des champignons et des bactéries colonisent asymptotiquement l'intérieur des tissus végétaux et jouent un rôle protecteur contre les maladies et les infections des plantes. Par exemple, la découverte du champignon endophyte producteur de taxol, *Taxomyces andreanae*, de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) **(Jalgaonwala et al., 2011)**.

Par ailleurs, les champignons endophytes synthétisent un grand nombre de substances complexes et économiquement très importantes tels que les acides organiques, alcaloïdes, antibiotiques, molécules antimicrobiennes, antiparasitaires, anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-insectes, anticancéreuses, antinéoplasiques, cytotoxiques et neuroprotectrices et les enzymes. Aujourd'hui, la connaissance de la biologie de ces champignons est encore partielle; cependant, la compréhension des métabolismes primaires et secondaires et de la génétique de ces microorganismes permet de maîtriser de mieux en mieux leurs capacités de biosynthèse et leur mise à profit pour l'homme **(Jia et al., 2016)**. C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont l'objectif est la présentation des méthodes et des techniques permettant l'étude des champignons endophytes et de leurs activités biologiques.

On présentera cette étude théorique en deux chapitres :

Le premier chapitre est consacré à des généralités sur les champignons endophytes, comprenant les éléments suivants : La définition, la biodiversité et l'intérêt des champignons endophytes. Dans le second chapitre nous aborderons les techniques utilisées dans l'étude des champignons endophytes, c'est-à-dire l'échantillonnage, le dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne l'identification des champignons endophytes, puis la fermentation, l'extraction et l'identification des molécules bioactives, et enfin les techniques d'évaluation des activités antimicrobienne, antioxydante, antivirale, antiparasitaire et anticancéreuse.

# ***Chapitre I :***

***Généralités sur les champignons endophytes***

## **I.1. Définition des champignons endophytes**

Les champignons endophytes existent largement à l'intérieur des tissus sains des plantes vivantes et sont des micro-écosystèmes végétaux (**Jia et al.,2016**).

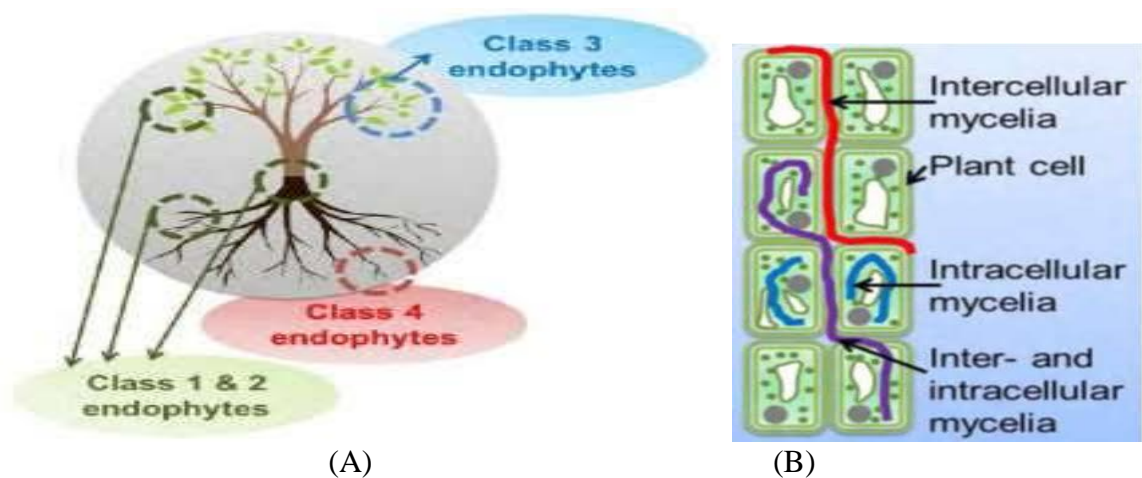
Les endophytes sont des micro-organismes qui vivent dans les tissus végétaux sans provoquer des symptômes de maladie. Ce sont des composants importants du micro biomes de la plante.

La définition la plus couramment utilisée pour décrire les endophytes est celle de **Pertini, (1991)** qui définit les endophytes comme étant tous les microorganismes vivants dans les organes végétaux internes à un certain moment de leur vie sans causer de dommage apparent à leur hôte (**Hyde et Soytong, 2008**).

## **I.2. Biodiversité et classification des champignons endophytes**

Tous les types de plantes abritent des champignons endogènes, cette colonisation des plantes de l'intérieur a été déjà retrouvée chez tous les genres et espèces vivants dans différents écosystèmes tels que les arbustes, les fougères, les mousses, les lichens, les graminées et les conifères. Le nombre total de champignons endophytes, est estimé à 1.5 million d'espèces (**Mishra et al.,2014**).

Les champignons endophytes sont actuellement divisés en 4 classes selon la famille de l'endophyte concerné, la localisation dans les tissus de l'hôte, et le mode de transmission (**Andéol et Benjamin,2016**). Ces 4 classes sont regroupées à leur tour en deux grands groupes: les endophytes Clavicipitaceae et les non-Clavicipitaceae (**Rodriguez et al., 2009**).



**Figure (1).** Représentation schématique de l'association des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes (**Andéol et Benjamin, 2016**).

(A) : Localisation des différentes classes d'endophytes

(B) : Différents modèles de localisation des champignons endophytes dans les tissus végétaux.

**Les endophytes Clavicipitaceae (Classe 1) :** Cette famille est constituée actuellement de 37 genres dont quatre possèdent des espèces capables d'endophytisme : *Balansia*, *Ephelis*, *Epichloë* et *Neotyphodium*, appartenant aux *Ascomycota* et *Hyocreales*, et colonisant les parties aériennes ainsi que le rhizome des plantes hôtes. Les mycéliums ne sont que très rarement trouvés dans le faisceau vasculaire de l'hôte. (Andéol et Benjamin, 2016). Ils se développent de façon systémique à l'intérieur des cellules des graminées et les carex, et se transmettent verticalement à travers les graines (Rodriguez et al., 2009). Selon l'espèce de l'hôte, et des conditions environnementales, ces champignons peuvent conférer à leurs hôtes une augmentation de la biomasse, une tolérance à la sécheresse, et peuvent également produire des molécules toxiques pour les animaux et les herbivores protégeant ainsi leurs plantes hôte (Mishra et al., 2014).

**Les endophytes non-Clavicipitaceae,** un groupe très diversifié phylogénétiquement, appartenant principalement aux ascomycètes. Ils ont été isolés à partir de toutes les plantes étudiées de tous les écosystèmes terrestres allant des tropiques à la toundra. Ils sont divisés en trois classes selon le type de colonisation, le mécanisme de transmission et les avantages conférés à leurs hôtes (Zerroug, 2021).

- **Classe 2 :** Ils sont tous issus de Dikarya. Ils sont en majorité constitués d'*Ascomycota* et une minorité aux *Basidiomycota*. Ils présentent un spectre d'hôte large (Andéol et Benjamin, 2016). Ils peuvent coloniser toutes les parties de la plante et sont capables de former des infections étendues dans les plants (Rodriguez et al., 2009). Ils croissent de manière extensive dans le milieu intercellulaire principalement. Leur transmission est le plus souvent verticale (Andéol et Benjamin, 2016).
- **Classe 3 :** Ils sont tous issus de Dikarya, et sont en majorité constitués d'*Ascomycota*, mais également des *Basidiomycota*, plus souvent présent dans les tissus ligneux que dans les tissus foliaires, leur spectre d'hôte est très large (Andéol et Benjamin, 2016). Les membres de cette classe se caractérisent par leur grande diversité, ils sont particulièrement fréquents chez les plantes tropicales et se transmettent horizontalement. Le rôle de ces endophytes est l'amélioration de la résistance aux maladies et la dissuasion des herbivores (Rodriguez et al., 2009).
- **Classe 4 :** Ils appartiendraient aux *Ascomycota* et au sous embranchement des *Pezizomycotina* (Andéol et Benjamin, 2016). Ce sont des champignons bruns cloisonnés (Rodriguez et al., 2009). Le mode de transmission de ces champignons est



strictement horizontal. Ils ont un rôle particulièrement important dans les milieux arides, semi arides, alpins ou subalpins. Ils sont ubiquitaires du point de vue du biotope. Ils ont une importance similaire à celle des mycorhizes (**Andéol et Benjamin,2016**).

Dans le tableau (II) quelques exemples de champignons endophytes isolés à partir de différentes plantes :

**Tableau (II) :** Exemples de champignons endophytes isolés à partir de certaines plantes (Mohamed, 2017)

<b>Champignons endophytes</b>	<b>Plantes hôtes</b>
<i>Trichoderma</i> sp. <i>T. harzianum</i> .	Cacaotier Poivron rouge Tomate, Tabac.
<i>T. koningii</i> .	Tomate, Ryegras, Tabac.
<i>Beauveria bassina</i> .	Café, coton, tomate.
<i>Cladosporium</i> sp., <i>Rhytismataceae</i> sp., <i>Nemania</i> sp.	Pin.
<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.	Caféier.
<i>Colletotrichum gloesporioides</i> , <i>Cladosporium</i> sp. <i>Piriformospora indica</i> .	Citronnier. Orange.
<i>Trichoderma asperellum</i> T34. <i>Phialocephala fortinii</i> .	Arabette. Gymnospermes, angiospermes, Monocotylédones et dicotylédones.

### **I.3. Intérêt des champignons endophytes**

Les champignons endophytes produisent des composés métaboliques bioactifs inestimables bénéfiques à l'homme avec des propriétés antimicrobienne, anticancéreuse, antidiabétique, anti-inflammatoire, antioxydante, antivirale, etc. Parmi ces composés bioactifs on peut citer la pestacine, le taxol, la camptothécine, l'ergoflavine, phloroglucinol, etc. les endophytes peuvent également avoir d'autres rôles tels que :

- Conférer à la plante la protection contre les maladies (**Redman et al.,2001**), la résistance aux stress biotiques et abiotiques et l'amélioration de l'assimilation des nutriments nécessaires à la croissance (**Miral,2018**).
- Applications dans le domaine de l'énergie ; les champignons endophytes ont été découverts comme des producteurs de composés organiques volatiles principalement des hydrocarbures et autre composés oxygénés qui peuvent être une bonne alternative aux composés fossiles (**Yan et al.,2018**).
- Biosynthèse d'enzymes ; ces enzymes peuvent avoir différentes applications dans les domaines de la santé, de la production alimentaire, de l'énergie et de l'environnement (**Suryanarayanan et al., 2012**).
- Applications dans la bioremédiation de l'environnement afin d'éliminer des polluants (**Soleimani et al., 2010**).

### **I. 4. Modes de transmission des champignons endophytes**

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction :

Le premier se fait par la croissance végétative des hyphes qui est complètement interne (**Selosse et Schardl, 2007**); ainsi les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les graines (**Saikkonen et al., 2004a**). Ceci est communément appelé transmission verticale (**Saikkonen et al., 2004b**). Et c'est le principal mode de transmission des champignons endophytes (**Saikkonen et al., 2010**).

Le second se fait via les spores (**Clay, 1986**) ; ce groupe de champignons se transmet horizontalement (**Saikkonen et al., 2004a**), c'est-à-dire le champignon peut être transmis soit par spores sexuées ou asexuées (**Saikkonen et al., 2004b**) pour infecter d'autres plantes (**Arnold et al., 2003; Gallery et al., 2007**).

Etant donné que certains champignons peuvent produire soit des spores sexuées soit asexuées et que la reproduction sexuée nécessite des spores sexuées, elle est donc toujours horizontale, contrairement à la reproduction asexuée qui peut se faire verticalement via les graines ou horizontalement par les spores ou éventuellement les hyphes (**Saikkonen et al.,2004a**).

# *Chapitre II :*

*Les techniques d'étude des champignons  
endophytes*

## **II.1. Isolement des champignons endophytes**

Pour isoler les champignons endophyte à partir des différentes parties des plantes, deux méthodes peuvent être utiliser.

Une étape commune entre les deux méthodes est la stérilisation de surface qui consiste selon le protocole de **Qin et al., 2009** et **Strangthem et Momota, 2012** à laver tous les échantillons collectés avec de l'eau du robinet, ils sont ensuite coupés en petits fragments (2 à 3cm), trempés dans de l'éthanol à 70% pendant 30 secondes, puis dans l'hypochlorite de sodium à 1% pendant 3 minute, et dans de l'éthanol à 95% pendant 5 minute, ils sont ensuite rincés 3 fois dans de l'eau distillée stérile et séchés à l'aide de papier filtre stérile.

Après cette étape et pour la première méthode, les échantillons coupés en fragments beaucoup plus petits (1 à 1.5cm) sont directement placés dans des boites de Pétri contenant du Potato Dextrose Agar (PDA) (**Zakaria et al.,2016**) supplémentées de Gentamicine à 150 mg/L pour inhiber la croissance bactérienne (**Khan et al.,2010**).

Pour la deuxième méthode, les fragments de plantes stérilisés sont broyés, à l'aide d'un mortier et d'un pilon stériles, des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à arriver à la dilution  $10^{-5}$  et l'ensemencement est ensuite fait par étalement (**Momota et al.,2017**).

Toutes les boites (Les deux méthodes) sont incubées à 28 °C pendant 2 semaines jusqu'à observation de croissance fongique endophyte. Chaque champignon doit être isolé et purifié par repiquage successif sur des boites contenant du PDA (**Jinxiu et al.,2018**).

Afin d'évaluer la charge des champignons endophytes colonisant la plante, un taux de colonisation est calculé à l'aide de la formule donnée par (**Petrini et al., 1982**).

$$\text{Pourcentage de colonisation (\%)} = \frac{\text{Nombre de segments infectés}}{\text{Nombre total des segment examinés}} \times 100$$

## **II.2. Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne**

Les activités antifongique et antibactérienne des champignons endophytes peuvent être évalué par la technique de double culture et des cylindres d'agar respectivement afin de sélectionner d'une façon rapide et qualitative des microorganismes actifs.

### **II.2.1. Technique de la double culture**

La méthode de la double culture est généralement utilisée pour cribler la capacité des champignons endophytes à lutter contre les champignons pathogènes ou phytopathogènes. Dans cette technique un disque du champignon pathogène est transféré au centre d'une boite

de PDA, ensuite, les isolats fongiques endophytes sont placés à 2.5 cm du champignon pathogène. Toutes les boîtes sont incubées à 25°C pendant 7 jours, après cela, les rayons de l'agent pathogène en double culture et dans la boîte contrôle sont mesurés en millimètres (**Jinxiu et al.,2018**).

Le pourcentage d'inhibition est calculé ensuite en utilisant la formule suivante (**Ting et al., 2009**) :

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

R1 étant la croissance radiale de l'agent pathogène dans le contrôle

R2 la croissance radiale de l'agent pathogène en double culture

## **II.2.2. Technique des cylindres d'agar**

Des disques de 6 mm de diamètres provenant d'une culture de champignon endophyte âgée de 7 jours sont découpées transférés à la surface de boîtes de Pétri préalablement ensemencées soit de bactéries pathogènes (gélose Muller Hinton Agar (MHA) ou de champignons pathogènes (gélose Sabouraud Dextrose Agar (SDA)).

Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24heures pour la croissance bactérienne, et à 25°C à 28°C pendant 48 heures pour la croissance fongique. L'activité antimicrobienne est estimée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition. (**Santo et al.,2015**).

## **II.3. Identification des champignons endophytes**

### **II.3.1. Identification morphologique**

Les champignons endophytes sont identifiés à partir des colonies pures, pour l'observation macroscopique, l'aspect général de la colonie ; la couleur et le diamètre de la croissance sont les critères pris en compte. Pour l'examen microscopique, il se fait après réalisation d'un dépôt de petits fragments entre lame et lamelle, pour cela, les échantillons sont prélevés aussi bien à partir des bordures des colonies où les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores est peu, et du centre des colonies pour prélever les structures renfermant des spores et où les spores sont beaucoup plus matures. L'observation du mycélium révèle la présence ou l'absence de septum, la nature de la reproduction et les caractéristiques des fructifications et des spores (**Bouyaiche et Guedjal, 2018**).

### **II.3.2. Identification moléculaire**

Pour confirmer l'identification morphologique des champignons endophytes, une identification moléculaire est souvent réalisée. L'application des méthodes moléculaires pour l'étude des champignons endophytes est devenue impérative non seulement pour l'identification précise des différents taxons occupant les plantes hôtes, mais également pour l'exploration du polymorphisme existant au sein de ces mêmes organismes les méthodes moléculaires servent à l'analyse séquentielle des acides nucléiques (ADN, ARN) ainsi que les produits protéiques (**Verscheure et al., 2002**).

Ces méthodes se basent essentiellement sur l'extraction et la purification de l'ADN qui peut se faire soit manuellement, soit automatiquement en utilisant différents kits tels que GE Healthcare, EZ1 Advanced DNA bactérie extraction, et des automates, ainsi que sur la technique de réaction de polymérisation en chaîne : PCR (Polymérase Chain Réaction) (**Brunner et al., 2007**). Une variété de techniques est disponible entre autres : PCR-RFLP (Restriction Length Polymorphisme), DNA RAPD (Random Amplified Polymorphic), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (**Brunner et al., 2007**). Cette amplification concerne plusieurs régions de l'ADN tels que ITS (Internal Transcribed Spacer), LSU (Large-subunit), SSU (Small-subunit),  $\beta$ -tubuline en utilisant des amorces spécifiques pour chaque région. Après séquençage, les séquences obtenus sont comparées avec les séquences de la banque de donnée GenBank au moyen de recherche BLAST afin d'évaluer l'appartenance taxonomique des souches (**Altschul et al., 1990**).

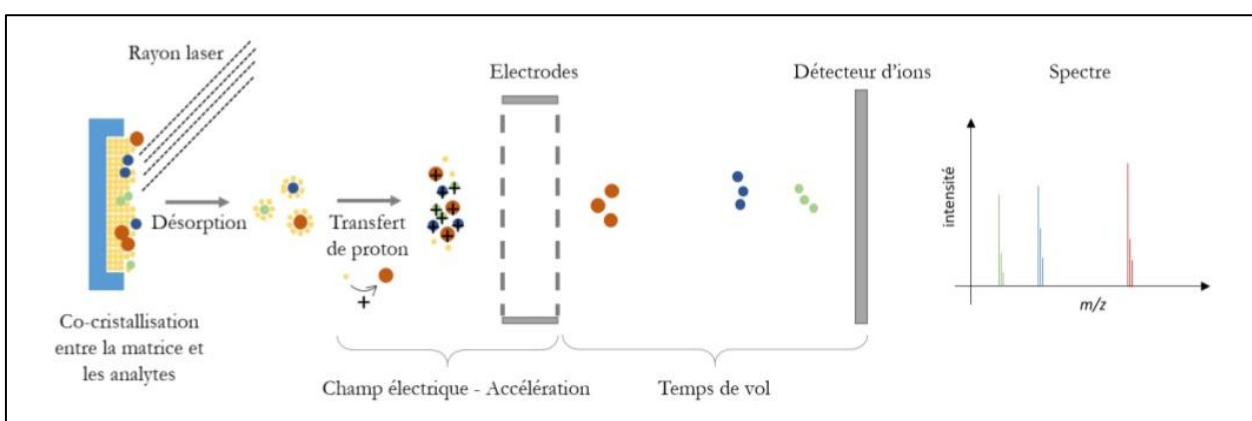
### **II.3.3. Identification par spectrophotométrie de masse**

Le MALDI est une ionisation douce qui implique un laser frappant une matrice de petites molécules pour faire passer les molécules d'analyse dans la phase gazeuse sans les fragmenter ou les décomposer. Certaines biomolécules sont trop grosses et peuvent se décomposer lorsqu'elles sont chauffées, et les techniques traditionnelles fragmentent ou détruisent les macromolécules. Le MALDI est approprié pour analyser des biomolécules comme les peptides, les lipides, les saccharides ou d'autres macromolécules organiques (**Elosta et al., 2007**).

Dans cette technique, les protéines fongiques extraits sont noyés dans un très grand excès d'un composé matriciel déposé sur une surface solide appelée cible, généralement constituée d'un métal conducteur et comportant des spots pour plusieurs échantillons

différents. Après une très brève impulsion laser, le point irradié est rapidement chauffé et devient vibratoirement excité. Les molécules de la matrice ablatées énergétiquement de la surface de l'échantillon, absorbent l'énergie laser et entraînent les molécules de l'analyse dans la phase gazeuse également. Pendant le processus d'ablation, les molécules d'analyse sont généralement ionisées en étant protonées ou déprotonées avec les molécules de matrice proches. Le format d'ionisation MALDI le plus courant est que les molécules d'analyse portent une seule charge positive (**Carbonnelle et Xavier, 2011**).

Les ions sont ensuite accélérés dans l'analyseur TOF, et séparés en fonction de leur temps de vol ; la vitesse de chacune de ces particules dépend du rapport masse charge; une fois les ions arrivés au détecteur, le signal est amplifié et traité pour être mis finalement sous forme de spectre (**Zerroug, 2021**)



**Figure (02) :** Principe du MALDI-TOF MS pour l'obtention d'un spectre(**Moussaoui, 2012**).

## **II.4. Fermentation et extraction**

Afin d'extraire, les métabolites secondaires bioactifs à partir des champignons endophytes, ces derniers doivent être mis à croître sur du PDA à 25°C, après cinq jours d'incubation, deux à trois pièces (0.5 x 0.5 cm) des champignons sont inoculées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de PDB (Potato Dextrose Broth) et incubés sous agitation périodique. Après 14 jours d'incubation à 25°C, les cultures sont filtrées à travers une gaze stérile, le filtrat est ensuite centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 min, et le surnageant récupéré et extrait avec le même volume (v/v) d'un solvant organique, tel que le butanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme, l'n hexane etc. Après agitation pendant deux heures, les solutions sont ensuite mises au repos dans des ampoules à décompter pour séparer la phase organique de celle aqueuse. Les phases organiques sont ensuite récupérées pour être concentré en utilisant un évaporateur rotatif afin d'obtenir l'extrait brut et sec contenant les métabolites secondaires (**Marcellano et al., 2017**).

## **II.5. Identification des molécules**

Avant l'identification des molécules bioactives présentes dans l'extrait brut, une séparation de ces dernières doit être réalisée, plusieurs méthodes peuvent être utilisées, parmi les plus utilisées on citera la chromatographie sur couche mince (CCM) et High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gaschromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Pour la CCM, une feuille d'aluminium avec du gel de silice (1cm x10cm) est préparée, ensuite, l'extrait brut est déposé à 1 cm du bas de la plaque CCM, cette dernière est placée dans une cuve en verre préalablement saturée par un système d'éluion composé d'un ou de plusieurs solvants, la cuve doit être ensuite hermétiquement fermée. Le système de solvant va migrer du bas de la plaque CCM jusqu'à ce qu'il atteigne le front de migration. Pour la détection de des différentes fractions, le chromatogramme doit être examiné visuellement et également observé sous une lumière ultraviolette (252 -366 nm). Les valeur Rf des taches séparées sont également déterminées (**Atallah et al., 2008**).

Pour l'HPLC, Les extraits fongiques (2mg) sont reconstitués avec 2 ml de méthanol de qualité HPLC. Le mélange est sonique pendant 10 min puis centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 min. Ensuite, 100 µL de l'échantillon sont transférés dans un flacon contenant 500 µL de méthanol de qualité HPLC. Le flacon est ensuite placé dans la Machine HPLC pour analyse est la détection se fait à 235 nm. La colonne de séparation (125x4 mm ; Longueur x diamètre interne) est pré remplie avec Eurospher-10 C18 et un gradient linéaire d'un ou de plusieurs solvants est utilisé comme éluant. Les pics d'absorption de l'extrait fongique sont ensuite analysés par comparaison avec ceux de la base de données HPLC-UV/Vis (**Eze et al., 2018**).

Les différentes fractions actives peuvent être soumis à un système de chromatographie en phase gazeuse équipé de spectrophotomètre de masse à détecteur sélectif inerte afin de détecter la nature chimique du composé présent dans chaque fraction. Un cycle de température est suivi : 70°C pendant 2 minutes puis à 250°C pendant 30 min et maintenue à 250°C pendant 20 min. Le gaz porteur (hélium) est ensuite fourni à un débit constant de 1,2 ml/min. Les composés chimiques de chaque fraction sont identifiés par comparaison avec la base de données (**Yin et al., 2016**).

## **II.6. Activité antimicrobienne**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits ou des molécules bioactives fongiques peut être réalisé en utilisant la méthode de diffusion sur disque, des puits, l'autobiographie et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricides (CMB).



### **II.6.1. Méthode de diffusion sur disque**

Les extraits bruts secs ou les molécules pures doivent être dissous dans 0.1% de diméthylsulfoxyde (DMSO) afin d'obtenir la concentration voulue, par la suite 20 à 30µl des solutions dissoutes sont déposés sur des disques stériles de papier Whatman (6 mm de diamètre) ces derniers sont laissés sécher pendant une heure à l'intérieur de l'incubateur à 35°C.

Cinq disques imbibés sont déposés sur les géloses MHA ou Potato Dextrose Agar (PDA) préalablementensemencées par des bactéries ( $10^8$  UFC/mL) ou des champignons ( $0.4-5 \times 10^6$  UFC/mL) pathogènes respectivement. Des disques imbibés avec le même volume de 0.1% de DMSO et d'antibiotique ou d'antifongique (10mg/ml) sont utilisés comme contrôles négatif et positif, respectivement. Toutes les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 72 heures pour les champignons et les zones d'inhibition résultantes sont mesurées (Marecellano et al., 2017).

### **II.6.2. Méthode des puits**

La méthode des puits peut également être utilisée pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne, pour cela, des puits de 6mm de diamètre sont formés dans la gélose (MHA / PDA), ces derniers sont remplis par 20µl des extraits bruts ou des molécules pures. Des puits remplis d'antibiotique et d'antifongiques sont utilisés comme témoins positifs et de DMSO comme témoin négatif (Nighat et al., 2016).

Les boîtes sont incubées à 35°C pendant 24 heures pour les bactéries, et 30°C pendant 72 heures pour les champignons. Les diamètres des zones d'inhibition formées autour des puits sont mesurés (Ananda et al., 2012).

### **II.6.3. Autobiographie de contact**

L'autobiographie de contact est une méthode utilisée pour tester l'activité antimicrobienne des différentes molécules présentes dans un extrait. Dans cette méthode, les plaques de CCM développées sont placées sur les géloses préalablement inoculées avec les microorganismes pathogènes testés. Après une nuit au réfrigérateur pour permettre la diffusion des composés bioactifs, les plaques CCM sont retirées et les boîtes incubées à 37°C pendant une nuit. Les zones d'inhibition observées sur les géloses sont comparées avec la plaque CCM précédemment retirée afin de déterminer quelle molécule est active (Yin et al., 2017).

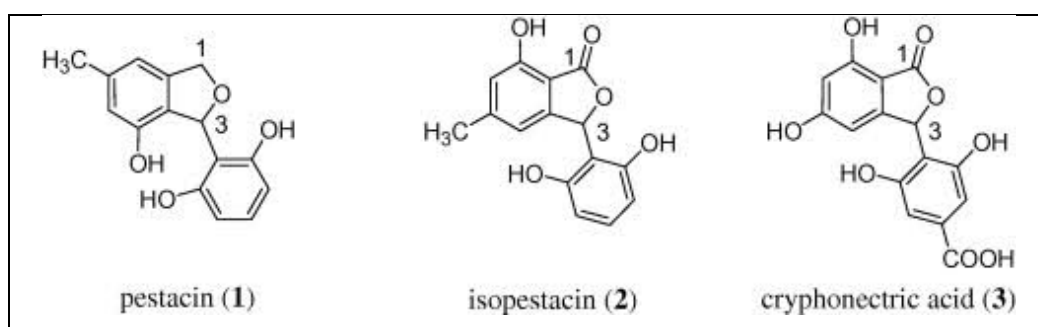
## II.6.4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

Les CMI et les CMB sont généralement déterminées en utilisant la méthode de micro-dilution en milieu liquide, le protocole a été décrit par CLSI 2012, 2002a et 2002b pour les bactéries, les levures et les champignons respectivement. Différentes concentrations des extraits bruts ou des molécules pures sont préparées en utilisant du DMSO à 0,1%. Les suspensions bactériennes, de levures et fongiques sont préparées et leurs turbidités ajustées de façon que les charges finales dans chaque puits soient de  $2 \times 10^5$  UFC/mL pour les bactéries, de  $2.5 \times 10^3$  cellule/mL pour les levures et de  $0.4-5 \times 10^4$  UFC/mL pour les champignons. Les puits des microplaques contenant les différentes concentrations des extraits, sont inoculé avec les différentes suspensions microbiennes, le DMSO ainsi qu'un antibactérien et un antifongique sont utilisés comme témoins négatif et positifs respectivement. Les microplaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 et 48 heures pour les bactéries et les levures respectivement et à 35°C pendant 46 à 50 heures pour les champignons. La concentration la plus faible de l'extrait qui inhibe la croissance visible du microorganisme est considérée comme la CMI (Marcellano et al., 2017).

Pour les CMB, tous les puits ne présentant pas de croissance microbienne sont inoculés sur du MHA pour les bactéries et de Sabouraud dextrose Agar (SDA) pour les champignons. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la plus faible concentration ne présentant aucune croissance visible était considérée comme étant la CMB.

## II.7. Activité antioxydante

Le stress oxydatif résulte d'un état de déséquilibre conduisant à des dommages cellulaires. Les agents antioxydant sont très important pour piéger les radicaux libres et pour inhiber les mécanismes d'oxydation qui conduisent à des maladies dégénératives, et ils pourraient réduire le risque de maladies chroniques (Selim et et al., 2016). Certains composés antioxydants ont été isolés à partir des champignons endophytes tels que isopestacine, pestacine, curaphislacton A et etcorynether A.



**Figure (03) :** Structure des composés antioxydants isolés à partir des champignons endophytes (Barthélemy, 2019).

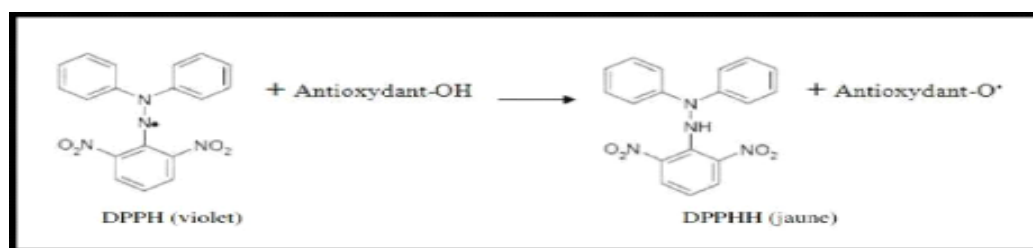
### II.7.1. Activité de piégeage du radical, 1- diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)

Le test du pouvoir de piégeage du radical libre DPPH des extraits fongiques est déterminé en mélangeant l'extrait (0,1 ml) avec 3 ml d'une solution méthanolique à 0,004% de DPPH. Après agitation et incubation à l'obscurité pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 517 nm, et le pourcentage de l'activité d'inhibition est calculé à partir de l'équation suivante :

$$[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A<sub>0</sub> : L'absorbance du témoin.

A<sub>1</sub> : L'absorbance de l'extrait fongique (Braca et al., 2001)



**Figure (04) :** Réaction du test DPPH (Prior, 2005).

### II.7.2. Test du pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power)

L'activité antioxydant des extraits peut être mesurée en utilisant le pouvoir réducteur du fer (Fe<sup>3+</sup>). La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction du fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleue, pour cela, un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. Un aliquote (2,5ml) du surnageant est combiné avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant ; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond

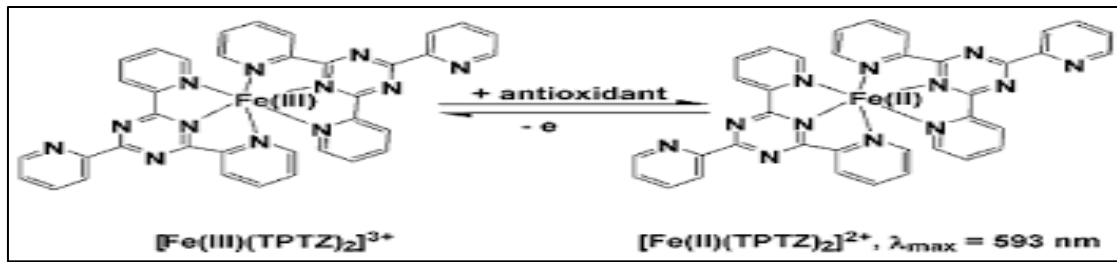
à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton et Rossi, 1965).

Le pourcentage du pouvoir réducteur du fer est calculé par la formule suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur du fer (\%)} = \left[ \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100.$$

A0 : Absorbance de FeCl<sub>3</sub>.

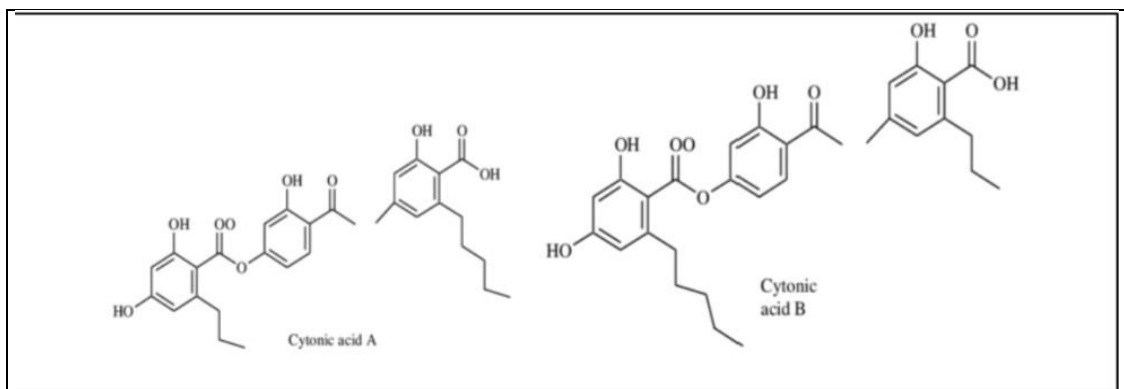
A1 : Absorbance de FeCl<sub>3</sub> en présence de l'extrait (Ghaisas *et al.*, 2008).



**Figure (05) :** Schéma de la réaction du test FRAP (Ben Moussa *et al.*, 2020).

## II.8. Activité antivirale

Bien des recherches ont démontré l'importance des endophytes dans la production d'agents antiviraux, mais peu d'études ont été faites sur ce sujet car la découverte des molécules antivirales produites par les champignons endophytes n'est qu'à son début. Parmi ces études, on peut citer celle de **Zhang *et al.*** où ils ont isolé et purifié deux nouvelles molécules, l'emerimidine A et B à partir de *Emericella* sp. Ainsi d'autres molécules inhibitrices de cytomégalovirus ; l'acide cétonique A et B (**Figure 06**), ont été isolés après fermentation solide du champignon endophyte *Cytospora* sp. isolé de la plante *Quercus* sp., il y a aussi xanthoviridicats E et F qui inhibent la réaction de clivage de l'intégrase du VIH (Virus de l'immunodéficience humaine), produite par l'endophyte *Penicillium chrysogenum* (Waqas *et al.*, 2015).



**Figure (06) :** Structure de l'acide cétonique A et B (Ahrawel, 2016)

L'activité antiviral est déterminée par colorimétrie. Le virus ciblé doit être maintenu dans une lignée cellulaire, qui est cultivée dans du milieu essential minimum d'Eagle avec addition de 10% de sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur et de pyruvate de sodium 1 mM. Différentes concentrations de l'extrait fongique sont placés dans les puits d'une plaque de microtitration et le virus est ensuite ajouté dans chaque puit, suivi de l'ajout des cellules ( $10^5$  cellules/mL). Après incubation à 37°C pendant 72 heures dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub>, la viabilité des cellules utilisées est déterminée par le dosage de la sulforhodamine B (SRB). L'acycloviret le DMSO sont utilisés comme témoin positif et négatif respectivement (Souwalak et al., 2007).

## II.9. Activité antiparasitaire

Les infections parasitaires sont les principales causes de maladies chroniques. Les champignons endophytes sont à l'origine de plusieurs molécules antiparasitaires (figure 07). On citera par exemple les molécules produites par *Aspergillus terreus*-F7, un champignon endophyte associé à *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, qui ont montré une activité contre *Leishmania amazonensis* et *Trypanosoma cruzi* ainsi que sur l'enzyme adénine phosphoribosyl transférase (APRT) de *Leishmania tarentolae* (Romos et Said, 2011).

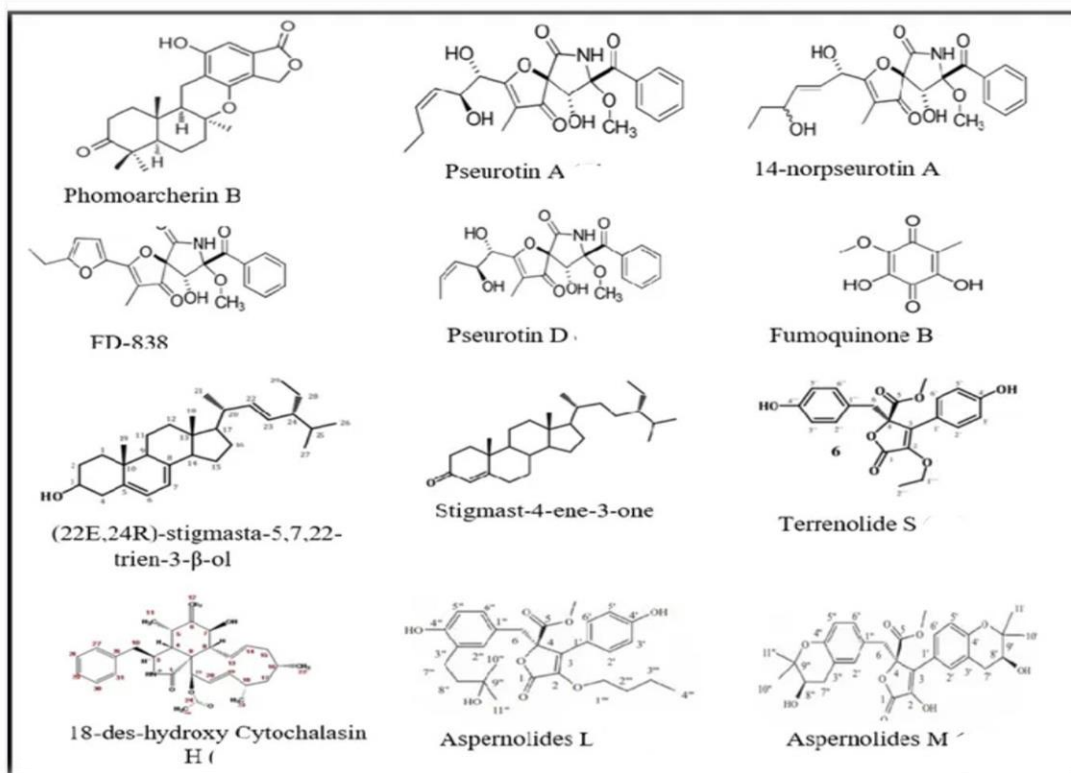
L'activité antiparasite des champignons endophytes peut être testé par leur capacité à inhiber les enzymes gGAPDH (Glycerid 3 phosphate déshydrogénase) de *Trypanosoma cruzi* et APRT de *Leishmania tarentolae*. Pour cela, et pour la première enzyme, un mélange réactionnel contenant, l'extrait fongique, 50 mmol/l Tris-HCl pH 8,6, tampon avec 1 mmol/l EDTA et 1 mmol/l β-mercapto-éthanol, 30 mmol/l Na<sub>2</sub>HA<sub>5</sub>O<sub>4</sub>, 2,5 mmol/l NAD<sup>+</sup>, 0,3 mmol/l glycéraldéhyde-3-phosphate et 1,5 µg de l'enzyme, dans un volume total de 1 ml est préparé. La réaction est initiée par l'ajout de l'enzyme et le NADH formé est évalué à 340 nm à 30 secondes d'intervalle. Un autre mélange est préparé pour l'activité APRT, il doit contenir ; l'extrait fongique, 100 mmol/l de Tris-HCl, pH 7,4, 5 mmol/l de MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol/l d'adénine, 560 mmol/l de pyrophosphate de phosphoribosyle et 7,5 µg d'APRT, dans un volume total de 1 ml. L'activité APRT est également déterminée par spectrophotométrie par la mesure de l'AMP résultant à 259 nm après 60 secondes (Romos et Said, 2011).

L'activité antiparasitaire peut également être évalué en utilisant directement le parasite, pour cela, deux protocoles peuvent être utilisés :

Pour *Trypanosoma cruzi*, les puits d'une plaque de 96 puits sontensemencés avec 4000 cellules, par exemple celles du tissu conjonctif de souris, dans 80 µL de milieu Roswell Park

Memorial Institute (RPMI) avec du rouge phénol. Après incubation de la plaque pendant une nuit à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>, les cellules sont infectées par 40000 trypanomastigotes dans 20 µL de RPMI additionné de rouge phénol. L'absorbance est ensuite mesurée à 570 nm. Le benznidazole est utilisé comme témoin positif. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction induite par l'extrait dans le développement de l'infection par rapport à la culture de cellules infectées avec un parasite non traité (**Brissow et al., 2017**).

Concernant *Leishmania amazonensis*, la densité d'amastigotes est tout d'abord ajustée à 1x10<sup>8</sup> parasites/ ml, 90 µl sont ensuite ajoutés à chaque puits d'une plaque de 96 puits. Un certain volume des extraits fongiques et de solutions témoins sont ajoutés pour atteindre les concentrations souhaitées. Après incubation à 32 °C pendant 72 heures, la viabilité cellulaire est déterminée à l'aide du test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport aux témoins sans extraits. L'amphotéricine B est utilisée comme contrôle positif (**Santiago et al., 2011**).



**Figure (07) :** Structure de certaines molécules antiparasitaires produites par les champignons endophytes (**Zerroug, 2021**).

## II.10. Activité anticancéreuse

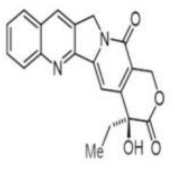
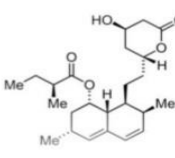
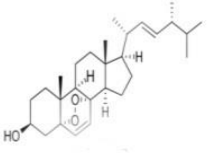
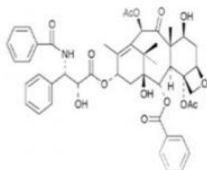
Récemment les endophytes et leurs métabolites sont étudiés pour leurs propriétés anticancéreuses, où plus de 100 composés anticancéreux ont été isolés et identifiés. Ces



composés bioactifs semblent être une nouvelle alternative prometteuse pour la découverte de nouveaux médicaments anticancéreux (Strobel et al., 2004).

L'effet des extraits fongiques sur la survie et la croissance des lignées cellulaires cancéreuses humaines est généralement déterminé à l'aide d'un colorimètre. En bref, les cellules sont inoculées dans une plaque à 96 puits et laisser se stabiliser pendant 24 heures dans un incubateur à CO<sub>2</sub> et à 37°C. Différentes concentrations des extraits fongiques sont ajoutées et les plaques incubées pendant 48 heures sous les mêmes conditions. De l'acide trichloracétique est ajouté à chaque puits pour précipiter les protéines, qui sont quantifiées dans un dosage colorimétrique à l'aide du colorant sulforodamine B. Tous les dosages. L'étoposide (16µg/ml) et la lignée cellulaire cancéreuse sans extrait sont utilisés en parallèle comme contrôles positif et négatif respectivement. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance par rapport au témoin sans extrait (Carvalho et al., 2012).

**Tableau (I) :** Quelques molécules d'origine endophytes à activité anticancéreuse (Strobl, 2021).

La molécule	Champignons/ Plante hôte	Propriété pharmacologique et type de cancer	Structure chimique
<b>La camptothécine</b>	<i>Fusarium solani</i> / <i>Nothapodytes nimmoniana</i>	-Inhibiteur de la Topoisomérase I  -Ces dérivés sont utilisés en chimiothérapie  -L'irinotécan (cancer colorectal)  -Letopotécan (cancer bronchique, ovaire)	
<b>La Lovastatine</b>	<i>Aspergillus niger</i> Souche PN2/ <i>Taxus baccata</i>	-Effet sur la prolifération cellulaire et le cancer : inhiber la progression du cycle cellulaire en phase G1  -Elle est commercialisée sous le nom de Mevacor®	
<b>L'ergostérol peroxide</b>	<i>Guignardia sp.</i> <i>Untaria pinnatifida</i>	-Ces dérivés ont une activité contre la lignée cellulaire KB (Ubiquitous KERATIN-forming tumor cell line HeLa) de la tumeur épidermoïde nasopharyngée humaine	
<b>Le paclitaxel</b>	<i>Taxomyces andreanae</i> <i>Taxus brevifolia</i>	-Taxol(paclitaxel®) est un médicament très utilisé contre le cancer de l'ovaire, du sein et le cancer bronchique	

# *Conclusion*



## **Conclusion**

Les champignons endophytes sont d'excellentes source de nouveaux métabolites secondaires bioactifs ayant un potentiel d'exploitation dans une grande variété de domaines aussi bien médical, industriel qu'agricole. Il a été rapporté que toutes les plantes étudiées jusqu'à maintenant abritaient divers taxon fongiques endophytes plus intéressant les uns que les autres par leurs activités antibactérienne, antifongiques, antivirales, antioxydante, antiparasitaire, anticancéreuse, etc. ces champignons ainsi que leurs molécules bioactives doivent être étudié et exploré afin de les valoriser et les utiliser dans divers domaines. C'est dans ce sens que s'inscrit notre synthèse , où différentes techniques utilisées dans l'étude des champignons endophytes ont été abordés.

Afin d'étudier les champignons endophytes, un bon isolement doit être réalisé afin d'extraire que les champignons endophytes et non les épiphytes, pour cela une bonne stérilisation de la surface de la plante doit être réalisée. Parmi tous ces champignons endophytes isolés, ceux qui sont actifs doivent être sélectionné après un dépistage préliminaire en utilisant les techniques de la double culture et des cylindres d'agar. Selon la bibliographie, une identification morphologique des champignons endophytes actifs, seraient insuffisante pour arriver jusqu'à l'espèce exact pour cela, une identification moléculaire et le plus souvent réalisé en ciblant différentes régions de l'ADN fongiques, tels que l'ITS,  $\beta$ -tubuline, calmoduline, LSU, SSU, etc.

Après l'extraction des métabolites secondaires et avant leur identification, une séparation doit être réalisée par différentes méthodes on en a cité deux ; la chromatographie sur couche mince, qui permettra la détermination du système de séparation optimum, et la chromatographie en phase liquide à haute performance. Pour finir et afin de déterminer les différentes activités biologiques des molécules bioactives, divers tests sont effectués, on en a cité, la méthode de diffusion sur disque, celle des puits, l'autobiographie, et la détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides pour l'activité antimicrobienne, l'activité de piégeage du radical 1, 1- diphenyl-2-picryl-hydrazyl et le test du pouvoir réducteur pour l'activité antioxydante, l'activité antiviral et anticancéreuses sont généralement déterminées par colorimétrie, alors que l'activité antiparasitaire est déterminée soit par la capacité des molécules actives à inhiber les gGAPDH et APRT soit en utilisant des cultures cellulaires infectées par le parasite et en mesurant le taux de viabilité de ces dernières après traitement par les molécules fongiques.

# *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

**Ahrawel R. P., Kumar S., Sandhu S. (2016).** Endophyticmycoflora as a source of Biotherapeuticcompounds of DiseaseTreatment.*Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (10), 242-254.

**Ananda K., Sathish L., & Pavithra N. (2012).** Antimicrobial activity and biodegrading enzymes of endophytic fungifrom eucalyptus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(8), 2574.

**Andéol S. C., Benjamin C. (2016).**Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. *Science pharmaceutique*. Dumas-01266084.

**Arnold A. E., Mejia L. C., Kylo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E. A. 2003.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 100: 15649-15654.

**Atallah T. L., Wang J., Bosch M., Seo D., Burke R. A., M. & Zhu, X. Y. (2008).** Electrostatic screening of charged defects in monolayer MoS<sub>2</sub>. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 8(10), 2148-2152.

**Altschul S. & Karlin S. (1990).** Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(6), 2264-2268.

**Ben Moussa M. T., Khelil K., Harkat H & Hadeff Y. (2020).** Chemical composition, antimicrobial and antioxydant activity of thé essential oil of *Brocchia cinerea* VIS. *from Algeria*. ResearchGate.net/figure. Dio: 10.48087/BJMSoa.2020.7213.

**Braca A., De Tommasi N., Di Bari L., Pizza C., Politi M. & Morelli I. (2001).** Antioxidant principles from *Bauhinia t arapotensis*. *Journal of natural products*, 64(7), 892-895.

**Brissow E. L., Silva I. P., Siqueira K. A., Senabio J. A., Pimenta L. P., Januário A. H., MagalhaesL. G., Furtado R. A., Tavares D. C., Junior P. A. S., Santos J. L., Soares. M. A. (2017).** 18-Des-hydroxy Cytochalasin : an endophytic fungus isolated from *Combretum Lanceolatum* pohl ex Eichler. *Parasitol Res*, dio 10.1007/s00436-017-5451-9.

**Barthélémy M., (2019).** Étude de la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers. Thèse de doctorat en Chimie des substances naturelles. Sciences de la nature et de l'homme-ED 227. Sorbonne Université, 358 pages.

**Brunner Y., Coute Y., Iezzi M., Foti M., Fukuda M., Hochstrasser D. F. & Sanchez, J. C. (2007).**Proteomics Analysis of Insulin Secretory Granules\* S. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(6), 1007-1017.

**Bouyaiche S., Guedjal N. (2018).** Isolement et identification des champignons endophytes à partir de *Zygophyllum album*. Mémoire de Master Biotechnologie microbienne SNV. Université Saad Dahlab blida 1, Algérie, 62 pages.

**Carbonnelle É & Xavier N. (2011).** Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences* 27.10, 882-888.

**Carvalho CR., Goncalves VN., Pereira CB., Johann S., Galliza IV., Alves TM. A., Rabello A., Sorbral ME. G., Zani CI., Rosa CA., Rosa LH. (2012).** The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart). Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis* 57: 95-107.

**Clay K. Grass endophytes. In: Fokkema N. J. and Van Den Heuvel J.(eds).1986).** Microbiology of the phyllosphere, Cambridge, UK: Cambridge University Press; pp. 188-204.

**Combès A. I., Ndoye C., Bance J., Bruzard C., Djedjat J., Dupont B., Nay S. & Prado. (2012).** Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. PLoS One, 15 octobre 2012.

**Elosta, S., Gajdosova, D., Hégrová, B., & Havel, J. (2007).** MALDI TOF mass spectrometry of selected mycotoxins in barley. *Journal of Applied Biomedicine*, 5(1), 39-47

**Gallery R. E., Dalling J ; W. and Arnold A. E. (2007).** Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi : a case study with *Cecropia*. *Ecology* ; 88 : 582-588.

**Ghaisas, M. M., Navghare, V. V., Takawale, A. R., Zope, V. Deshpande, A. D. (2008).** In vitro antioxidant activity of *Tectona grandis* Linn. *Pharmacology online*, 3, 296-305.

**Hyde K. D & Soyong K. (2008).** Isolation and Morphological Identification of Culturable Endophytic Fungal Species from Mangrove Ecosystem. *Applied Ecology and Environmental Sciences* 3, 128-134.

**Jalgaonwala RE., Mohite BV., Mahajan RT. (2011).** A review: natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal of microbiology biotechnology research*, 1(2), 21-32.

**Jia M., Chen L., Xin H-L., Zheng C-J., Rahman K., Han T and Qin L-P. (2016).** Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants : A Systematic Review. *Front. Microbiol.*7:906. doi:10.3389/fmicb.2016.00906.

**Jinxu Y., Ying W., Zhen H., Mi L., Kaiming Z., Bida G. (2018).** Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with *Camellia oleifera*. *Article from Mycobiology are provided here courtesy of Korean Society of Mycology.* 85(2), 85-91.

**Khan R., Shahzad S., Choudhary MI., Khan SA., Ahmad A. (2010).** Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pak J Bot*, 42(2), 1281-1287.

**Momota P, S. Indira D., Dinabandhu S., Gary A. S. (2017).** Functional Characterization of Endophytic Fungal Community Associated with *Oryza sativa* L. and *Zeamays* L. *Endophytic Fungi and Sustainable agriculture*, 325.

**Marcellano J. P., Collanto A. S., Fuentes R. J. (2017).** Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from the bark of *Cinnamomum mercadoi*. *Pharmacognosy Journal* 9.(3),405-407.

**Mishra Y., Singh A., Batra A., Sharma MM (2014).** Understanding the Biodiversity and

Biological Application of Endophytic Fungi: A review. J Microb Biochem Technol S8: 004. doi: 10.4172/1948-5948.

**Moussaoui L. (2012).** Applications de la spectrométrie de masse type MALDI-TOF à la bactériologie et à la distinction de variants génétiques (Doctoral dissertation, université de Strasbourg).

**Miral A. (2018).** Helichrysum italicum et ses micromycètes : Diversité et biotransformations. Thèse de doctorat. Université Toulouse Paul Sabatier. 132 p.

**Nighat F., Mukhtar U., Ul-Haq I., AhmedQazi M. (2016).** Biological évaluation of endophytic fungus *chaetomium sp.* NF15 of *Justiciaadhatoda L.*: A potential candidate for drugdiscovery. *Jundishapur Journal ofMicrobiology* 9, 29978.

**Prior R L., WU X., SCHAICH K.(2005).** Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements . *Agric. Food Chem.* (53) : 4290-4302.

**Redman R. S., Dunigan D. D., Rodrigues R. J. (2001).**Fungal symbiosis from mutualism to parasitism, who contrôle the outcome, host or invader?. *New phytologists.* 151: 705-716.

**Rodriguez R. J., White J. F., Arnold A. E., Redman ARA. (2009).** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist,* 182(2), 314-330.

**Romos H. P & Said S. (2011).** Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus underdifferent culture conditions. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2, 433-449.

**Eze P. A., Ojimba N. K., Abonyi D. O., Chukwunwejim C. R., Abba C. C., Okoye F. B. S., Esimone C. O. (2018).** Antimicrobial Activity of Metabolites of an Endophytic Fungus Isolated from the Leaves of *Citrus jambhiri* (Rutaceae). *Tropical Journal of Natural Product Research* 2(3), 145-149.

**Saikkonen K., Helander M. and Faeth S. H. 2004a.** Fungal endophytes: hich- hikers of the Green world. In: Gillings M. and Holmes A. J.(eds). *Plant microbiology.* Garland Science; pp. 81-101.

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

**Santiago I. F., Alves T. M. A., Rabello A., Sales Junior P. A., Romanha A. J., Zani C. L., Rosa C. A., Rosa L. H. (2012).** Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Des champsia antaractica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles* 16, 95-103.

**Santos IP., Silva LCN., Silva MV., Araújo JM., Cavalcanti MS & Lima VLM. (2015).** Antibacterialactivity ofendophyticfungifromleaves of *Indigoferasuffruticosa* Miller (Fabaceae). *Journal of Frontiers in Microbiology* 6 :350. Dio : 10.3389/fmicb.2015.00350.

**Selosse M. A. and Schardl C. L. (2007).** Fungal endophytes of grasses : hybrids rescued by vertical transmission ? An evolutionary perspective. *New phytologist ;* 173 : 452-458.

**Souwalak P., Jaru N., Nattawut R., Jariya S., Nongporn H-T., Vatcharin R., Kanyawim K. (2007).** Biological activities of extract from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 3, 517-525.

**Strobel, G., Daisy, B., Castillo, et Harper, J. (2004).** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural products*, 67(2), 257-268.

**Singleton V. L., and Ross J. A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* 16(3), 144-158.

**Soleimani M., Hajabbasi M.A., Afyuni M., Mirlohi A., Borggaard OK., Holm P. E. (2010).** Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca paratensis*. *Ont J Phytoremediation*. 12: 535-549.

**Suryanarayanan T. S., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu M. B., Gopalan V. (2012).** Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity*. 54: 19-30.

**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. *Am – Eurasian J Sustain Agric* 3, 399-406.

**Verscheure M. G. L and Michel M. (2002).** Revue bibliographique: les methodes chimiques d'identification et de classification des champignons." *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* 6.(3), 131-142.

**Waqas M., Khan A. L., Hamayum M., Shahzad R., Kang S-M & Lee I-J. (2015).** Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *Journal of plant interactions* 10(1), 280-287.

**Yin O. C. J., Ibrahim D., Lee C. C (2017).** Bioactive Compounds from *Aspergillus Terreus* MP15, Endophytic Fungus Isolated from *Swietenia Macrophylla* leaf. *Malaysian Journal of Medical and Biological Research* 4, 107-116.

**Yan L., Zhao H., Zhao X., Xu X., Di Y., Jiang C., Shi J., Shao D., Shao D., Huang Q., Yang H., Jin M. (2018).** Production of bioproducts by endophytic fungi : chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 102: 6279-6298.

**Zakaria L., Izzam M., Jamil M., & Intan S. M. A. (2016).** Molecular Characterization of Endophytic Fungi from Roots of Wild Banana (*Musa acuminata*). School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, 153-162.

**Zerroug, A. (2021).** Champignons endophytes des plantes médicinales de la région de Sétif: isolement, Identification et activités biologiques Doctoral en Science biologique, spécialité: Microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie, 173 pages.



## الملخص

الهدف من هذا العمل هو معرفة الطرق المستخدمة في دراسة الفطريات بما في ذلك عزلها وتحديدها واستخراج وتحديد مستقلباتها الثانوية النشطة بيولوجيا وكذلك تقييم الأنشطة البيولوجية الخاصة بهذه الأخيرة. قبل أي عزل للفطريات الداخلية، تعقيم سطح أجزاء النباتات المختلفة ضروري، ثم اختيار مجموعة من الفطريات الأكثر نشاطا والذي يتم غالبا باستخدام طرق الثقافة المزدوجة واسطوانات "اجار". يتم تحديد النباتات الداخلية الأكثر نشاطا أولا شكليا بعد ذلك جزيئيا لمزيد من الدقة. بعد استخراج المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا التي تنتجها هذه الفطريات، يتم فصلها وتحديد هويتها بواسطة طرق مختلفة، من بينها نحد تقنية التلوين في شكل طبقة رقيقة من السائل وفق أداء مرتفع. أخيرا تحديد الأنشطة البيولوجية المختلفة للجزيئات النشطة يتم بالنسبة للنشاط الميكروبي المضاد بواسطة طريقة الانتشار على القرص، الأبار والسيرة الذاتية وتحديد الحد الأدنى من التركيزات المثبطة ومبيدات البكتيريا. فيما يتعلق بنشاط مضادات الأكسدة ومن بين أكثر الطرق استخداما نجد: نشاط الكسح الجذري **diphenyl-2-picryl-hydrazyl-1-1** واختبار "القدرة المختزلة". بالنسبة لنشاط مضاد الفيروسات والسرطان، فان قياس الألوان هو المحدد، بينما يتم تحديد مضاد الطفيليات بطريقتين، إما عن طريق استغلال قدرة الجزيئات النشطة على تثبيط **gGAPDH** و **APRT** إما باستخدام مزارع الخلايا المصابة بالطفيلي ثم قياس مستوى فعالية هذا الأخير بعد العلاج بالعناصر الفطرية.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات الداخلية، النشاط المضاد للميكروبات، مضادات الأكسدة، مضادات الفيروسات، مضادات الطفيليات، مضادات السرطان

## Résumé

L'objectif de ce travail est de connaître les méthodes utilisées pour l'étude des champignons endophytes impliquant leur isolement, leur identification, l'extraction et l'identification de leurs métabolites secondaire bioactifs ainsi que l'évaluation des activités biologiques de ces dernières. Avant tout isolement des champignons endophytes, une stérilisation de la surface des différentes parties de plantes est nécessaire, une sélection des champignons les plus actifs, est ensuite le plus souvent réalisée en utilisant les méthodes de la double culture et des cylindres d'agar. Les endophytes les plus actifs sont identifiés premièrement morphologiquement ensuite moléculairement pour plus de précision. Après l'extraction des métabolites secondaires bioactifs produits par ces champignons, leurs séparations et identification, sont réalisées par différentes méthodes, telles que la chromatographie surcouche mince et en phase liquide à haute performance. Enfin la détermination des différentes activités biologiques des molécules bioactives est estimée, pour l'activité antimicrobienne parla méthode de diffusion sur disque, des puits, l'autobiographie et la détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides. Concernant l'activité antioxydante, les méthodes les plus utilisées est l'activité de piégeage du radical 1, 1- diphenyl-2-picryl-hydrazyl et le test du pouvoir réducteur. Pour les activités antivirale et anticancéreuse on utilise la colorimétrie, alors que l'activité antiparasitaire est déterminée soit par la capacité des molécules actives à inhiber les **gGAPDH** et **APRT** soit en utilisant des cultures cellulaires infectées par le parasite et en mesurant le taux de viabilité de ces dernières après leur traitement par les molécules fongiques.

**Mots Clés :** Champignons endophytes, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité antivirale, activité antiparasitaire, activité anticancéreuse.

## Abstract

The objective of this work is to know the methods used for the study of fungi endophytic involving their isolation, identification, extraction and identification of their secondary bioactive metabolites as well as the evaluation of the biological activities of these latest. Before any isolation of endophytic fungi, sterilization of the surface of the different parts of plants is necessary, a selection of the most active fungi, is then most often carried out using the methods of double culture and cylinders of agar. The most active endophytic are identified first morphologically then molecularly for more precision. After extraction of bioactive secondary metabolites produced by these fungi, their separation and identification, are carried out by different methods, such as thin-layer and liquid chromatography at high performance. Finally, the determination of the different biological activities of the bioactive molecules is estimated, for the antimicrobial activity the diffusion on disk method, wells, autobiography and determination of minimum inhibitory concentrations and bactericides. With regard to antioxidant activity, among the most widely used methods, we find: "1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl" radical scavenging activity and "reducing ability" test. For antiviral and anticancer activity, colorimetry is the determinant, while antiparasitic is determined in two ways, either by exploiting the ability of the active molecules to inhibit **gGAPDH** And **APRT** either using cell cultures infected with the parasite and then measuring the level of effectiveness of the latter after treatment with the fungal agents.

**Keywords:** Endophytic fungi, antimicrobial activity, antioxidant activity, antiviral activity, Antiparasitic activity, anticancer activity.