

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



THESE DE DOCTORAT LMD 3^{ème} CYCLE
EN : SCIENCES BIOLOGIQUES
OPTION : BIOCHIMIE, MICROBIOLOGIE ET SCIENCES ALIMENTAIRES

PAR

M^{ELLE} OUZID YASMINA

THEME



**ACTIVITES BIOLOGIQUES ET DIVERSITE
EN MYCOENDOPHYTES DES FEUILLES DE
Peganum harmala L. DE LA REGION DE
LAGHOUAT (ALGERIE)**

DEVANT LE JURY :

M^r MATI ABDERAHMANE	Professeur à l'UMMTO	Président
M^r HOUALI KARIM	Professeur à l'UMMTO	Directeur de thèse
M^{me} SMAIL-SAADOUN NORIA	Professeur à l'UMMTO	Co-Directrice de thèse
M^r RIBA AMAR	Professeur à l'UMBB	Examineur
M^{me} SAIDI FAIROUZ	Professeur à l'USDB	Examinatrice
M^r ZERROUG M^{ED} MIHOUB	Professeur à l'UFAS	Examineur

2017 - 2018

REMERCIEMENTS

*En préambule à cette thèse, je réserve une attention toute particulière au professeur **Smail-Saadoun Noria** de l'UMMTO, en me proposant ce sujet et qui a mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma très vive reconnaissance pour sa disponibilité, son aide, ses conseils, ainsi que pour ses qualités relationnelles et humaines.*

*Je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance au professeur **Houali Karim** à l'UMMTO, qui m'a donné le courage et la chance d'intégrer la recherche, qui a guidé, surveillé le déroulement et l'exécution du travail de cette thèse, en me prodiguant tout aide possible, orientations, conseils, conditions matériels et en me consacrant beaucoup de son temps précieux.*

J'exprime ma profonde reconnaissance à tout le personnel du Laboratoire Ressources Naturelles et Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies de l'UMMTO.

*Je tiens à remercier également professeur **Mati Abderahmane** à l'UMMTO, qui a accepté de présider le jury, c'est un honneur pour moi de le voir siéger parmi les membres du jury de cette thèse.*

J'exprime mes respectueux dévouements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail :

Pr. Riba Amar de l'université de Boumerdes

Pr. Saidi Fairouz de l'université de Blida

Pr. Zerroug Mohamed Mihoub de l'université de Sétif

DEDICACES

*A mon défunt et très cher **PAPA** sans lequel je ne serai pas arrivée jusque là,
que DIEU t'accueille dans son vaste paradis.*

*A ma très chère **MAMAN** pour ses encouragements incessants et son soutien
moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite.*

*Que mes chers parents trouvent dans ce travail la preuve modeste d'une
reconnaissance infinie et d'un profond amour.*

*A ma très chère **sœur** et très cher **frère** pour leur présence et encouragements.*

*A ma chère **Mamani** ainsi qu'à mes défunts Grands-parents : **Djeddi, PapaHadj,**
Ayi et à tous ceux qui m'aiment.*

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....	01
Partie I : <i>Peganum harmala</i> L. et diversité en épiphytes et mycoendophytes foliaires	
1.1. Présentation de la plante : <i>Peganum harmala</i> L.....	03
1.1.1. Caractéristiques de l'espèce	03
1.1.2. Position taxonomique	04
1.1.3. Aire de répartition	04
1.1.4. Etude phytochimique : métabolites secondaires	04
1.1.5. Activités biologiques de <i>Peganum harmala</i> L.....	07
1.2. Diversité de la phyllosphère	08
1.2.1. Introduction	08
1.2.2. Classification des champignons endophytes	09
1.2.2.1. Mycoendophytes Clavicipitaceae (C- endophytes).....	10
1.2.2.2. Mycoendophytes non-Clavicipitaceae	10
1.2.3. Mode de reproduction et de transmission	11
1.2.3.1. Transmission verticale.....	11
1.2.3.2. Transmission horizontale	12
1.2.4. Interaction plante – champignon endophyte	14
1.2.5. Diversité des champignons endophytes au niveau végétaux.....	17
1.2.5.1. Facteurs de diversité des champignons endophytes.....	17
1.2.5.2. Les obstacles rencontrés dans la découverte de la biodiversité des mycoendophytes .	18
1.2.6. Rôles biologiques des champignons endophytes	19
1.2.6.1. Rôle dans la nutrition et la croissance	19
1.2.6.2. Rôle dans la tolérance au stress.....	20
1.2.6.3. Rôle dans la résistance contre les pathogènes et les herbivores.....	22
1.2.6.4. Rôle dans l'environnement	23
1.2.6.5. Applications Biotechnologiques des mycoendophytes	23
1.2.6.6. Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs.....	24
1.3. Matériel et méthodes	26
1.3.1.Zone d'étude.....	26

1.3.1.1. Description de la zone d'étude	26
1.3.1.2. Bioclimat de la zone d'étude	27
1.3.2. Echantillonnage sur le terrain.....	29
1.3.3. Matériel, produits chimiques et milieux de cultures	29
1.3.4. Coloration des feuilles et mise en évidence des mycoendophytes foliaires.....	29
1.3.5. Isolement et mise en culture	30
1.3.5.1. Préparation du milieu PDA	30
1.3.5.2. Isolement et mise en culture des épiphytes	30
1.3.5.3. Stérilisation superficielle et mise en culture des champignons endophytes.....	30
1.3.6. Identification macroscopique et microscopiques des souches fongiques	31
1.3.7. Etude statistique	31
1.4. Résultats et discussion.....	33
1.4.1. Résultats	33
1.4.1.1. Champignons épiphytes	33
1.4.1.2. Champignons endophytes	36
1.4.1.2.1. Mise en évidence des champignons endophytes au niveau des feuilles de <i>Peganum harmala</i>	36
1.4.1.2.2. Fréquence de colonisation des champignons endophytes au niveau des feuilles de <i>Peganum harmala</i>	39
1.4.1.2.3. Diversité et abondances des champignons endophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i>	40
1.4.2. Discussions.....	44
1.4.3. Interaction champignons épiphytes-endophytes	47
 Partie II : Activités biologiques des mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i> L.	
2.1. Données bibliographiques.....	55
2.1.1. Introduction	55
2.1.2. Biosynthèse des métabolites secondaires par la plante hôte ou mycoendophytes	56
2.1.3. Composés bioactifs issus des mycoendophytes	56
2.1.3.1. Composés anticancéreux	57
2.1.3.2. Composés antiviraux	63
2.1.3.3. Composés antioxydants.....	64

2.1.3.4. Composés antimicrobiens	65
2.1.3.5. Composés immunomodulateurs	67
2.1.4. Les mycoendophytes sources de peptides à activités biologiques	69
2.1.4.1. Peptides à activité anticancéreuse	69
2.1.4.2. Peptides à activité antimicrobienne	69
2.1.5. Peptides issus des mycoendophytes : les futurs médicaments	70
2.2. Matériel et méthodes	72
2.2.1. Présentation des mycéliums des mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i>	72
2.2.2. Fermentation et extraction des métabolites secondaires fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i>	74
2.2.3. Préparation de l'extrait de feuilles de <i>Peganum harmala</i>	74
2.2.4. Etude de l'activité antimittotique des extraits fongiques bruts des mycoendophytes	74
2.2.5. Etude de l'activité antiproliférative des extraits fongiques bruts des mycoendophytes ..	75
2.2.6. Etude de l'activité antioxydante des extraits fongiques bruts et de l'extrait foliaire	76
2.2.6.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	76
2.2.6.2. Dosage des polyphénols	77
2.2.7. Etude de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i> des mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i>	77
2.2.7.1. Matériel bactérien.....	78
2.2.7.2. Autre matériel utilisé	80
2.2.7.3. Méthodes utilisées	80
2.2.7.3.1. La double culture de diffusion sur gélose	80
2.2.7.3.2. Détection de l'activité antibactérienne des mycéliums de mycoendophytes foliaires sélectionnés par le screening	82
2.2.8. Analyse statistique.....	84
2.3. Résultats et discussions	84
2.3.1. Activité antimittotique.....	84
2.3.2. Activité antiproliférative	88
2.3.3. Activité antioxydante	92
2.3.4. Activité antibactérienne.....	95

Synthèse et discussion générale	114
Conclusion générale	119
Références bibliographiques	122
Annexes	

Liste des abréviations

ACC ase	1-Amino Cyclopropane -1- Carboxylate Désaminase
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CD	Cluster of Determination
CPT	Camptothécine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMP	4- dimethylpodophyllotoxine
DPDT	Deoxypodophyllotoxine
DPPH	2, 2-Diphényl-1-Picryl-Hydrazyle
DPPH-H	Diphényle Picryl Hydrazine
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
FCR	Réactif de Folin Ciocalteu
FRI	Food Research Institute
HupA	Huperzine A
ITS	Internal transcribed spacer
MH	Milieu Mueller Hinton
MFA	Mycorhize Fongique Arbusculaire
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
Na₂CO₃	Carbonate de Sodium
NRPS	Synthétases de Peptides Non Ribosomiques
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth
PDT	Podophyllotoxine
PDTG	Podophyllotoxine-β-D-glucoside
ROS	Reactives Oxygen Species
sakA	Protéine kinase A
THH	Tetrahydroxyharmane

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photo de <i>Peganum harmala</i> L. prise sur le terrain d'échantillonnage à Dayate Aiat (Laghouat, Algérie)	03
Figure 2 : Principaux alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i> :Harmine, Harmaline, Harmalol et Harmol	05
Figure 3 : Synthèse des β -carbolines de <i>Peganum harmala</i> L. et de la sérotonine à partir du Tryptophane	06
Figure 4 : Structure générale des quinazolines de <i>Peganum harmala</i> L.....	06
Figure 5: Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes.....	09
Figure 6 : Représentation schématique du cycle de vie des champignons endophytes du genre <i>Neotyphodium</i> transmis verticalement	12
Figure 7 : Représentation schématique du cycle de vie des mycoendophytes foliaires transmis horizontalement chez les plantes tropicales	13
Figure 8 : Interactions plantes-champignons endophytes	14
Figure 9 : Développement symbiotique des endophytes fongiques.....	16
Figure 10 : Situation géographique de la zone d'étude (Laghouat, Algérie)	27
Figure 11 : Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen pour la station d'étude	28
Figure 12 : Abondances des genres épiphytes des feuilles de <i>Peganum harmala</i>	33
Figure 13 : Genres fongiques existant comme épiphytes foliaires chez <i>Peganum harmala</i> sous microscope optique (X1440), ainsi que les colonies fongiques sur milieu PDA	35
Figure 14 : Composition des épiphytes des feuilles de <i>Peganum harmala</i> selon le Phylum....	36
Figure 15 : Observation microscopique de filaments de champignons parcourant la surface foliaire et pénétrant dans les stomates et le mésophylle.....	37
Figure 16 : Observation microscopique d'une colonisation inter et intracellulaire des cellules épidermiques et des stomates des feuilles de <i>Peganum harmala</i>	37
Figure 17 : Observation microscopique des champignons endophytes au niveau du parenchyme palissadique (x 1680) de <i>Peganum harmala</i>	37

Figure 18: Observation microscopique des nervures principales et secondaires des feuilles de <i>Peganum harmala</i> colonisées par les champignons endophytes	38
Figure 19: Observation microscopique d'un trichome glandulaire de la feuille de <i>Peganum harmala</i> colonisé par les champignons endophytes	38
Figure 20: Fréquence de colonisation par les mycoendophytes foliaires des différents sujets échantillonnés de <i>Peganum harmala</i>	39
Figure 21: Abondances des genres de mycoendophytes des feuilles de <i>Peganum harmala</i>	40
Figure 22: Les genres fongiques existant que comme mycoendophytes foliaires chez <i>Peganum harmala</i> ainsi que leurs colonies fongiques purifiées sur milieu PDA.....	42
Figure 23 : Composition des mycoendophytes des feuilles de <i>Peganum harmala</i> selon le Phylum	43
Figure 24: Genres fongiques existant comme épiphytes et mycoendophytes foliaires chez <i>Peganum harmala</i> observés sous microscope optique (X2000), ainsi que leurs colonies fongiques purifiées sur milieu PDA	48
Figure 25: Les quotients de similarités de Sorensen des différents sujets de <i>Peganum harmala</i>	51
Figure 26 : ACP représentants les genres de champignons épiphytes et endophytes des sujets de <i>Peganum harmala</i> de Dayate Aiat.....	52
Figure 27: Présentation des composés bioactifs des champignons endophytes et de leurs plantes hôtes, ainsi que leurs applications potentielles	57
Figure 28 : Structure du Paclitaxel et ses analogues : baccatine III, 10-désacétylbaccatineIII.....	59
Figure 29 : Structure de la Camptothécine et ses analogues	60
Figure 30 : Structures de quelques molécules anticancéreuses isolées des champignons endophytes	61
Figure 31 : Structure de la vinblastine et de la vincristine	62
Figure 32: Structure de la Podophyllotoxine et ses analogues.....	63

Figure 33: Structures des acides cytoniques A et B isolés à partir du champignon endophyte <i>Cytonaema sp</i>	63
Figure 34: Structures de deux molécules antioxydantes isolées de <i>Pestalotiopsis microspora</i>	64
Figure 35: Structure de la Phomodione (A) et du Polycétide 5-hydroxyramulosine (B).....	67
Figure 36: Structure des métabolites antimicrobiens isolés de <i>Hypericum perforatum</i>	67
Figure 37: Structure des Fusaristatines A et B isolées de <i>Fusarium sp</i>	69
Figure 38 : Structure des Cyclo-(Pro-Thr) et Cyclo- (Pro-Tyr) à activité antibactérienne isolés de <i>Penicillium sp.</i> champignon endophyte isolé de <i>Acrostichum aureum</i>	69
Figure 39: Des approches importantes dans la découverte du médicament.....	71
Figure 40: Genres de champignons endophytes les plus abondants au niveau des feuilles de <i>Peganum harmala</i> L.....	72
Figure 41: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	76
Figure 42 : Technique de diffusion des mycéliums de mycoendophytes foliaires <i>Peganum harmala</i> sur gélose	82
Figure 43: Technique de diffusion des disques de mycéliums de mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i> sur gélose	82
Figure 44: Schéma récapitulatif de la technique de double diffusion sur gélose.....	83
Figure 45 : Phases mitotiques normales.....	85
Figure 46 : Anomalies chromosomiques, nucléaires et cellulaires	86
Figure 47 : Les indices mitotiques des différents extraits testés	87
Figure 48 : Action des extraits fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i> sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
Figure 49 : Pourcentages de cytotoxicité des différents extraits testés.....	90
Figure 50: Teneur en polyphénols des extraits fongiques bruts et l'extrait foliaire.....	95
Figure 51 : Activité antibactérienne des quatre champignons endophytes et de l'antibiotique sur <i>S. aureus</i> MU 50 mec A, <i>B.cereus</i> ATCC 10876 et <i>B.cereus</i> ATCC 14579 dans la première manipulation.....	97
Figure 52 : Activité antibactérienne du genre <i>Alternaria</i> et de l'antibiotique dans la seconde manipulation sur <i>B.cereus</i> ATCC10876 et <i>B.cereus</i> ATCC 14579.....	97

Figure 53 : Activité antibactérienne du genre <i>Aspergillus</i> et de l'antibiotique dans la seconde manipulation sur <i>S. aureus</i> FRI 6.....	98
Figure 54: Activité des quatre champignons endophytes et de l'antibiotique vis-à-vis des souches <i>S. aureus</i> ATCC 43300 et <i>S. aureus</i> FRI 326, dans la première manipulation	99
Figure 55 : ACP représentant les différentes activités biologiques des extraits bruts de mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i> de dayate Aiat (Laghout, Algérie.....	117

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Critères symbiotiques qui caractérisent les classes des champignons

Endophytes 10

Tableau II: Mycoendophytes isolés de différentes plantes médicinales et leurs activités biologiques 26

Tableau III : Données et variables calculées utilisés dans la classification écoclimatique de LE HOUEROU 28

Tableau IV : Abondances des genres fongiques des épiphytes foliaires de *Peganum harmala* de Dayate Aiat (Laghouat) 34

Tableau V : Diversité des champignons épiphytes chez les feuilles de *Peganum harmala* : indice de diversité Shannon (H) 36

Tableau VI: Comparaison des moyennes des fréquences de colonisations par les mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* chez les sujets échantillonnés 40

Tableau VII : Abondances des genres fongiques des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* de Dayate Aiat (Laghouat)..... 41

Tableau VIII : Diversité des champignons endophytes chez les feuilles de *Peganum harmala* : indice de diversité Shannon (H) 43

Tableau IX : Interactions significatives entre les champignons de la phyllosphère de *Peganum harmala* 50

Tableau X : Production des composés bioactifs d'intérêt thérapeutique et leurs analogues par les mycoendophytes et leurs plantes hôtes 58

Tableau XI: Quelques structures chimiques de composés antibactériens et antifongiques..... 66

Tableau XII : Quelques composés bioactifs immunosuppresseurs issus de mycoendophytes 68

Tableau XIII: Description des mycéliums de mycoendophytes foliaires utilisés de *Peganum harmala* 73

Tableau XIV : Normes utilisées dans l'expression de la sensibilité des bactéries au chloramphénicol avec des disques de 6 mm de diamètre..... 83

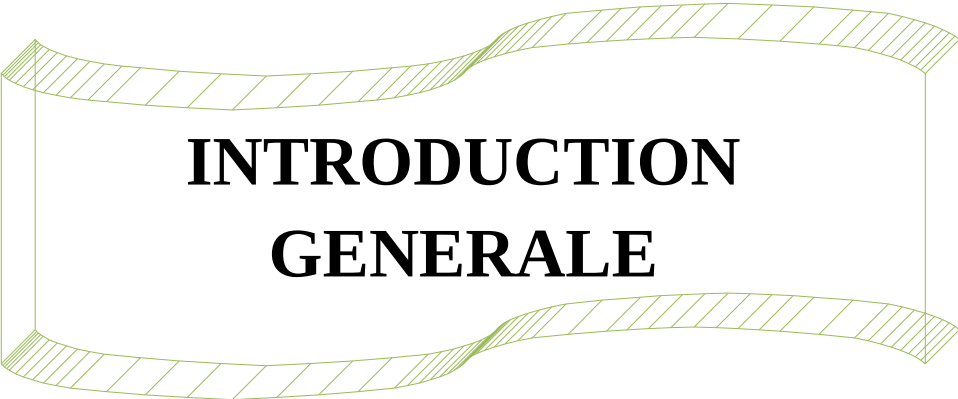
Tableau XV : Comparaison des moyennes des indices mitotiques des différents extraits des mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i>	88
Tableau XVI : Comparaison des moyennes des pourcentages de cytotoxicité des différents extraits des mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i>	91
Tableau XVII: Les IC 50 des différents extraits	94
Tableau XVIII : Inhibition de la croissance des souches bactériennes par les mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i> dans le premier screening	98
Tableau XIX: Inhibition de la croissance des souches bactériennes par les mycoendophytes dans le second dépistage	98
Tableau XX : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	102
Tableau XXI: Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes <i>Staphylococcus aureus</i> TCC 25923	103
Tableau XXII : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes <i>Staphylococcus aureus</i> FRI 326.....	104
Tableau XXIII : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes <i>Staphylococcus aureus</i> FRI S6.....	105
Tableau XXIV : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes <i>Staphylococcus aureus</i> FRI 361	106
Tableau XXV : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes <i>Staphylococcus aureus</i> TCC 43300	107
Tableau XXVI : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes <i>Staphylococcus aureus</i> MU 50 mecA	108

Tableau XXVII : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* FRI 137 **109**

Tableau XXVIII : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Bacillus cereus* ATCC 10876..... **110**

Tableau XXIX : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Bacillus cereus* ATCC 14579..... **111**

Tableau XXX : Matrice de corrélation des différentes activités biologiques des extraits bruts mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* **116**



INTRODUCTION GENERALE

Pendant longtemps, les remèdes naturels furent le principal, voire l'unique recours de la médecine de nos grands parents. Cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante une tradition thérapeutique connue depuis nos ancêtres. L'organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 80% de la population mondiale utilise des herbes comme méthode de soin de santé primaire (BOUSLIMAN *et al.*, 2012 ; AHMED *et al.*, 2012). Des recherches récentes ont montré un immense potentiel des plantes médicinales comme source de composés bioactifs (DAS *et al.*, 2010 ; TENGURIA *et al.*, 2011). Par son action en douceur et en profondeur, la phytothérapie apparaît d'autre part comme la réponse idéale aux "maladies du siècle" qui caractérisent nos sociétés, comme le stress, la perte du sommeil ou la prise de poids (CHABRIER, 2010).

Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés thérapeutiques. Toute matière d'origine végétale utilisée pour soin est une plante médicinale. Ces dernières comme la plupart des plantes sont en relation avec des microorganismes endophytes, qu'elles hébergent à l'intérieur de leurs tissus (STROBEL *et al.*, 2002 ; ELLOUZ, 2011). Ces endophytes sont notamment composés de bactéries et de champignons microscopiques (champignons endophytes) (SCHULZ *et al.*, 2006). Ils sont une composante importante de la communauté végétale (ARNOLD *et al.*, 2001 ; ARNOLD *et al.*, 2003), qui peuvent développer avec elle diverses interactions (RAVELOMANANTSOA, 2004). Les mycoendophytes peuvent contribuer à la croissance de la plante et sa défense, mais aussi être une source importante de nouveaux composés bioactifs naturels, avec des applications potentielles dans l'agriculture, la médecine et l'industrie alimentaire. Durant les deux dernières décennies, de nombreux composés à activités biologiques, à savoir : antimicrobiennes, anticancéreuses, cytotoxiques et insecticides ont été isolés de ces champignons endophytes (SCHULZ *et al.*, 2002 ; ZHAO *et al.*, 2010a).

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques des plantes médicinales. L'Algérie, de part sa position géographique, présente une large gamme d'étages bioclimatiques, induisant une biodiversité de plantes utilisées comme condiments, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques (AMEENAH, 2006).

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence des mycoendophytes chez une plante médicinale des régions arides d'Algérie : *Peganum harmala* L (Harmel), une plante de la famille des Zygophyllaceae. C'est une espèce cosmopolite, elle pousse de manière spontanée dans les régions semi-arides, les steppes, les sols sablonneux et salins (DARABPOUR *et al.*, 2011 ; HAMMICHE *et al.*, 2013 ; NIROUMAND *et al.*, 2015). Elle est utilisée pour des usages thérapeutiques depuis le premier siècle après J-C (LAMCHOURI, 2014). En médecine traditionnelle nord africaine, elle a été considérée comme une véritable panacée, réputée traiter la plupart des troubles (HAMMICHE *et al.*, 2013), tel que l'hypertension, l'asthme, la toux, la jaunisse, le lombago, la colique hypoglycémique et bien d'autres maladies (DARABPOUR *et al.*, 2011 ; LAMCHOURI, 2014 ; AKBARY *et al.*, 2014). L'Harmel est une plante toxique et sa toxicité est due aux différents alcaloïdes qui la constituent. Ces derniers sont très présents dans les graines, qui représentent la partie la plus toxique. Les feuilles et les graines de *P. harmala* sont connues pour avoir des propriétés hypothermiques et hallucinogènes. Beaucoup d'études ont démontré les activités biologiques générées par cette essence, à savoir des effets antibactériens, antifongiques, antiviraux, antitumoraux, cytotoxiques, antispasmodiques, antihistaminiques, vasorelaxants, analgésiques, anti-inflammatoires et immuno-modulateurs (DARABPOUR *et al.*, 2011 ; AKBARY *et al.*, 2014 ; LAMCHOURI, 2014 ; JAVADIAN *et al.*, 2016 ; GUL KANWAL *et al.*, 2016).

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail, qui consiste en l'étude de la biodiversité des champignons endophytes et épiphytes, des métabolites secondaires de ces mêmes champignons endophytes isolés des feuilles de *Peganum harmala* L. de la région de Timzerth, dayate Aiat, wilaya de Laghouat, ainsi que leurs différentes activités : antioxydante, antimitotique, antiproliférative et antibactérienne. Ce travail s'est fait dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies et celui des Ressources Naturelles de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Les objectifs sont les suivants :

- isolement et purification des mycoendophytes et épiphytes ;
- identification microscopique et macroscopique ;
- fermentation et extraction des métabolites secondaires des mycoendophytes;
- mise en évidence des activités biologiques des extraits bruts fongiques des feuilles de *Peganum harmala* L.

**PARTIE I : *Peganum harmala* ET
DIVERSITE EN EPIPHYTES ET
MYCOENDOPHYTES FOLIAIRES**

1.1. Présentation de la plante : *Peganum harmala* L.

1.1.1. Caractéristiques de l'espèce

Peganum harmala L. a plusieurs noms vernaculaires : «*Harmel* ou *Harmal El sahari*» en Algérie et en Afrique du Nord, «*Rue sauvage*» en France, «*African rue* ou *Syrian rue*» aux Etats Unis et «*Espanol*» en Iran (JINOUS et FERESHTEH, 2012). Son odeur forte, désagréable rappelle en effet celle de la rue. La plante et ses extraits ont été employés en médecine traditionnelle depuis l'aube de la civilisation (ACHOUR *et al.*, 2012).

C'est une plante vivace, à racines pivotantes, pouvant atteindre une profondeur de 6 m si le sol est très sec, à tiges peu rameuses de 30 à 90 cm de haut, à entre-noeuds assez courts, densément feuillés (Figure 1). Les feuilles sont de couleur vert clair, alternes sur la tige, allongées et irrégulièrement divisées en étroites lanières (MANSOUR et SOUDABE, 2012 ; KEMASSI *et al.*, 2013). La plante présente des fleurs solitaires et blanches avec des sépales inégaux persistants, qui dépassent la corolle et des pétales crème lavés de rose-orangé à nervures jaunes. Les fleurs sont dotées de dix à quinze étamines. Le gynécée est de 8 à 9mm de longueur, à ovaire supère (une fleur hypogyne) et globuleux, surmonté d'un style cylindrique. Il est composé de trois à quatre loges et de stigmates à trois carènes. Les fruits sont des petites capsules sphériques déprimées au sommet renfermant des graines noires aplaties. Chaque fruit est divisé en trois loges, dont chacune porte 45 à 60 graines (BAHMANI *et al.*, 2013; KEMASSI *et al.*, 2013).



Figure 1 : Photo de *Peganum harmala* L. prise sur le terrain d'échantillonnage à Dayate Aiat (Laghouat, Algérie).

1.1.2. Position taxonomique

Peganum harmala L. appartient à la famille des Zygophyllaceae (MOGHADAM *et al.*, 2010 ; TANWEER *et al.*, 2012), qui compte 22 genres et plus de 250 espèces (JINOUS et FERESHTEH, 2012). D'après DOBIGNARD et CHATELAIN (2013), la position taxonomique du *Harmel* est la suivante:

Ordre: Sapindales

Famille: Zygophyllaceae

Genre: *Peganum*

Espèce: *Peganum harmala* L.

1.1.3. Aire de répartition

Peganum harmala L. est une espèce cosmopolite, largement distribuée dans le monde et très commune sur les sols sableux, originaire des zones arides et semi-arides (CHEVALLIER, 1996 ; DARABPOUR *et al.*, 2011; LAMCHOURI *et al.*, 2013). Cette plante pousse en Afrique du Nord, Moyen-Orient, Pakistan, Inde, Iran, Turquie et a été introduite en Amérique et en Australie (YOUSFI *et al.*, 2009 ; MOSHIRI *et al.*, 2013).

En Algérie, cette espèce est commune aux Hauts Plateaux, au Sahara septentrional, méridional et aux montagnes du Sahara central. Elle est réputée pour les terrains sableux, dans les lits d'oued et à l'intérieur des agglomérations (OZENDA, 1991).

1.1.4. Etude phytochimique : métabolites secondaires

Les composés phytochimiques les plus connus de *Peganum harmala* sont les alcaloïdes, les flavonoïdes et les anthraquinones (BUKHARI *et al.*, 2008 ; SHARAF *et al.*, 1997; PITRE et SRIVASTAVA, 1987). La teneur totale en alcaloïdes chez *Peganum harmala* L. varie entre 2 et 5%, représentée par l'harmaline, l'harmine et l'harmalol (Figure 2). Les graines et les racines contiennent les taux plus élevés en alcaloïdes, comparativement aux tiges et aux feuilles. Ces derniers sont absents dans les fleurs. L'harmine et l'harmaline s'accumulent dans les graines sèches à 4,3 et 5,6% (p/p). De même, l'harmalol et la tetrahydroharmine sont respectivement à 0,6% et à 0,1% (p/p). Les racines contiennent l'harmine et l'harmol avec 2,0 et 1,4% (p / p) (HERRAIZ *et al.*, 2010).

L'analyse des principaux alcaloïdes de *Peganum harmala* L. (harmaline, harmine, harmol et harmalol) (Figure 2) a montré que le contenu de ces métabolites secondaires dépend

du stade de développement de la plante. La concentration des alcaloïdes majeurs dans tous les organes augmente au cours des trois premières semaines et se stabilise à un niveau constant pendant la phase de croissance végétative, puis diminue au début de la floraison. La concentration des alcaloïdes majeurs de *P. harmala* L. varie avec le stade de développement de la plante entre 21,16 et 26,96 mg/g et l'harmine reste la molécule la plus abondante (MAYAD *et al.*, 2013).

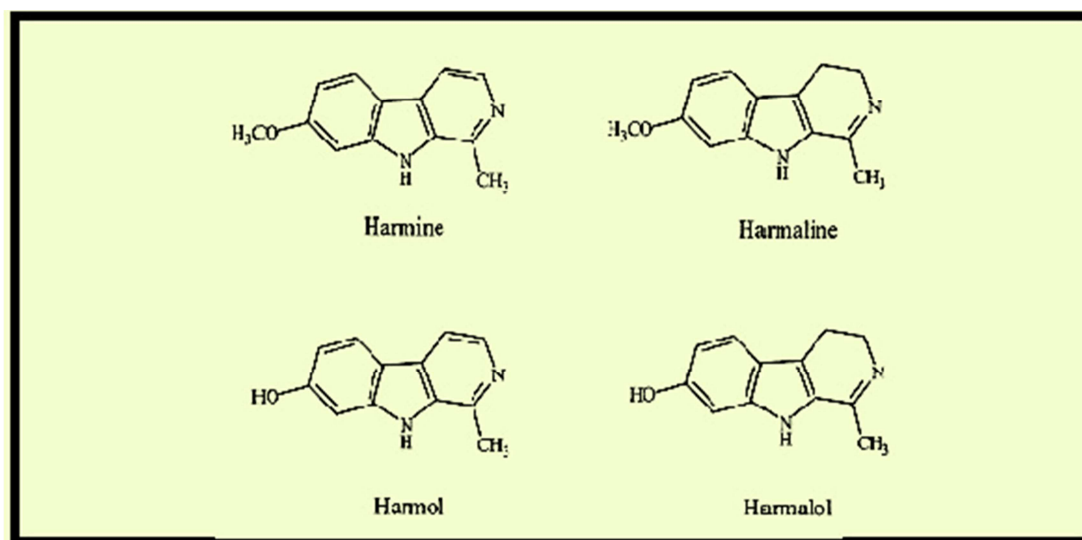


Figure 2 : Principaux alcaloïdes de *Peganum harmala* : Harmine, Harmaline, Harmalol et Harmol (MAYAD *et al.*, 2013).

Peganine, isopeganine, dipeganine, désoxypéganine ont été également identifiés chez *Peganum harmala* (FATHIZAD *et al.*, 2007; KHASHIMOV *et al.*, 1970). La teneur en alcaloïdes des graines en maturation est inférieure à celles mûres (KARTAL *et al.*, 2003). Certains effets pharmacologiques rapportés de *Peganum harmala* L. peuvent être attribués à ses alcaloïdes β-carbolines, principalement l'harmine, ainsi que l'harmaline, l'harmalol, l'harmane, le tetrahydroxyharmin (THH) (Figure 3), peganine, isopeganine, dipeganine, désoxypéganine et les dérivés de quinazoline, tels que vasicine, vasicinone et deoxyvasicinone (MAHMOUDIAN *et al.*, 2002, KARTAL *et al.*, 2003). Les graines de *Peganum harmala* contiennent ces quinazolines, dont le précurseur est l'acide anthranilique (Figure 4) (KHASHIMOV *et al.*, 1969 ; ZHAREKEEV *et al.*, 1974).

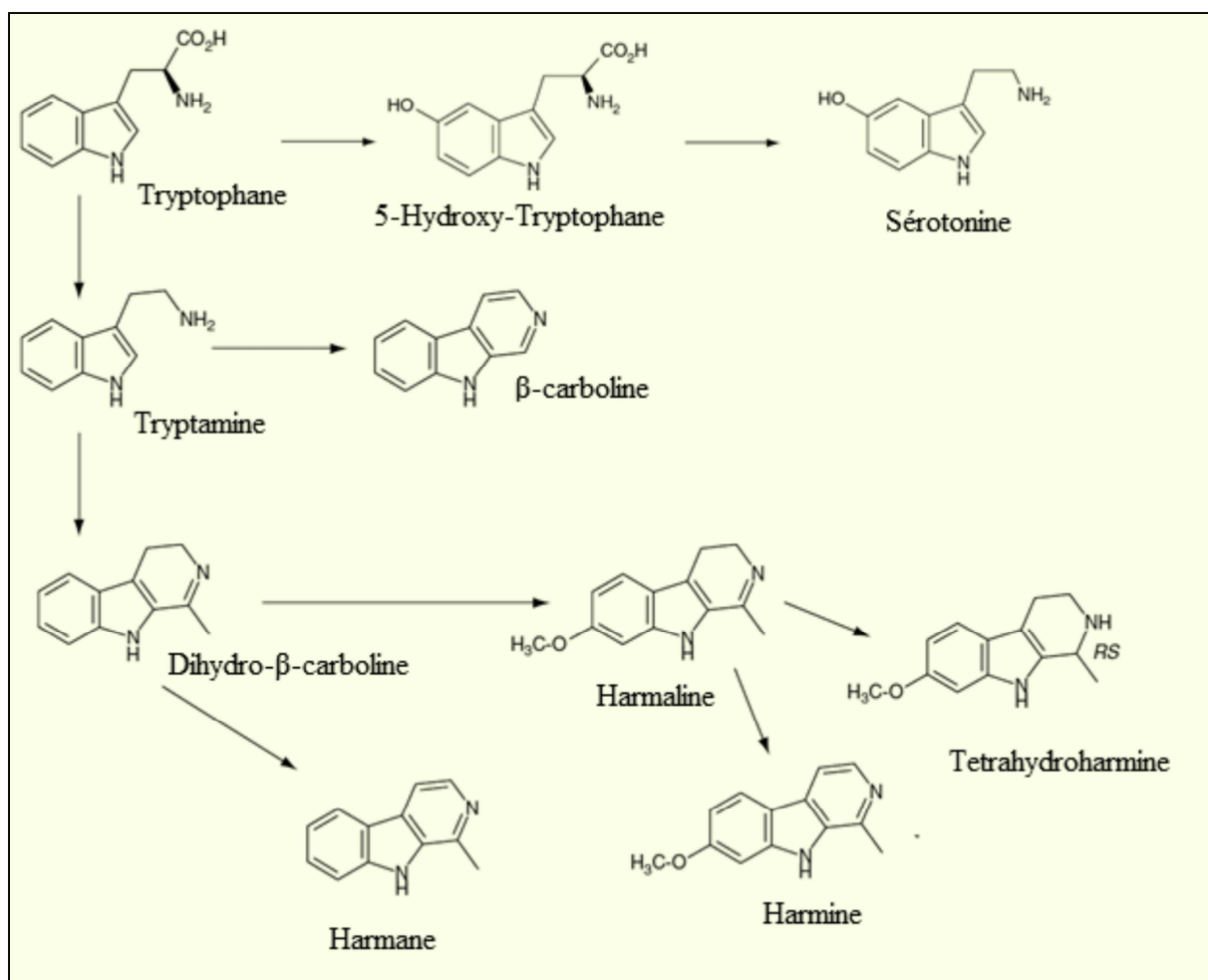


Figure 3 : Synthèse des β -carboline de *Peganum harmala* L. et de la sérotonine à partir du Tryptophane (ANISZEWSKI, 2007).

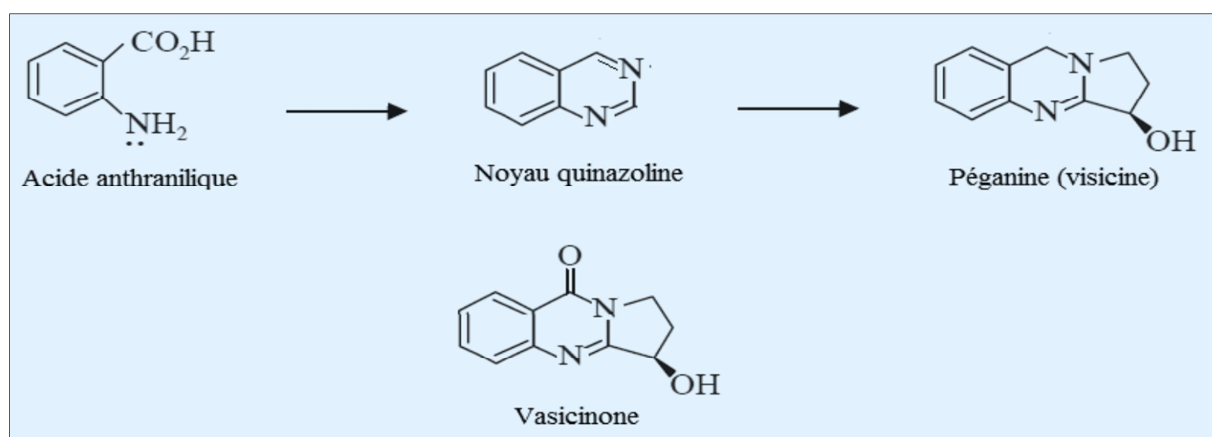


Figure 4 : Structure générale des quinazolines de *Peganum harmala* L. (ANISZEWSKI, 2007).

1.1.5. Activités biologiques de *Peganum harmala* L.

Peganum harmala est une plante médicinale connue pour ses propriétés hallucinogènes et hypothermiques depuis l'antiquité. Bien que les alcaloïdes identifiés ont montré de nombreuses actions pharmacologiques, ils restent très cytotoxiques (LAMCHOURI, 2014). Les alcaloïdes identifiés à partir de *Peganum harmala* ont montré de vastes actions pharmacologiques, tels que les effets antitumoraux (JAHANIANI *et al.*, 2005), des effets analgésiques (FAROUK *et al.*, 2008), des activités vasorelaxantes (ASTULLA *et al.*, 2008), une activité antimicrobienne (PRASHANTH et JOHN, 1999; ARSHAD *et al.*, 2008), une forte inhibition réversible de la monoamine oxydase (KIM *et al.*, 1997; SCHWARZ *et al.*, 2003) et une activité inhibitrice contre l'acétylcholinestérase (ZHENG *et al.*, 2009). L'harmaline, le principe actif des graines de *Peganum harmala* provoque des problèmes visuels, perte de coordination, une agitation et du délire et à fortes doses, il peut produire une paralysie (LAMCHOURI *et al.*, 2002).

Ces dernières décennies, plus d'attention a été donnée aux activités anticancéreuses (BOEIRA *et al.*, 2001; GOÇKLER *et al.*, 2009; ADHAMI *et al.*, 2011). Récemment, les effets pharmacologiques et thérapeutiques de *Peganum harmala* et ses principaux alcaloïdes ont été révélés (MOLOUDIZARGARI *et al.*, 2013). D'après LAMCHOURI *et al.* (1999), les concentrations d'extraits totaux d'alcaloïdes des graines de *Peganum harmala* ont été testées *in vitro* sur quatre lignées cellulaires tumorales. Les résultats obtenus indiquent que ces alcaloïdes ont une toxicité élevée sur les cellules *in vitro*. Par la suite, la prolifération tumorale a été significativement réduite avec les extraits de *Peganum harmala* (LAMCHOURI *et al.*, 2000). En 2010, LAMCHOURI et ces collaborateurs ont démontré que l'harmine et les β -carbolines ont plus d'activité cytotoxique. Par ailleurs, l'étude entreprise par HAMSA et KUTTAN en 2011 montre que l'harmine inhibait significativement la formation de nodules dans le tissu pulmonaire et diminue divers paramètres biochimiques associées à la métastase pulmonaire.

En outre, différentes activités biologiques et pharmacologiques de *Peganum harmala* ont été révélées, à savoir l'activité insecticide (GOEL *et al.*, 2009), antileishmania (MIRZAIE *et al.*, 2007 et KHOSHZABAN, 2014), anti-spasmodique, anti-histaminique (ASGHARI et LOCKWOOD, 2002), anti-oxydante, immunomodulatrice, guérison de la leucémie (ZAKER *et al.*, 2007), hypoglycémique (SINGH *et al.*, 2008), analgésique et anti-inflammatoire, antinociceptive (MONSEF *et al.*, 2004), effet hépatoprotecteur (KHALED *et al.*, 2008) et activité cytotoxique entre autres. En outre, il a été rapporté que cette plante a des effets antibactériens, antifongiques et antiviraux (DARABPOUR *et al.*, 2011). Comme la toxicité de

P. harmala a souvent été liée à ses alcaloïdes et à leurs dérivés, la détermination des changements dans le contenu et la nature chimique de ces «produits actifs» dans la plante sont des données précieuses pour améliorer l'efficacité des substances à base de *Peganum harmala*, lorsque l'activité biologique est souhaitée. Selon WIESER (1955), l'activité biologique dépend du stade de croissance de la plante (MAYAD *et al.*, 2013).

1.2. Diversité de la phyllosphère

1.2.1. Introduction

Les parties aériennes des plantes, à savoir les feuilles, les tiges, les bourgeons, les fleurs et les fruits constituent un habitat pour les microorganismes appelés phyllosphère. Ces microorganismes peuvent être retrouvés à la fois comme épiphytes à la surface de la plante et/ou comme endophytes à l'intérieur des tissus végétaux (ARNOLD *et al.*, 2000 ; INACIO *et al.*, 2002 ; LINDOW et BRANDL, 2003 ; STAPLETON et SIMMONS, 2006). Les bactéries sont les plus dominantes de la phyllosphère, bien que les champignons filamenteux et les levures puissent également être importants. La distinction entre le statut d'endophyte et d'épiphyte n'est pas évidente. En effet, certaines espèces microbiennes peuvent activement pénétrer les tissus de la feuille pour devenir endophytes (VIRET *et al.* 1994 ; WILSON *et al.* 1999).

Le terme épiphyte, du grec épi (sur) et phyton (plante) a été introduit par MIRBEL dans son livre *Eléments de physiologie végétale et de botanique* en 1815 et se réfère à un organisme qui se développe sur une plante vivante. Les épiphytes ne sont pas des parasites, c'est-à-dire qu'ils sont habituellement indépendants de la plante hôte pour la nutrition, bien qu'ils puissent parfois endommager la plante hôte. On distingue des holoépiphytes, qui complètent leur cycle de vie sans contact avec le sol et les hémiepiphytes, qui a un certain stade de leur développement, le continue au niveau des racines dans le sol (REINERT et FONTOURA, 2005).

En 1977, WILSON a considéré les associations bénéfiques de divers champignons et de racines de plantes : les mycorhizes. Ultérieurement, il a suspecté des associations champignons-feuilles qu'il a dénommé « mycophyllae ». Les premières descriptions des champignons endophytes remontent à la fin du 19^{ème} et 20^{ème} siècle (STANIEK *et al.*, 2008). En 1866, ANTON DE BARY inventa le terme endophytes (MORICCA ET RAGAZZI, 2008), qui est composé de deux mots grecs, « endon » signifiant au sein et « phyton » désignant plante (STANIEK *et al.*, 2008), qui désignait tout organisme survenant dans les

tissus des plantes et se retrouvent dans leurs différentes parties ((PETRINI, 1991; STONE et *al.*, 2000 ; HYDE ET SOYTONG, 2008). On a longtemps pensé que ces champignons n'avaient aucune fonction, ni aucun intérêt. Cependant, dans les dernières décennies, les recherches ont commencé à s'intéresser aux endophytes (MORICCA et RAGAZZI, 2008), qu'on considère maintenant comme source de composés bioactifs, tels que les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticides... (MAHESHWARI, 2006).

Les champignons endophytes présentent une grande diversité. Ils sont hétérotrophes et se nourrissent de l'hôte sans que celui-ci ne présente des signes de maladie. Ils peuvent croître dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (ARNOLD, 2007) (Figure 5).

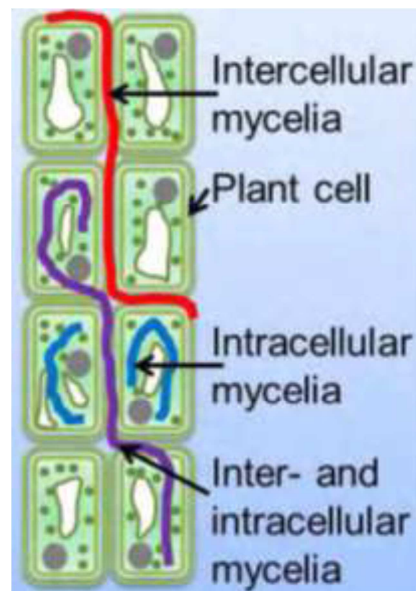


Figure 5 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes (KUSARI et SPITELLER, 2012a).

1.2.2. Classification des champignons endophytes

Les champignons endophytes sont classés en deux groupes majeurs (RODRIGUEZ et *al.*, 2009) : le groupe des Clavicipitaceae, qui colonisent les Graminées (Poacées) (TINTJER et *al.*, 2008 ; HYDE et SOYTONG, 2008 ; RAJA et *al.*, 2015) et le groupe des mycoendophytes non Clavicipitaceae qui colonisent toutes les autres plantes terrestres et aquatiques (HYDE et SOYTONG, 2008 ; RAJA et *al.*, 2015). Les différentes classes des mycoendophytes sont mentionnées dans le tableau I. Ces dernières reflètent les différences évolutives, taxonomiques, les fonctions écologiques, leur mode de transmission, ainsi que la nature de leurs hôtes (RODRIGUEZ et *al.*, 2009).

Tableau I : Critères symbiotiques qui caractérisent les classes des champignons endophytes (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Critères	Clavicipitaceae	Non-Clavicipitaceae		
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Classe d'hôte	Limitée	Vaste	Vaste	Vaste
Tissu(s) colonisé (s)	Pousses et rhizome	Pousses, racines et rhizome	Pousses	Racines
Colonisation dans la plante	Extensive	Extensive	Limitée	Extensive
Biodiversité au niveau de la plante	Basse	Basse	Elevée	Inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Verticale et horizontale	Horizontale	Horizontale
Avantages sur la forme de la plante (Fitness)*	NHA	NHA et HA	NHA	NHA

- ***Habitat-adapted (HA):** dépend de l'habitat, les avantages pour la plante résultent de la nature et la spécificité de l'habitat telles que le pH, température et salinité.

- **Non habitat-adapted (NHA):** les avantages tels que la tolérance à la sécheresse et l'augmentation de la croissance sont dues aux mycoendophytes indépendamment de l'habitat d'origine.

1.2.2.1. Mycoendophytes Clavicipitaceae (C- endophytes)

C'est le groupe de champignons endophytes le plus étudié du fait de leur importance économique et écologique. Les C-endophytes (endophytes de classe I) représentent un petit nombre phylogénétique apparenté aux espèces de Clavicipitaceae (RODRIGUEZ *et al.*, 2009), des Balansieae et leurs anamorphes (CLAY *et al.*, 1990), occupant quelques Graminées de saisons fraîches et chaudes (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Ce sont des endophytes systémiques (TINTJER *et al.*, 2008 ; RAJA *et al.*, 2015).

1.2.2.2. Mycoendophytes non-Clavicipitaceae

Les non-Clavicipitaceae représentent un groupe très diversifié. Ils forment un assemblage polyphylétique, essentiellement d'Ascomycètes et représentent au moins trois

groupes fonctionnels distincts selon leurs caractéristiques, leurs modes de vie et leurs importances écologique (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Ils se retrouvent asymptomatiquement chez tous les types de plantes (SAIKKONEN *et al.*, 2015), à savoir les tissus des plantes non vasculaires, des fougères, des conifères, des Angiospermes et chez les plantes de tous les écosystèmes terrestres (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Ces mycoendophytes non-systémiques ont été souvent signalés de manière abusive comme des mycoendophytes, infectant exclusivement les non-Graminées, alors qu'ils peuvent se retrouver aussi chez les Graminées (SAIKKONEN *et al.*, 2015) et coloniser asymptomatiquement des parties de feuilles de ces dernières (CLAY *et al.*, 1990).

1.2.3. Mode de reproduction et de transmission

Les mycoendophytes ont élaboré deux modes de transmission qui sont : la transmission verticale, via les graines de la plante hôte et la transmission horizontale, via les spores sexuées ou asexuées.

1.2.3.1. Transmission verticale

Les mycoendophytes transmis verticalement ont été décrit par CAROLL (1988) comme des « mutualistes constitutifs », associés systématiquement à leur plante hôte. Ils sont transmis d'une plante à sa descendance par l'intermédiaire de leurs graines (DIRIHAN, 2016). C'est le cas des mycoendophytes des Graminées, leurs hyphes se développent dans les espaces intercellulaires des tissus des feuilles et des tiges, puis intègrent l'ovule et les graines (CLAY *et al.*, 1990 ; GIMENEZ *et al.*, 2007 ; DIRIHAN, 2016) (Figure 6).

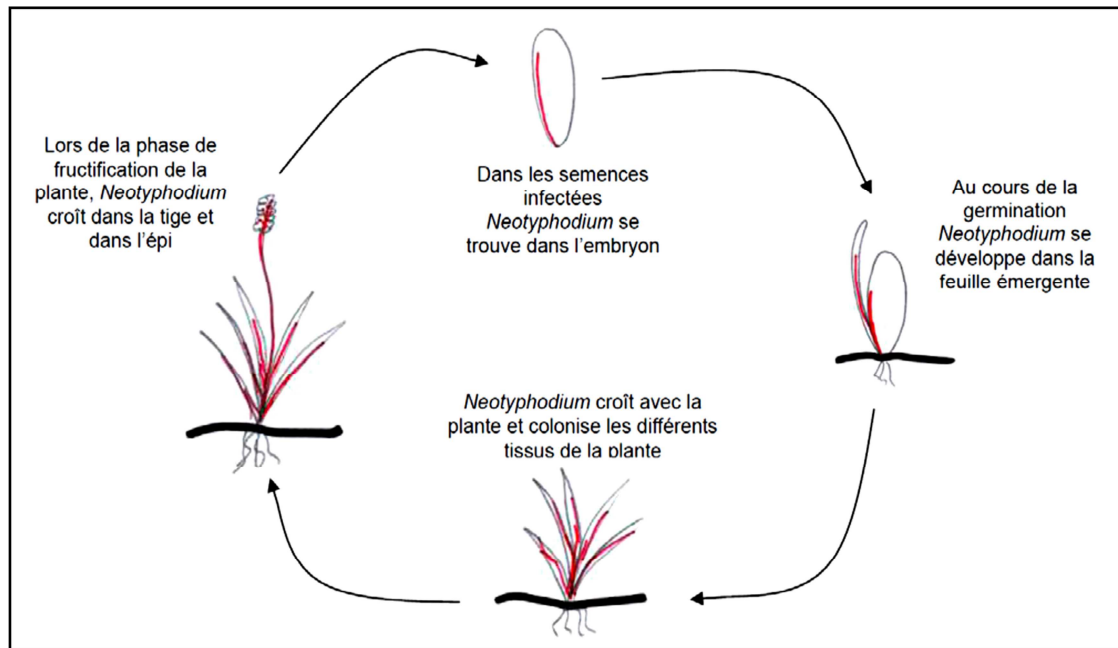


Figure 6 : Représentation schématique du cycle de vie des champignons endophytes du genre *Neotyphodium* transmis verticalement (→) (REPUSSARD *et al.*, 2013).

[→ Les parties de la plante colonisées par le *Neotyphodium*]

Les mycoendophytes sont initialement contenus dans la graine et se retrouvent plus tard dans les différentes parties de la plante après la germination, c'est le cas du genre *Claviceps*, endophytes d'herbe. Elle 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 ; SAIKKONEN *et al.*, 2010).

La transmission verticale par la graine a principalement été observée chez quelques espèces de champignons endophytes de la famille des Clavicipitaceae qui colonisent les Poaceae, les Cypéraceae et les Juncaceae. Elle existe chez d'autres espèces d'endophytes ayant été observés comme pouvant coloniser plusieurs espèces non graminéoïdes (*Pinus* spp., *Vigna unguiculata*, *Theobroma cacao*, *Castanea* spp., *Colophospermum mopane*) (CURRIE *et al.*, 2014).

1.2.3.2. Transmission horizontale

Ce mode de transmission se fait par transfert de spores sexuées ou asexuées des parties aériennes d'une plante à l'autre avec l'aide de différents vecteurs comme l'air, le vent, les

insectes, etc ... (CAROLL, 1988). Ces mycoendophytes non systémiques sont des « mutualistes induits » (CAROLL, 1988). Souvent originaires de spores isolées, ils vont coloniser des tissus particuliers et un espace limité par contagion (ARNOLD et LUTZONI, 2007 ; SAIKKONEN *et al.*, 2015 ; DIRIHAN, 2016). Les spores, en germant vont pénétrer à travers la cuticule, les stomates ou les blessures des tissus et coloniser l'espace intra ou intercellulaire des tissus de la plante hôte. Ce genre d'endophytes sont généralement associés aux plantes ligneuses. La majorité des jeunes feuilles des plantes vasculaires, qui sont généralement exemptes de mycoendophytes dans les premiers moments de leur vie, vont être contaminés par ces derniers, tel qu'il est mentionné au niveau de la figure 7, qui schématise le mode de transmission horizontale chez des plantes tropicales (HERRE *et al.*, 2007).

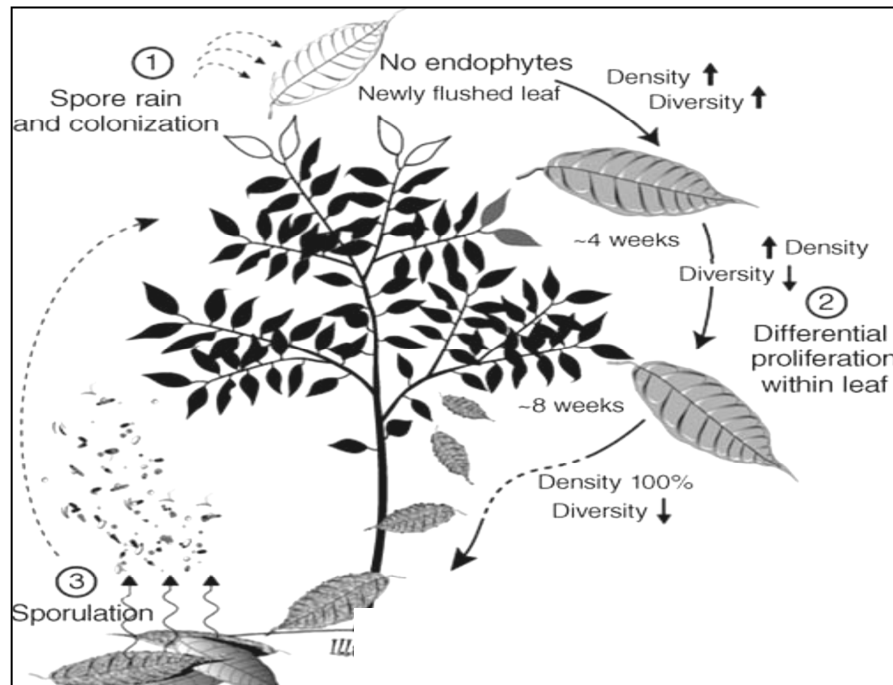


Figure 7 : Représentation schématique du cycle de vie des mycoendophytes foliaires transmis horizontalement chez les plantes tropicales (HERRE *et al.*, 2007).

Les spores de champignon emportées par le vent ou la pluie se déposent sur les parties aériennes et les racines de la plante, pénètrent à travers les stomates ou en formant des appressoria (organes de fixation et de germination des spores) et colonisent finalement l'intérieur de la plante.

1.2.4. Interaction plante-champignon endophyte

Toute interaction plante-champignon est précédée d'une rencontre physique entre une plante et un champignon. Plusieurs barrières physiques et chimiques doivent être surmontées pour établir avec succès une association. L'hypothèse de l'antagonisme équilibré était initialement proposé (SCHULZ *et al.*, 1999; SCHULZ et BOYLE, 2005). Comment un endophyte évite d'activer les défenses de l'hôte et parvient à se développer au sein de celui-ci sans provoquer des manifestations visibles d'infection ou de maladie ? (ARNOLD, 2005, 2007, 2008; SCHULZ et BOYLE, 2006) (Figure 8A).

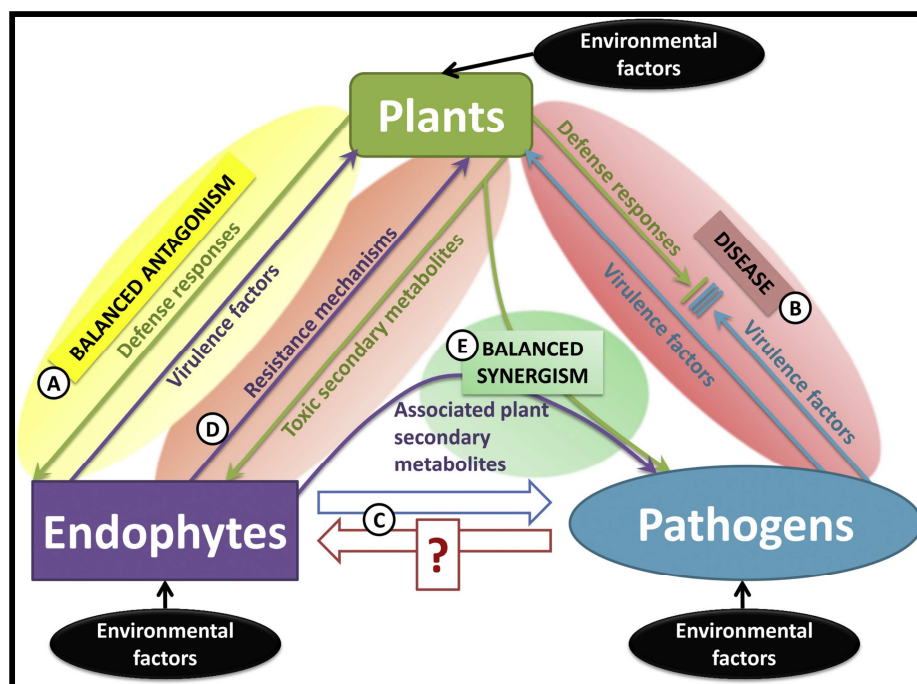


Figure 8 : Interactions plantes-champignons endophytes (KUSARI *et al.*, 2012c).

(A) L'hypothèse d'un antagonisme équilibré.

(B) Maladie de la plante causée par des champignons pathogènes.

(C) Réciprocité endophytes- pathogène.

Le point d'interrogation (?) indique que ce phénomène pourrait ne pas être universel, en plus la recherche est nécessaire pour la vérification.

(D) Stratégie de survie des endophytes.

(E) Synergie équilibrée.

Si les mécanismes de défense des plantes neutralisent complètement les facteurs de virulence fongique, le champignon périra. A l'inverse, si la plante succombe à la virulence du champignon, une relation plante-pathogène conduirait à des maladies des plantes (Figure 8B). Parce que de nombreux endophytes pourraient éventuellement être pathogènes latents, ils

pourraient être influencés par certains facteurs intrinsèques ou environnementaux pour exprimer les facteurs qui conduisent à la pathogénicité (ARNOLD, 2008) (Figure 8C). Par exemple, l'expression du gène de la protéine kinase (sakA) de l'endophyte *Epichloe festucae* se révèle être vital pour le maintien de son association mutualiste avec l'hôte *Lolium perenne* et la prévention de cette association pour devenir pathogène (EATON *et al.*, 2010, 2011).

Récemment, il a été révélé que l'interaction plante-endophyte pourrait ne pas être juste un équilibre entre la virulence et la défense, mais une interaction beaucoup plus complexe et contrôlée avec précision (Figure 8D). La production de produits naturels par des champignons endophytes, autrefois considérée comme exclusive aux plantes, soulève également des questions intrigantes concernant l'organisme source d'origine. En fait, il est possible que divers métabolites végétaux pourraient en fait être des produits biosynthétiques de leurs endophytes (KUSARI *et al.*, 2012c).

Le commensalisme et le mutualisme représentent les étapes équilibrées d'interactions des plantes-microorganismes.

➤ **Commensalisme**

Le commensalisme est bénéfique pour l'endophyte qui perçoit un abri et une provision d'éléments nutritifs et que sa présence à l'intérieur d'un tissu hôte ne provoque aucun dérangement (FANO HARANTSOA, 2011).

➤ **Mutualisme**

Le mutualisme, par contre, est défini comme une interaction bénéfique pour les deux partenaires. En plus des avantages pour l'endophyte, le mutualisme est fréquemment considéré comme des résultats encouragés par l'hôte, car la plante perçoit aussi des éléments nutritifs et des molécules de défense contre les phytopathogènes (WALLER *et al.*, 2005).

Les différentes étapes de la colonisation par un champignon endophyte sont illustrées dans la figure 9.

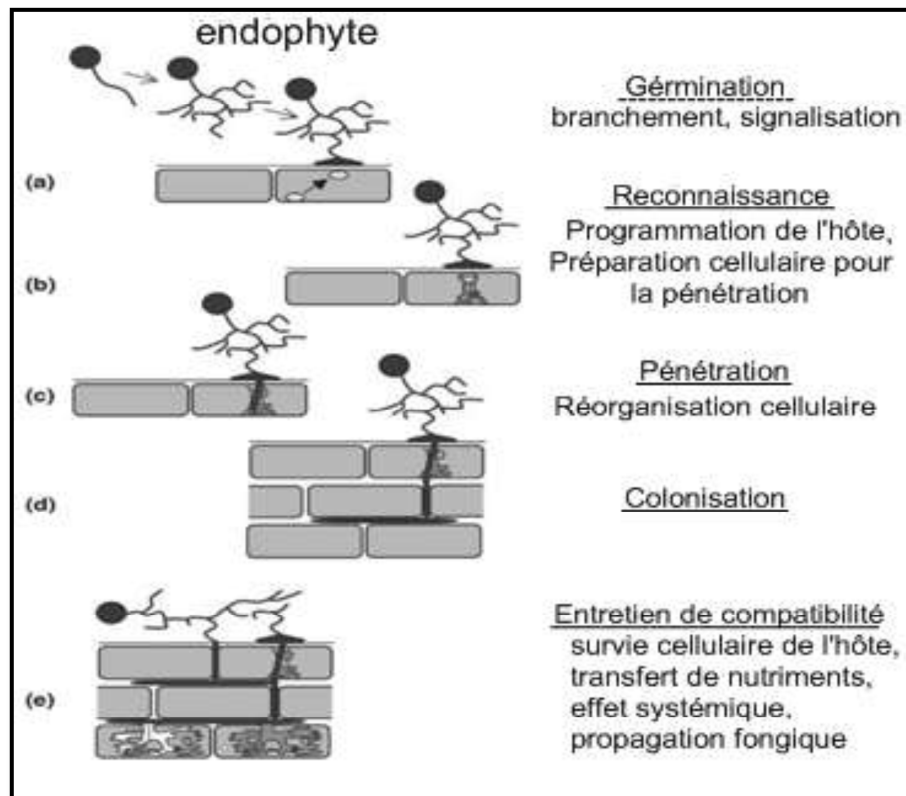


Figure 9 : Développement symbiotique des endophytes fongiques (AKIYAMA *et al.*, 2005).

- (a) Une fois que les spores germent et approchent un appareil végétatif de l'hôte, la dominance apicale est abandonnée et le branchement d'hyphes est déclenché par le 5- désoxy-strigol (AKIYAMA *et al.*, 2005) ,
- (b) Dès le premier contact physique, le champignon forme un appressorium qui paraît induire le mouvement du noyau de la plante vers le site du contact (AKIYAMA *et al.*, 2005),
- (c) Les éléments cytosquelettiques et le réticulum endoplasmique forment l'appareillage de la pré-pénétration le long de l'axe du mouvement nucléaire (GENRE *et al.*, 2005),
- (d) Quand le mycète atteint finalement le cortex intérieur, il pénètre la paroi cellulaire et forme une structure hyphale (comme un réseau filamenteux).
- (e) La colonisation des tissus commence. L'infection initiale est accompagnée par une induction équilibrée de gènes de la défense de la plante.

L'environnement de l'endophyte peut affecter le métabolisme des produits chimiques de défense de l'hôte (CABRAL *et al.*, 1993 ; PETERS *et al.*, 1998 ; SCHULZ *et al.*, 1999). Un environnement hostile peut expliquer l'évolution de la capacité de synthèse potentiellement accru des endophytes. Ceci dit l'endophyte isolé d'une plante hôte donnée produit un composé bioactif, mais ne parvient pas à le synthétiser lorsqu'il est isolé d'une autre espèce de plante (LI *et al.*, 1996).

En outre, les conditions environnementales qui ont un effet sur la croissance de la plante hôte influent sur le nombre et la diversité des populations d'endophytes, et de ce fait sur les métabolites produits par ces endophytes (SELIM *et al.*, 2012).

La différence entre les endophytes est au niveau de leur profil métabolique et donc de leur activité biologique. Cela est liée à la composition chimique des plantes hôtes (PAULUS *et al.*, 2006).

Les champignons endophytes exhibent généralement une vie discrète le plus souvent entière et quelques fois partielle, durant laquelle la colonisation et la croissance peuvent cesser temporairement, mais reprendre à nouveau après un changement induit de la part du végétal hôte ou de l'environnement biotique. Ce rythme de croissance épisodique est une caractéristique déterminante des endophytes en général (STONE *et al.*, 2004).

1.2.5. Diversité des champignons endophytes au niveau des végétaux

Les mycoendophytes sont fréquemment isolés à partir des plantes médicinales. DREYFUSS et CHAPELA (1994) ont estimé qu'il pourrait y avoir au moins 1 million d'espèces de mycoendophytes.

La plupart des champignons endophytes appartiennent à l'embranchement des Ascomycota ; cependant certains appartiennent à d'autres taxons tels que les Deuteromycota, Basidiomycota, Zygomycota et les Oomycota (SAAR *et al.*, 2001); ils représentent un groupe très diversifié (ZABALGOGEAZCOA, 2008) avec une estimation de 1.5 millions d'espèces (FERNANDES *et al.*, 2009) et une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante, dont les multiples strates de tissus sont utilisées comme habitat. Ils ont été isolés à partir de toutes les plantes étudiées à ce jour, des plantes allant des grands arbres (OSES *et al.*, 2008), palmiers (FROHLICH *et al.*, 2000), Graminées marines (ALVA *et al.*, 2002) et même à partir des lichens (LI *et al.*, 2007) et aussi, à partir de plantes poussant dans les forêts aussi bien tropicales, tempérées que boréales (STONE *et al.*, 2004).

1.2.5.1. Facteurs de diversité des champignons endophytes

Les données démontrent que les assemblages, l'abondance, la diversité et la composition taxonomique des endophytes diffèrent en fonction de l'identité et la localisation de l'hôte, mais aussi en fonction des affinités avec les hôtes de ces communautés (SCHULZ et BOYLE, 2006 ; HOFFMAN *et al.*, 2008). La saison, la méthode d'isolement et l'état de santé du tissu affectent aussi la fréquence et la distribution des espèces mycoendophytiques (VARVAS *et al.*, 2013). La diversité et la densité de colonisation augmentent fréquemment pendant la

période de végétation, puisque la transmission horizontale prédomine, mais aussi en automne à la fin de la période de végétation où la sporulation asexuée augmente (SCHULZ et BOYLE, 2006). La transmission horizontale et la reproduction sexuée fréquente augmentent aussi la diversité génétique et le nombre d'espèces de mycoendophytes non systémiques, même dans une seule feuille (SAIKKONEN *et al.*, 2015).

Un autre facteur qui contribue à la large diversité observée dans les assemblages endophytiques est la variation géographique. Les taxa isolés des mêmes espèces d'hôte tendent à changer d'un emplacement à un autre. Dans le contexte géoclimatique, les assemblages endophytiques semblent être riches dans les tropiques comparés aux zones tempérées ou froides du monde (ZABALGOGEAZCOA, 2008).

L'âge des plantes aussi a un effet sur la diversité des mycoendophytes. Comme le temps de l'exposition à l'inoculum endophytique augmente avec l'âge, les plantes semblent accumuler un nombre élevé de mycoendophytes dans leurs tissus. C'est pour cela, les parties âgées des plantes peuvent arborer plus de mycoendophytes que les plus jeunes (ZABALGOGEAZCOA, 2008). Quelques corrélations existent entre les assemblages endophytiques et la chimie de l'hôte. Par exemple, la teneur totale en flavonoïdes et en composés phénoliques chez des plantes médicinales étudiées influencent le nombre de taxa de mycoendophytes isolés (HUANG *et al.*, 2008).

1.2.5.2. Obstacles rencontrés dans la découverte de la biodiversité des mycoendophytes

Selon CHEN *et al.* (2015), la biodiversité fongique et l'emplacement phylogénétique et taxonomique de la majorité des champignons endophytes n'est pas encore explorée et c'est en partie pour les raisons suivantes:

- quelques endophytes ne peuvent pas être mis en culture (ARNOLD et LUTZONI, 2007 ; CHEN *et al.*, 2015) ;
- même quand ils sont mis en culture, beaucoup de champignons endophytes ne forment pas *in vitro* la structure morphologique qui est utilisée traditionnellement dans la taxonomie (CHEN *et al.*, 2015), donc le critère Reconnaissance Morphologique des Espèces (RME) est difficile à développer chez les taxa de mycoendophytes, parce que leur caractères phénotypiques sont simples et ne développent pas souvent des caractères taxonomiques végétatifs et des structures de reproduction sexuée ou asexuée (GAZIS *et al.*, 2011) ; en outre, le critère

Reconnaissance Biologique des Espèces (RBE) est aussi difficile à formuler, parce que les systèmes de reproduction sont inconnus et la majorité des espèces ne peuvent pas être amenées à produire leur formes sexuées en culture (GAZIS *et al.*, 2011) ;

- la majorité des études de culture-indépendante de champignons s'appuient sur la transcription nucléaire ribosomale interne de la région espaceur (nrITS) (CHEN *et al.*, 2015) ; c'est le critère Reconnaissance Phylogénétique des Espèces (RPE) en rapport avec les variations de l'acide nucléique pour délimiter l'uniformité phénotypiques, les manifestations asexuées et les lignées de champignons incultivable (GAZIS *et al.*, 2011), qui n'est pas favorable à des analyses phylogénétiques de grande envergure, ou utilisent de courtes interprétations qui prouveraient la limite de la puissance de résolution (GAZIS *et al.*, 2011 ; CHEN *et al.*, 2015) ;
- de plus, la grande majorité des espèces mycoendophytiques n'ont pas été décrites, même si beaucoup d'ordres ont été consignés dans la base de données GenBank, ce qui prouvent la limite des informations taxonomiques (CHEN *et al.*, 2015).

1.2.6. Rôles des champignons endophytes

Les champignons endophytes reçoivent les nutriments, la protection et la possibilité de se propager grâce à leurs hôtes (CLAY et SCHARDL, 2002) et en retour la plante hôte bénéficie aussi de certains avantages procurés par l'endophyte.

1.2.6.1. Rôle dans la nutrition et la croissance

Les champignons endophytes ont un rôle dans la croissance de l'hôte et l'absorption des nutriments (SELIM *et al.*, 2012). De nombreux endophytes sont connus pour la fixation de l'azote (N), la solubilisation du phosphate, l'amélioration de l'absorption du phosphore (P), la production de sidérophores, ACC désaminase et hormones végétales. Parmi ces hormones, il y a les auxines, abscisines, éthylène et gibbérellines, qui sont importants pour la croissance des plantes ainsi qu'à leur développement et résistance au stress biotique et abiotique (BALDANI *et al.*, 1986 ; BARRAQUIO *et al.*, 1997 ; MALINOWSKI *et al.*, 1999 ; ZOU *et al.*, 1999 ; MALINOWSKI et BELESKY, 2000 ; BODDEY *et al.*, 2003 ; LOIRET *et al.*, 2004, SANDHIYA *et al.*, 2005 ; FIRAKOVA *et al.*, 2007).

D'autre part, ces mycoendophytes peuvent améliorer la croissance d'une plante en produisant des phytohormones, sans faciliter l'absorption des nutriments de l'hôte ou stimuler le métabolisme. Ces champignons peuvent augmenter la biomasse en produisant des hormones de croissance ou en induisant la production des hormones de l'hôte (PETRINI,

1991 ; SCHULZ et BOYLE, 2005 ; LI *et al.*, 2012). Selon SELIM *et al.* (2012), l'utilisation d'extraits de cultures fongiques d'endophytes pour améliorer la croissance des plantes, indiquent que les agents solubles dans ces extraits de culture peuvent stimuler la croissance de l'hôte de manière similaire aux champignons en croissance active, ce qui prouve que les champignons endophytes produisent des phytohormones *in vitro* ainsi qu'*in vivo*.

D'après SURYANARAYAN *et al.* (2012), le mode d'absorption et de nutrition chez les champignons ont conduit à l'évolution et à la sécrétion d'une batterie d'enzymes qui catabolisent des complexes de polymères organiques dans l'environnement en petits constituants, absorbés ensuite par leurs cellules pour le métabolisme.

D'après PRASAD *et al.* (2008), les plantules régénérées de tabac soumis à deux techniques de durcissements biologiques différents ont montré 88-94% de survie lorsqu'elles sont inoculées avec un endophyte racinaire comme *Piriformospora indica*, mais seulement 62% de survie chez les témoins non inoculés. Ainsi, *P. indica* améliore la croissance des plantes et la survie par un impact positif sur l'état nutritionnel et de l'eau de la plante. Il augmente le potentiel de reproduction, améliore les performances de la racine et fournit une défense naturelle contre les envahisseurs, y compris les parasites et les pathogènes. En effet, l'amélioration de la nutrition et de la croissance peuvent avoir des effets positifs indirects sur les autres fonctions bien connues, comme une plus grande tolérance au stress ou la résistance à des agents pathogènes chez les plantes (SCHULZ et BOYLE, 2005).

1.2.6.2. Rôle dans la tolérance au stress

En plus de l'approvisionnement en éléments nutritifs et minéraux, les mycoendophytes peuvent améliorer aussi la tolérance aux stress abiotiques et biotiques. Ils peuvent ainsi aider les plantes hôtes à tolérer et à résister au stress de l'environnement tels que la sécheresse, les sels et les températures élevées (POTER *et al.*, 1979 ; WEST, 1994 ; MALINOWSKI et BELESKY, 2000). Dans la plante herbacée *Dichanthelium lanuginosum*, qui vit dans les régions où les températures du sol peuvent atteindre 57°C, la présence des champignons endophytes peut améliorer les conditions physiques des plantes. Avec un champignon endophyte comme *Curvularia sp.* la plante a mieux survécu à la température élevée du sol et au stress hydrique que les plantes indemnes de ces champignons (REDMAN *et al.*, 2002). Lorsque *Curvularia* qui est un mycoendophyte occupe une localisation foliaire, il confère à l'herbe *Dichanthelium* une adaptation à la chaleur extrême (REDMAN *et al.*, 2002).

WALLER *et al.* (2005) ont signalé le potentiel de *Piriformospora indica* à induire une tolérance au stress salin chez l'orge. L'effet bénéfique sur l'état de défense a été détecté dans les feuilles distales, ce qui démontre une induction de la tolérance systémique et de la résistance par un champignon endophyte racinaire. Cette alternance de manière systémique a été associée à une augmentation de la capacité antioxydante, due à une activation du cycle de glutathionascorbate qui se traduit par une augmentation globale du rendement en grain. Par conséquent, ces symbioses sont d'une grande importance, car elles pourraient aider les plantes à mieux s'adapter au changement climatique (RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Les champignons endophytes des Graminées fourragères augmentent de manière significative la tolérance à la sécheresse de ces espèces (CLAY et SCHARDL, 2002). La teneur en eau des Graminées associées à des endophytes était plus élevée que celle des Graminées dépourvues d'endophytes (BUCK *et al.*, 1997; ELBERSEN et WEST, 1996). Ce phénomène peut s'expliquer par l'accumulation accrue de solutés dans les tissus des plantes infectées par les endophytes par rapport aux autres, ou par la réduction de la conductance foliaire et un ralentissement du flux de transpiration (MALINOWSKI et BELESKY, 2000), ou encore par la limitation de la germination des graines pour réduire le risque de la mort de la plantules (GUNDEL *et al.*, 2006). De même pour la teneur en aluminium du sol, *Festuca spp.* infectée par les endophytes a démontré une plus grande tolérance à l'aluminium et une plus grande croissance par rapport à la plante non infectée (LIU *et al.*, 1996; ZAUROV *et al.*, 2001).

Les conditions climatiques à la surface des feuilles variant rapidement en fonction des cycles jour/nuit et des épisodes de pluie, on peut s'attendre à ce que le changement climatique ait un effet sur les communautés microbiennes de la phyllosphère. La température et l'humidité superficielle sont des paramètres environnementaux qui déterminent le taux de croissance, la germination, et les paramètres de colonisation. Cependant, les niveaux de température et d'humidité présentent souvent de forts changements, même à l'intérieur de courts cycles jour-nuit, limitant ainsi la fréquence des conditions appropriées pour l'infection des tissus végétaux (MONTESINOS *et al.*, 2002).

1.2.6.3. Rôle dans la résistance contre les pathogènes et les herbivores

Les champignons endophytes peuvent protéger leurs plantes hôtes des agents pathogènes et de parasites (ARNOLD *et al.*, 2003, AKELLO *et al.*, 2007). Les mycoendophytes peuvent réduire la pression des herbivores, en produisant des alcaloïdes toxiques pour les insectes et les vertébrés (SCHARDL, 2001).

Il y a au moins trois principaux mécanismes par lesquels les endophytes peuvent améliorer la résistance de l'hôte aux agents pathogènes (MANDYAM et JUMPPONEN, 2005).

- Le premier mécanisme est basé sur la concurrence entre endophyte et l'agent pathogène sur les mêmes ressources. Ceci est observé par exemple chez *Fusarium oxysporum*. Un endophyte non pathogène *F. oxysporum* Fo47 inhibe le pathogène *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* et réduit la pourriture des racines de la tomate (BOLWERK *et al.*, 2005).
- Le deuxième mécanisme permettant de lutter contre les pathogènes peut être lié à l'effet des endophytes sur la plante hôte pour produire des phytoalexines et/ou des composés biocides ou de sa capacité de produire lui-même des fumigants et d'autres agents antimicrobiens. C'est le cas de *Spilanthes calva* lorsqu'il est inoculé avec *Piriformospora indica*, il produit une gamme de composés antifongiques. Les plantes inoculées avec *P. indica* produisent des extraits qui étaient inhibiteurs des agents pathogènes transmis par le sol (*Fusarium oxysporum* et *Trichophyton mentagrophytes*) (RAI *et al.*, 2002). La capacité des champignons endophytes à repousser les insectes et même à augmenter leurs taux de mortalité est corrélée avec leurs capacité de produire des toxines, par exemple *Acremonium lolii*, un endophyte de *Lolium perenne*, produit une forte toxine lolitrem B qui provoque la réduction des attaques d'insectes, il y a aussi les toxines N-formilonine et paxiline produites par *Neotyphodium* sp. un endophyte de *Echinopogon ovatus*, qui tue le charançon *Listronotus bonariensis* et d'autres insectes (MILES *et al.*, 1998).
- Le troisième mécanisme possible est d'améliorer la résistance à des agents pathogènes de l'hôte, par induction de réponses de défense de l'hôte par des endophytes localisés. Ce mécanisme est souvent rencontré dans les systèmes mycorhiziens. Des modifications structurelles et l'induction de la signalisation de la défense peuvent de même résulter de la colonisation par les endophytes (KOIDE et SCHREINER, 1992 ; GIANINAZZI *et al.*, 1996). Un endophyte associé aux racines non identifié appelé LtVB3 limite la propagation de *Verticillium longissima* chez *Brassica campestris* en

formant des barrières mécaniques, par appositions de la paroi cellulaire et épaissements (NARISAWA *et al.*, 2004). En conséquence, les symptômes des pathogènes externes et internes ont été réduits de plus de 80%.

1.2.6.4. Rôle dans l'environnement

Les mycoendophytes jouent un rôle important au niveau écologique, dans le but de diminuer l'ampleur de la dégradation de l'environnement, la perte de la biodiversité, la détérioration des terres et de l'eau causée par l'utilisation excessive des insecticides organiques toxiques, eaux usées industrielles et des gaz toxiques. La lutte biologique en utilisant ces endophytes s'est révélée comme une nouvelle méthode efficace, largement utilisée dans l'assainissement de l'environnement (GUO *et al.*, 2008). Les champignons endophytes peuvent jouer un rôle direct ou indirect dans le processus de phytoremédiation et la dégradation des toxines environnementales. Indirectement par l'amélioration de la croissance des plantes ayant la capacité de phytoremédiation ou directement par la dégradation et/ou l'accumulation de polluants. VAN AKEN *et al.* (2004) ont rapporté qu'un endophytes *Methylobac-Corynebacterium sp populum. nov*, la souche BJ001 a été impliquée dans la dégradation des composés énergétiques tels que le 2,4,6-trinitrotoluène, hexa-hydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, hexa-hydro-1 et 3,5-trimtro-1,3,5-triazine. DAI *et al.* (2010) ont montré que l'endophyte *Ceratobasidium stevensii* pourrait dégrader le phénanthrène, hydrocarbure aromatique polycyclique, mettant ainsi en évidence une nouvelle application pour la bioremédiation des champignons endophytes (SURYANARAYAN *et al.*, 2012).

Certains endophytes ont montré une mobilisation des métaux lourds par sécrétion d'acides organiques de faible masse moléculaire. Ils jouent un rôle clé dans l'adaptation de la plante hôte aux environnements pollués et peuvent améliorer la phytoremédiation en mobilisant, dégradant ou immobilisant les contaminants dans le sol, favorisant l'amélioration de la tolérance aux métaux par les plantes (GERMAINE *et al.*, 2009 ; LI *et al.*, 2012).

1.2.6.5. Applications biotechnologiques des mycoendophytes

Les mycoendophytes ont une grande capacité à produire un arsenal enzymatique qui pourrait être utilisé dans diverses applications biotechnologiques telles que les applications environnementales des enzymes de dégradation, les applications médicales ainsi que les biotransformations des composés organiques (FIRAKOVA *et al.*, 2007, PIMENTEL *et al.*, 2011, SURYANARAYANAN *et al.*, 2012).

Les champignons endophytes produisent habituellement les enzymes nécessaires pour la colonisation des tissus végétaux. Il a été démontré que la plupart des endophytes sont capables d'utiliser au moins *in vitro* plus de nutriments végétaux et de composants cellulaires. La plupart de ces endophytes étudiés utilisent le xylane et la pectine, montrent une activité lipolytique et produisent des peroxydases, des laccases, des chitinases et des glucanases (SIEBER *et al.*, 1991; LEUCHTMANN *et al.*, 1992 ; MOY *et al.*, 2002 ; LI *et al.*, 2004).

Selon STAMFORD *et al.*, (2002), les enzymes thermostables amylolytiques sont intéressantes pour l'amélioration des processus industriels de dégradation de l'amidon. *Streptosporangium sp.* un actinomycète endophyte isolé à partir de feuilles de maïs (*Zea mays* L.) est capable de produire une glucoamylase possédant des propriétés thermostables. KUMARESAN *et al.* (2002), en utilisant des tests qualitatifs de dépistage sur gélose, ont constaté que la plupart des champignons endophytes foliaires des arbres de différentes forêts de la chaîne de montagnes des Ghâts occidentaux (Inde du Sud) ont produit des enzymes extracellulaires telles que des amylases, des cellulases, des chitinases, des chitosonases, des laccases, des lipases, des protéases et des pectinases. Cette polyvalence constitue le fondement que les enzymes des champignons endophytes seront probablement utilisées dans de nombreuses applications y compris dans les domaines de la santé, la production alimentaire, l'énergie ainsi que l'environnement.

Selon BORGES *et al.* (2009) et BARTH *et al.* (2010), il n'est peut-être pas surprenant que ces endophytes catalysent la biotransformation d'une variété de molécules. Par exemple, les endophytes isolés d'*Aphelandra tetragona* biotransforment les molécules de phytoanticipines en nouveaux métabolites par une acylation, une oxydation, une réduction, une hydrolyse et des réactions de nitration (ZIKMUNDOVA *et al.*, 2002). Ces champignons endophytes sont capables de transformer des métabolites secondaires en des produits similaires à ceux qui sont formés par le métabolisme de phase I des xénobiotiques dans le foie chez les mammifères (SURYANARAYANAN *et al.*, 2012).

1.2.6.6. Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs

Les métabolites secondaires sont définis comme des composés de bas poids moléculaire, qui ne sont pas nécessaires pour la croissance en culture pure, sont produits comme une adaptation pour des fonctions spécifiques dans la nature. Ils jouent un rôle vital *in vivo* : comme exemple, les nombreuses interactions métaboliques entre les champignons et leurs plantes hôtes, comme la signalisation, la défense et la symbiose (SCHULZ et BOYLE, 2005).

D'après TENGURIA *et al.* (2011), les champignons endophytes sont la source de produits naturels et dans l'optimisation de la recherche de ces nouveaux métabolites secondaires bioactifs ; il est pertinent de considérer que:

1. les métabolites secondaires synthétisés par un champignon peuvent correspondre avec son environnement écologique ;
2. les interactions métaboliques continues entre les champignons et les plantes hôtes peuvent augmenter la synthèse de ces métabolites secondaires.

Le nombre de médicaments produits par les mycoendophytes est important par rapport à celui des bactéries endophytes. Les produits naturels de ces champignons endophytes peuvent être regroupés en plusieurs catégories : les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpénoïdes, les isocoumarines, les quinones, les phénylpropanoïdes, les lignanes, les phénols, les acides phénoliques et les lactones aliphatiques, etc... Ces champignons sont capables de fournir de nouveaux métabolites secondaires ayant des activités biologiques utiles. Beaucoup de principes actifs ont été isolés et caractérisés à partir de ces endophytes et possédant diverses activités biologiques, parmi elles l'activité anticancéreuse, antioxydante, antifongique, antibactérienne, antivirale et anti-immunitaire, qui sont résumées dans le tableau II (RAI *et al.*, 2012).

Selon STROBEL (2003), si une source microbienne d'un médicament était disponible, ceci pourrait contribuer à limiter l'utilisation des plantes médicinales et à préserver celles qui sont rares. Le prix du médicament devrait également être réduit, étant donné que ces molécules peuvent être produites par fermentation de la même manière que la pénicilline. L'exemple du taxol, molécule anticancéreuse est également produit par un certain nombre de mycoendophytes, tels que *Phyllosticta spinarum*, *Robillardoides bartalinia*, *Pestalotiopsis terminaliae*, *Botryodiplodia theobromae*. En outre, d'autres genres communs comme *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium* et *Mucor* ont été rapportés en tant que producteurs de taxol (GANGADEVI et MUTHUMARY, 2008 ; KUMARAN *et al.*, 2008 ; GANGADEVI et MUTHUMARY, 2009 ; PANDI *et al.*, 2010 ; ZHAO *et al.*, 2010).

Tableau II : Mycoendophytes isolés de différentes plantes médicinales et leurs activités biologiques (RAI *et al.*, 2012).

Champignon endophyte	Hôtes	Utilisation de la plante en médecine traditionnelle	localisation	Bio-activités	Références
<i>Cylindrocarpon sp.</i> , <i>Phoma sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	<i>Saussurea involucrata</i>	Polyarthrite rhumatoïde, toux et mal de ventre	Asie et Europe	antimicrobienne	YA-LI <i>et al.</i> (2010)
<i>Fusarium solani</i>	<i>Apodytes dimidiata</i> (poire blanche)	Parasites intestinaux et inflammation de l'oreille	Afrique du sud	Anticancéreuse	SHWETA <i>et al.</i> (2010)
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	cancer	Amérique du nord	Anticancéreuse, cancer des poumons	WIYAKRUTTA <i>et al.</i> (2004)
<i>Penicillium crysogenum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Catharanthus roseus</i> (sadabahar).	Coagulation du sang et diabète.	Inde	Anticancéreuse	KHARWAR <i>et al.</i> (2008)
<i>Phoma medicaginis</i>	<i>Medicago sp.</i>	Tractus digestif et reins.	Italie	antimicrobienne	WEBER <i>et al.</i> (2004)
<i>Phoma sp.</i>	<i>Fagonia cretica</i> (dhamisha).	Fièvre, vomissements, la dysenterie, typhoïde, maux de dents, troubles d'estomac et maladie de la peau.	Alicante (Espagne)	Antifongique et algicide.	KROHN <i>et al.</i> (2007)
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Paris polyphylla</i> (satuwa).	Morsures de serpents venimeux, furoncles, maux de têtes et ulcère.	Chine	antibactérienne	ZHAO <i>et al.</i> (2010b)

1.3. Matériel et méthodes

1.3.1. Zone d'étude

1.3.1.1. Description de la zone d'étude

La région de Laghouat est éloignée de la capitale Alger de 400 Km, sur la latitude Nord de 33° 48', la longitude Est de 02°35', avec une altitude de 752 m. Elle s'étale sur une superficie de 25052 Km² (ANONYME 1, 1998). Elle est limitée géographiquement : au nord et à l'est par la wilaya de Djelfa, à l'ouest par les wilayas de Tiaret et El Bayadh et au sud par la wilaya de Ghardaïa (Figure 10). La wilaya de Laghouat est constituée de trois zones sur le plan naturel, à savoir une zone nord constituée par les Hautes Plaines Steppiques agropastorales, de superficie totale égale à 464.500 ha, une zone centrale de piémonts et

montagnes agrosylvopastorale, ainsi qu'une zone du plateau saharien au sud de la wilaya (ANONYME 2, 2010).



Figure 10 : Situation géographique de la zone d'étude (Laghouat, Algérie)
(Google Earth, 2014).

Au cœur du pays des dayas, dans la partie méridionale de la wilaya de Laghouat, se localise notre zone d'étude. Dayate Aiat se localise à 50 km du chef-lieu de la wilaya, dans la région de Timzerth. Ces coordonnées GPS sont 33°31N pour la latitude, 2°56E pour la longitude. Elle se trouve à 871 m d'altitude (LIMANE et *al.*, 2014).

1.3.1.2. Bioclimat de la zone d'étude

Pour caractériser le climat d'une région donnée, pluviosité et température sont les principaux paramètres pris en considération, car les plus disponibles des paramètres météorologiques, mais aussi au vu de l'importante influence qu'ils exercent sur la distribution de la végétation ainsi que l'interaction de cette dernière avec le sol.

La zone d'échantillonnage étudiée est dépourvue de station météorologique. Nous avons donc utilisé les données thermiques et pluviométriques de la station de Hassi R'mel qui a été mise en place en 1994. Elle est située à 764 m d'altitude, à une latitude de 32° 56' N et une longitude de 03° 18' E, et ceci pour une période de dix ans (2002-2012), recueillis par l'Office National de la Météorologie (O.N.M) d'Alger.

Sur le plan bioclimatique, la zone d'étude se situe dans l'étage aride, avec une saison sèche de 11 mois par an (LIMANE et *al.*, 2014). Le diagramme ombrothermique de

BAGNOULS et GAUSSEN montre que la période sèche dure toute l'année (Figure 11). La zonation éoclimatique de LE HOUEROU (1995) concerne spécialement les régions d'Afrique du Nord. Elle consiste à tracer un diagramme qui porte sur les ordonnées le quotient pluvio-évapotranspiratoire (P/ETP_p)³ et sur les abscisses les moyennes des températures minimales du mois le plus froid. Le croisement de ces deux variables donne l'étagement bioclimatique de la région étudiée.

Les données nécessaires pour la zonation éoclimatique selon la méthode de LE HOUEROU (1995) sont données dans le tableau III.

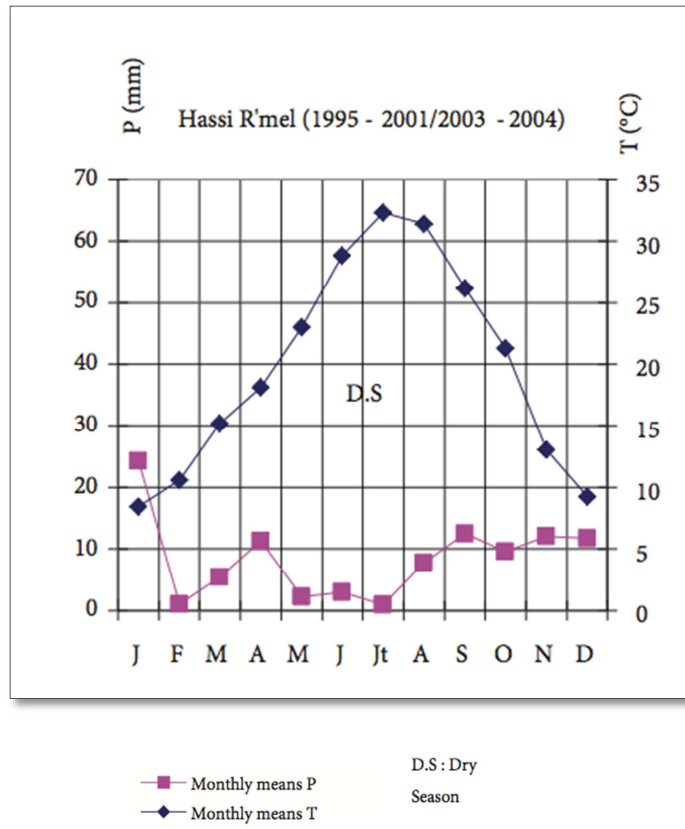


Figure 11 : Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen pour la station d'étude (Source LIMANE *et al.*, 2014).

Tableau III: Données et variables calculées utilisés dans la classification éoclimatique de LE HOUEROU (1995) de la station d'étude (BOUBRIMA, 2014).

Station étudiée	Altitude (m)	P (mm)	M	m	$\frac{M+m}{2}$	$ETP_p \left[\frac{(M+m)}{2} \times 68, 64 \text{ (mm)} \right]$	$\frac{P}{ETP_p}$	$(\frac{P}{ETP_p}) \times 100$	Classification
Laghouat	777	181,42	40,89	2,03	21,46	1473	0,12	12	Aride inférieur à hiver frais

ETP correspond à l'évapotranspiration calculée à partir de la formule de PENMAN :
$$ETP = [(M+m)/2] \times 68,64$$
 (LE HOUEROU, 1995).

L'analyse du climat à travers ses différentes composantes sur une période allant de 2002 à 2012 (Tableau I) a révélé que notre daya se place dans l'étage bioclimatique aride inférieur à hiver frais.

1.3.2. Echantillonnage sur le terrain

Les feuilles de *Peganum harmala* ont été fraîchement récoltées sur dix sujets sains au mois d'Avril 2015 de manière aléatoire. L'échantillonnage a été effectué à dayate Aiat, région de Timzerth, wilaya de Laghouat (Algérie). Les échantillons ont été placés dans des enveloppes et conservés dans des glacières jusqu'à leur utilisation rapide au laboratoire. Les feuilles ont été partagées en deux lots, certaines à colorer afin de mettre en évidence la présence des mycoendophytes, d'autres à mettre en culture pour l'isolement des champignons endophytes et épiphytes.

1.3.3. Matériel, produits chimiques et milieux de cultures

Matériel : boîtes de Pétri, Bec Bunsen, lames à Bistouri, cristallisoirs, lames, lamelles, microscope optique, étuve, balance de précision.

Produits chimiques : éthanol 95%, eau javel, eau distillée stérilisée, chloramphénicol, glucose, Agar- Agar, Bleu Trypan, KOH (10%), H₂O₂ (10%), acide lactique (10%).

Milieux de culture : PDA (Potatos Dextrose Agar), PDB (Potatos Dextrose Broth) (Annexe 1).

1.3.4. Coloration des feuilles et mise en évidence des mycoendophytes foliaires

La coloration des feuilles de *Peganum harmala* a été réalisée selon le protocole de PHILLIPS et HAYMAN (1970).

- Mettre des feuilles dans du KOH (10%), à l'étuve pendant 30 min (2 X 15 min) à 90°C, remplacer la solution de KOH lorsqu'elle est foncée.
- Rinçage à l'eau courante.
- Mettre les feuilles dans du H₂O₂ (10 %), à l'étuve pendant 5 min à 90 °C.
- Rinçage à l'eau courante.
- Neutraliser les feuilles dans un bain d'acide lactique (10%) pendant 3 à 4 min.
- Rinçage à l'eau courante.

- Mettre les feuilles dans du Bleu Trypan, à l'étuve (90°C) pendant 2 heures (ou toute une nuit).
- Rinçage à l'eau courante.
- Mettre dans du glycérol pour la conservation.
- Après coloration, mettre les feuilles entre lames et lamelles, observer au microscope optique à différents grossissements.

1.3.5. Isolement et mise en culture

1.3.5.1. Préparation du milieu PDA

- 200g de pomme de terre en tranches + 200ml d'eau distillée.
- Mettre à cuire pendant 15 à 20 min, ensuite on filtre.
- Le filtrat est récupéré et mis dans un erlen meyer à agiter en chauffant.
- On rajoute 20g de glucose, 20g d'Agar-Agar et on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée (Annexe 1). Le mélange est retiré de la plaque chauffante lorsqu'il est homogène et clair.
- On autoclave le milieu de culture à 120°C pendant 20 min, on rajoute quelques mg de chloramphénicol.
- On laisse refroidir et on coule les boîtes de Pétri entre deux Bec Bunsen, avec respect des conditions d'aseptie.

1.3.5.2. Isolement et mise en culture des épiphytes

Les champignons épiphytes ont été isolés suivant le protocole de PUSZ *et al.* (2015) avec quelques modifications. Les sujets échantillonnés ne présentant aucun symptôme de maladie. Cinq feuilles ont été détachées de chaque sujet. Ces dernières sont placées dans des flacons de 20 ml, contenant 10 ml d'eau distillée stérilisée. Les flacons sont mis à centrifuger pendant 10 min à 4250 tours par minute (6X550g). 1ml du surnageant obtenu a étéensemencé pour chacun des dix sujets dans trois boîtes de Pétri (trois répétitions par sujet). Ces dernières sont préalablement coulées avec du PDA contenant du chloramphénicol, afin d'éviter toute contamination bactérienne et incubés à l'obscurité et à température ambiante.

1.3.5.3. Stérilisation superficielle et mise en culture des champignons endophytes

La stérilisation superficielle a été réalisée selon le protocole de SCHULZ *et al.* (1993), afin d'éliminer les organismes épiphytes qui demeurent au niveau du phylloplan. Des folioles sont détachées et lavées à l'eau courante, afin d'éliminer les poussières et les débris. Chaque échantillon est traité avec de l'éthanol 95% pendant 2 min, suivi d'un traitement à l'eau

javellisée pendant 3 min, puis un deuxième traitement à l'éthanol 95% pendant 30 sec. Entre ces trois traitements, on procède à un rinçage à l'eau distillée stérilisée. On sèche les feuilles avec du papier buvard stérilisé. On coupe à l'aide d'une lame à bistouri stérilisée des fragments qu'on ensemence sur PDA. Quinze feuilles par sujet sont ensemencées sur PDA additionné de Chloramphénicol, pour éviter la prolifération intempestive de bactéries, incubés à l'obscurité et à température ambiante.

1.3.6. Identification macroscopique et microscopiques des souches fongiques

Après incubation (7 jours à l'obscurité, température ambiante), on procède à l'isolement et l'identification microscopique des genres fongiques. L'identification des champignons a été réalisée à partir des observations macroscopiques et microscopiques, à savoir la morphologie des hyphes, présence ou absence de septations, forme et regroupement des conidies et spores (solitaires, chaîne, bouquet...), ainsi que les caractères morphoculturels sur PDA (contours, couleur, relief, transparence, aspect de la surface et taille) (ELLIS, 1971 ; WATANABE, 2002 ; DOMSCH *et al.*, 2007 et SAMSON *et al.*, 2010).

1.3.7. Etude statistique

- La fréquence de colonisation FC (%) est calculée selon la formule suivante :

$$\text{FC}(\%) = \text{Nombre de fragments colonisés} / \text{Nombre total de fragments} \times 100$$

Des histogrammes concernant les différences de fréquence de colonisation selon les sujets échantillonnés ont été tracés. Une analyse statistique de type ANOVA a été réalisée afin de mettre en évidence les différences entre les fréquences de colonisations par les mycoendophytes des dix sujets échantillonnés. Un test complémentaire de comparaisons multiples des moyennes (NEWMAN-KEULS) a été réalisé pour classer ces sujets en groupes homogènes, afin de mettre en évidence la fréquence de colonisation par les mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*.

- Afin d'estimer cette diversité fongique, les abondances des différents genres fongiques recensés pour les dix sujets concernant les champignons épiphytes et endophytes ont été calculés suivant cette formule :

$$A(\%) = \frac{N_g}{N_t}$$

A : Abondance des genres,

Ng : Nombre de fois que le genre est recensé chez un sujet,

Nt : Ensemble des répétitions.

- La diversité fongique est estimée par l'indice de Shannon qui est calculé avec la formule suivante (MAGURRAN, 1988) :

$$H = - \sum \frac{x_i}{x_0} \ln \frac{x_i}{x_0}$$

x_i : est le nombre total d'isolats spécifiques,

x_0 est le nombre total de tous les isolats.

L'indice de Shannon a été calculé pour chacun des dix sujets épiphytes et endophytes.

- Pour déterminer la similarité entre les communautés fongiques épiphytique et endophytique pour les différents sujets récoltés, le quotient de similarité (QS) de Sorensen a été utilisé et calculé par la formule suivante (KREBS, 1999) :

$$QS = \frac{2a}{2a+b+c}$$

a : nombre d'espèces communes à la surface (épiphyte) et intérieur des feuilles (endophyte),

b : nombre d'espèces propres à la surface des feuilles,

c : nombre d'espèces unique à l'intérieur des feuilles.

Une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée, afin d'estimer la diversité des communautés fongiques chez les différents sujets (Microsoft Excel 2010). Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée entre ces communautés fongiques endophytiques et épiphytiques des différents sujets échantillonnés, en vue de mettre en évidence la distribution spatiale des différents genres fongiques en fonction des sujets échantillonnés (logiciel Stat Box 6.40).

1.4. Résultats et discussion

1.4.1. Résultats

1.4.1.1. Champignons épiphytes

Après deux mois d'incubation des fragments de feuilles de *Peganum harmala*, les fréquences de colonisation des dix sujets sont de 100% pour toutes les boîtes de Pétri. De ce fait, l'analyse statistique type ANOVA n'a indiqué aucune différence significative entre les fréquences de colonisations des sujets recensés. Nous avons procédé à l'identification des différents taxons de champignons épiphytes. 15 genres d'épiphytes ont été identifiés. Les résultats obtenus montrent une abondance des genres *Penicillium* et *Rhizopus*. Les genres *Mycoclados*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Phoma*, *Colletotricum* et *Epicoccum* existent aussi comme épiphytes. Le genre *Penicillium* domine avec (14,66%), suivi de *Rhizopus* (13,33%) et *Alternaria* (11,99%). *Mycoclados*, *Phoma*, *Rhizoctonia* et *Colletotricum* (0,66%) sont les moins abondants des épiphytes foliaires de *Peganum harmala* (Figure 12 et 13 Tableau IV).

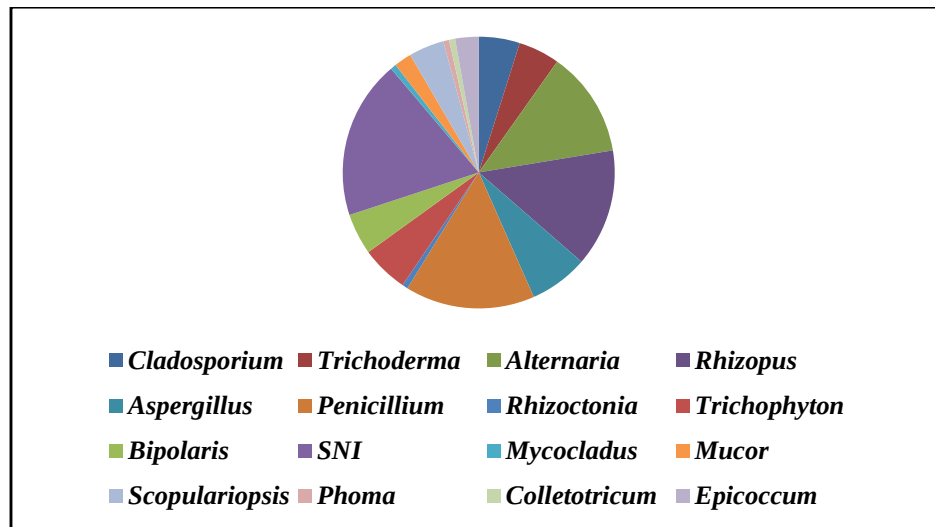


Figure 12: Abondances des genres épiphytes des feuilles de *Peganum harmala*.

Tableau IV : Abondances des genres fongiques des épiphytes foliaires de *Peganum harmala* de Dayate Aiat (Laghoutat)

Genre de champignon	Abondance (%)	Phylum	Ordre	Famille
<i>Alternaria</i>	11,99	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Aspergillus</i>	6,66	Ascomycota	Eurotiales	Trichocomaceae
<i>Bipolaris</i>	4,66	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Cladosporium</i>	4,66	Ascomycota	Capnodiales	Davidiellaceae
<i>Colletotricum</i>	0,66	Ascomycota	Glomerellales	Glomerellaceae
<i>Epicoccum</i>	2,66	Ascomycota	Pléosporales	Leptosphaeriaceae
<i>Mucor</i>	1,99	Zygomycota	Mucorales	Mucoracées
<i>Mycocladius</i>	0,66	Zygomycota	Mucorales	Mycocladales
<i>Penicillium</i>	14,66	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Phoma</i>	0,66	Ascomycota	Microascales	Microascaceae
<i>Rhizoctonia</i>	0,66	Basidiomycota	Cantharellales	Ceratobasidiaceae
<i>Rhizopus</i>	13,33	Zygomycota	Mucorales	Mucoracées
<i>Scopulariopsis</i>	3,99	Ascomycota	Microascales	Microascaceae
<i>Trichoderma</i>	4,66	Ascomycota	Hypocreales	Hypocreaceae
<i>Trichophyton</i>	5,33	Ascomycota	Onygenales	Arthrodermataceae
<i>SNI</i>	17,99	/	/	/

SNI : Structure non identifiée

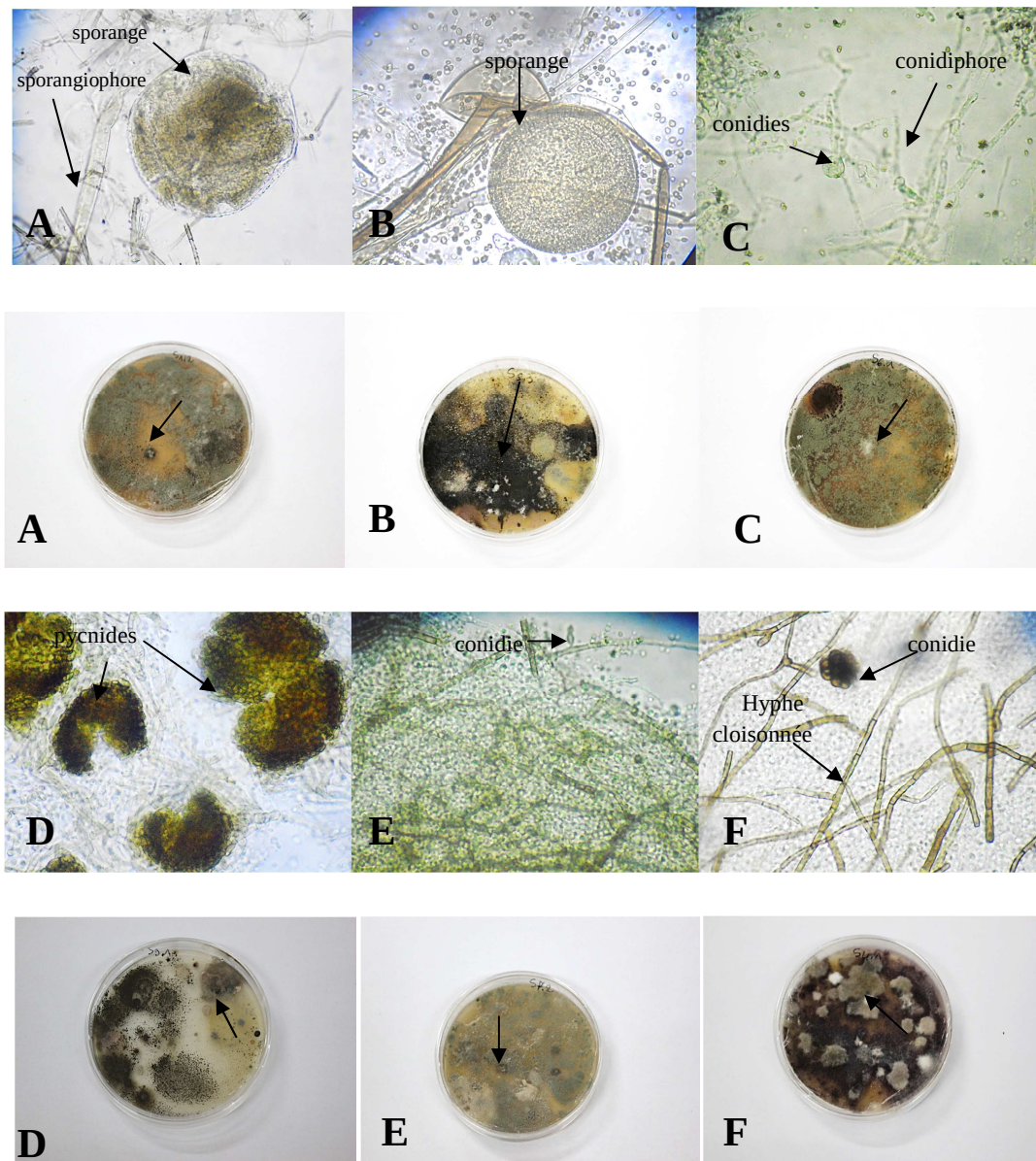


Figure 13 : Genres fongiques existant comme épiphytes foliaires chez *Peganum harmala* sous microscope optique (X1440) ainsi que les colonies fongiques sur milieu PDA.

A : *Mycocladus*, **B :** *Mucor*, **C :** *Scopulariopsis*, **D :** *Phoma*, **E :** *Colletotricum*, **F :** *Epicoccum*.

Les champignons épiphytes appartiennent à des phylums différents, à savoir Ascomycota avec 78%, Zygomycota (21%) et Basidiomycota avec 1% (Figure 14).

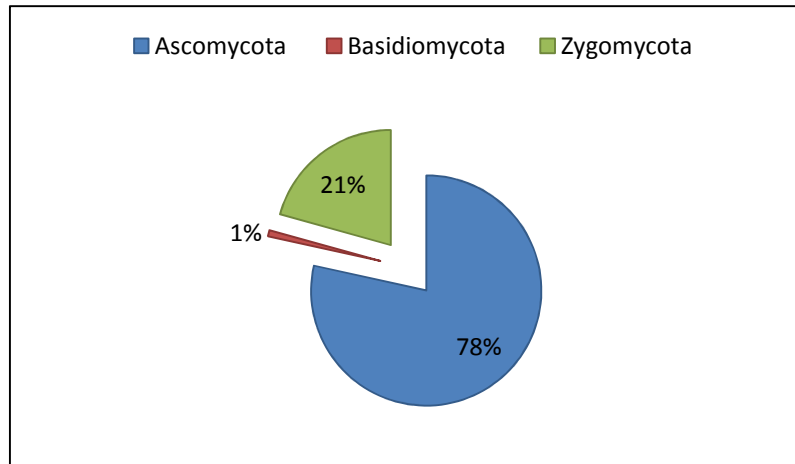


Figure 14 : Composition des épiphytes des feuilles de *Peganum harmala* selon le phylum.

La diversité des champignons épiphytes des feuilles de *Peganum harmala* au niveau des sujets recensés est estimée par l'indice de Shannon. Les résultats sont mentionnés dans le tableau V. L'indice le plus élevé est celui du sujet 10 (2,118) et l'indice le plus faible est relevé chez le sujet 8 (0,995). L'analyse de variance (ANOVA) entre les indices de Shannon des feuilles des différents sujets de *Peganum harmala* n'indique aucune différence significative entre les communautés épiphytiques des feuilles ($p=0,21$).

Tableau V : Diversité des champignons épiphytes chez les feuilles de *Peganum harmala* : indice de diversité Shannon (H)

	Sujets									
Indice de Shannon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	2,059	2,062	1,589	2,046	1,522	1,585	1,876	0,995	1,979	2,118

1.4.1.2. Champignons endophytes

1.4.1.2.1. Mise en évidence des champignons endophytes au niveau des feuilles de *Peganum harmala*

Les observations sous microscope optique des feuilles de *Peganum harmala* colorées au bleu trypan révèlent une colonisation de tous les compartiments de la feuille par les mycoendophytes. Les filaments mycéliens se placent sur l'épiderme et le traverse au niveau des appressoria. Les cellules stomatiques et l'ostiole sont colorés en bleu de par la présence de

mycoendophytes (Figure 15). Les stomates sont nombreux et se répartissent de manière aléatoire au niveau de la surface épidermique.

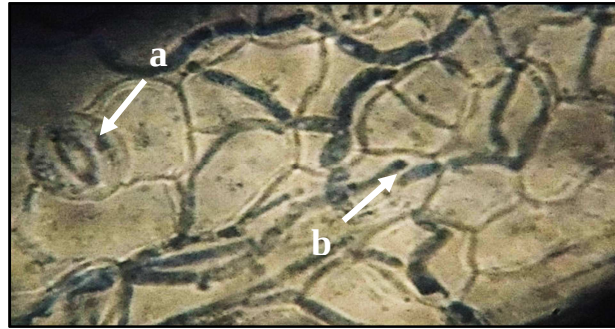
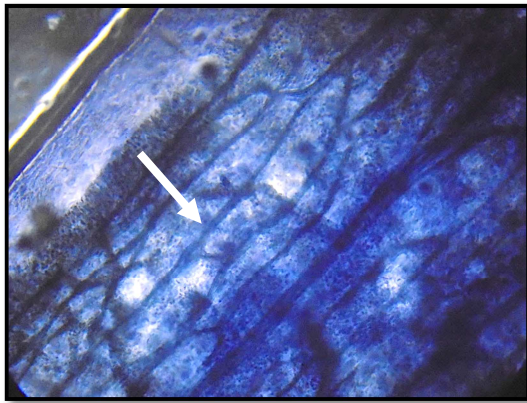
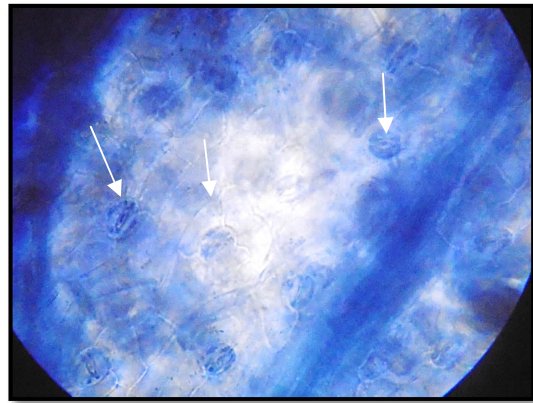


Figure 15 : Observation microscopique de filaments de champignons parcourant la surface foliaire et pénétrant dans les stomates **(a)** et le mésophylle **(b)** (X2000).

Nous observons la présence des hyphes mycéliennes pigmentées au niveau des espaces inter et intracellulaires des feuilles de *Peganum harmala* (Figure 16).



(A)



(B)

Figure 16 : Observation microscopique d'une colonisation inter **(A)** (X220) et intracellulaire **(B)** (X760) des cellules épidermiques et des stomates des feuilles de *Peganum harmala*.

Les observations microscopiques des feuilles montrent l'existence des champignons endophytes à l'intérieur et entre les cellules du parenchyme (Figure 17).

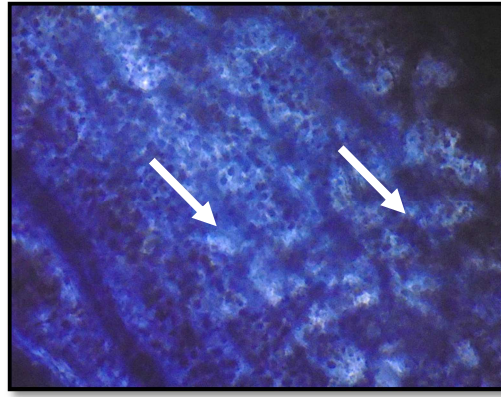


Figure 17 : Observation microscopique des champignons endophytes au niveau du parenchyme palissadique (**X1680**) de *Peganum harmala*.

Les observations microscopiques montrent que les champignons endophytes colonisent aussi les tissus conducteurs. Ces résultats peuvent expliquer la présence d'une forte coloration en bleu de la nervure principale, de certaines nervures secondaires (Figure 18).

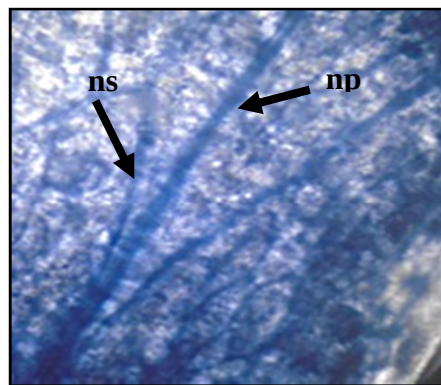


Figure 18: Observation microscopique des nervures principales (**np**) et secondaires (**ns**) des feuilles de *Peganum harmala* colonisées par les champignons endophytes (**X 190**).

Les champignons endophytes colonisent toutes les surfaces des trichomes glandulaires des feuilles de *Peganum harmala* (Figure 19).

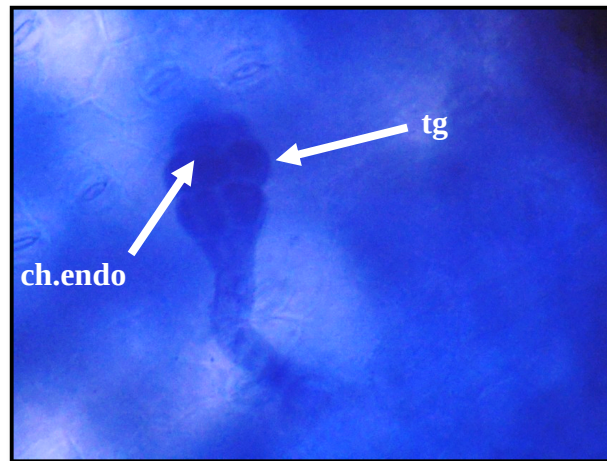


Figure 19: Observation microscopique d'un trichome glandulaire (**tg**) de la feuille de *Peganum harmala* colonisé par les champignons endophytes (**ch.endo**) (X1200).

1.4.1.2.2. Fréquence de colonisation des champignons endophytes au niveau des feuilles de *Peganum harmala*

Les feuilles de *Peganum harmala* mises en culture montrent la présence des mycoendophytes. Les différents sujets recensés présentent une colonisation par ces champignons, avec une moyenne de 39,86%. Les fréquences de colonisation des différents sujets indiquent une divergence de colonisation par les mycoendophytes de ces derniers (Figure 20). La fréquence de colonisation la plus élevée est observée chez le sujet 4 (86,66%), suivi de celle du sujet 8 (66,66%), et la fréquence de colonisation la plus faible est observée chez le sujet 2 (13,33%). L'analyse statistique type ANOVA a révélé une différence hautement significative ($p < 0,01$) entre les fréquences de colonisations des dix sujets échantillonnés (Annexe 2).

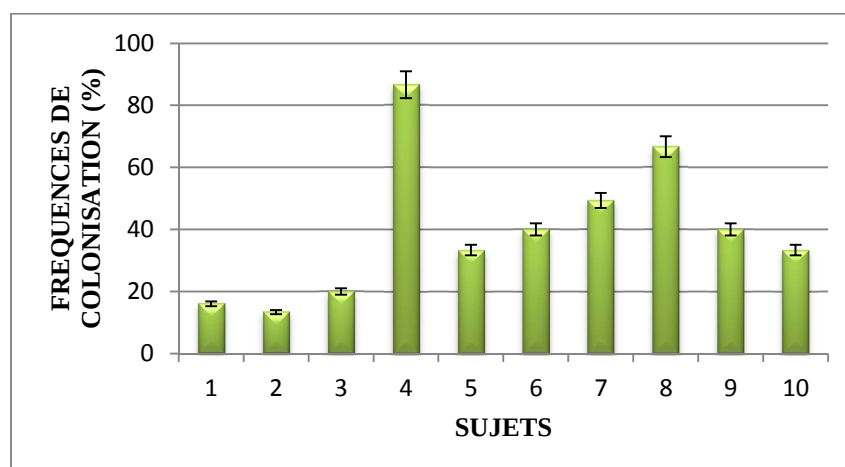


Figure 20: Fréquence de colonisation par les mycoendophytes foliaires des différents sujets échantillonnés de *Peganum harmala*.

Le test complémentaire de comparaisons multiples des moyennes (NEWMAN-KEULS) réalisé a permis de classer les dix sujets recensés en groupes homogènes suivant les moyennes des fréquences de colonisations par les mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*. Il y a eu formation de trois groupes homogènes (A, AB et B). Le groupe A correspond aux sujets 2, 1 et 3 avec des moyennes de 13,33%, 16% et 20% respectivement. Le groupe AB représenté par les sujets 10, 5, 6, 9, 7 et 8, avec des moyennes respectives de 33,33%, 33,33%, 40%, 40%, 49,33% et 66,67%. Enfin le groupe B est réduit au sujet 4 avec une moyenne de 86,67% (Tableau VI).

Tableau VI: Comparaison des moyennes des fréquences de colonisations par les mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* chez les sujets échantillonnés.

Sujets	Groupes	Moyennes %
Sujet 02	A	13,33
Sujet 01	A	16,00
Sujet 03	A	20,00
Sujet 10	AB	33,33
Sujet 05	AB	33,33
Sujet 06	AB	40,00
Sujet 09	AB	40,00
Sujet 07	AB	49,33
Sujet 08	AB	66,67
Sujet 04	B	86,67

1.4.1.2.3. Diversité et abondances des champignons endophytes foliaires de *Peganum harmala*

Plusieurs champignons endophytes ont été isolés. 14 genres de ces champignons ont été identifiés au niveau des feuilles de *Peganum harmala*. Le genre *Cladosporium* (34,63%) est le plus abondant des genres fongiques identifiés, suivi d'*Alternaria* (21,89%) et *Aspergillus* (14,74%). Les genres *Exophiala*, *Aureobasidium*, *Verticillium*, *Paraphaeoherbia* et *Absidia* existent aussi comme mycoendophytes (Figure 21, Tableau VII).

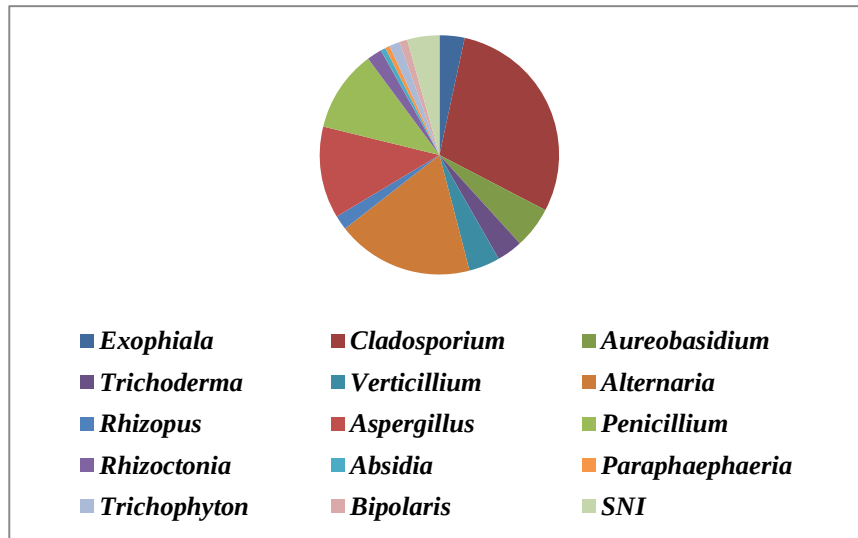


Figure 21: Abondances des genres de mycoendophytes des feuilles de *Peganum harmala*.

Tableau VII : Abondances des genres fongiques des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* de Dayate Aiat (Laghoutat).

Genre de champignon	Abondance (%)	Phylum	Ordre	Famille
<i>Absidia</i>	0,76	Zygomycota	Mucorales	Mucoraceae
<i>Alternaria</i>	21,89	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Aspergillus</i>	14,74	Ascomycota	Eurotiales	Trichocomaceae
<i>Aureobasidium</i>	6,66	Ascomycota	Dothideales	Dothioraceae
<i>Bipolaris</i>	1,25	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Cladosporium</i>	34,63	Ascomycota	Capnodiales	Davidiellaceae
<i>Exophiala</i>	4,03	Ascomycota	Chaetothyriales	Herpotrichiellacées
<i>Paraphaephaeria</i>	0,76	Ascomycota	/	/
<i>Penicillium</i>	13,03	Ascomycota	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Rhizoctonia</i>	2,43	Basidiomycota	Cantharellales	Ceratobasidiacées
<i>Rhizopus</i>	2,31	Zygomycota	Mucorales	Mucoracées
<i>Trichoderma</i>	4,10	Ascomycota	Hypocreales	Hypocreaceae
<i>Trichophyton</i>	1,66	Ascomycota	Onygenales	Arthrodermatacées
<i>Verticillium</i>	4,99	Ascomycota	non défini	Plectosphaerellaceae
<i>SNI</i>	5,16	/	/	/

SNI : Structure Non Identifiée

Les genres *Absidia*, *Paraphaephaeria* (0,769%), *Bipolaris* (1,25%) et *Trichophyton* (1,66%) sont les moins abondants au niveau des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* (Figure 22).

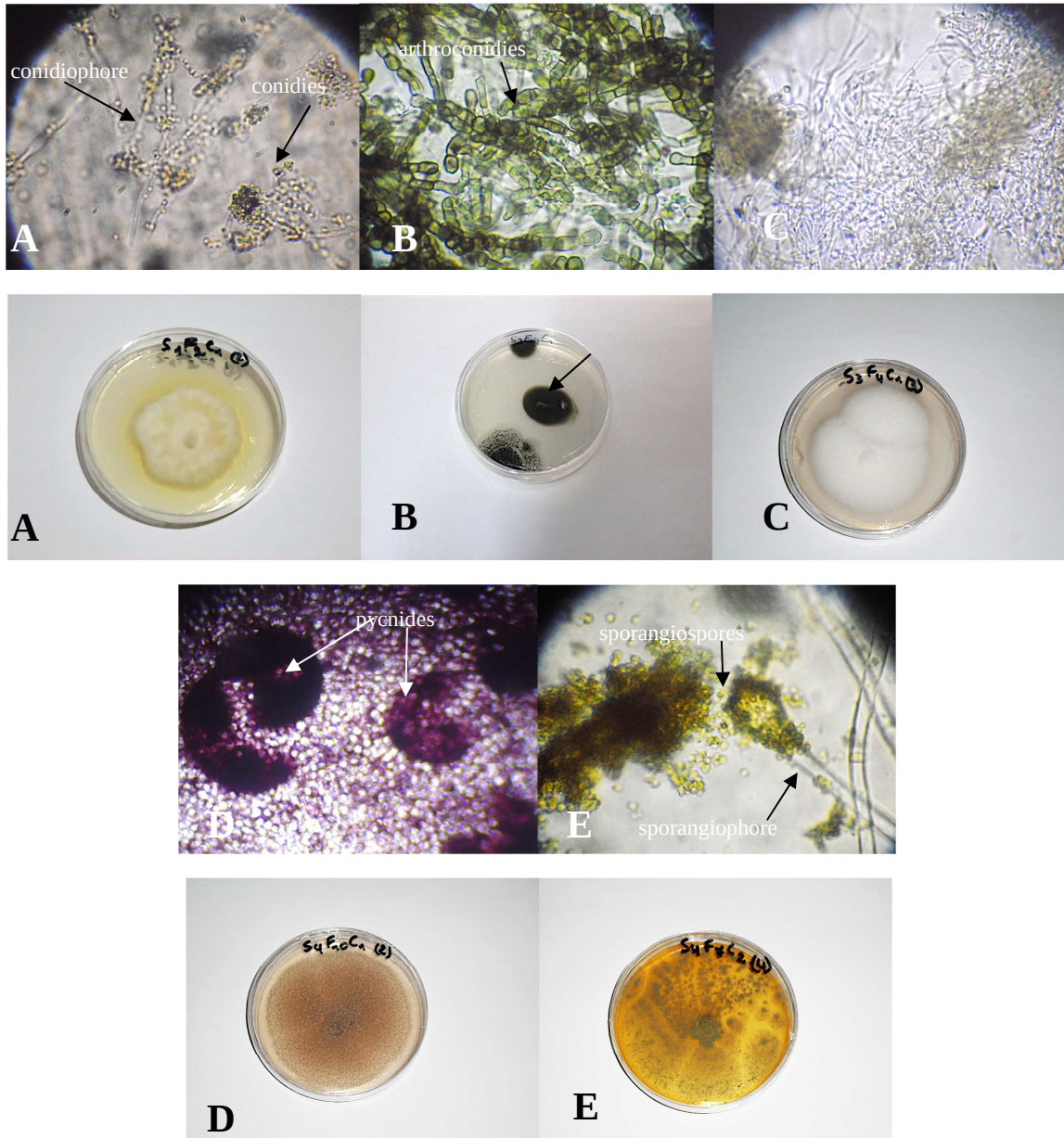


Figure 22 : Les genres fongiques existant comme mycoendophytes foliaires chez *Peganum harmala* (X 2000), ainsi que leurs colonies fongiques purifiées sur milieu PDA.

A: *Exophiala*, **B:** *Aureobasidium*, **C:** *Verticillium*, **D:** *Paraphaephaeria*, **E:** *Absidia*.

Pour les champignons endophytes recensés, 97% appartiennent au phylum des Ascomycota, 2% seulement aux Basidiomycota et 1% aux Zygomycota (Figure 23).

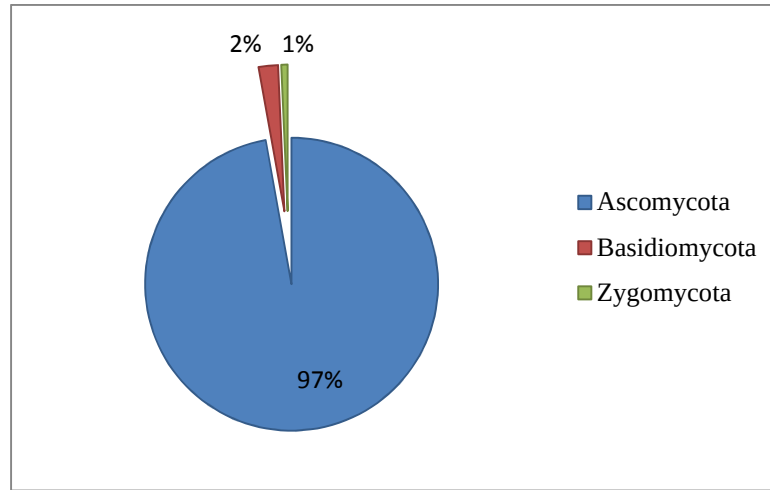


Figure 23: Composition des mycoendophytes des feuilles de *Peganum harmala* selon le Phylum.

La diversité des champignons endophytes des feuilles de *Peganum harmala* au niveau des sujets recensés est estimée par l'indice de Shannon, les résultats sont mentionnés dans le tableau VIII. L'indice le plus élevé est relevé chez le sujet 4 (2,177) et le plus faible est celui du sujet 2 (0). L'analyse de variance (ANOVA) entre les indices de Shannon des feuilles des différents sujets de *Peganum harmala* indique une différence significative entre les communautés endophytiques ($p = 0,05$).

Tableau VIII : Diversité des champignons endophytes chez les feuilles de *Peganum harmala* : indice de diversité Shannon (H).

Indice de Shannon	Sujets									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
H	0,562	0	1,039	2,177	1,277	1,313	1,162	0,926	1,559	0,735

1.4.2. Discussions

Notre étude indique la présence des champignons endophytes au niveau de tous les compartiments foliaires de *Peganum harmala* de dayate Aiat (Timzerth, Laghouat). Nos résultats montrent la présence de ces champignons au niveau des stomates, ceci concorde avec ceux de ZAREB (2014) sur le pistachier de l'Atlas de la même daya, où la présence de mycoendophytes semble importante au niveau des stomates. D'autres auteurs, tels que SUN *et al.* (2011) et EL-NAGERABI *et al.* (2013) ont montré aussi la présence des mêmes structures au niveau des feuilles du jujubier d'Oman (El Jabel El Akhdar).

Nos résultats confirment ceux de SANCHEZ-AZOFEIRA *et al.* (2012), ainsi que DURAN *et al.* (2005), lorsqu'ils ont observé des hyphes fongiques au niveau des cellules du parenchyme palissadique des feuilles de *Citrus limon*. BERNADI-WENZEL *et al.* (2010) et ORLANDELLI *et al.* (2012) ont montré que les champignons endophytes peuvent former des associations à partir d'une colonisation inter et intracellulaire des tissus de la plante hôte. L'espace intercellulaire est riche en substances nécessaires pour soutenir la croissance des champignons endophytes. De plus, les concentrations de sucres signalées dans l'apoplasme non endophytique sont suffisantes pour soutenir la croissance fongique (FERRAR *et FERRAR*, 1986 ; KULDAN *et BACON*, 2008).

Ces champignons sont aussi présents au niveau des trichomes glandulaires des feuilles de *Peganum harmala*, ceci est en accord avec les résultats obtenus par ZAREB (2014) où toutes les cellules des trichomes glandulaires des feuilles du Pistachier de l'Atlas de Dayate Aiat (Timzerth) ont été colonisées par les champignons endophytes. Par ailleurs BENFODIL (2015) a noté que ces derniers colonisent uniquement la base des trichomes des feuilles du Pistachier de l'Atlas de Dayate El Gouffa. La majorité d'entre eux sont pigmentés en marron. La densité des trichomes est une caractéristique influencée par les conditions écologiques. L'altitude et les valeurs positives des températures minimales peuvent jouer un rôle important dans leur répartition et leur densité sur les feuilles (BELHADJ, 2007). La défense chimique contre les herbivores peut être associée avec différents types de trichomes, les trichomes glandulaires contiennent parfois des métabolites de défense toxiques (STEINITE *et LEVINSH*, 2003). Ils sont responsables d'une part importante de la chimie secondaire d'une plante (GLAS *et al.*, 2012). Les trichomes glandulaires sont l'une des structures les plus communes qui produisent des huiles essentielles chez les plantes.

Les mycoendophytes ont été retrouvé aussi au niveau des tissus conducteurs des feuilles de *Peganum harmala*. Ceci a été confirmé par ZAREB (2014), avec la colonisation des vaisseaux conducteurs des feuilles de *Pistacia atlantica* Desf. de notre daya d'étude (dayate Aiat) par les mycoendophytes. De ce fait, les mycoendophytes colonisent aussi bien les espaces intercellulaires que les cellules du xylème et du phloème (GARCIA *et al.*, 2012).

Les mycoendophytes sont présents dans tous les compartiments de la feuille de *Peganum harmala* : les cellules épidermiques, les stomates, les trichomes glandulaires, les cellules parenchymateuses et les nervures. Ce type de symbiose est nécessaire à la survie et l'adaptation de cette plante aux conditions d'aridité de la zone d'étude, à savoir dayate Aiat, région de Timzerth, wilaya de Laghouat (Algérie). La présence des mycoendophytes facilite l'épanouissement de cette essence naturelle et son adaptation malgré les stress abiotique et biotique. Ces champignons synthétisent au même titre que la plante hôte des métabolites secondaires qui peuvent être source d'un arsenal d'activités biologiques qui méritent d'être mises en lumière.

Les champignons de la phyllosphère des feuilles de *Peganum harmala* de dayate Aiat (Timzerth, Laghouat) sont majoritairement des Ascomycètes. En effet, les Ascomycètes, Deutéromycètes et Basidiomycètes sont les champignons endophytes les plus rencontrés (PETRINI, 1996). Un grand nombre de genres et espèces de champignons, appartenant aux deux premières classes, sont capables de vivre comme endophyte au niveau des plantes. Dans la présente étude, les champignons endophytes isolés appartiennent à la classe des Deutéromycètes et Ascomycètes.

SUN *et al.* (2012) ont observé un taux de colonisation par les endophytes de 69% au niveau des tiges et des feuilles des plantes des zones désertiques de Chine. L'étude de LORO *et al.* (2012) sur la diversité des champignons endophytes de 18 plantes des régions semi-arides du Venezuela, a révélé que toutes les espèces végétales contiennent des champignons endophytes. Quant à notre étude sur les champignons endophytes foliaires de *Peganum harmala*, elle révèle la présence de ces champignons au niveau de tous les sujets échantillonnés. De plus, certaines études ont montré que la diversité en champignons endophytes dans les zones arides est faible, en raison de facteurs écologiques défavorables, tels que la diminution des précipitations et la faible densité de végétation (ARNOLD *et al.*, 2003; SURYANARAYANAN *et al.*, 2002, 2003, 2005).

Les genres fongiques les plus fréquemment enregistrés au niveau de la phyllosphère sont *Cladosporium* et *Alternaria*. KITA (1988) et KUTRZEBA (1993) ont confirmé que ces champignons sont omniprésents dans les limbes des feuilles de nombreuses espèces végétales. Cela confirme les abondances de ces deux genres comme mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* étudié. Pour PUSZ *et al.* (2015) ces deux genres dominent comme épiphytes au niveau des feuilles d'*Amaranthus spp.* BEZZERA *et al.* (2015), ont démontré chez *Bauhinia forficata* que certaines espèces étaient spécifiques à des tissus, par exemple, *A. chartarum* aux semences, *A. Niger* aux tiges, *C. australiensis* aux feuilles, et *C. oxysporum* aux sépales. Cette distribution des endophytes est spécifique pour l'hôte et le tissu végétal.

Nos résultats sont en accord avec ceux observés dans d'autres études, où il est rapporté que les populations de champignons endophytes sont directement liées à la différence d'intensité et de durée d'exposition de ces organismes au rayonnement solaire, ce qui se produit généralement dans les zones qui ont des différences de facteurs climatiques (MARTIN *et al.*, 2004; MARTIN PINTO *et al.*, 2006; HASHIZUME *et al.*, 2010). En outre, d'autres paramètres environnementaux tels que le sol, la quantité d'eau disponible, ainsi que les conditions physiologiques au moment de la collecte, peuvent également influencer sur la colonisation endophytique (HASHIZUME *et al.*, 2008).

Le genre *Alternaria* est présent comme endophyte (21.89%) et épiphyte (11.99%) au niveau des feuilles de *Peganum harmala* de dayate Aiat (Timzerth, Laghouat). GRBIC *et al.* (2015), ont mis en évidence le genre *Alternaria* (endophyte et épiphyte) avec une fréquence de 75% au niveau de *Nepeta rtanjensis*. Il est aussi dominant chez *Withania somnifera* (KHAN *et al.*, 2010). Ce genre a été signalé chez d'autres espèces végétales, comme *Triticum aestivum* et *Zea mays* (FISHER *et al.*, 1992 ; LARRAN *et al.*, 2002 et ZHANG *et al.*, 2006). La plupart des espèces d'*Alternaria* sont des saprophytes généralement retrouvés dans le sol ou dans les tissus végétaux. Certaines espèces sont pathogènes des plantes (opportunistes) causent un éventail de maladies. Les deux principales caractéristiques des espèces *Alternaria* sont la production de mélanine, en particulier dans les spores et la production de toxines spécifiques à l'hôte, dans le cas des espèces pathogènes (BART, 2003). La forte pigmentation de leurs spores peut fournir une bonne résistance aux UV et contribuer à la colonisation de nombreuses surfaces végétales. Cependant, elles possèdent aussi une tolérance efficace aux facteurs abiotiques et produisent ainsi des enzymes hydrolytiques nécessaires à la compétitivité dans ces niches écologiques (HYANG, 2015).

L'analyse de variance (ANOVA) entre les indices de Shannon des feuilles des différents sujets de *Peganum harmala* n'indique aucune différence significative entre les communautés épiphytiques des feuilles ($p=0,21$). Par contre, cette différence est significative entre les communautés endophytiques ($p=0,05$). Pour ce qui est de l'ANOVA réalisée entre les indices de Shannon globaux, la différence est hautement significative entre les deux communautés : épiphytes et endophytes foliaires ($p=0,00$).

Cette étude démontre la présence des champignons aussi bien qu'épiphytes qu'endophytes au niveau des feuilles de *Peganum harmala* de dayate Aiat, Laghouat (Algérie). La colonisation par ces champignons des différents sujets choisis peut être expliquée par la période d'échantillonnage (mois d'avril). Beaucoup de champignons endophytes se développent durant la saison printanière, cela est en rapport avec les précipitations qui peuvent augmenter la dispersion des spores fongiques, favorisant ainsi la colonisation des tissus végétaux (GORE et BUCAK, 2007 ; EL NAGERABI, 2013).

1.4.3. Interaction champignons épiphytes-endophytes

Les genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Trichophyton* et *Bipolaris* existent comme mycoendophytes ainsi qu'épiphytes au niveau des feuilles de *Peganum harmala* (Figure 24).

Le genre *Cladosporium* (34,63%) est plus abondant comme endophytes qu'épiphytes (4,66%). De même pour le genre *Alternaria* (21,89%) comme endophyte et épiphytes (11,99%). Mais pour le genre *Rhizopus*, il est plus abondant comme épiphyte (13,33%) qu'endophyte (2,30%). Il en est de même pour le genre *Aspergillus* qui est peu abondant comme épiphyte (6,66%) qu'endophyte (14,74%). Pour le genre *Trichoderma*, il est peu abondant aussi bien comme épiphytes (4,66%) qu'endophytes (4,10%). Quant à *Rhizoctonia*, il est aussi peu abondant comme endophytes (2,43%) qu'épiphytes (0,66%). De même pour *Trichophyton*, il est peu abondant comme épiphytes (5,33%) qu'endophytes (1,66%). Ainsi que pour le genre *Bipolaris*, qui est abondant comme épiphytes (4,66%) qu'endophytes (1,25%). Mais pour le genre *Penicillium*, il est abondant comme épiphytes (14,66%) qu'endophytes (13,07%).

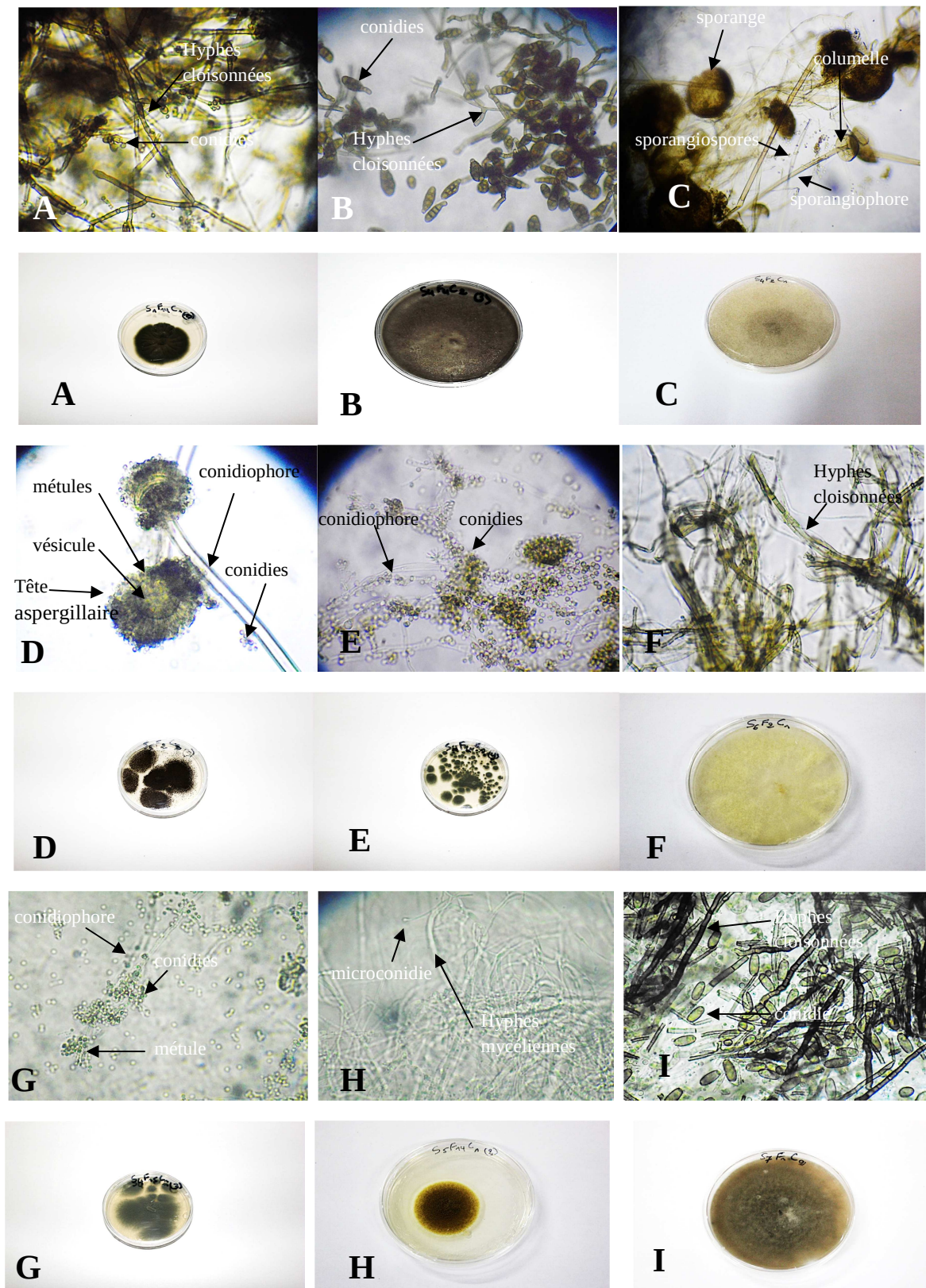


Figure 24 : Genres fongiques existant comme épiphytes et mycoendophytes foliaires chez *Peganum harmala* observés sous microscope optique (X2000), ainsi que leurs colonies fongiques purifiées sur milieu PDA. **A :** *Cladosporium*, **B :** *Alternaria*, **C :** *Rhizopus*, **D :** *Aspergillus*, **E:** *Trichoderma*, **F:** *Rhizoctonia*, **G:** *Penicillium*, **H:** *Trichophyton*, **I:** *Bipolaris*.

Bien que de nombreuses espèces de champignons sont généralement décrites comme endophytes, d'autres peuvent être trouvés occasionnellement colonisant le tissu hôte (SIQUEIRA *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2013). Ainsi, la présence des champignons épiphytes est influencée par des facteurs tels que la disponibilité en nutriments, l'humidité, l'âge et type des feuilles. La croissance des champignons filamenteux au niveau du phylloplan est généralement considérable lorsque le taux d'humidité est élevé et les températures sont modérées (INACIO *et al.*, 2002).

Les Zygomycètes ont été observés beaucoup plus chez les épiphytes foliaires de *Peganum harmala*. Cela est en accord avec les travaux de KHAN *et al.* (2010) sur *Withania somnifera* des régions semi-arides (Karachi, Pakistan) où les Deutéromycètes dominent sur les Ascomycètes. Quant aux Zygomycètes et Basidiomycètes endophytes, ils sont retrouvés beaucoup plus chez les plantes herbacées (PORRAS-ALFARO et BAYMAN, 2011).

Des interactions importantes sont décrites entre les différents taxons fongiques de la phyllosphère de *Peganum harmala* de dayate Aiat. A cet effet, une matrice de corrélation est faite pour identifier et décrire la nature de ces interactions. Les interactions significatives sont récapitulées dans le tableau IX. A partir de la matrice de corrélation, nous relevons une seule corrélation négative entre *Cladosporium* et les souches non identifiées (SNI) (-0,62). Des corrélations fortement positives ont été observées entre deux genres fongiques exclusivement endophytes : *Absidia* et *Paraphaephaeria* (1), *Aureobasidium* et *Verticillium* (0,89), *Exophiala* et *Absidia* (0,49). Il y a lieu de noter des corrélations positives entre deux genres fongiques, où l'un est exclusivement épiphyte : *Mucor* et l'autre à la fois endophyte et épiphyte : *Rhizopus* (0,88), de même pour *Aureobasidium* uniquement épiphyte et *Trichoderma* endophyte et épiphyte (0,83), entre *Verticillium* uniquement endophyte et *Trichoderma* les deux à la fois (0,70), *Epicoccum* exclusivement épiphyte et *Bipolaris* endophyte et épiphyte (0,62), *Mycoclados* exclusivement épiphyte et *Rhizopus* endophyte et épiphyte (0,56). Quant à *Aspergillus* et *Rhizoctonia*, ils sont tous les deux endophytes et épiphytes (0,63). Des genres exclusivement épiphytes sont aussi positivement corrélés entre eux : *Mucor* et *Mycoclados* (0,55), *Epicoccum* et *Mycoclados* (0,46) et enfin *Phoma* et *Epicoccum* (0,46).

Tableau IX : Interactions significatives entre les champignons de la phyllosphère de *Peganum harmala*.

Genres	Valeur significative de l'interaction (au seuil $p=0,05$)
<i>Cladosporium</i> – SNI	-0,62
<i>Absidia</i> – <i>Paraphaephaeria</i>	1,00
<i>Aureobasidium</i> – <i>Verticillium</i>	0,89
<i>Rhizopus</i> – <i>Mucor</i>	0,88
<i>Trichoderma</i> – <i>Aureobasidium</i>	0,83
<i>Trichoderma</i> – <i>Verticillium</i>	0,70
<i>Aspergillus</i> – <i>Rhizoctonia</i>	0,63
<i>Bipolaris</i> – <i>Epicoccum</i>	0,62
<i>Rhizopus</i> – <i>Mycoclados</i>	0,56
<i>Mycoclados</i> – <i>Mucor</i>	0,55
<i>Scropulariopsis</i> – <i>Mucor</i>	0,53
<i>Bipolaris</i> – SNI	0,53
<i>Exophiala</i> – <i>Absidia</i>	0,49
<i>Exophiala</i> – <i>Paraphaephaeria</i>	0,49
<i>Epicoccum</i> – <i>Mycoclados</i>	0,46
<i>Phoma</i> – <i>Epicoccum</i>	0,46
<i>Epicoccum</i> – SNI	0,45

SNI : souches non identifiées.

Les quotients de similarité de Sorensen obtenus pour les dix sujets échantillonnés varient entre 0–0,73 (Figure 25). Le sujet 9 montre un quotient de similarité entre les communautés épiphytes et endophytes le plus élevé (0,73), suivi du sujet 8 et 6 (0,67), par ailleurs, le sujet 2 (0) ne présente aucune similarité dans ces communautés fongiques.

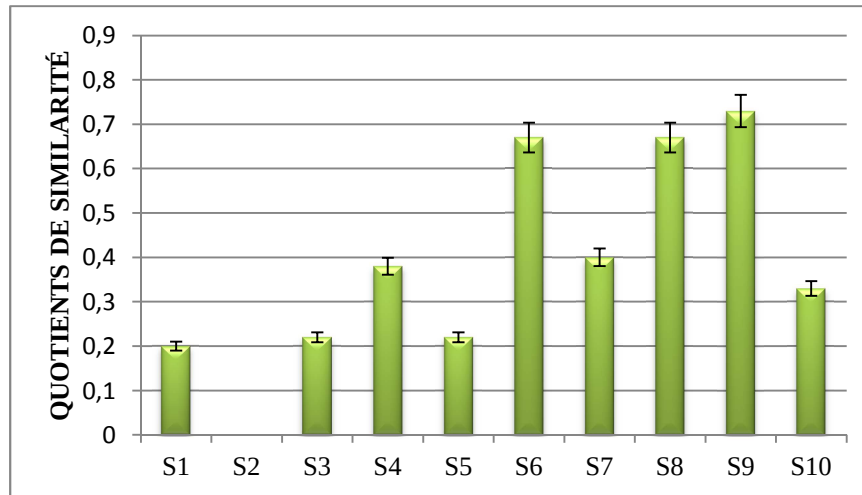


Figure 25 : Quotients de similarités de Sorensen des différents sujets de *Peganum harmala*.

Les quotients de similarité (QS) obtenus dans notre étude sont compris entre 0 et 0,73, où le QS le plus élevé est celui du sujet 9 (0,73) qui présente une forte similarité entre ces communautés épiphytiques et endophytiques, par ailleurs, le QS le plus faible est observé chez le sujet 2, où la similarité est absente. Cette différence est due aux conditions environnementales et emplacement des différents sujets dans la daya. Selon OSONO et MORI (2004), l'assemblage des champignons phyllosphériques épiphytes et endophytes est intermédiaire dans la gamme QS entre 0,12 et 0,79. Les résultats des QS obtenus par GRBIC' *et al.* (2015) sont entre 0,24 et 0,32. Ils suggèrent que les espèces intermédiaires se chevauchent entre le phylloplan et l'intérieur des feuilles. Tous les champignons déterminés en tant qu'espèces du phylloplan ne pouvaient pénétrer le tissu hôte et coloniser l'intérieur des feuilles.

Nous avons réalisé une analyse en composantes principales (ACP). Elle nous fournit des indications sur la nature, la force et la pertinence des liens entre les différents sujets et entre les genres de champignons épiphytes et endophytes. Son objectif est donc de faciliter l'interprétation de ces synergies et d'identifier les tendances dominantes de l'ensemble des données (Figure 26).

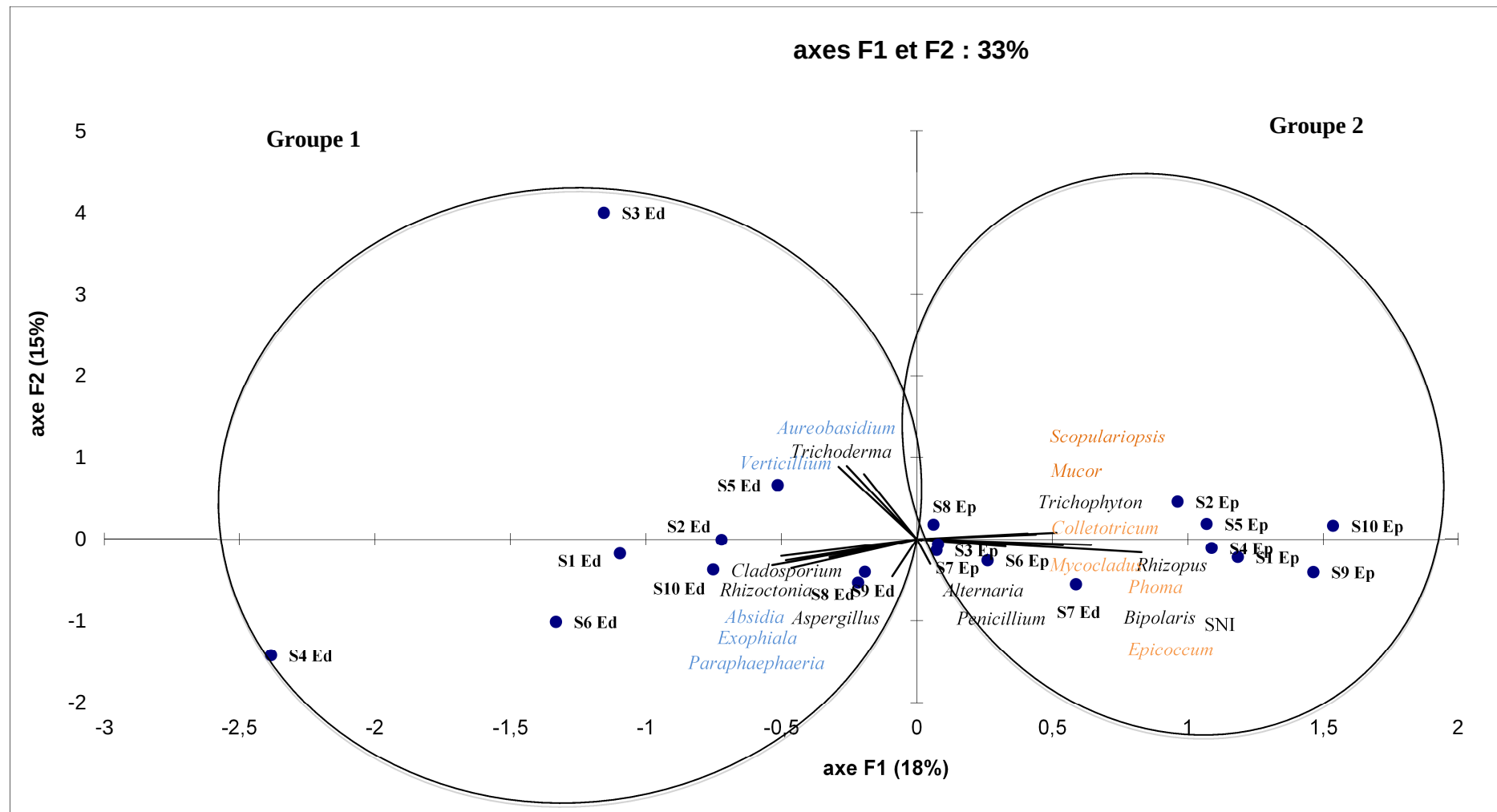


Figure 26 : ACP représentant les genres de champignons épiphytes et endophytes des sujets de *Peganum harmala* de Dayate Aiat.

Afin d'interpréter les synergies et les interactions entre ces champignons endophytes et épiphytes, nous avons considéré le plan 1-2 de l'analyse en composante principale (ACP), qui explique 33% du phénomène, avec pour l'axe 1 : 18% et pour l'axe 2 : 15% de l'inertie totale.

Nous avons deux grands groupes, le premier comporte S1, S2, S3, S4, S5, S6, S8, S9 et S10 Ed où les genres *Cladosporium* et *Aspergillus* dominant. Le second comprend S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10 Ep et S7 Ed où les genres *Alternaria* et *Penicillium* dominant.

Les genres *Aureobasidium*, *Verticillium*, *Absidia*, *Exophiala* et *Paraphaephaeria* n'existent que comme endophytes, tandis que *Scopulariopsis*, *Mucor*, *Colletotricum*, *Mycoclados*, *Phoma* et *Epicoccum* existent uniquement comme épiphytes au niveau des feuilles de *Peganum harmala*.

Les deux groupes formés sont composés des sujets du compartiment interne de la phyllosphère pour le premier groupe et de sujets du compartiment externe de la phyllosphère plus un sujet de l'endosphère pour le deuxième groupe. Ceci pourrait être expliqué par les relations entre les épiphytes et les endophytes. On ne sait pas dans quelle mesure les plantes contrôlent les champignons capables d'entrer dans la feuille et dans laquelle les épiphytes peuvent affecter ce processus (LEBRO *et al.*, 2001). Alors que l'intérieur des feuilles subit des changements dus aux températures et à d'autres conditions, les surfaces extérieures quant à elles peuvent être considérées comme beaucoup plus extrêmes en termes de stress abiotique. PETRINI (1991) a suggéré que les communautés endophytiques contiennent souvent une variété d'espèces classiques épiphytiques, dont *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens* et autres, qui pénètrent facultativement dans les tissus foliaires au début de la sénescence foliaire. *Alternaria*, *Epicoccum* et *Cladosporium* sont considérés comme des colonisateurs primaires communs de plantes et sont essentiellement épiphytiques, lorsque la feuille est viable (KAYINI et PANDEY, 2010).

Les champignons épiphytes et endophytes peuvent avoir des propriétés biologiques distinctives, qui mettent en évidence des différences fonctionnelles ou écologiques entre ces associations. Des interactions se créent entre les mycoendophytes d'une part et entre les mycoendophytes et la plante hôte d'autre part (ARNOLD, 2007). La relation positive entre la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes est due principalement à la complémentarité entre espèces. La plupart des études BEF (Biodiversity Ecosystem

Functioning) portaient principalement sur les interactions entre les plantes. Cependant, les plantes sont intégrées dans un réseau dense d'interactions multitrophiques au-dessus et au-dessous du sol, qui sont susceptibles de jouer un rôle crucial dans les relations BEF (EISENHAUER, 2012).

Les plantes dans les zones arides sont exposées à de nombreux stress environnementaux, y compris la faible disponibilité en eau, la salinité élevée, les différences de température diurnes élevées, les radiations et la carence en nutriments. Comme les champignons endophytes peuvent aider contre les contraintes environnementales, il est quelque peu surprenant que les endophytes de plantes de la zone aride ont reçu peu d'attention (SURYANARAYANAN *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2012). La symbiose plante-endophytes offre une protection à l'hôte des insectes, des parasites et herbivores, mais aussi aide à mieux s'adapter dans différentes conditions de stress (CLAY et SCHARDL, 2002 ; CLAY, 2005 ; MALINOWSKI *et al.*, 2006 et KNOP *et al.*, 2007).

**PARTIE II : ACTIVITES
BIOLOGIQUES DES
MYCOENDOPHYTES FOLIAIRES DE
Peganum harmala L.**

2.1. Données bibliographiques

2.1.1. Introduction

L'utilisation des molécules bioactives végétales à des fins thérapeutiques prend de plus en plus d'essor mais ce domaine reste soumis à plusieurs contraintes comme : (a) des rendements extrêmement bas qui varient selon les conditions environnementales, (b) une offre limitée et insuffisante conduisant à une récolte excessive et (c) des structures extrêmement complexes qui rendent la synthèse et la semi-synthèse totales très difficiles (VENUGOPALAN et SRIVASTAVA, 2015). L'extraction de métabolites secondaires à partir des plantes médicinales ne donne pas toujours un bon rendement (environ moins de 1% de la masse sèche de la plante) qui dépend des facteurs environnementaux comme le climat, le sol et autres (WILSON et ROBERTS, 2012).

La découverte de champignons endophytes capables de mimer le répertoire des métabolites secondaires de leur hôte, dans la plupart des plantes médicinales a donné une impulsion à la possibilité d'utiliser la fermentation microbienne pour répondre à la demande sans cesse croissante en plusieurs médicaments vitaux. De plus, on sait que ces champignons endophytes ont développé de nouveaux mécanismes de résistance à leurs métabolites toxiques et ceux de leurs hôtes en tant qu'adaptation co-évolutionnaire (KUSARI *et al.*, 2011a; MU *et al.*, 1999).

La fermentation microbienne présente certains avantages qui rendent cette stratégie plus robuste que d'autres. Le milieu de culture des souches fongiques est relativement simple et peu coûteux, consistant essentiellement en sous-produits, tandis que le milieu de culture des cellules végétales nécessite des additifs coûteux comme les phytohormones. La croissance est plus rapide chez les champignons, vu que la période de fermentation est plus courte, avec un moindre risque de contamination, par rapport à celle des cellules végétales à croissance lente ou des cultures de tissus. L'optimisation et la régulation des paramètres de fermentation sont relativement plus faciles dans les fermentations microbiennes, comparativement à celles des cultures de cellules et de tissus végétaux dans les bioréacteurs. De plus, les cultures microbiennes sont facilement gérables avec des stratégies d'amélioration comme l'amélioration des souches, des précurseurs d'alimentation, plus d'éliciteurs, les inhibiteurs annexés et la co-culture (ZHAO *et al.*, 2010a). La fermentation des champignons endophytes peut ainsi réduire la menace de la récolte excessive des plantes, tout en assurant un approvisionnement régulier en métabolites secondaires végétaux importants, indépendamment des conditions environnementales (VENUGOPALAN et SRIVASTAVA, 2015).

2.1.2. Biosynthèse des métabolites secondaires par la plante hôte ou les mycoendophytes

Trois hypothèses ont été émises sur les origines du métabolisme secondaire chez les plantes, qui mettent tous l'accent sur le rôle des endophytes.

- 1) Les plantes et les champignons endophytes peuvent intervenir dans des voies de biosynthèse parallèle pour produire ces produits naturels.
- 2) Le transfert horizontal des gènes (HGT) peut avoir eu lieu entre les plantes et les champignons pendant leur période d'association.
- 3) Les plantes ou les champignons endophytes peuvent produire ces métabolites secondaires et les transférer à l'autre symbiote (KARUPPUSAMY, 2009). En outre, l'hypothèse de xenohormesis soutient l'idée que les endophytes pourraient avoir la machinerie nécessaire pour synthétiser les métabolites de la plante hôte (KUSARI *et al.*, 2012c). Des études récentes ont rapporté la présence de gènes biosynthétiques clés dans le taxol et la camptothécine produits par des souches fongiques endophytiques (KUSARI *et al.*, 2011b, 2014). Le séquençage complet du génome d'un endophyte *Shiraia sp.* le Slf14, précédemment rapporté pour produire à la fois l'huperzine A et l'hypocrélline A, a également révélé la présence d'un groupe de gènes biosynthétiques putatifs d'huperzine A (HupA) (YANG *et al.*, 2014a). Ces résultats indiquent clairement que les champignons endophytes sont des usines de métabolites secondaires par eux-mêmes.

2.1.3. Composés bioactifs issus des mycoendophytes

Les champignons pénètrent les tissus végétaux par des ouvertures ou des plaies, en utilisant des enzymes hydrolytiques telles que la cellulase et la pectinase (ZHANG *et al.*, 2006). Au cours de la longue période de co-évolution, les champignons endophytes se sont adaptés graduellement à leurs microenvironnements grâce à la variation génétique, y compris l'absorption de certains segments d'ADN végétaux dans leurs propres génomes, ainsi que l'insertion de leurs propres segments d'ADN dans les génomes hôtes. Ceci a induit la biosynthèse de composés phytochimiques provenant de leurs plantes hôtes (ZHANG *et al.*, 2006 ; STIERLE *et al.*, 1993). Un exemple typique est celui de la production de la gibbérelline provenant à la fois des champignons et des plantes (CHOI *et al.*, 2005). Le schéma des composés bioactifs à la fois des champignons endophytes et de leurs plantes hôtes, ainsi que leurs applications potentielles est illustré sur la figure 27.

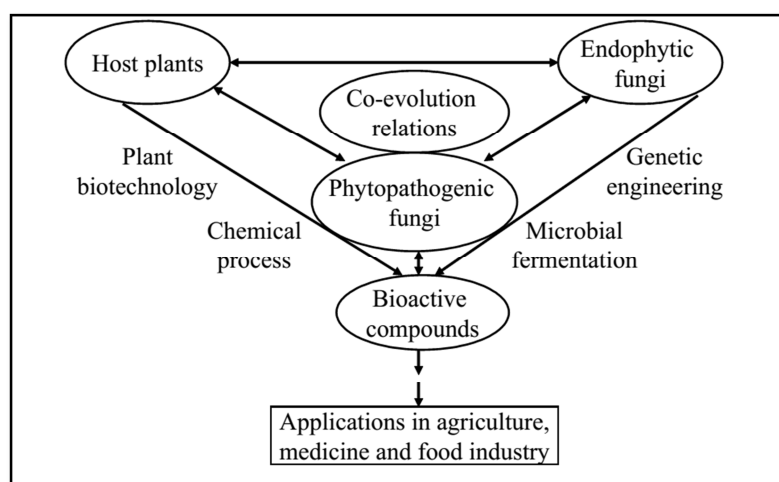


Figure 27 : Présentation des composés bioactifs des champignons endophytes et de leurs plantes hôtes, ainsi que leurs applications potentielles (ZHAO *et al.*, 2011).

2.1.3.1. Composés anticancéreux

Le cancer est une maladie caractérisée par une croissance non régulée et une propagation des cellules anormales, qui peuvent entraîner la mort si ce n'est pas contrôlée (PIMENTEL *et al.*, 2011). Il a été considéré comme l'une des principales causes de décès dans le monde (environ 13% de tous les décès). De nombreux produits naturels bioactifs de plantes, de micro-organismes, et de sources marines ont été identifiés comme des agents anticancéreux (FIRAKOVA *et al.*, 2007). Les propriétés anticancéreuses de plusieurs métabolites secondaires des endophytes ont été étudiées récemment. Le tableau X résume ces molécules bioactives issues des champignons endophytes.

Tableau X : Production des composés bioactifs d'intérêt thérapeutique et leurs analogues par les mycoendophytes et leurs plantes hôtes.

Champignon endophyte	Souche fongique	Plante hôte	Composés et leur rendement	Références
<i>Alternaria</i> sp.	Ja-69	<i>Taxus cuspidata</i>	Paclitaxel 0.16µg/l	STROBEL <i>et al.</i> (1996)
<i>Alternaria alternata</i>	TPF6	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairei</i>	Paclitaxel 84.5µg/l	TIAN <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EPTP-1	<i>Podocarpus</i> sp.	Paclitaxel 557.8µg/l	SUN <i>et al.</i> (2008)
<i>Botrytis</i> sp.	HD181-23	<i>Taxus cuspidata</i>	Paclitaxel 206.34µg/l	ZHAO <i>et al.</i> (2008)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MD2	<i>Taxus media</i>	Paclitaxel 800µg/l	ZHANG <i>et al.</i> (2009b)
<i>Fusarium solani</i>	Tax-3	<i>Taxus chinensis</i>	Paclitaxel 163.35µg/l	DENG <i>et al.</i> (2009)
<i>Alternaria neesex</i>	Ty	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	Podophyllotoxine 2.4 µg/L	CAO <i>et al.</i> (2007)
<i>Fusarium oxysporum</i>	JRE1	<i>Juniperus recurva</i> (= <i>Sabina recurva</i>)	Podophyllotoxine 28 µg/g	KOUR <i>et al.</i> (2008)
<i>Fusarium solani</i>	MTCC 9667	<i>Apodytes dimidiata</i>	Camptothécine 0.37 µg/g	SHWETA <i>et al.</i> (2010)
<i>Nodulisporium</i> sp.	-	<i>Nothapodytes foetida</i>	Camptothécine 5.5 µg/g	REHMAN <i>et al.</i> (2009)
<i>Alternaria</i> sp.	97CG1	<i>Catharanthus roseus</i>	Vinblastine -	GUO <i>et al.</i> (1998)
<i>Fusarium oxysporum</i>	97CG3	<i>Catharanthus roseus</i>	Vincristine -	ZHANG <i>et al.</i> (2000)

- : rendement non estimé

➤ Paclitaxel (Taxol)

Le premier agent anticancéreux produit par les endophytes est le taxol et ses dérivés. C'est un diterpénoïde hautement fonctionnalisé, isolé à partir de l'if (*Taxus*) (BACON et WHITE, 1994). Le mode d'action du taxol est d'empêcher les molécules de tubuline de dépolymérisation pendant les processus de division cellulaire (TAN et ZOU, 2001).

Jusqu'à présent, au moins 20 genres de champignons endophytes : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Ectostroma*, *Fusarium*, *Metarhizium*, *Monochaetia*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Ozonium*, *Papulospora*, *Periconia*, *Pestalotia*,

Pestalotiopsis, *Phyllosticta*, *Pithomyces*, *Taxomyces* et *Tubercularia*, ont été testés pour avoir la capacité de produire du paclitaxel et ses analogues, tels que la baccatine III (2) ou la 10-désacétylbaccatine III (3) (Figure 28, Tableau X). Les hôtes de champignons producteurs de paclitaxel comprennent principalement des espèces de *Taxus* (*T. baccata*, *T. cuspidata*, *T. media* et *T. yunnanensis*) appartenant à la famille des Taxaceae, *Torreya grandifolia* (Taxaceae), mais aussi *Cardiospermum halicacabum* (Sapindaceae), *Citrus medica* (Rutaceae), *Cupressus* sp. (Cupressaceae), *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), *Hibiscus rosa-sinensis* (Malvaceae), *Podocarpus* sp. (Podocarpaceae), *Taxodium distichum* (Taxodiaceae), *Terminalia arjuna* (Combretaceae) et *Wollemia nobilis* (Araucariaceae). Un tel nombre et une large gamme implique que les champignons endophytes producteurs de paclitaxel et leurs hôtes ont une grande diversité biologique (ZHAO *et al.*, 2011).

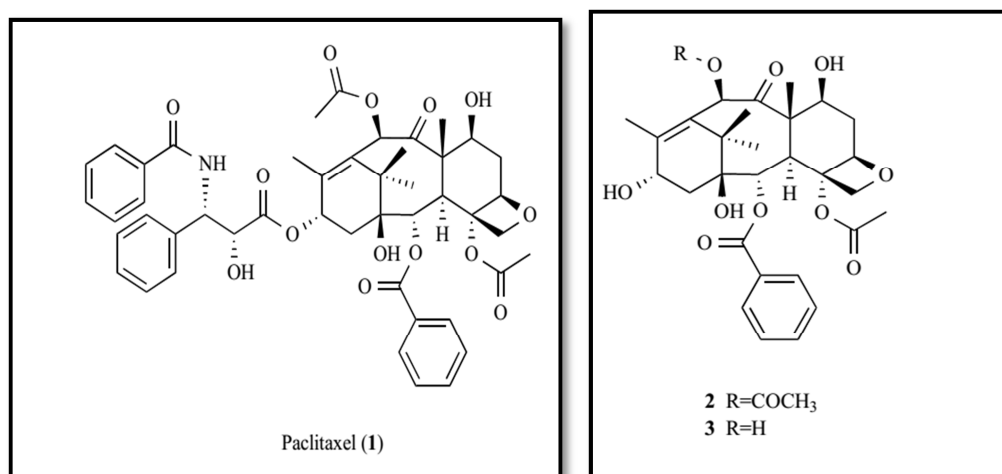


Figure 28 : Structure du paclitaxel (1) et ses analogues : baccatine III (2), 10-désacétylbaccatine III (3) (ZHAO *et al.*, 2011).

➤ Camptothécine

La camptothécine (CPT) et la 10-hydroxycamptothécine sont deux précurseurs importants pour la synthèse des médicaments anticancéreux cliniquement utiles, topotécan et l'irinotécan (UMA *et al.*, 2008). Les produits ont été obtenus à partir d'un champignon endophyte *Fusarium solani* isolé de *Camptotheca acuminé* (KUSARI *et al.*, 2009). La camptothécine (CPT, 8), un alcaloïde quinolique pentacyclique, a d'abord été isolée à partir du bois de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) par WALL *et al.* en 1966. CPT et son analogue 10-hydroxycamptothécine (10) (Figure 29) sont considérés comme deux des agents antinéoplastiques les plus efficaces. Le mécanisme d'action primaire du CPT inhibe l'enzyme

intra-nucléaire topoisomérase-1, qui est nécessaire dans la réplication de l'ADN et la transcription au cours de la prolifération cellulaire (HSIANG *et al.*, 1985).

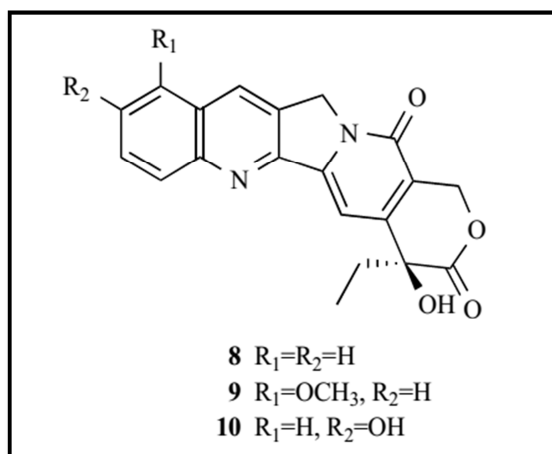


Figure 29 : Structure de la camptothécine et ses analogues (UMA *et al.*, 2008).

8 : camptothécine (CPT) ; **9 :** 9- methoxycamptothecine ; **10 :** 10-hydroxycamptothecine

➤ Cytochalasines

Les genres fongiques comme *Xylaria*, *Phoma*, *Hypoxylon* et *Chalara* sont des producteurs représentatifs d'un groupe relativement important de substances connues comme les cytochalasines. Ces composés possèdent une activité antitumorale, mais ils ont aussi une toxicité cellulaire. Trois nouvelles cytochalasines (Figure 30), cytochalasine E, cytochalasine J et cytochalasine H ont été synthétisés par *Rhinocladiella* sp. isolé de *Tripterygium wilfordii*. Ces composés ont une activité antitumorale qui est représenté par 22-oxa-12-cytochalasines (WAGENAAR *et al.*, 2000). La vincristine synthétisée par *Mycelia sterilia*, un endophyte isolé de *Catharanthus roseus* possède également une activité anticancéreuse (YANG *et al.*, 2004).

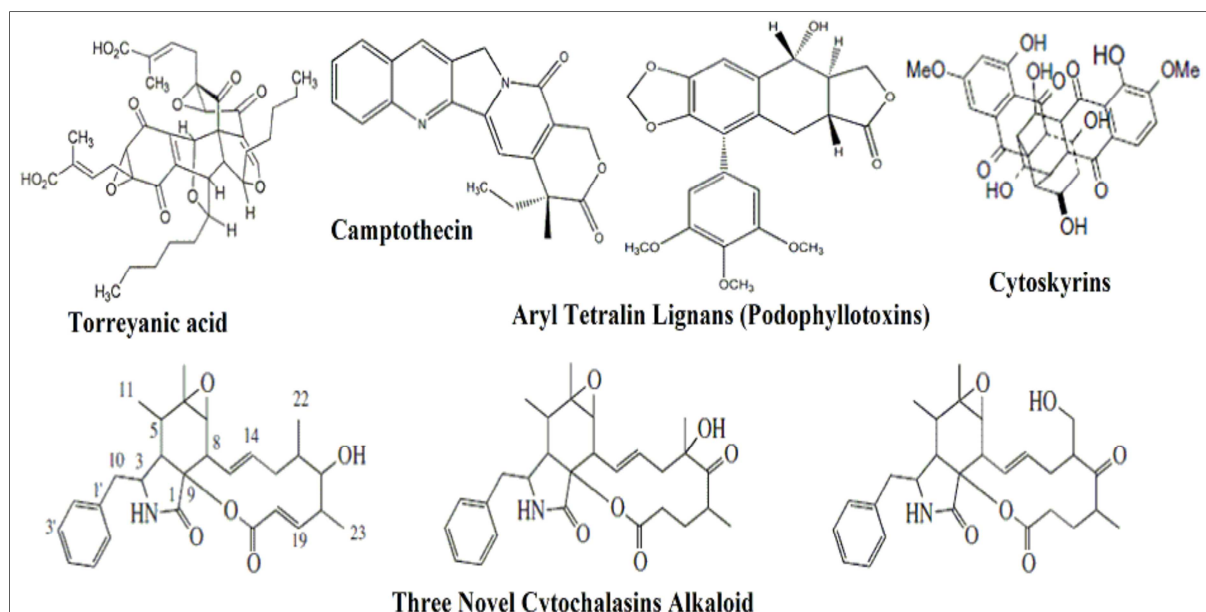


Figure 30 : Structures de quelques molécules anticancéreuses isolées des champignons endophytes (SELIM *et al.*, 2012).

➤ Vinblastine et Vincristine

La vinblastine (11) et la vincristine (12) (Figure 31) sont des alcaloïdes indoliques terpénoïdes, issus du couplage des monomères vindoline et catharanthine. Ce sont deux agents anticancéreux bien connus (PEREZ *et al.*, 2002 ; WANG *et al.*, 2010). Le principal mécanisme d'action de la vincristine est par interférence avec la formation des microtubules et la dynamique du fuseau mitotique, la perturbation du transport intracellulaire et la diminution du flux sanguin tumoral, qui a comme conséquence l'anti-angiogenèse (PEREZ *et al.*, 2002 ; MOORE et PINKERTON, 2009). GUO *et al.* (1998) ont isolé pour la première fois un champignon endophyte *Alternaria* sp. du phloème de *Catharanthus roseus* qui avait la capacité de produire la vinblastine (11). Plus tard, ZHANG *et al.* (2000) ont isolé *Fusarium oxysporum* un champignon endophyte du phloème de *Catharanthus roseus*, qui produit de la vincristine (12). YANG *et al.* (2004) ont également mis en évidence un champignon endophyte non identifié, producteur de la vincristine à partir des feuilles de cette même plante.

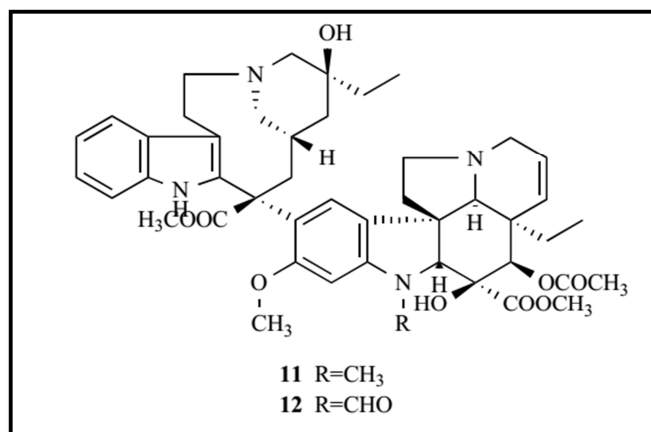


Figure 31 : Structure de la vinblastine (11) et de la vincristine (12)
(WANG *et al.*, 2010).

➤ Podophyllotoxine

La podophyllotoxine (PDT, 4) (Figure 32) une lignane d'aryltétraline bien connu avec de puissantes propriétés anticancéreuses, antivirales, antioxydantes, antibactériennes, immunostimulantes et anti-rhumatismales. Elle se rencontre principalement chez les genres *Diphylleia*, *Dysosma*, *Juniperus* et *Sinopodophyllum* (également appelé *Podophyllum*) (YANG *et al.*, 2003 ; PURI *et al.*, 2006). PDT a été utilisé comme un précurseur pour la synthèse chimique des médicaments anticancéreux comme l'étoposide, le téniposide et le phosphate d'etopophose qui agissent comme inhibiteurs de la topoisomérase (KOUR *et al.*, 2008 ; EYBERGER *et al.*, 2006).

YANG *et al.* (2003) ont d'abord isolé six champignons endophytes de *Sinopodophyllum hexandrum*, *Diphylleia sinensis* et *Dysosma veitchii* qui avaient la capacité de produire de la podophyllotoxine. Plus tard, EYBERGER *et al.* (2006) ont obtenu avec succès deux souches de champignons endophytes *Phialocephala fortinii* (PPE5 et PPE7), provenant des rhizomes de *Sinopodophyllum peltatum* qui produit la PDT, avec des rendements de 0,5-189 µg/l en culture en suspension liquide. D'autres champignons endophytes producteurs de PDT, dont *Alternaria* sp. de *Sinopodophyllum hexandrum* (CAO *et al.*, 2007) et *Fusarium oxysporum* de *Sabina recurva* ont également été signalés (KOUR *et al.*, 2008).

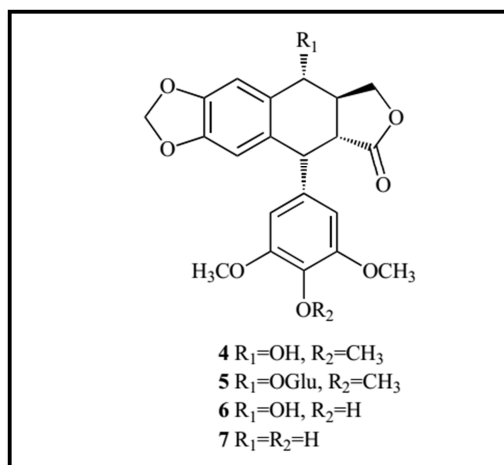


Figure 32 : Structure de la podophyllotoxine et ses analogues (EYBERGER *et al.*, 2006).

4 : podophyllotoxine (PDT) ; **5 :** podophyllotoxine- β -D-glucoside (PDTG) ; **6 :** 4- diméthylpodophyllotoxine (DMP) ; **7 :** deoxypodophyllotoxine (DPDT)

2.1.3.2. Composés antiviraux

Une autre utilisation intéressante des métabolites secondaires des champignons endophytes est l'inhibition des virus. Il est évident que la découverte du potentiel de ces composés antiviraux est à ses débuts mais certains composés prometteurs ont déjà été identifiés. Deux inhibiteurs de la protéase de cytomégalo virus, l'acide cytonique A et B (Figure 33) ont été isolé à partir d'une fermentation à l'état solide du champignon endophyte *Cytospora* sp. Leurs structures ont été élucidées par spectrométrie de masse et RMN (GUO *et al.*, 2000). Un champignon endophyte *Pestalotiopsis theae* d'une espèce d'arbre non identifiée d'une montagne de Chine, était capable de produire du pestalotheol C avec des propriétés anti-VIH (LI *et al.*, 2008).

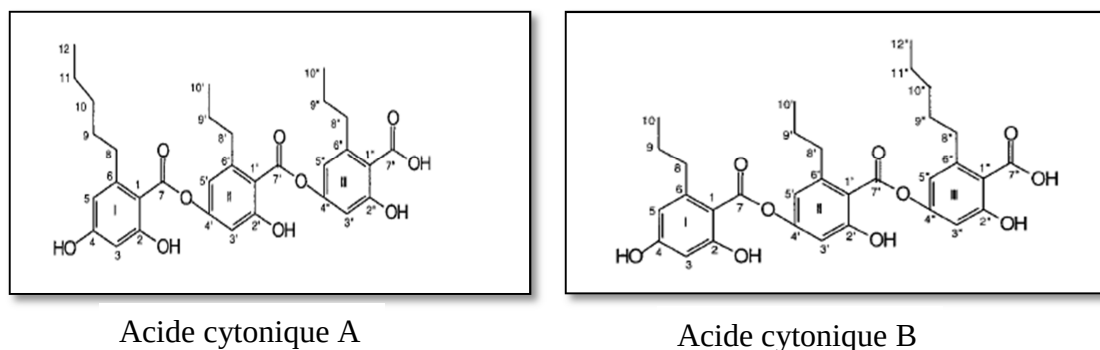


Figure 33 : Structures des acides cytoniques A et B isolés à partir du champignon endophyte *Cytospora* sp (GUO *et al.*, 2000).

2.1.3.3. Composés antioxydants

L'activité antioxydante d'un composé contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les dérivés de l'oxygène libre contribuent à une variété d'effets physiologiques et pathologiques, par exemple des dommages de l'ADN, la carcinogenèse et la dégénérescence cellulaire (HUANG *et al.*, 2007; SEIFRIED *et al.*, 2007). Les antioxydants sont considérés comme une thérapie prometteuse pour la prévention et le traitement des maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète sucré, les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson, la polyarthrite rhumatoïde et le vieillissement (VALKO *et al.*, 2007).

Naturellement les composés antioxydants sont retrouvés couramment dans les légumes, les fruits et les plantes médicinales. Cependant, il a été observé que les mycoendophytes sont également une source potentielle de nouveaux antioxydants naturels. *Xylaria* sp. un endophyte isolé de la plante médicinale *Ginkgo biloba*, synthétise des composés possédant des activités antioxydantes (LIU *et al.*, 2007). Pestacine et isopestacine (1,3-dihydro isobenzofurannes) (Figure 34) ont été obtenues à partir du champignon endophyte *Pestalotiopsis microspora* isolé de *Terminalia morobensis*, une plante qui pousse dans la Papouasie-Nouvelle-Guinée (STROBEL *et al.*, 2002 ; HARPER *et al.*, 2003).

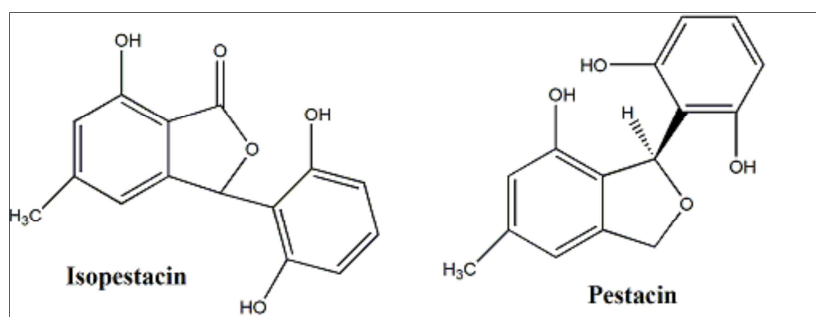


Figure 34 : Structures de deux molécules antioxydantes isolées de *Pestalotiopsis microspora* (STROBEL *et al.*, 2002).

2.1.3.4. Composés antimicrobiens

Les agents antimicrobiens sont des substances organiques naturelles de bas poids moléculaire, produites par des microorganismes qui sont actifs à faible concentration contre d'autres microorganismes (GUO *et al.*, 2000).

La recrudescence des maladies infectieuses, l'apparition de bactéries multi-résistantes et des infections fongiques chez les patients greffés et immuno-déficients ont limité la médication conventionnelle. Afin de pallier à ce manque, de nouvelles sources d'agents

thérapeutiques doivent être explorées (STROBEL et DAISY, 2003 ; MISHRA *et al.*, 2013). C'est pourquoi les mycoendophytes peuvent représenter une nouvelle source de composés bioactifs antifongiques et antibactériens (GAO *et al.*, 2010). Des sesquiterpènes, diterpénoïdes et triterpénoïdes synthétisés par des mycoendophytes ont démontré des propriétés antibactériennes. En effet, un composé terpénoïde obtenu de la fraction d'acétate d'éthyle de *Phomopsis* sp. un endophyte de *Plumeria acutifolia* a montré une grande activité antibactérienne (KAUL *et al.*, 2012). Le phomol (Tableau XI) un antibiotique extrait de *Phomopsis* sp. un endophyte colonisant *Erythrina crista-galli* a montré une activité contre *Arthrobacter citreus* et *Corynebacterium insidiosum* (avec des CMI : concentration moyenne inhibitrice de 20 et 10µg/ml) respectivement (DESHMUKH *et al.*, 2015).

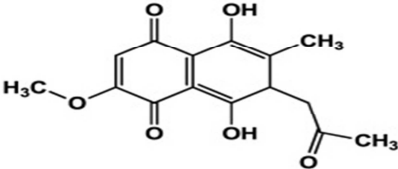
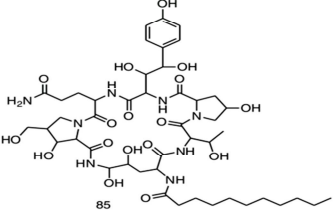
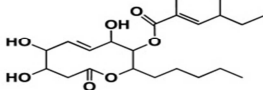
ZOU *et al.* (2000) ont extrait un métabolite qui est l'acide colletotrique de *Colletotrichum gloeosporioides*, un endophyte colonisant la tige d'*Artemisia mongolica* actif contre des bactéries, comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Sarcina lentea*, mais aussi contre un champignon saprophyte de plantes *Helminthosporium sativum*. De plus, l'acide tenuazonique isolé d'*Alternaria alternata* s'est avéré actif contre *Mycobacterium tuberculosis* avec une CMI de 250µg/ml (Kaul *et al.*, 2012) et l'altercétine, un nouvel alcaloïde isolé de l'endophyte *Alternaria* spp. a montré une activité antibactérienne contre différentes bactéries pathogènes gram-positif (GAO *et al.*, 2010).

La javanicine (Tableau XI) extraite d'un champignon endophyte isolé de *Azadirachta indica* a montré une forte propriété antibactérienne contre *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ce composé est aussi actif contre les champignons pathogènes (KHARWAR *et al.*, 2014). La cryptocandine (Tableau XI) extraite de l'endophyte *Cryptosporiopsis quercina* a montré une activité contre des champignons pathogènes de l'homme comme : *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida parapsilosis* et *Histoplasma capsulatum* (KHARWAR *et al.*, 2014).

Le 3, 11, 12-trihydroxycadalene un dérivé de cadinane sesquiterpènes, extrait de *Phomopsis cassiae*, un mycoendophyte isolé de *Cassia spectabilis* a été identifié comme le composé antifongique le plus actif contre *Cladosporium sphaerospermum* et *Cladosporium cladosporioides* (GAO *et al.*, 2010 ; KAUL *et al.*, 2012). En outre, ARIVUDAINAMBI *et al.* (2014) ont démontré une activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'espèce

endophytique *Alternaria alternaria* contre des *Staphylococcus aureus*, avec un maximum de zone d'inhibition de $21,4 \pm 0,07$ mm.

Tableau XI : Quelques structures chimiques de composés antibactériens et antifongiques.

Nom du composé	Structure chimique	Référence
Javanicine		DESHMUKH <i>et al.</i> (2015)
Cryptocandine		KAUL <i>et al.</i> (2012)
Phomol		DESHMUKH <i>et al.</i> (2015)

Phoma sp., un champignon endophyte isolé de *Saurauia scaberrinae*, produit une molécule bioactive, la phomodione (Figure 38) ($C_{20}H_{22}O_8$) [2,6-diacétyl-7-hydroxy-4, 9-diméthoxy-8,9-diméthyl-4,9-dihydrodibenzofuranne-1,3-dione], un dérivé d'acide usnique. La concentration minimale inhibitrice de cette dernière est de l'ordre de $1,6 \mu\text{g/ml}$ contre *Staphylococcus aureus* (HOFFMAN *et al.*, 2008). SANTIAGO *et al.* (2012) ont isolé *Phoma* sp. de *Cinnamomum mollissimum* et extrait un composé bioactif, le polycétide 5-hydroxyramulosine (Figure 35) ($C_{10}H_{14}O_4$) inhibant le champignon pathogène *Aspergillus niger*.

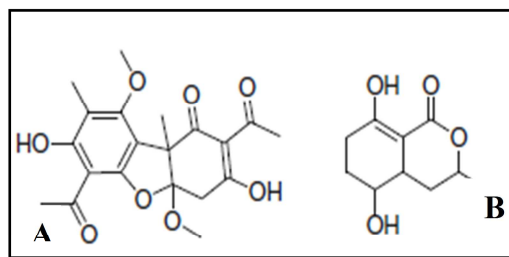


Figure 35 : Structure de la phomodione (A) et du polycétide 5-hydroxyramulosine (B) (SANJANA *et al.*, 2012).

Les agents antimicrobiens hypéricine et émodyne (Figure 36) ont été produits par un champignon endophyte isolé de *Hypericum perforatum*. Les deux composés possèdent une activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries et champignons, à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozaenae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*, ainsi que les pathogènes fongiques, tels que *Aspergillus niger* et *Candida albicans* (KUSARI *et al.*, 2008).

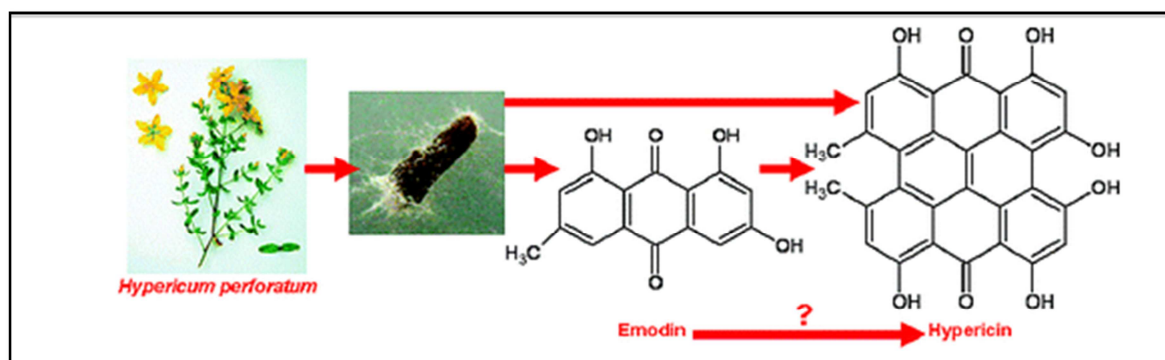


Figure 36 : Structure des métabolites antimicrobiens isolés de *Hypericum perforatum* (KUSARI *et al.*, 2008).

2.1.3.5. Composés immunomodulateurs

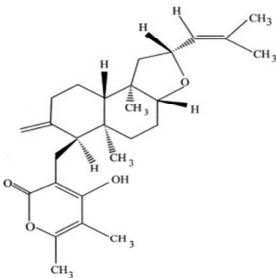
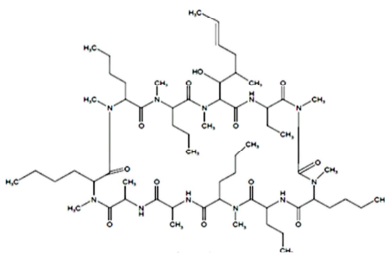
Les immunomodulateurs sont des substances qui modifient la réponse immune de l'organisme en le stimulant ou en la déprimant, selon les doses utilisées. Les systèmes immuns concernés sont les macrophages, les lymphocytes B ou T (BEAU, 2001). Ces composés sont classés en médicaments immunosuppresseurs et immunorégulateurs (KAUL *et al.*, 2012).

Les médicaments immunosuppresseurs sont utilisés d'une part pour prévenir les rejets des greffons chez les patients greffés et d'autre part pour le traitement des dysfonctionnements auto-immuns, l'arthrite rhumatoïde (TENGURIA *et al.*, 2011) ; les immunorégulateurs ont le pouvoir de renforcer le système immunitaire et les défenses de l'organisme. Ils sont utilisés pour le traitement de l'allergie, les cancers et les maladies infectieuses (BEAU, 2001).

Un nombre important d'immunomodulateurs ont été isolés des mycoendophytes (KAUL *et al.*, 2012). Le subglutinol-A ($C_{27}H_{38}O_4$) (Tableau XII) et le subglutinol-B sont d'importants composés immunosuppresseurs, qui sont des diterpènes pyrones non-cytotoxiques. Ils ont été isolés et caractérisés à partir de l'endophyte *Fusarium subglutinans*, qui colonise *Tripterygium wilfordii*. (KAUL *et al.*, 2012 ; KHARWAR *et al.*, 2014). La

cyclosporine-A ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$) (Tableau XI) et l'acide mycophénolique sont des métabolites fongiques immunosuppresseurs très puissants, utilisés pour le traitement des maladies auto-immunes et la transplantation d'organes. Ils ont été extraits d'espèces de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssoschlamys* et *Septoria* (KAUL *et al.*, 2012). C'est le cas de *Trichothecium roseum*, qui produit des cyclopeptides trichomides A et B possédant aussi un pouvoir immunosuppresseur (ZHANG *et al.*, 2015).

Tableau XII : Quelques composés bioactifs immunosuppresseurs issus de mycoendophytes.

Nom du composé	Structure chimique	Référence
Subglutininol A		STROBEL et DAISY (2003)
Cyclosporine A		KAUL <i>et al.</i> (2012)

2.1.4. Mycoendophytes sources de peptides à activités biologiques

Les peptides issus des endophytes sont un agencement d'acides aminés, présents aussi bien chez les bactéries que chez les champignons non endophytes (PAN *et al.*, 2008).

2.1.4.1. Peptides à activité anticancéreuse

Plus de 60% des médicaments anticancéreux actuellement en usage clinique sont des produits naturels ou des dérivés de produits naturels (ABDALLA *et al.*, 2010 ; McALPINE *et al.*, 2005).

Deux lipopeptides cycliques, les fusaristatines A et B ont été isolés d'un champignon endophyte : *Fusarium sp.* (YG-45) à partir des cultures de riz. La fusaristatine B possède un effet inhibiteur modéré sur les topoisomérases I (IC_{50} : $73\mu M$) et II (IC_{50} : $98\mu M$) sans complexes clivables. De plus, les fusaristatines A et B ont démontré une activité inhibitrice de

la croissance vis-à-vis des cellules cancéreuses du poumon LU 65, avec des valeurs de IC₅₀ de 23 et 7 μ M, respectivement (SHIONO *et al.*, 2007) (Figure 37).

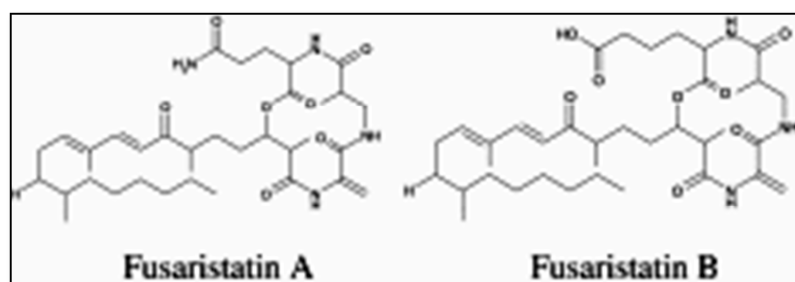


Figure 37: Structure des fusaristatines A et B isolées de *Fusarium* sp.
(SHIONO *et al.*, 2007).

2.1.4.2. Peptides à activité antimicrobienne

La recherche de nouvelles structures à partir de micro-organismes a augmenté au cours des quatre dernières décennies (ABDALLA 1 *et al.*, 2011). Il existe une nécessité urgente pour de nouveaux composés antimicrobiens ainsi que des stratégies de traitement, de vaincre la difficulté accrue de contrôler les infections bactériennes et les niveaux de résistance aux antibiotiques des souches pathogènes (ABDALLA 2 *et al.*, 2011). Actuellement, les peptides actifs membranaires antimicrobiens produits par des microorganismes ont un grand intérêt et sont des cibles importantes d'investigations intensives dans le monde (SETO *et al.*, 2007 ; CHRISTINA *et al.*, 2013). Des peptides cycliques antibactériens : cyclo- (Pro-Thr) et cyclo- (Pro-Tyr) (Figure 38) ont été produits par fermentation du champignon endophyte *Penicillium* sp. isolé de la plante de mangrove *Acrostichum aureum*. Les deux composés ont démontré une activité contre *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (CUI *et al.*, 2008).

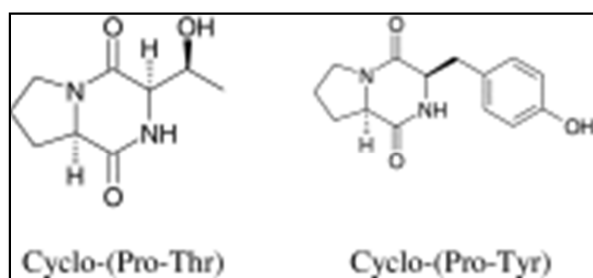


Figure 38 : Structure des Cyclo-(Pro-Thr) et Cyclo- (Pro-Tyr) à activité antibactérienne isolés de *Penicillium* sp. champignon endophyte isolé de *Acrostichum aureum* (CUI *et al.*, 2008).

2.1.5. Peptides issus des mycoendophytes : les futurs médicaments

Dans l'histoire de la découverte des médicaments, les méthodes de production de médicaments à base de peptides font l'objet de beaucoup de recherches. Les produits naturels classiques et les petits composés seront remplacés par des peptides générés au moyen d'une biosynthèse combinatoire, de méthodes sophistiquées génomiques, protéomiques et transcriptomiques (Figure 39) (BUTLER, 2008 ; KINGSTON, 2011).

Les enzymes NRPS (synthétases de peptides non ribosomiques) sont capables d'hydrolyser de nombreux dérivés peptidiques en utilisant un seul complexe enzymatique. Les peptides non ribosomiques sont linéaires, cycliques ou ramifiés et peuvent être modifiés par glycosylation, N-méthylation ou acylation (SCHWARZER et MARAHIEL, 2001 ; VON DOHREN *et al.*, 1997). Plusieurs agents antibiotiques, anticancéreux et immunosuppresseurs ont été synthétisés (RAJA *et al.*, 2003). La biosynthèse de la plupart de ces produits naturels est contrôlée par des groupes de gènes uniques (ALVIN *et al.*, 2014 ; HOFFMEISTER et KELLER, 2007).

Beaucoup de mycoendophytes n'ont pas été étudiés, il est nécessaire de les trier en utilisant des études de NRPS, afin de créer une base de données de ces microorganismes producteurs de peptides. Certains d'entre eux peuvent ne pas produire des peptides, parce que leurs groupes de gènes NRPS sont silencieux. La recherche devrait donc concentrer ses efforts sur les mécanismes de biosynthèse utilisés par les peptides synthétases non ribosomiques des endophytes, ce qui pourrait conduire à une optimisation de la production de ces peptides pour des études biotechnologiques et pharmacologiques (ABDALLA et MATASYOH, 2014).

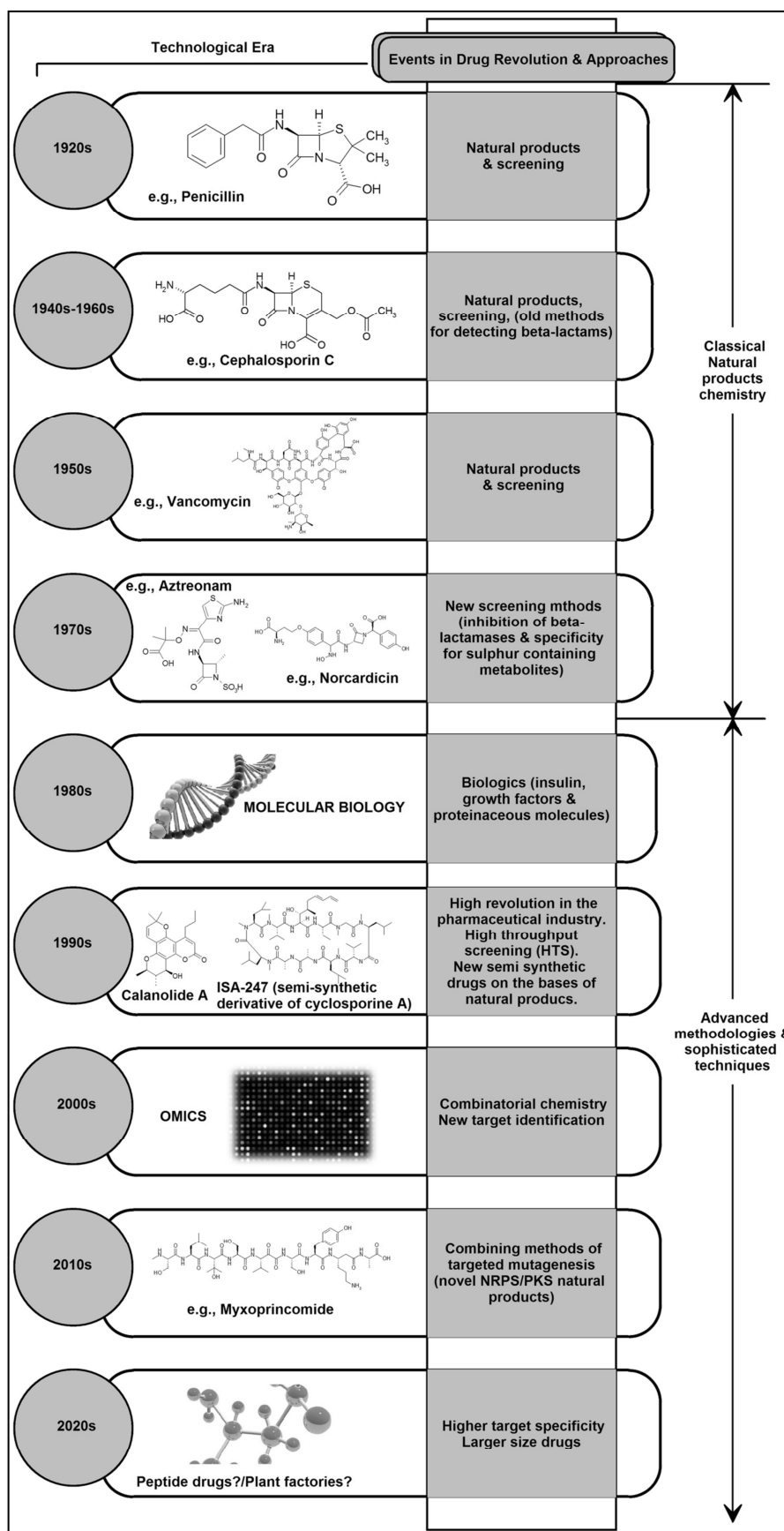


Figure 39 : Des approches importantes dans la découverte du médicament (ABDALLA et MATASYOH, 2014).

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Présentation des mycéliums des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* concernés

Les mycéliums des quatre genres les plus abondants : *Cladosporium* (Cl), *Alternaria* (Al), *Aspergillus* (As), *Penicillium* (Pe) ont été utilisés dans notre travail (Figure 40). Ils ont été isolés, identifiés et purifiés à partir des feuilles de *Peganum harmala* récoltée dans la région aride de Timzerth (Laghout), au mois d'avril 2015. Le tableau XIII regroupe les différentes caractéristiques générales et culturelles de ces souches fongiques.

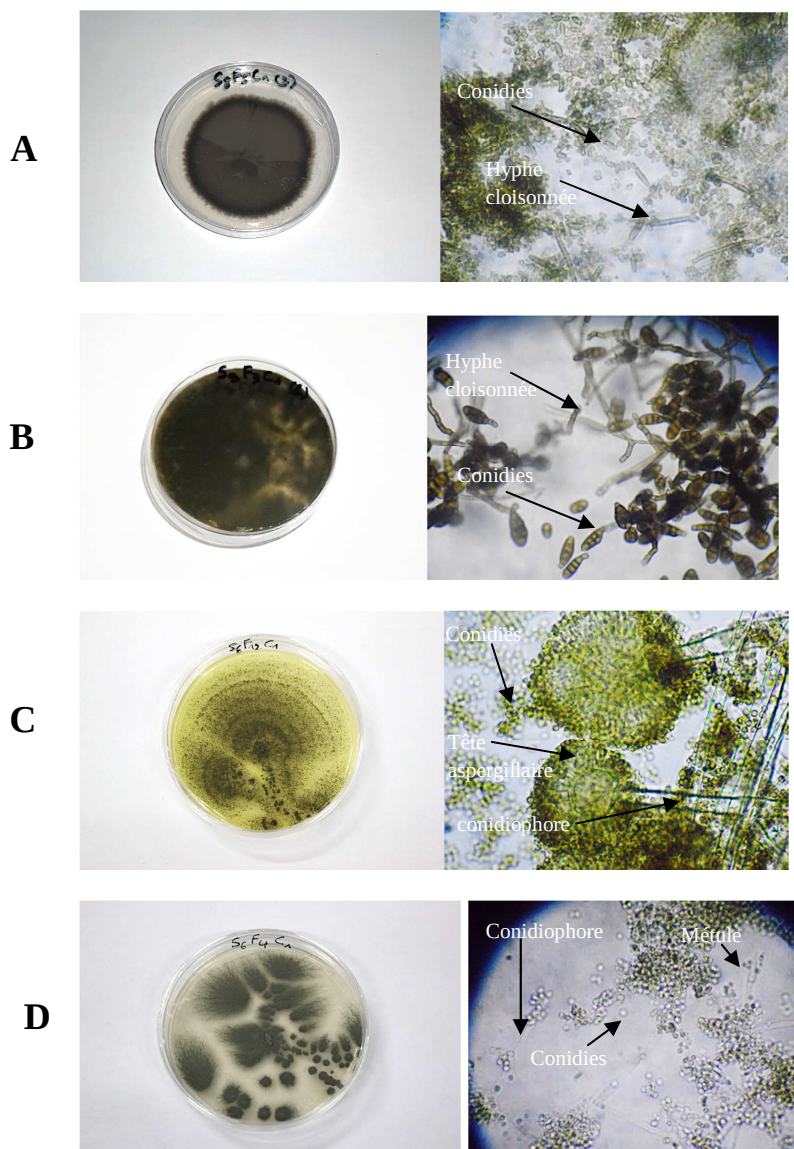
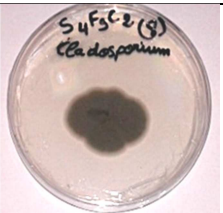
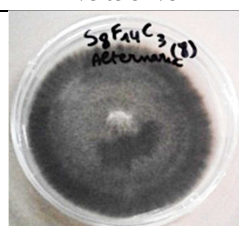


Figure 40 : Genres de champignons endophytes les plus abondants au niveau des feuilles de *Peganum harmala* L., observations sous microscope optique (X2000) et boîtes à l'œil nu.

A : *Cladosporium*, B : *Alternaria*, C : *Aspergillus* et D : *Penicillium*.

Tableau XIII: Description des mycéliums de mycoendophytes foliaires utilisés de *Peganum harmala*

Les genres de champignons	Caractéristiques générales	Caractéristiques culturelles des champignons endophytes utilisés
<i>Cladosporium</i>	Les <i>Cladosporium</i> ont une croissance lente, à modérément rapide sur tous les milieux de mycologie. Ils ne sont pas inhibés par le cycloheximide. Ils ne poussent généralement qu'à 20-25°C. Les colonies ont une texture veloutée ou floconneuse, parfois poudreuse. La couleur va du vert olive au brun noir très foncé et le revers est brun noir. Les hyphes, septés, sont pigmentés. Ils produisent des conidiophores (encore plus foncés) et forment de longues chaînes acropètes, ramifiées, réalisant des arbuscules fragiles. Ils synthétisent des toxines (cladosporine, emodine) (OGOREK <i>et al.</i> , 2012).	 Colonies veloutées de couleur verte olive
<i>Alternaria</i>	Après 7 jours de culture, les colonies apparaissent noires et duveteuses et présentent une texture épaisse, thalles brun-noir, veloutés, portant des spores de reproduction asexuée produites en grosses quantités, rugueuses et sombres, de forme ovale elliptique et présentent des stries longitudinales et transversales, parfois, une excroissance verruqueuse à l'extrémité des chaînes de spores. Résiste à la sécheresse (THOMMA, 2003). Les espèces d' <i>Alternaria</i> produisent des toxines tel que l'alternariol, l'alternariole monométhyle éther, altenuene, altertoxins I, II, III, tenuazonic acid et bien d'autres métabolites toxiques (OSTRY, 2008).	 Colonies rugueuses à centre bombé de couleur brune foncée
<i>Aspergillus</i>	Les <i>Aspergillus</i> présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques additionnés d'antibiotiques. La majorité poussent à 22-25°C ; les espèces thermophiles se développent à 37-40°C, parfois jusqu'à 57°C. Ils forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. Les colonies prennent des teintes caractéristiques, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces et peuvent synthétiser des toxines tel que les aflatoxines, ochratoxine A, fumagiline, l'acide helvolique, la gliotoxine, les dérivés quinoniques et des alcaloïdes (TABUC, 2007).	 Colonies poudreuses et granuleuses de couleur noire aux contours clairs
<i>Penicillium</i>	Les <i>Penicillium</i> se développent rapidement et facilement sur les milieux de mycologie. Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. les colonies sont habituellement duveteuses, poudreuses. La sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge. La majorité d'espèces du genre <i>Penicillium</i> sont capables de produire des mycotoxines : l'acide cyclopiazonique, l'acide pénicillique ; la patuline ou la clavacine, la citrinine, l'ochratoxine A (TABUC, 2007).	 Colonies duveteuses de couleur verte aux contours blancs

2.2.2. Fermentation et extraction des métabolites secondaires fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*

Les champignons endophytes sélectionnés : *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont été mis en culture sur milieu PDA, à température ambiante pendant sept jours. Deux à trois pièces (0.5 x 0.5 cm) de chaque champignon ont été inoculées dans des erlenmeyers de 500ml contenant 100ml de PDB et répété deux fois (XIAOLING *et al.*, 2010). Ils sont ensuite incubés à température ambiante pendant trois à quatre semaines, avec une agitation périodique à 150 tours/minute. Par la suite, le contenu est filtré à travers une gaze stérile, afin de séparer le mycélium du bouillon de culture (MOHANTA *et al.*, 2008 ; BARIK *et al.*, 2010). Ce dernier est centrifugé à 5000 tours/min (2795g) pendant 15min et le surnagent est récupéré (MADKI *et al.*, 2010).

On réalise une extraction à l'acétate d'éthyle, meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires fongiques selon BADJI *et al.* (2005) ; GOGOI *et al.* (2008) et QIN *et al.* (2009). A chaque filtrat, on rajoute un volume égal de solvant et on le met sous agitation pendant 30 min à 40°C. La solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décanter pour séparer les deux phases. La phase organique est récupérée pour être concentré sous pression, par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C (MOHANTA *et al.*, 2008; OLIVEIRA SILVA *et al.*, 2009).

2.2.3. Préparation de l'extrait de feuilles de *Peganum harmala*

Les feuilles récoltées ont été séchées à l'ombre et à température ambiante, puis réduites en une fine poudre. 1g de la poudre est additionné à 10 ml d'une solution aqueuse constituée d'acétate d'éthyle : eau distillée (8 : 2 v/v), centrifugée à 4000 tours (1789g) pendant 15 min pour recueillir le surnageant. Ce processus est répété trois fois. Ensuite, le solvant est éliminé par évaporation (DARABPOUR *et al.*, 2010).

2.2.4. Etude de l'activité antimittotique des extraits fongiques bruts des mycoendophytes

La méthode adoptée par SHWETA *et al* (2012) avec quelques modifications a été utilisée pour la détermination de l'activité antimittotique, en utilisant les racines d'*Allium cepa*. Des bulbes d'*Allium cepa* sont mis à germer dans l'eau pendant 48-72 heures, à température ambiante. Les extrémités des racines uniformes sont sélectionnées pour notre étude. Ces dernières sont mises dans les différents extraits fongiques bruts de *Cladosporium*, d'*Alternaria*, d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Des combinaisons d'extraits fongiques sont

réalisées à savoir : *Aspergillus/Penicillium*, *Alternaria/Cladosporium*, *Cladosporium/Penicillium*, *Alternaria/Aspergillus*, *Cladosporium/Aspergillus* et *Alternaria/Penicillium*. Nous avons considéré aussi l'extrait foliaire de *Peganum harmala* et cela pendant 48 heures pour tous les extraits. Quelques pointes de racines aussi ont été mises dans de la colchicine utilisée comme standard. Après 48h, les pointes des racines sont fixées dans une solution composée d'acide acétique et d'alcool (1:3). Les racines ainsi fixées sont colorées par du carmin acétique. La morphologie et le nombre de cellules sont observés au microscope optique (X400). Le nombre de cellules totales est estimé à 400 cellules. Ces cellules apparaissent dans différentes étapes de la mitose, à savoir l'interphase et prophase (P), la métaphase (M), l'anaphase (A) et la télophase (T) ont été enregistrées. L'indice mitotique est calculé selon la formule suivante (SHWETA *et al.*, 2012; SUBHADRADEVI *et al.*, 2011) :

$$\text{Indice mitotique} = \frac{\text{P} + \text{M} + \text{A} + \text{T}}{\text{Nombre total des cellules}} \times 100$$

2.2.5. Etude de l'activité antiproliférative des extraits fongiques bruts des mycoendophytes

L'évaluation de l'activité antiproliférative de l'extrait fongique a été effectuée suivant le protocole de SHWETA *et al.* (2012), utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle de cellule eucaryote. La préparation de l'inoculum de levure est réalisé dans du PDB, incubé à 37°C pendant 24 heures.

Pour la détermination de la viabilité cellulaire, nous préparons 13 tubes avec dans chacun 2,5ml de PDB et 0,5ml d'inoculum de levure (DO=0.1 à 650nm). Dans le premier tube, nous rajoutons de l'eau distillée, dans le deuxième la quercétine en tant que standard (1mg/ml), dans le troisième la colchicine comme second standard. Dans les 10 tubes restants, nous additionnons les extraits fongiques bruts seuls et les différentes combinaisons d'extraits fongiques. Tous les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, on rajoute dans tous les tubes du bleu de méthylène (0.1%). Le nombre de cellules ainsi que leurs couleurs sont observés sous microscope optique. Les cellules ovales transparentes sont des cellules vivantes, par contre celles colorées en bleu sont des cellules mortes. Leur comptage est effectué dans 16 chambres d'hémocytomètre et le nombre moyen de cellules est calculé.

Le pourcentage de la viabilité cellulaire est calculé en utilisant la formule suivante (SEHGAL *et al.*, 2006) :

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{\text{Nombre de cellules mortes}}{\text{Nombre de cellules mortes} + \text{Nombre de cellules vivantes}} \times 100$$

2.2.6. Etude de l'activité antioxydante des extraits fongiques bruts et de l'extrait foliaire

2.2.6.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyle) est un radical libre stable violet en solution. Il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en DPPH-H (diphényle picryl hydrazine), par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (Figure 41). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (SANCHEZ-MORENO, 2002 ; PISOSCHI *et al.*, 2009).

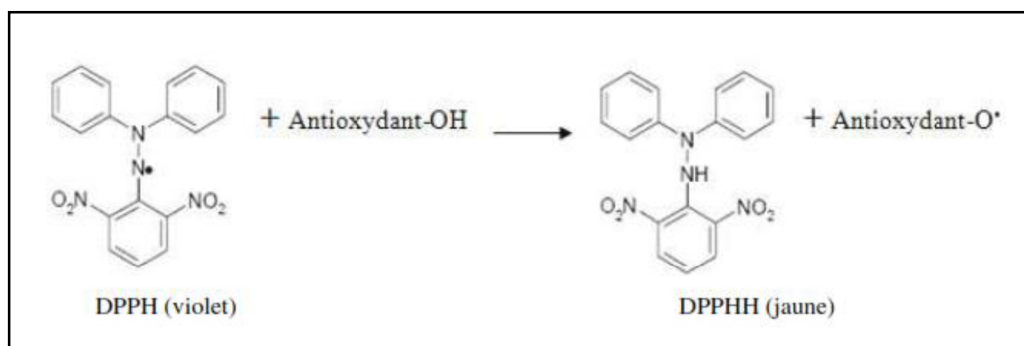


Figure 41 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (CONGO, 2012).

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, nous avons utilisé le test de piégeage du radical libre DPPH (SANCHEZ-MORENO *et al.*, 1998), qui est défini par l'indice d'inhibition de l'activité radicalaire en pourcentage, où le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique, dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons (extraits de métabolites secondaires fongiques bruts de *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium*, ainsi que l'extrait foliaire). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol

(solution DPPH à 0.002%). 50µl des solutions d'extrait fongique et foliaire, ainsi que le standard sont ajoutés à 1.95 ml de solution de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min. Un contrôle négatif qui contient uniquement la solution de DPPH est réalisé. Les absorbances sont mesurées à 517nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) suivant la formule suivante :

$$I\% = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle

At : Absorbance du test.

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, la concentration inhibitrice IC₅₀ de l'antioxydant a été estimée, elle correspond à une réduction de 50% de l'activité du DPPH• dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC₅₀ est petite. L'indice IC₅₀ montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• de 50% (SANCHEZ-MORENO *et al.*, 1998). Les valeurs des IC₅₀ sont déterminées graphiquement par la régression linéaire.

2.2.6.2. Dosage des polyphénols

Les polyphénols sont déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2007 par LI et ses collaborateurs. 200 µl d'extrait fongique ou foliaire est mélangé avec 1ml de réactif de Folin Ciocalteu (FCR), dilué 10 fois dans de l'eau distillée. Après 4 minutes, 800µl de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à concentration de 7,5 g/l sont ajoutés. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 1 à 2 heures, à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0-300µg/ml), dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés par milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

2.2.7. Etude de l'activité antibactérienne *in vitro* des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*

Conscient de l'importance que nous attribuons aujourd'hui aux recherches de nouvelles substances naturelles, susceptibles de présenter des activités intéressantes, nous nous proposons, dans ce sens, d'évaluer le potentiel de quelques champignons endophytes

associés aux feuilles de *Peganum harmala* concernant ces activités. Il s'agit d'une recherche préliminaire sur les potentiels antibactériens de ces champignons.

L'émergence de la résistance aux antibiotiques, suite à l'utilisation massive et parfois abusive de ces derniers est devenue un réel problème de santé publique. Certaines bactéries manifestent un certain degré de résistance vis-à-vis des antibiotiques usuels, voire parfois une résistance totale à toute thérapeutique, d'où l'intérêt de rechercher de nouvelles substances d'origine naturelle incluant les plantes. Ainsi, un grand intérêt est porté aux propriétés antimicrobiennes des extraits de plantes aromatiques ainsi qu'à leurs champignons endophytes.

2.2.7.1. Matériel bactérien

Les souches bactériennes utilisées sont des souches pures de références connues, disponibles au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou, qui sont *Enterococcus faecalis* (ATCC 49452), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (FRI 326), *Staphylococcus aureus* (FRI S6), *Staphylococcus aureus* (FRI 361), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Staphylococcus aureus* (MU 50 mecA), *Staphylococcus aureus* (FRI 137), *Bacillus cereus* (ATCC 10876) et *Bacillus cereus* (ATCC 14579) (Annexe 3).

Une étude bibliographique a été réalisée sur ces souches afin de mettre en lumière leurs différentes caractéristiques, résistance aux antibiotiques ainsi que les maladies qu'elles génèrent.

Staphylococcus aureus : cocci Gram-positif, c'est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Il est impliqué dans une très grande variété d'infections communautaires ou nosocomiales : furoncles, abcès, fascistes, arthrites septiques, ostéomyélites, septicémies, pneumopathies, diarrhées infectieuses, endocardites, méningites etc (VIEU, 2014). Les *S. aureus* résistantes, en particulier *S. aureus* MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) tel que *S. aureus* (MU50) et *S. aureus* (ATCC 43300), sont les plus importants pathogènes à l'échelle mondiale (ARIVUDAINAMBI *et al.*, 2014).

Le staphylocoque doré ne possède aucune résistance naturelle aux antibiotiques. L'utilisation massive des pénicillines G et V a conduit à l'émergence de bactéries résistantes à ces molécules (VIEU, 2014). Plus de 80 % des souches produisent une pénicillinase (DAUREL ET LECLERCQ, 2008). Les *S. aureus* possèdent une très grande plasticité génétique. Sous la pression de sélection des antibiotiques, ils ont très vite acquis des gènes

portés par des plasmides codant pour des pénicillinases. Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le cycle β -lactame des pénicillines G, V et A (VIEU, 2014).

Le traitement des infections causées par ces souches est simple. Il repose sur l'utilisation de pénicillines semi-synthétiques, stables à l'action des pénicillinases type oxacilline ou alors, d'amoxicilline additionnée d'un inhibiteur de β -lactamase type acide clavulanique (VIEU, 2014).

Bacillus cereus : il s'agit de bacilles Gram-positif, pouvant apparaître Gram-négatif ou Gram variable sur les cultures anciennes, mobiles par ciliature pérित्रiche, poussant bien sur milieu ordinaire en 24 heures, aéroanaérobie, possédant une cytochrome oxydase, une lécithinase et une gélatinase, très hémolytique et résistant à la pénicilline G (TEYSSOU *et al.*, 1998).

Les infections à *B. cereus* peuvent être classées en trois catégories.

Les infections digestives surviennent dans le cadre de toxi-infections alimentaires collectives et déterminent deux tableaux cliniques distincts en fonction du type de toxine produite par la bactérie : syndrome diarrhéique lié à la production d'une entérotoxine, ou vomissements diffus dus à la présence d'une toxine émetissante thermostable préformée dans l'aliment (TEYSSOU *et al.*, 1998)

Les infections locales et systémiques surviennent sur des terrains prédisposés : plaies, blessures et effractions cutanées pour les infections locales, immunodépression pour les infections systémiques (TEYSSOU *et al.*, 1998).

B. cereus est peu sensible aux β -lactamines, il possède une β -lactamase chromosomique, inhibée par l'acide clavulanique et non par l'EDTA. Elle est responsable de la résistance naturelle à la pénicilline G et aux amino- et carboxypénicillines. Les céphalosporines sont peu actives. *B. cereus* produit également une carbapénémase chromosomique, inhibée par l'EDTA. La présence de cette enzyme est responsable de la résistance *in vitro* à l'imipénème et à de nombreuses autres β -lactamines. En revanche, *B. cereus* est toujours sensible à l'érythromycine, à la clindamycine, au chloramphénicol, à la vancomycine, aux aminosides, aux cyclines et aux sulfamides. Il est naturellement résistant au triméthoprim (TEYSSOU *et al.*, 1998).

Enterococcus faecalis : c'est un coccobacille Gram-positif, commensale du tube digestif d'un grand nombre d'organismes, dont l'homme. D'autre part, il peut survivre de longues périodes dans le milieu extérieur hostile, dont la présence est considérée comme un indice de contamination fécale (CHINGWARU *et al.*, 2003; FISHER et PHILLIPS, 2009). Il n'intervient que comme pathogène occasionnel, entraînant des infections urinaires ou des

suppurations profondes et plus rarement, des endocardites ou des septicémies. En outre, ces *E. faecalis* sont des bactéries multi-résistantes aux glycopeptides ou aminoglycosides (comme les vancomycin-resistant enterococcus) et les souches virulentes expriment une exotoxine, appelée cytolyse, qui peut provoquer la lyse des cellules bactériennes ou eucaryotiques (VAN TYNE *et al.*, 2013).

2.2.7.2. Autre matériels et milieux utilisés

- Boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre
- Milieu gélosé PDA (Potato dextrose agar)
- Milieu solide MH (Mueller Hinton)
- BHI (Brain Heart Infusion)
- Disques d'antibiotique (chloramphénicol 30 µg)
- Pipettes pasteur en verre
- Ecouvillons
- Eau distillée
- Deux béc benzène
- Un spectrophotomètre (UVmini-1240, uv-vis spectrophotometer, SHIMADZU).

2.2.7.3. Méthodes utilisées

2.2.7.3.1. La double culture de diffusion sur gélose

Cette technique a été décrite par MANDEEL *et al.* (1998) et DEVARAJU et SATISH (2011). Les cultures de 8 jours de mycélium de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* sont utilisées pour tester leur pouvoir antibactérien.

- **Préparation des mycoendophytes tests**

Les champignons endophytes préalablement isolés, identifiés et purifiés sont repiqués aseptiquement entre deux béc benzène, dans des boîtes de Pétri contenant du PDA, exempt d'antibiotiques et incubés à température ambiante pendant 8 jours.

- **Préparation des souches bactériennes d'essai**

Les souches bactériennes sélectionnées sont revivifiées en les repiquant aseptiquement sur un milieu nutritif BHI et incubées à 37°C pendant 18 à 24 h avant d'être utilisées.

- **Préparation de l'inoculum et ajustement de la turbidité**

L'inoculum est préparé à partir des cultures fraîches de 18 à 24h qu'on a préalablement réalisées. Quelques colonies bien distinctes sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur. L'inoculum est déchargé dans 100µl d'eau physiologique stérile à 0,9%. La densité de la suspension bactérienne obtenue est bien homogénéisée et ajustée au standard 0,5 McFarland (soit une DO entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde de 625nm, soit 10^8 unité formant colonie (UFC/ml) et utilisé dans les 15 mn de sa préparation (NAKAMURA *et al.*, 1999 ; VALGAS *et al.*, 2007; DEVARAJU et SATISH, 2011).

- **Screening préliminaire de l'activité antibactérienne des mycoendophytes**

Tout d'abord, la suspension bactérienne est ensemencée aseptiquement à l'aide d'un écouvillon stérile sur des boîtes de Pétri, contenant le milieu MH. L'écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis essoré en le faisant tourner sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum de l'excédent. Le milieu MH est frotté sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas, en stries serrées en tournant la boîte d'environ 60° à chaque fois, puis autour des bords de la boîte pour une distribution uniforme de l'inoculum (SCORZONI *et al.*, 2007).

Des disques de 6mm de diamètre d'agar de cultures de 8 jours de nos mycoendophytes foliaires sur gélose PDA sont découpés aseptiquement et disposés sur gélose MH, dans les boîtes préalablement inoculées par les suspensions bactériennes (MANDEEL *et al.*, 1998). Un disque d'antibiotique chloramphénicol (C : 30µg) qui est un antibiotique bactériostatique, thermostable avec un large spectre antibactérien qui inhibe la synthèse des protéines en agissant sur le ribosome bactérien, est déposé comme témoin dans chaque boîte.

Après 20mn à température ambiante et afin de permettre la diffusion des métabolites actives sécrétées par les mycoendophytes, les boîtes de Pétri sont mises à incuber à 37°C pendant 24 h (MANDEEL *et al.*, 1998 ; DEVARAJU et SATISH, 2011). L'expérience a été répétée trois fois et les diamètres des zones d'inhibitions autour des blocs de gélose, correspondant à l'activité antibactérienne sont mesurés puis consignés. Dans ce premier screening, les disques des mycéliums des mycoendophytes foliaires ont été disposés ensemble dans chaque boîte inoculée par les différentes souches bactériennes ainsi que le disque d'antibiotique control (Figure 42).

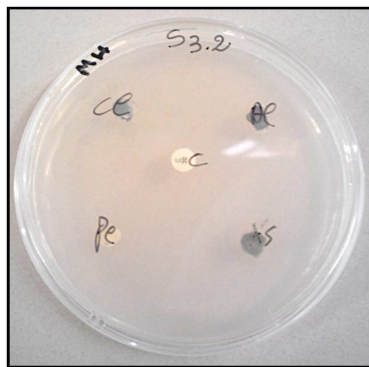


Figure 42 : Technique de diffusion des mycéliums de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* sur gélose.

Cl : mycélium de *Cladosporium*, **Al :** mycélium d'*Alternaria*, **As :** mycélium d'*Aspergillus*, **Pe :** mycélium de *Penicillium*, **C :** chloramphénicol

2.2.7.3.2. Détection de l'activité antibactérienne des mycéliums de mycoendophytes foliaires sélectionnés par le screening

Pour cette seconde manipulation, le même protocole que la première a été suivi. Cinq des dix souches bactériennes qui présentaient une zone d'inhibition significative avec les trois champignons endophytes foliaires, à savoir *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* sont sélectionnées. Les mycéliums de mycoendophytes sont disposés chacun seul dans une boîte de Pétri (Figure 43).

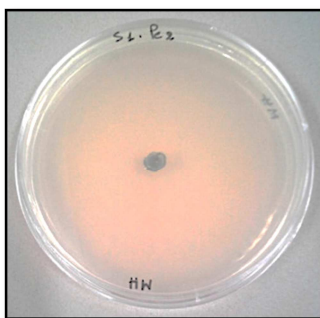


Figure 43 : Technique de diffusion des disques de mycéliums de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* sur gélose (un seul disque de mycélium par boîte).

La sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis des champignons endophytes et de l'antibiotique est estimée en mesurant la zone d'inhibition autour de chaque disque après 18 heures et 48 heures d'incubation. La présence de zones d'inhibition est observée autour des disques des mycoendophytes, produisant des métabolites antibactériens actifs contre la souche

test. Plus cette zone est grande, plus l'activité antibactérienne est importante (Figure 44). Le tableau XIV permet d'évaluer le degré de sensibilité des bactéries à un antibiotique donné et de qualifier par conséquent le spectre d'action de l'antibiotique vis-à-vis des bactéries.

Tableau XIV : Normes utilisées dans l'expression de la sensibilité des bactéries au chloramphénicol avec des disques de 6 mm de diamètre (RAVELOMANANTSOA, 2004).

Diamètre de la zone d'inhibition (ZI) en mm	Sensibilité des bactéries
ZI < 7	Résistant
7 < ZI < 9	Sensible
ZI > 9	Très sensible

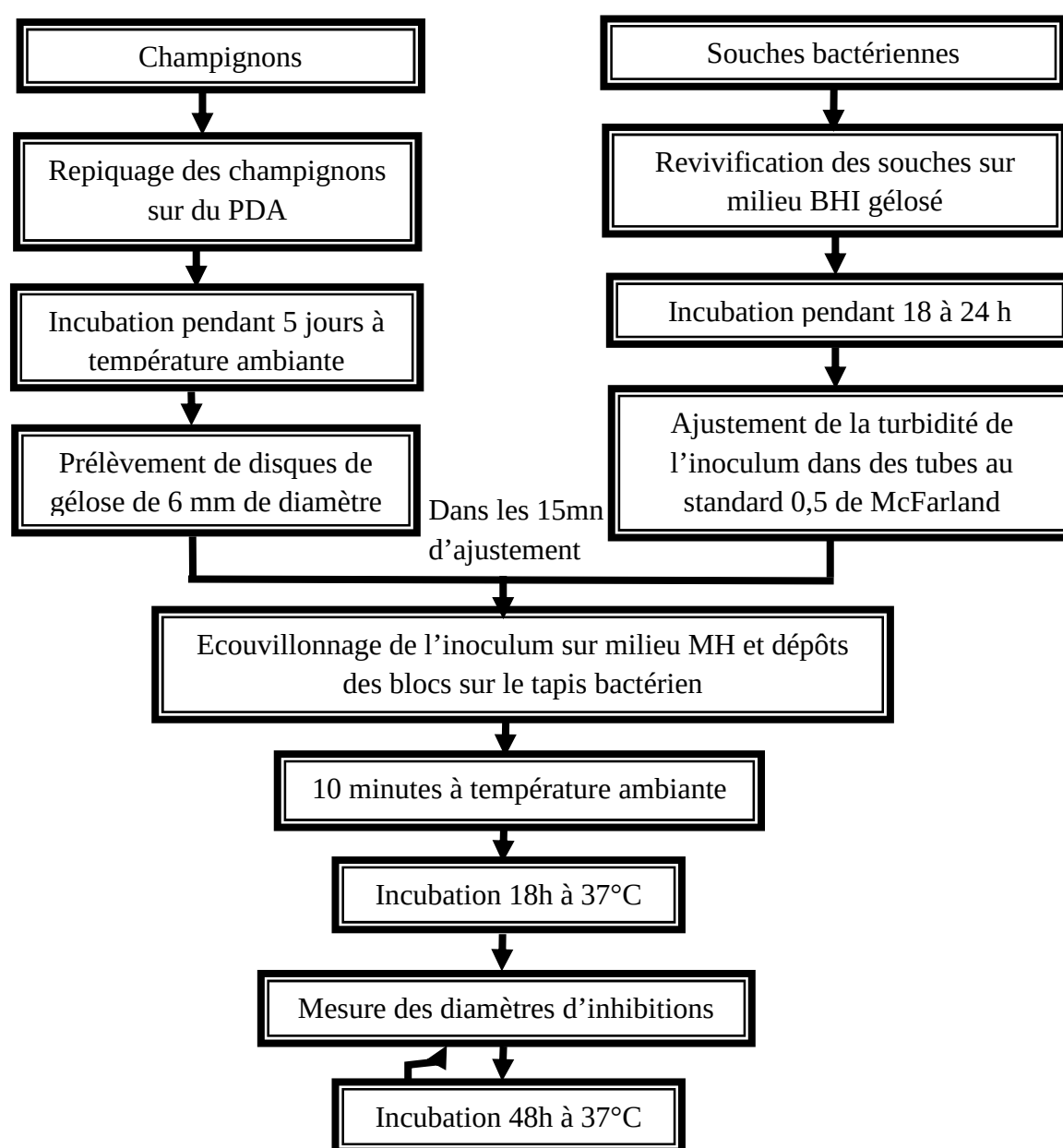


Figure 44 : Schéma récapitulatif de la technique de double diffusion sur gélose.

2.2.8. Analyse statistique

L'étude statistique est réalisée avec le logiciel d'analyse et de traitement statistique : STATBOX 6.40. Les indices mitotiques et les pourcentages de cytotoxicité sont calculés. Des ANOVA sont réalisées afin de mettre en évidence la signification des différences obtenues entre les extraits et les standards utilisés. Un test complémentaire de comparaisons multiples des moyennes est réalisé pour classer les différents extraits fongiques testés en groupes homogènes. Le test est réalisé afin de mettre en évidence le pouvoir antimitotique et antiprolifératif des extraits de champignons endophytes foliaires de *Peganum harmala* et les standards utilisés, de mettre en évidence les différences potentielles d'efficacité entre les extraits fongiques et des éventuelles interactions qui peuvent y avoir entre ces mycoendophytes.

Les IC50 des extraits fongiques et de l'extrait foliaire ont été calculé ainsi que la teneur en polyphénols de ces derniers. Des analyses statistiques de variance (ANOVA) ont été réalisées afin de mettre en évidence les résultats obtenus avec les différents extraits ainsi qu'avec les standards utilisés. De même pour mettre en évidence les différences entre les zones d'inhibitions des différents mycoendophytes vis-à-vis de chacune des souches bactériennes testées. La différence entre les activités antibactériennes des quatre champignons endophytes testés, mais aussi entre ces derniers et l'antibiotique utilisé a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est ≤ 0.05 (Annexe 2). De ce fait, un test complémentaire de comparaisons multiples des moyennes (Newman-Keuls) a été réalisé pour classer les champignons en groupes homogènes, afin de mettre en évidence le comportement des champignons endophytes foliaires de *Peganum harmala* et de l'antibiotique testés vis-à-vis des souches bactériennes, de mettre en évidence les différences potentielles d'efficacité entre les champignons et des éventuelles interactions qui peuvent y exister.

2.3. Résultats et discussions

2.3.1. Activité antimitotique

Les essais antimitotiques ont révélé que les extraits de métabolites secondaires fongiques bruts des différents genres, ainsi que les différentes combinaisons présentent une inhibition de la division des cellules méristématiques, à différents stades du cycle cellulaire. Comparativement aux différentes phases mitotiques normales (Figure 45), nous avons constaté un rétrécissement des cellules, une distribution chromosomique anormale à la

métaphase, des agglutinations chromosomiques à l'anaphase, une dégénérescence chromosomique ainsi que des cellules gigantesques (Figure 46).

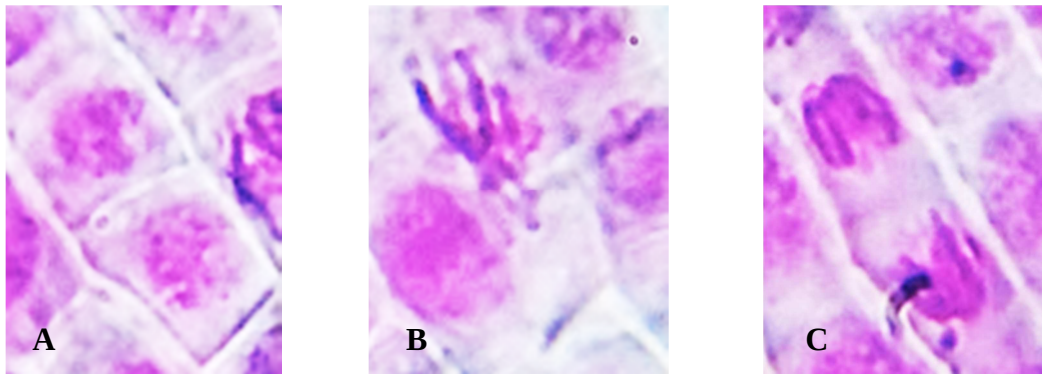


Figure 45 : Phases mitotiques normales (X3100).

A) Interphase, B) Métaphase, C) Anaphase

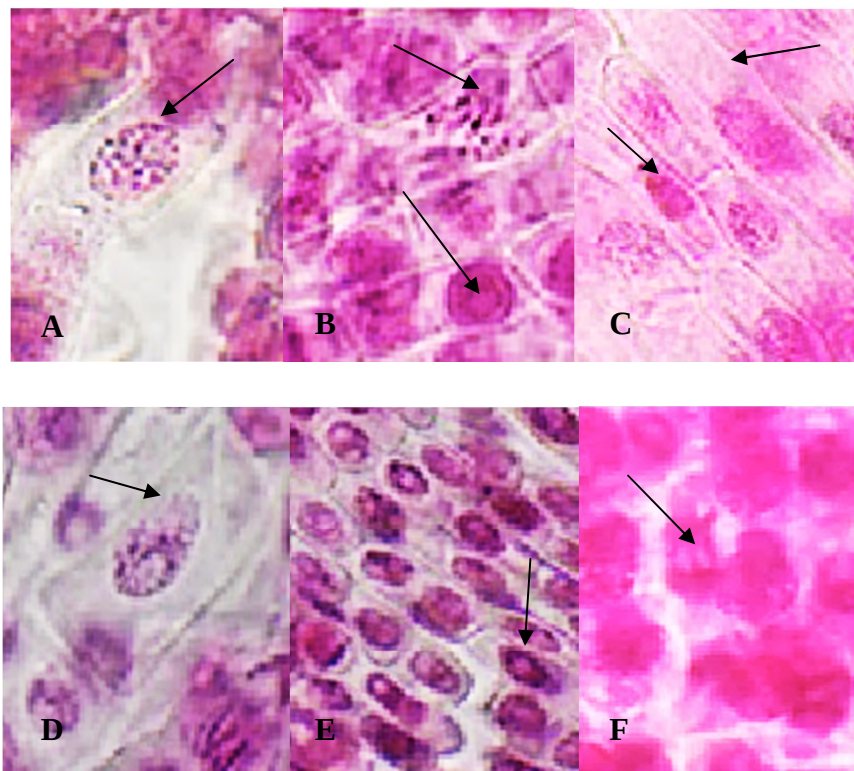


Figure 46 : Anomalies chromosomiques, nucléaires et cellulaires (X1440).

A) distribution anormale des chromosomes après métaphase, B) dégénérescence et agglutination chromosomique, C) Allongement des cellules et rétrécissement du noyau, D) cellule gigantesque avec large noyau, E) Agglutinations chromosomiques, F) Ponts et Agglutinations chromosomiques.

Les indices mitotiques retrouvés sont de 32,30% pour l'extrait brut de *Cladosporium*, 32,15% pour l'extrait brut d'*Alternaria*, 43,80% pour l'extrait brut d'*Aspergillus*, 42,50% pour l'extrait brut de *Penicillium*, 32,05% pour l'extrait brut d'*Aspergillus/Penicillium*, 30,85% pour l'extrait d'*Alternaria/Cladosporium*, 33,45% pour *Alternaria/Penicillium*, 37,15% pour *Cladosporium/Aspergillus*, 27,95% pour *Cladosporium/Penicillium*, 28,60% pour *Alternaria/Aspergillus*, 34% pour l'extrait de colchicine, tandis que le témoin non traité a montré un indice de 79,95% (Figure 47).

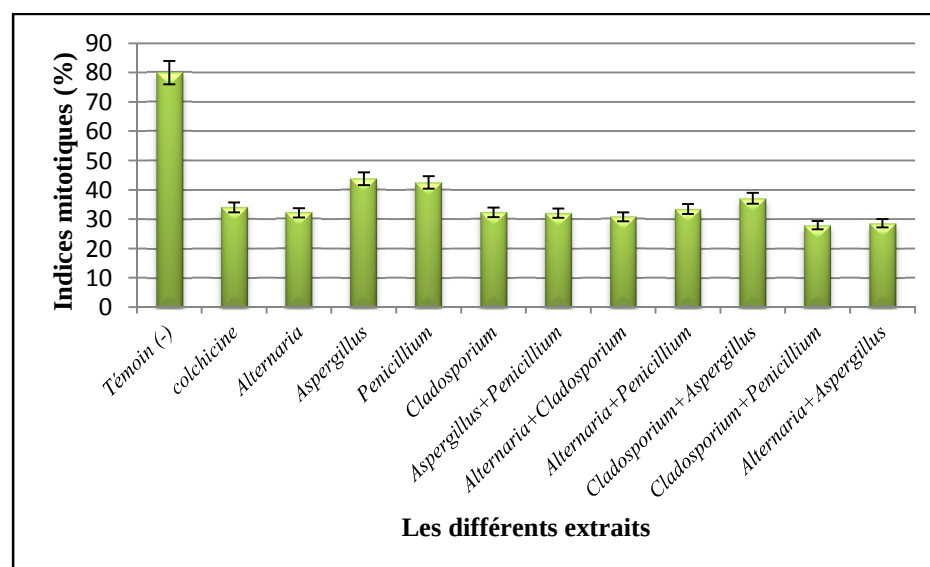


Figure 47 : Les indices mitotiques des différents extraits testés.

Des ANOVA réalisées entre le témoin non traité, la colchicine prise comme standard et les différents extraits fongiques montrent une différence hautement significative entre ces valeurs ($p=0.00$). Les comparaisons multiples des moyennes ont révélé la formation de plusieurs groupes. Le groupe A est représenté par deux extraits fongiques, dont l'effet antimitotique est le plus élevé et donc plus élevé que la colchicine, à savoir l'extrait *Cladosporium/Penicillium* et *Alternaria/Aspergillus*. Le groupe AB est représenté par le standard : la colchicine, ainsi que les extraits fongiques d'*Alternaria*, *Cladosporium*, *Alternaria/Cladosporium*, *Aspergillus/Penicillium*, *Alternaria/Penicillium*. Ceci confirme leur action dans l'inhibition de la mitose au même titre que la colchicine. Pour ce qui est de l'extrait combiné *Cladosporium/Aspergillus*, il appartient au groupe BC. Le groupe C regroupe les extraits possédant l'effet antimitotique le plus faible. Il est représenté par les extraits fongiques de *Penicillium* et d'*Aspergillus* (Tableau XV).

Ces résultats indiquent que les extraits combinés *Cladosporium*/*Penicillium* et *Alternaria*/*Aspergillus* possèdent un effet antimitotique meilleur que celui de la colchicine utilisé comme standard, comparativement aux extraits fongiques de *Penicillium* et d'*Aspergillus* utilisés seuls, avec un effet antimitotique plus faible. Les extraits fongiques d'*Alternaria* et de *Cladosporium* avaient quant à eux, un effet antimitotique similaire au standard sur les cellules méristématiques d'*Allium cepa*. Ceci montre les synergies entre ces champignons endophytes dans l'inhibition de la mitose.

Tableau XV : Comparaison des moyennes des indices mitotiques des différents extraits des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*.

Extraits testés	Indices mitotiques (%) $\pm$ ES
Témoin (-)	79,95 $\pm$ 2.64
<i>Aspergillus</i>	43,80 C $\pm$ 1.76
<i>Penicillium</i>	42,50 C $\pm$ 1.04
<i>Cladosporium</i> / <i>Aspergillus</i>	37,15 BC $\pm$ 1.74
Colchicine	34,00 AB $\pm$ 1.07
<i>Alternaria</i> / <i>Penicillium</i>	33,45 AB $\pm$ 1.03
<i>Cladosporium</i>	32,30 AB $\pm$ 1.76
<i>Alternaria</i>	32,15 AB $\pm$ 0.98
<i>Aspergillus</i> / <i>Penicillium</i>	32,05 AB $\pm$ 0.80
<i>Alternaria</i> / <i>Cladosporium</i>	30,85 AB $\pm$ 1.15
<i>Alternaria</i> / <i>Aspergillus</i>	28,60 A $\pm$ 1.09
<i>Cladosporium</i> / <i>Penicillium</i>	27,95 A $\pm$ 0.86

ES : Erreur Standard.

Les mycoendophytes concernés produisent des métabolites secondaires à activité antimitotique. En effet, les souches d'*Alternaria* sont endophytes au niveau foliaire et leurs métabolites présentent une variété d'activités biologiques : phytotoxiques, cytotoxiques et antimicrobiennes (BRASE *et al.*, 2009; TSUGE *et al.*, 2013). Cependant dans notre étude, les associations synergiques entre *Cladosporium* et *Penicillium*, mais aussi entre *Alternaria* et *Aspergillus* montrent un pouvoir antimitotique meilleur, ceci est dû probablement à la synthèse simultanée de métabolites secondaires fongiques à effet antimitotique. Ce qui nous amène à dire que les métabolites secondaires d'*Alternaria* et de *Cladosporium* possèdent une activité similaire à celle de la colchicine dans l'inhibition de la mitose. Un grand nombre d'agents anticancéreux naturels sont issus de champignons endophytes. Le taxol est un

diterpénoïde qui agit contre les cellules tumorales en améliorant l'assemblage des microtubules et en inhibant leur dépolymérisation. Il a été extrait à partir d'endophytes, *Taxomyces andreanae* (STIERLE *et al.*, 1993), *Pestalotiopsis microspora* (LI *et al.*, 1996), *Alternaria alternata*, *Periconia sp.*, *Pithomyces sp.*, *Chaetomella raphigera*, *Monochaetia sp.* et *Seimatoantlerium nepalense* (VISALAKCHI et MUTHUMARY, 2010).

Vingt genres de champignons endophytes (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Ectostroma*, *Fusarium*, *Metarhizium*, *Monochaetia*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Ozonium*, *Papulospora*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Pithomyces*, *Taxomyces* et *Tubercularia*) ont la capacité de produire du paclitaxel et ses analogues tels que la baccatine III ou la 10-déacétylbaccatine III (ZHAO *et al.*, 2011). Le mode d'action du paclitaxel se liant à la tubuline- β spécifiquement, empêche leur dépolymérisation au cours des processus de division cellulaire, ce qui fait de lui un agent efficace contre les cancers de la prostate, des ovaires, du sein et des poumons (SCHIFF *et al.*, 1979 ; WANG *et al.*, 1999).

D'après CHANNABASAVA et GOVINDAPPA (2014), l'extrait de métabolites secondaires fongiques d'*Aspergillus niger* contient du lapachol et montre la même activité antimitotique que le taxol, qui est un agent anticancer. SADANANDA *et al.* (2011) ont principalement rapporté que le lapachol est produit par des champignons endophytes (*Aspergillus niger* et *Alternaria alternata*). CHANNABASAVA et GOVINDAPPA (2014) montrent que le lapachol est produit aussi par des champignons endophytes type *Aspergillus sp.*, *Alternaria sp.* et *Penicillium sp.* GOVINDAPPA *et al.* (2014) obtiennent un indice mitotique de 30,6% pour l'extrait éthanolique d'*Alternaria alternata* endophyte de *Tabebuia argentea*. Cela va dans le même sens que nos résultats, avec l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Alternaria*, endophyte foliaire de *Peganum harmala*. Des résultats similaires ont été observés avec des extraits de plantes d'*Ocimum gratissimum*, *Morinda lucida* (BERNICE *et al.*, 2009) et les endophytes *Fusarium oxysporum*, *Trichothecium sp.* (SADANANDA *et al.*, 2013) et *Aspergillus niger* (CHANNABASAVA et GOVINDAPPA, 2014). L'extrait fongique a montré une activité antimitogène potentielle en induisant des changements structuraux dans les chromosomes.

2.3.2. Activité antiproliférative

Les essais antiprolifératifs sur *Saccharomyces cerevisiae* révèlent une inhibition de la croissance cellulaire pour les échantillons traités avec les extraits fongiques ainsi que pour les

échantillons traités avec les deux standards (colchicine et quercetine). Le phénomène de nécrose cellulaire (la cellule deverse son contenu cytoplasmique à l'extérieur) a été observé au niveau des levures traitées par l'extrait d'*Alternaria* et l'extrait combiné *Alternaria*+*Penicillium* (Figure 48).

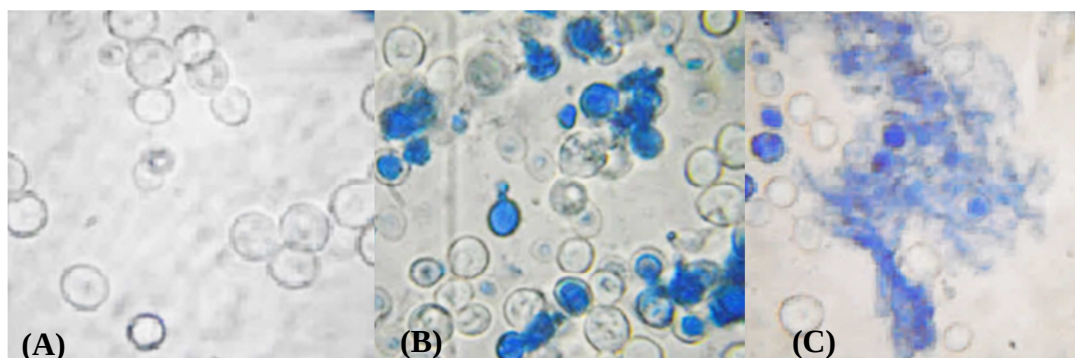


Figure 48 : Action des extraits fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* sur *Saccharomyces cerevisiae* (X2000).

A : contrôle (sans aucun extrait fongique). **B :** levure traitée avec l'extrait fongique (les cellules colorées sont des cellules mortes avec des débris cellulaires). **C :** début de nécrose cellulaire chez la levure traitée par l'extrait d'*Alternaria* et *Alternaria*/*Penicillium*.

Les pourcentages de cytotoxicité des extraits fongiques bruts sont estimés à 43,75% pour *Cladosporium*, 54,08% pour *Alternaria*, 36,24% pour *Aspergillus*, 49,64% pour *Penicillium*, alors que celui de la quercetine est de 48,16% et celui de la colchicine de 57,21%. En revanche, les pourcentages de cytotoxicité observés pour les différentes combinaisons d'extraits fongiques sont les suivants : pour *Alternaria*/*Aspergillus* : 51,19%, pour *Alternaria*/*Cladosporium* : 57,01%, pour *Alternaria*/*Penicillium* : 57,33%, pour *Cladosporium*/*Penicillium* : 44,87%, pour *Aspergillus*/*Cladosporium* : 51,63% et pour *Aspergillus*/*Penicillium* : 46,44% (Figure 49).

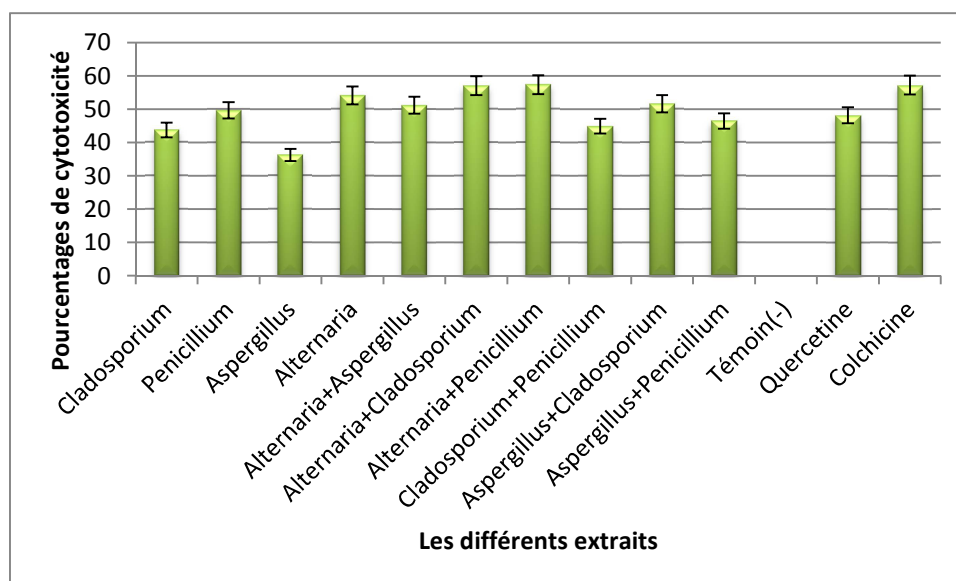


Figure 49 : Pourcentages de cytotoxicité des différents extraits testés.

Les pourcentages de cytotoxicité des extraits fongiques bruts testés sont donnés dans le tableau XV. Des ANOVA réalisées entre le témoin non traité, la colchicine et la quercétine prises comme standards, ainsi que les différents extraits fongiques testés montrent une différence hautement significative entre ces mesures ($p=0,00$). Ceci confirme leur action cytotoxique différente sur la prolifération cellulaire. Les comparaisons multiples des moyennes ont révélé la formation de différents groupes. L'extrait d'*Aspergillus* appartient au groupe A et l'extrait de *Cladosporium* au groupe AB. Le groupe BC regroupe respectivement les extraits combinés *Cladosporium/Penicillium* et *Aspergillus/Penicillium*. Le groupe BCD est représenté par la quercétine, qui est un flavonoïde à effet antiprolifératif. Quant au groupe BCDE, il est représenté par l'extrait fongique de *Penicillium*. L'extrait combiné *Alternaria/Aspergillus* appartient au groupe BCDEF. Le groupe CDEF est constitué de l'extrait fongique combiné *Aspergillus/Cladosporium*. Pour l'extrait d'*Alternaria*, il appartient au groupe DEF. Pour l'extrait combiné *Alternaria/Cladosporium*, il appartient quant à lui au groupe EF. Enfin, le groupe F est représenté par la colchicine et l'extrait fongique combiné *Alternaria/Penicillium*. Ces derniers représentent les indices les plus élevés, ce qui confirme leur cytotoxicité sur les cellules de levure, empêchant ainsi leur prolifération (Tableau XVI).

Tableau XVI : Comparaison des moyennes des pourcentages de cytotoxicité des différents extraits des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*.

Extraits testés	Pourcentages de cytotoxicité $\pm$ ES
<i>Alternaria</i> / <i>Penicillium</i>	57.33 F $\pm$ 0.77
Colchicine	57.21 F $\pm$ 1.25
<i>Alternaria</i> / <i>Cladosporium</i>	57.01 EF $\pm$ 1.17
<i>Alternaria</i>	54.08 DEF $\pm$ 0.90
<i>Aspergillus</i> / <i>Cladosporium</i>	51.63 CDEF $\pm$ 1.43
<i>Alternaria</i> / <i>Aspergillus</i>	51.19 BCDEF $\pm$ 1.09
<i>Penicillium</i>	49.64 BCDE $\pm$ 1.00
Quercétine	48.16 BCD $\pm$ 1.80
<i>Aspergillus</i> / <i>Penicillium</i>	46.44 BC $\pm$ 2.71
<i>Cladosporium</i> / <i>Penicillium</i>	44.87 BC $\pm$ 1.59
<i>Cladosporium</i>	43.75 AB $\pm$ 1.34
<i>Aspergillus</i>	36.24 A $\pm$ 0.92

PC : Pourcentages de cytotoxicité ; ES : Erreur standard.

Saccharomyces cerviseae est l'organisme modèle pour mettre en lumière la mort cellulaire des cellules eucaryotes et identifier les altérations du cycle cellulaire en cours. C'est ce qui a été observé pour le lapachol isolé d'*Aspergillus niger* endophyte de *Tabebuia argentea* (CHANNABASAVA et GOVINDAPPA, 2014). En outre, le test de comparaison des moyennes des indices de cytotoxicité a révélé que les extraits : *Alternaria*, *Alternaria*/*Cladosporium*, *Alternaria*/*Aspergillus*, *Aspergillus*/*Cladosporium* et *Alternaria*/*Penicillium* ont un indice cytotoxique similaire à celui de la colchicine qui possède l'indice le plus élevé. Par ailleurs, l'extrait de *Penicillium*, d'*Alternaria*/*Aspergillus*, *Aspergillus*/*Penicillium* et *Cladosporium*/*Penicillium* ont un indice cytotoxique similaire à la quercétine dont l'indice de cytotoxicité est moins important que celui de la colchicine. Ceci confirme que ces extraits fongiques, ainsi que leurs associations se comportent soit comme les flavonoïdes ou les alcaloïdes que les mycoendophytes synthétisent dans les feuilles de la plante hôte.

Dans notre étude, la plupart des cellules sont mortes et les débris cellulaires ont été observés en raison de la toxicité de l'extrait fongique d'*Alternaria* ainsi que l'association *Alternaria* + *Penicillium* similaire à la cytotoxicité de la colchicine, confirmant ainsi la

toxicité des feuilles de *Peganum harmala*. Nous avons observé ainsi le phénomène de nécrose suite à cela. Des résultats similaires sont rapportés en utilisant des lignées de cellules cancéreuses à l'aide d'extraits de plantes (YU *et al.*, 2007 ;TÜRK *et al.*, 2011). Le genre *Alternaria* est capable de produire le taxol à partir des taxanes, tel que rapporté par CARUSO *et al.* (2000). Ces souches endophytiques sont productrices aussi d'alcaloïdes type vinblastine (GUO *et al.*, 1998).

Les métabolites secondaires produits par ces champignons possèdent une activité similaire à celle de la colchicine dans l'inhibition de la mitose ainsi que la prolifération cellulaire. Ce qui nous incite à exploiter cette piste afin de trouver des molécules bioactives, qui peuvent inhiber la prolifération des cellules tumorales. La caractérisation chimique est nécessaire pour identifier ces composés et leur mécanisme d'action.

Les endophytes sont maintenant reconnus comme sources importantes d'une variété de métabolites secondaires structurellement nouveaux et biologiquement actifs, y compris les terpènes, les stéroïdes, les alcaloïdes et les dérivés des isocoumarines (YA-TUAN *et al.*, 2010). Les enzymes et les médicaments dérivés d'endophytes ont montré des applications dans la médecine, l'agriculture et l'industrie (ZAFERANLOO *et al.*, 2014).

2.3.3. Activité antioxydante

Nos essais sur les activités antioxydantes révèlent que les extraits de mycoendophytes foliaires et l'extrait de feuilles de *Peganum harmala* sont dotés d'un pouvoir antiradicalaire faible. Leurs IC₅₀ montre l'activité antioxydante la plus élevée pour l'extrait fongique d'acétate d'éthyle de *Penicillium* (IC₅₀=1,065±0.003mg/ml), suivie de celle de l'extrait d'*Aspergillus* (5,95±0.05mg/ml). Pour l'extrait d'*Alternaria*, elle est de 6.14±0.07mg/ml, de même pour l'extrait foliaire avec une IC₅₀ de 6,15±0.01mg/ml. Par ailleurs, l'extrait de *Cladosporium* montre une faible activité antioxydante, avec une IC₅₀ de 8,56±0.14mg/ml (Tableau XVII).

Les résultats enregistrés et les ANOVA réalisées entre les IC₅₀ des extraits fongiques, de l'extrait foliaire ainsi que le standard (acide ascorbique) indiquent une différence hautement significative (p=0,00) entre les IC₅₀ des différents extraits. Par ailleurs, les ANOVA entre IC₅₀ de l'extrait *Cladosporium* et l'extrait foliaire montre une différence significative (p=0,01), entre IC₅₀ de l'extrait *Alternaria* et l'extrait foliaire il n'y a aucune différence significative (p=0,93), de même que pour l'extrait *Aspergillus* et l'extrait foliaire

($p=0,13$). En outre, pour IC₅₀ de l'extrait *Penicillium* et l'extrait foliaire, la différence est hautement significative ($p=0,00$). Le résultat obtenu pour l'IC₅₀ du genre *Penicillium* est en accord avec les résultats trouvés par JAKOVLJEVIC *et al.* (2014) où la valeur IC₅₀ contre le radical DPPH était de 0,974 mg/ml pour *Penicillium funiculosum* et 1,336 mg/ml pour *Penicillium chrysogenum*. Ces résultats indiquent que l'extrait d'acétate d'éthyle du champignon testé pourrait être utilisé dans le piégeage du radical libre DPPH, en le transformant en produits stables. Les molécules antioxydantes extraites par l'acétate d'éthyle sont synthétisées beaucoup plus par *Penicillium*, mycoendophyte foliaire que par la feuille de *Peganum harmala* et ceci en présence de tous les autres champignons endophytes. Néanmoins, ces résultats restent relativement faibles par rapport à l'acide ascorbique, dont la valeur IC₅₀ est de l'ordre de $0,127 \pm 0,002$ mg/ml. Ceci est dû à sa capacité de céder l'hydrogène traduisant son important effet antioxydant (DE POOTER et SCHAMP, 1986).

Tableau XVII : IC 50 des différents extraits

Différents extraits	Extrait <i>Cladosporium</i>	Extrait <i>Alternaria</i>	Extrait <i>Aspergillus</i>	Extrait <i>Penicillium</i>	Extrait Foliaire	Acide Ascorbique
IC ₅₀ (mg/ml)	8.56 ± 0.14	6.14 ± 0.07	5.95 ± 0.05	1.065 ± 0.003	6.15 ± 0.01	0.127 ± 0.002

Les champignons endophytes ont été isolés des feuilles de *Peganum harmala* en saison printanière à dayate Aiat (Laghout, Algérie), qui est une zone à climat aride. L'extraction des métabolites à partir des champignons endophytes est affectée par divers facteurs, tels que la saison de la collecte de l'échantillon, les conditions climatiques et la situation géographique (SHUKLA *et al.*, 2014). L'activité antioxydante des extraits végétaux dépend essentiellement du taux des polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante (BURDA et OLESZEK, 2001). Il est possible que divers métabolites végétaux pourraient être des produits synthétisés par leurs endophytes (KUSARI *et al.*, 2012c).

Le type de solvant joue un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques et des molécules antioxydantes. Cependant, nos extraits fongiques endophytiques (*Alternaria*, *Aspergillus* et *Cladosporium*) ainsi que l'extrait foliaire de *Peganum harmala* ont montré une activité antioxydante faible par rapport à l'extrait fongique du genre *Penicillium*. Cela peut être dû à la nature des molécules extraites avec l'acétate d'éthyle. C'est un solvant sélectif pour les composés phénoliques de bas poids moléculaires (PREMJANU et JAYNTHY,

2014). L'activité antioxydante des extraits de champignons endophytes et de l'extrait foliaire est due à la présence des composés phénoliques dans ces derniers. En effet, nos résultats indiquent des teneurs en polyphénols différentes pour les différents extraits, à savoir l'extrait de *Cladosporium* avec $0,680 \pm 0,049$ mg/ml, l'extrait d'*Alternaria* avec $0,349 \pm 0,003$ mg/ml, d'*Aspergillus* avec $0,914 \pm 0,004$ mg/ml et l'extrait foliaire avec $0,020 \pm 0,001$ mg/ml. Par ailleurs, l'extrait de *Penicillium* présente une teneur en polyphénols importante par rapport aux autres, elle est de $4,143 \pm 0,007$ mg/ml (Figure 50).

Pour ce faire, des ANOVA ont été réalisées entre la teneur en polyphénols des différents extraits fongiques testés et l'extrait foliaire de *Peganum hamala*. Les résultats révèlent une différence hautement significative entre la teneur en polyphénols des extraits fongiques (*Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium*) et celle de l'extrait foliaire ($p=0,00$), il en est de même entre les différents extraits fongiques et l'extrait foliaire aussi. En outre, la différence est significative entre la teneur en polyphénols de l'extrait *Cladosporium* et l'extrait foliaire ($p=0,01$).

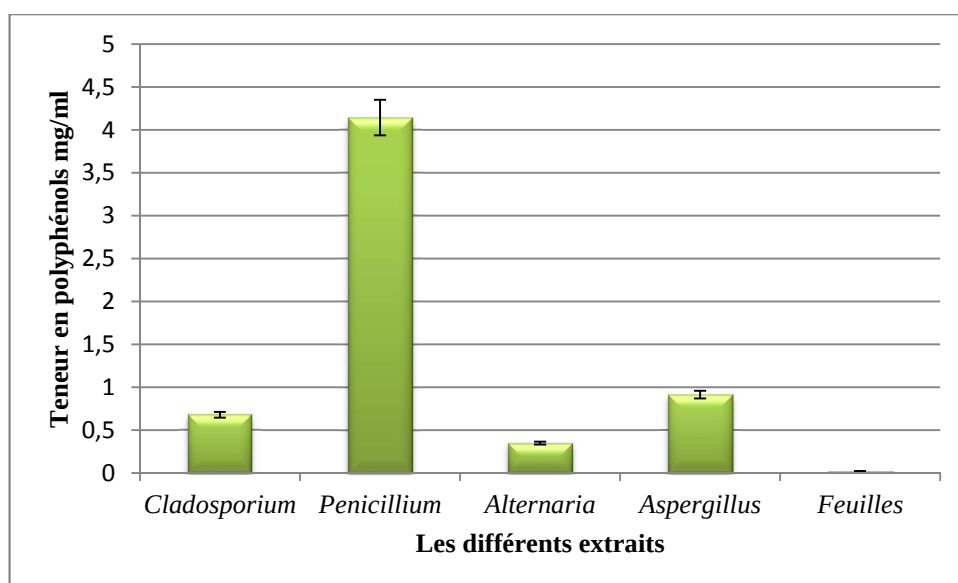


Figure 50 : Teneur en polyphénols des extraits fongiques bruts et l'extrait foliaire.

Nos résultats confirment que les mycoendophytes : *Cladosporium*, *Alternaria* et *Aspergillus* sont une source potentielle mais limitée de composés naturels antioxydants au même titre que la plante et avec une faible activité antioxydante, vu que *Peganum harmala* est une plante toxique, non comestible. Ces métabolites secondaires peuvent être produits par des entités associées sur le plan écologique et servent à de nombreuses fonctions physiologiques

communes entre la plante et ces microorganismes (NICOLETTI et FIORENTINO, 2015). Par ailleurs, *Penicillium* a montré une activité antioxydante par rapport aux autres champignons endophytes, avec une teneur importante en polyphénols ($4,143 \pm 0,007$ mg/ml). Les résultats obtenus par GOVINDAPPA *et al.* (2013) ont montré que les extraits méthanoliques de champignons endophytes de *Tabebuia argentea* révèlent des activités antioxydantes plus élevées que les extraits chloroformiques. De plus, cette étude a démontré que les mycoendophytes : *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* sont une source importante de composés phénoliques à activité antioxydante. SADANANDA *et al.* (2011) ont montré que les champignons endophytes *Aspergillus niger* et *Penicillium sp* de *Tabebuia sp* possèdent des propriétés biologiques relatives aux mécanismes antioxydants. Quant à FERNANDES *et al.* (2009), ils ont mis en évidence une activité antioxydante chez *Alternaria alternata* mycoendophyte du *Coffea arabica* L. Pour RAVINDRAN *et al.* (2012), *Aspergillus flavus*, champignon endophyte dominant chez les espèces de Mangrove, a un potentiel antioxydant. KHENNOUF *et al.* (2010) ont rapporté que les champignons endophytes *Phoma*, *Cladosporium* et *Chaetomium* montrent une activité antioxydante.

Resveratrol est une stilbène phytoalexine produite par de nombreuses plantes en réponse au stress biotique et abiotique. C'est aussi un nutraceutique réputé par ses propriétés antioxydantes (PANGENI *et al.*, 2014). Un certain nombre de souches endophytes de *Vitis vinifera* et de *Vitis quinquangularis* appartenant aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Cephalosporium*, *Geotrichum*, *Mucor* et *Penicillium* ont été identifiés et sont capables de produire ce composé. Cependant, une seule souche d'*Alternaria* conserve cette capacité après des cycles répétés de culture (SHI *et al.*, 2012). Une autre souche d'*Alternaria* endophyte foliaire synthétise l'acide cajaninstilbene, qui est un composé antioxydant (ZHAO *et al.*, 2012).

2.3.4. Activité antibactérienne

2.3.4.1. Détection de l'activité antibactérienne

Les différents champignons endophytes ont montré une activité antibactérienne plus ou moins importante contre au moins une souche bactérienne test (Annexe 4). Les diamètres des zones d'inhibition mesurés vont de 0 à $15,33 \pm 3,32$ mm (Tableaux XVIII et XIX).

Dans notre première manipulation, nous avons constaté que le genre *Cladosporium* n'a pas eu un effet inhibiteur notable sur la croissance des différentes souches bactériennes. Ce qui nous a poussés à nous en séparer dans la seconde manipulation. L'activité antibactérienne

a été plus marquée chez *Alternaria* dans les deux manipulations. Ce genre a montré un pouvoir antibactérien contre la souche *Staphylococcus aureus* MU 50 mecA, sur laquelle les autres mycoendophytes n'ont eu aucun effet, avec une zone d'inhibition assez importante ($14,33 \pm 0,00$ mm). Il a montré aussi une importante activité dans la première manipulation vis-à-vis des deux souches bactériennes *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Bacillus cereus* ATCC 14579, avec des zones d'inhibition respectives de $12 \pm 0,00$ mm et $15,33 \pm 3,32$ mm (Figure 51, Tableaux XVIII et XIX).

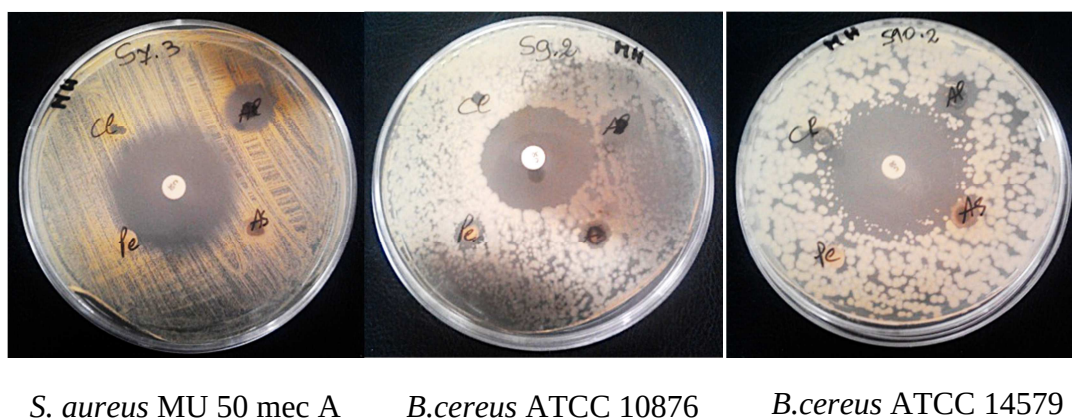


Figure 51 : Activité antibactérienne des quatre champignons endophytes et de l'antibiotique sur *S. aureus* MU 50 mec A, *B. cereus* ATCC 10876 et *B. cereus* ATCC 14579 dans la première manipulation.

Les moyennes des zones d'inhibitions ont diminué dans la seconde manipulation vis-à-vis de ces deux dernières, lorsque le champignon était déposé seul avec des zones respectives de $9,00 \pm 1,67$ et $10,00$ mm (Figure 52, Tableaux XVIII et XIX).

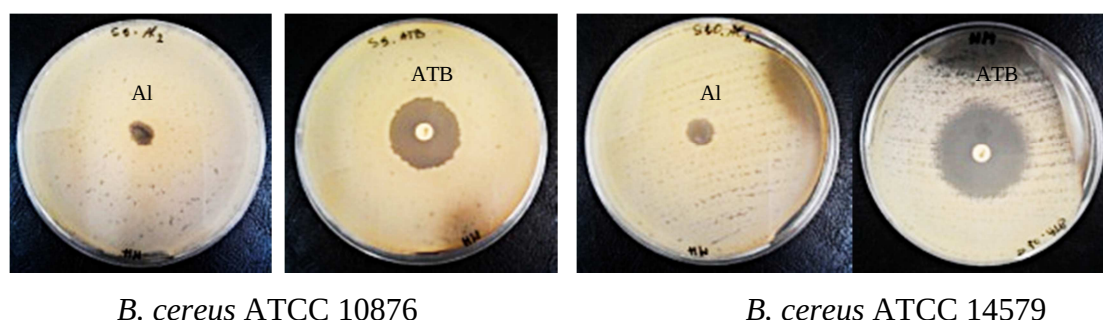


Figure 52 : Activité antibactérienne du genre *Alternaria* et de l'antibiotique dans la seconde manipulation sur *B. cereus* ATCC10876 et *B. cereus* ATCC 14579.

Le genre *Alternaria* n'a pas réagi vis-à-vis des souches bactériennes *Enterococcus faecalis* ATCC 494552, *Staphylococcus aureus* FRI S6 et *S. aureus* FRI 361 dans la première manipulation, mais des zones plus ou moins importantes sont apparues dans la seconde manipulation avec des zones d'inhibitions respectives de $14,00 \pm 0,81$ mm, $9,66 \pm 1,24$ mm et $8,66 \pm 0,46$ mm. Ces résultats suggèrent que le genre *Alternaria* possède des composés bioactifs qui inhibent le développement bactérien avec des effets plus ou moins importants. En comparant l'activité d'*Alternaria* dans les deux manipulations, nous avons constaté que les zones d'inhibitions sont plus élevées vis-à-vis des deux souches *Bacillus cereus* dans la première manipulation lorsqu'il était avec les autres mycoendophytes dans la même boîte de Pétri. Ceci peut s'expliquer par les éventuelles synergies qui peuvent exister entre certains champignons et qui ont pu amplifier leur pouvoir antibactérien. Ces derniers se sont mieux exprimés et ont réagi positivement contre ces souches bactériennes. D'un autre côté, le genre *Alternaria* n'a pas réagi dans la première manipulation vis-à-vis de certaines souches, par contre, il s'est exprimé dans la seconde quand il était seul. Ceci peut être lié aux effets de métabolites excrétés par les différents mycoendophytes qui ont entravé mutuellement leurs activités respectives et empêché l'expression des métabolites bioactifs du genre *Alternaria*. Nous pouvons penser aussi que la sensibilité des souches bactériennes aux métabolites bioactifs des mycoendophytes et à leurs concentrations peut changer en fonction de la présence simultanée de ces derniers et de l'antibiotique.

Tableau XVIII : Inhibition de la croissance des souches bactériennes par les mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* dans le premier screening. (n=3, moyenne $\pm$ erreur standard).

	<i>Cladosporium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	ATB
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	-	-	$8,00 \pm 00$	-	$29,10 \pm 0,33$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	$7,00 \pm 00$	-	$33,44 \pm 2,67$
<i>S. aureus</i> FRI 326	-	-	-	-	$34,77 \pm 2,43$
<i>S. aureus</i> FRI S6	-	-	$6,00 \pm 00$	-	$34,77 \pm 0,15$
<i>S. aureus</i> FRI 361	$7,00 \pm 00$	-	-	$9,33 \pm 1,33$	$35,11 \pm 1,76$
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	$35,44 \pm 2,31$
<i>S. aureus</i> MU 50 mec A	-	$14,33 \pm 00$	-	-	$32,32 \pm 0,46$
<i>S. aureus</i> FRI 137	-	-	$8,00 \pm 00$	-	$35,21 \pm 0,78$
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	-	12 ± 00	$8,00 \pm 00$	$12,16 \pm 3,83$	$32,88 \pm 4,56$
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	10 ± 00	$15,33 \pm 3,22$	$9,33 \pm 00$	$7,66 \pm 00$	$38,66 \pm 2,67$

Tableau XIX : Inhibition de la croissance des souches bactériennes par les mycoendophytes dans le second dépistage (n=3, moyenne $\pm$ erreur standard).

	Zone d'inhibition (mm)				
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	<i>S. aureus</i> FRI S6	<i>S. aureus</i> FRI 361	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
<i>Alternaria</i>	14.00 $\pm$ 0,81	9.66 $\pm$ 1,24	8.66 $\pm$ 0,46	9.00 $\pm$ 1,63	10.00 $\pm$ 00
<i>Aspergillus</i>	10.66 $\pm$ 1,24	10.00 $\pm$ 1,81	-	8.66 $\pm$ 0,46	7.00 $\pm$ 00
<i>Penicillium</i>	-	-	9.00 $\pm$ 00	8.00 $\pm$ 0,81	7.66 $\pm$ 0,46
ATB	30.66 $\pm$ 1,70	37.33 $\pm$ 0,46	32.00 $\pm$ 0,81	26.00 $\pm$ 00	34.33 $\pm$ 0,46

Les souches *Enterococcus faecalis* ATCC 494552, *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FRI S6, *S. aureus* FRI 137, *B. cereus* ATCC 10876, *B. cereus* ATCC 14579 ont été plus ou moins sensibles au genre *Aspergillus*, avec des zones d'inhibitions respectives de 8,00 $\pm$ 00 mm, 7,00 $\pm$ 00 mm, 6,66 $\pm$ 00 mm, 8,00 $\pm$ 00 mm, 8,00 $\pm$ 00 mm et 9,33 $\pm$ 00mm. Ces résultats ont été mis en évidence dans la seconde manipulation avec des zones d'inhibition un peu plus importantes contre *Enterococcus faecalis* ATCC 494552, *Staphylococcus aureus* FRI S6 (Figure 53) et *Bacillus cereus* ATCC 10876 (10.66 $\pm$ 1.24mm et 10,00 $\pm$ 1,81mm, 8,66 $\pm$ 0,46 mm respectivement). L'activité d'*Aspergillus* a légèrement diminué vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Tableaux XVII et XVIII). Par contre, aucune activité n'a été détectée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* FRI 361 dans les deux manipulations. Ce qui veut dire que cette dernière n'est pas sensible aux métabolites bioactifs excrétés par le genre *Aspergillus* (Tableaux XVIII et XIX).



Figure 53 : Activité antibactérienne du genre *Aspergillus* et de l'antibiotique dans la seconde manipulation sur *S. aureus* FRI 6.

Quant au genre *Penicillium*, il n'a montré un effet antibiotique qu'à l'encontre des souches de *S. aureus* FRI 361, *B. cereus* ATCC 10876 et *B. cereus* ATCC 14579 ($9,33 \pm 1,33$ mm, $12,16 \pm 3,83$ mm et $7,66 \pm 0,00$ mm respectivement) et aucun effet vis-à-vis des autres souches testées dans la première manipulation. Ces résultats ont été confirmés dans la seconde manipulation.

En revanche, les quatre champignons endophytes n'ont montré aucune zone d'inhibition, donc leurs métabolites secondaires sont sans effets sur les souches bactériennes *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* FRI 326 (Figure 54).

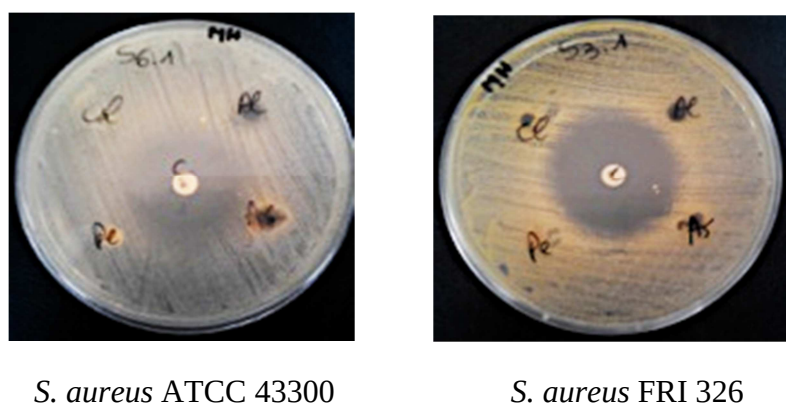


Figure 54 : Activité des quatre champignons endophytes et de l'antibiotique vis-à-vis des souches *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* FRI 326, dans la première manipulation.

La souche *S. aureus* MU 50 mecA n'a été sensible qu'au genre *Alternaria* avec une zone de $14 \pm 0,00$ mm. De même pour la souche *S. aureus* FRI 137, qui elle n'a réagi qu'à l'encontre du genre *Aspergillus*, avec une petite zone d'inhibition ($8 \pm 0,00$ mm). Ce qui nous a amené à ne pas utiliser ces souches dans la seconde manipulation.

Toutes les souches bactériennes ont montré une très grande sensibilité au contact de l'antibiotique chloramphénicol (30 μ g) avec des zones d'inhibition très importantes (Tableaux XVIII et XIX).

Tous les champignons ont montré des zones d'inhibition donc une activité antibactérienne vis-à-vis des deux souches de *B. cereus*. Ces souches sont plus ou moins sensibles à ces champignons et sont les plus sensibles des bactéries utilisées. En revanche, aucun mycoendophyte n'a montré d'activité vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 résistante à la méticilline (MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). En outre, le mycoendophyte du genre *Alternaria* seul a eu un effet antibactérien contre un

autre MRSA (*Staphylococcus aureus* MU50 mecA). Ce ci peut-être dû au fait que ce champignon a eu des synergies ou des interactions avec les autres champignons qui cohabitent avec lui dans la même boîte de Pétri. Ainsi, les différents champignons se sont mieux exprimés dans la seconde manipulation, quand ils étaient déposés séparément.

D'une manière générale, les mycoendophytes secrètent dans leurs milieux de culture des métabolites secondaires bioactifs (GIMENEZ *et al.*, 2007). L'acide 3- nitropopionique par exemple, secrété par certains champignons endophytes exhibe une importante activité antimycobactérienne (CHOMCHEON *et al.*, 2005). Nos résultats ont clairement montré que les champignons endophytes isolés des feuilles de *Peganum harmala* produisent des métabolites secondaires antibactériens durant la phase stationnaire de leur croissance (environs 8 jours d'incubation) et sont capables d'inhiber un large spectre de bactéries pathogènes. Ils ont montré aussi qu'il existait une corrélation entre la présence simultanée des champignons endophyte ensemble et leurs activités vis-à-vis des souches bactériennes. Un important effet antibactérien donné par le genre *Alternaria* a été observé. En effet, ARIVUDAINAMBI *et al.* (2014) ont affirmé que les endophytes *Alternaria spp.*, exhibent une variété de métabolites bioactifs tel que des phytotoxines, cytotoxines et des composés antimicrobiens. Ils produisent des alcaloïdes comme l'altersetine, qui montre une activité antibactérienne vis-à-vis de différentes bactéries Gram-positif pathogènes (HELLWIG *et al.*, 2002).

DEVARAJU et SATISH (2011) ont testé l'activité antibactérienne des métabolites secondaires de *Fusarium sp.* isolé de *Mirabilis jalapa* par la technique de double culture de diffusion sur gélose et ont noté des zones d'inhibition de 19 mm vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et de 14 mm pour *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Des travaux de Mandeel *et al.* (1998) avec la même technique sur les activités antibactériennes de différentes espèces de *Fusarium* ont aussi révélé des effets vis-à-vis de souches bactériennes Gram positif et négatif. Pour les deux études, les champignons ont réagi mieux à l'encontre des bactéries Gram positif.

Nos champignons comme la plupart des champignons endophytes de plantes, en particulier des plantes médicinales, produisent des métabolites secondaires aux effets antimicrobiens qui peuvent inhiber le développement de certaines bactéries avec des effets variables (KAUL *et al.*, 2012 ; ARIVUDAINAMBI *et al.*, 2014). Nous avons aussi eu connaissance dans la littérature des pouvoirs antimicrobiens de *Peganum harmala* (HAMMICHE *et al.*, 2013 ; AKBARY *et al.*, 2014 ; JAVADIAN *et al.*, 2016) ainsi que des différentes études qui ont rapporté les interactions, la transformation des métabolites et les

échanges de gènes entre les mycoendophytes et leurs plantes hôtes (ZHAO et al., 2010). Donc, nous pouvons penser qu'il pourrait y avoir aussi des interactions entre les champignons endophytes que nous avons étudié et leur plante hôte *Peganum harmala*. Le pouvoir antibactérien de cette dernière aurait un lien avec celui de ses champignons endophytes. Une voie qu'il est intéressant d'explorer.

L'ANOVA nous a montré une différence significative entre les activités antibactériennes des quatre champignons endophytes testés, mais aussi entre ces derniers et l'antibiotique utilisé (Annexe 2).

❖ Comportement antibactérien des champignons et de l'antibiotique vis-à-vis d'*Enterococcus faecalis* ATCC 49452

Dans la première manipulation (Tableau XVIII), il y a eu formation de deux groupes A et B. Tous les champignons endophytes appartiennent au groupe A avec des moyennes nulles ou très faibles dans le cas du genre *Aspergillus* (18 et 48). Le groupe B est représenté par l'antibiotique (18 et 48) avec une même moyenne. Dans cette première manipulation, nous avons constaté que l'efficacité des champignons du genre *Aspergillus* a augmenté de 2,67 mm après 18 heures à 4,67 mm après 48 heures d'incubation. Après 18 heures d'incubation, nous avons obtenu une moyenne de zone d'inhibition de 29,11 mm pour l'antibiotique, cette moyenne n'a pas changée après 48 heures.

Dans la seconde manipulation (Tableau XIX), cinq (5) groupes se sont formés (A, B, BC, C, D) en fonction du comportement antibactérien des mycoendophytes testés. Le groupe A correspond au genre *Penicillium* (18 et 48) avec des moyennes nulles. Le groupe B avec une moyenne assez significative (10,67mm) correspond à *Aspergillus* 18. Le groupe BC représenté par *Alternaria* 18 et 48, avec des moyennes respectives de 11,67mm et 14,00mm. Le groupe C compte le genre *Aspergillus* 48 (16,67mm). Enfin, le groupe D est réduit à l'antibiotique ATB (18 et 48), avec une moyenne de 30,67mm. Dans cette seconde manipulation, la moyenne des zones d'inhibition du genre *Aspergillus* a augmenté entre 18h et 48h d'incubation de 10,67mm à 16,67mm. La même constatation est notée pour *Alternaria* après 18h et 48h, avec des moyennes respectives de 11,67mm et 14,00mm. La moyenne de l'antibiotique est restée quant à elle la même.

Si nous comparons les deux manipulations (Tableau XX), nous constatons que *Penicillium* n'a pas réagi à l'encontre de la souche bactérienne. *Aspergillus* a vu sa moyenne augmentée dans la manipulation 2, ce qui signifie qu'il s'est mieux exprimé lorsqu'il est

déposé seul au contact de la souche, de même pour le genre *Alternaria* qui s'est exprimé dans la seconde manipulation. Quant à l'antibiotique, sa moyenne a légèrement augmenté dans la seconde manipulation.

Tableau XX : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Enterococcus faecalis* ATCC 49452.

Manipulation 1			Manipulation 2		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne	Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Cladosporium</i> 48	A	0,00	<i>Penicillium</i> 48	A	0,00
<i>Alternaria</i> 48	A	0,00	<i>Penicillium</i> 18	A	0,00
<i>Cladosporium</i> 18	A	0,00	<i>Aspergillus</i> 18	B	10,67
<i>Alternaria</i> 18	A	0,00	<i>Alternaria</i> 18	BC	11,67
<i>Penicillium</i> 18	A	0,00	<i>Alternaria</i> 48	BC	14,00
<i>Penicillium</i> 48	A	0,00	<i>Aspergillus</i> 48	C	16,67
<i>Aspergillus</i> 18	A	2,67	ATB 48	D	30,67
<i>Aspergillus</i> 48	A	4,67	ATB 18	D	30,67
ATB 18	B	29,11			
ATB 48	B	29,11			

❖ **Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* TCC 25923.**

Cette souche n'a été utilisée que dans la première manipulation, vu que les champignons endophytes n'ont pas réagi positivement à son rencontre. Ainsi, il y a eu formation de deux groupes. Le groupe A qui englobe tous les champignons avec des moyennes nulles, à l'exception d'*Aspergillus* avec une moyenne de 2,33 mm, qui est restée la même entre 18h et 48h d'incubation. Le groupe B comporte quant à lui l'antibiotique, qui a montré un important pouvoir antibiotique envers la souche *Staphylococcus aureus* TCC 25923, avec la même moyenne de 33,44 mm pour les deux périodes 18h et 48 h (Tableau XXI).

Tableau XXI : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* TCC 25923.

Manipulation 1		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
<i>Alternaria</i> 18	A	0,00
<i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
<i>Alternaria</i> 48	A	0,00
<i>Penicillium</i> 18	A	0,00
<i>Penicillium</i> 48	A	0,00
<i>Aspergillus</i> 48	A	2,33
<i>Aspergillus</i> 18	A	2,33
ATB 18	B	33,44
ATB 48	B	33,44

❖ **Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* FRI 326.**

Dans cette manipulation, tous les champignons endophytes appartiennent au même groupe et n'ont eu aucun effet vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* FRI 326. En revanche, cette dernière s'est montrée sensible à l'encontre de l'antibiotique, avec une moyenne de zone d'inhibition de 34,77 mm pour 18h et 48h d'incubation.

Ces résultats peuvent suggérer que les métabolites de ces champignons n'ont eu aucun effet antibactérien vis-à-vis de cette souche et que cette dernière est résistante aux composés bioactifs de ces mycoendophytes (Tableau XXII).

Tableau XXII : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* FRI 326.

Manipulation 1		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Alternaria</i> 18	A	0,00
<i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
<i>Aspergillus</i> 48	A	0,00
<i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
<i>Aspergillus</i> 18	A	0,00
<i>Alternaria</i> 48	A	0,00
<i>Penicillium</i> 18	A	0,00
<i>Penicillium</i> 48	A	0,00
ATB 48	B	34,77
ATB 18	B	34,77

❖ **Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* FRI S6.**

Concernant la première manipulation, deux groupes sont apparus. Le groupe A qui rassemble tous les champignons avec une moyenne nulle, sauf pour le genre *Aspergillus* avec des moyennes de 2,22mm après 18h et qui n'a pas changé après 48h d'incubation et *Alternaria* 48 avec une moyenne de 5,77mm. Le groupe B avec une moyenne de 34,77mm, est représenté par l'antibiotique après 18h et 48h d'incubation.

La seconde manipulation a révélée trois (3) groupes homogènes distincts. Le premier sous la lettre A englobe le genre *Penicillium* (18 et 48), qui n'a pas réalisé de zone d'inhibition, donc qui n'a eu aucun effet antibactérien vis-à-vis de la souche bactérienne. Le second groupe sous la lettre B rassemble les genres *Alternaria* 18 (9,69mm), *Aspergillus* 18 (10,00mm), *Aspergillus* 48 (10,00mm) et *Alternaria* 48 (10,69mm). Enfin, le groupe C correspond à l'antibiotique, avec une moyenne très importante de 37,33mm. Ici la moyenne de la zone d'inhibition d'*Alternaria* a légèrement augmenté après 48 heures d'incubation. Ceci veut dire que l'efficacité du champignon augmente avec le temps. Ses composés bioactifs diffusent progressivement. La moyenne du genre *Aspergillus* n'a pas changé au cours du temps.

L'efficacité de ces champignons vis-à-vis de la souche bactérienne n'a été observée que lors de la seconde manipulation, où la moyenne a augmenté chez le genre *Aspergillus*. Des zones d'inhibition sont apparues pour *Alternaria*, alors que dans la première manipulation la moyenne des zones d'inhibition était nulle. Ces résultats peuvent suggérer que l'activité antibactérienne des mycoendophytes n'a pas pu s'exprimer et leurs métabolites bioactifs respectifs ont réagi négativement les uns envers les autres et ont pu entraver leurs activités antibactériennes (Tableau XXIII).

Tableau XXIII : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* FRI S6.

Manipulation 1			Manipulation 2		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne	Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Cladosporium</i> 48	A	0,00	<i>Penicillium</i> 48	A	0,00
<i>Alternaria</i> 18	A	0,00	<i>Penicillium</i> 18	A	0,00
<i>Penicillium</i> 18	A	0,00	<i>Alternaria</i> 18	B	9,67
<i>Cladosporium</i> 18	A	0,00	<i>Aspergillus</i> 18	B	10,00
<i>Penicillium</i> 48	A	0,00	<i>Aspergillus</i> 48	B	10,00
<i>Penicillium</i> 18	A	0,00	<i>Alternaria</i> 48	B	10,67
<i>Aspergillus</i> 18	A	2,22	ATB 18	C	37,33
<i>Aspergillus</i> 48	A	2,22	ATB 48	C	37,33
<i>Alternaria</i> 48	A	5,22			
ATB 48	B	34,77			
ATB 18	B	34,77			

❖ **Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* FRI 361.**

Lors de la première manipulation, deux groupes se sont formés. Le groupe A concerne les mycoendophytes (18 et 48) avec des valeurs variant de 0 à 10,66mm. Le groupe B est celui de l'antibiotique (18 et 48) avec une moyenne de zone d'inhibition de 35,11mm. La seconde manipulation a vu l'apparition de trois (3) groupes homogènes. Le groupe A auquel appartient le genre *Aspergillus* (18 et 48) n'a montré aucune zone d'inhibition. Le groupe B englobe *Alternaria* 18, *Penicillium* 18, *Penicillium* 48 et *Alternaria* 48 avec des moyennes

respectives de 8,67mm, 9,00mm, 9,00mm et 10,00mm. Le groupe C comporte l'antibiotique avec une moyenne de 32,00mm.

Si nous comparons les deux manipulations, nous constatons que la moyenne pour le genre *Penicillium* a légèrement diminué lors de la deuxième manipulation, par rapport à la première. Ici les moyennes des zones d'inhibition du genre *Penicillium* n'ont pas évoluées au cours du temps pour les deux manipulations. La même chose est notée pour l'antibiotique. De plus, le genre *Alternaria* a eu une activité vis-à-vis de cette souche dans la seconde manipulation, alors qu'elle était nulle dans la première, donc il s'est mieux exprimé (Tableau XXIV).

Tableau XXIV : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* FRI 361.

Manipulation 1			Manipulation 2		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne	Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Aspergillus</i> 48	A	0,00	<i>Aspergillus</i> 18	A	0,00
<i>Alternaria</i> 18	A	0,00	<i>Aspergillus</i> 48	A	0,00
<i>Aspergillus</i> 18	A	0,00	<i>Alternaria</i> 18	B	8,67
<i>Alternaria</i> 48	A	0,00	<i>Penicillium</i> 18	B	9,00
<i>Cladosporium</i> 48	A	2,33	<i>Penicillium</i> 48	B	9,00
<i>Cladosporium</i> 18	A	2,33	<i>Alternaria</i> 48	B	10,00
<i>Penicillium</i> 48	A	10,66	ATB 48	C	32,00
<i>Penicillium</i> 18	A	10,66	ATB 18	C	32,00
ATB 48	B	35,11			
ATB 18	B	35,11			

❖ **Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* TCC 43300.**

Tous les champignons testés n'ont présenté aucune activité contre *Staphylococcus aureus* TCC 43300. Ils forment le groupe A. Les métabolites de ces différents champignons n'ont pas eu d'effets inhibiteurs sur cette souche. Par contre, l'antibiotique (groupe B) a été très efficace vis-à-vis de cette dernière, avec une moyenne qui a atteint son efficacité maximale après 18h (35,44 mm). Ainsi, cette souche n'a pas été réutilisée dans une seconde

manipulation, vu qu'elle n'a montré aucune sensibilité pour les quatre champignons (Tableau XXV).

Tableau XXV : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* TCC 43300.

Manipulation 1		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
<i>Alternaria</i> 18	A	0,00
<i>Aspergillus</i> 48	A	0,00
<i>Alternaria</i> 48	A	0,00
<i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
<i>Aspergillus</i> 18	A	0,00
<i>Penicillium</i> 18	A	0,00
<i>Penicillium</i> 48	A	0,00
ATB 48	B	35,44
ATB 18	B	35,44

❖ **Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* MU 50 mecA.**

Ici aussi les champignons étudiés n'ont pas réagi vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* MU 50 mecA. Ils forment le groupe A, bien que le genre *Alternaria* a émis une zone d'inhibition, donc possède des métabolites bioactifs qui peuvent inhiber la prolifération de la bactérie. En revanche, l'antibiotique a bien réagi avec une moyenne de 32,33mm pour 18 et 48h d'incubation (Tableau XXVI).

Tableau XXVI : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* MU 50 mecA.

Manipulation 1		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
<i>Aspergillus</i> 18	A	0,00
<i>Aspergillus</i> 48	A	0,00
<i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
<i>Penicillium</i> 18	A	0,00
<i>Penicillium</i> 48	A	0,00
<i>Alternaria</i> 18	A	4,78
<i>Alternaria</i> 48	A	5,00
ATB 48	B	32,33
ATB 18	B	32,33

❖ **Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* FRI 137.**

Dans la première manipulation, deux (2) groupes se sont formés. Le groupe A des champignons endophytes avec des moyennes de zones d'inhibition nulles, à l'exception d'une petite moyenne réalisée par le genre *Aspergillus*. Le groupe B concerne l'antibiotique avec une moyenne très représentative de son efficacité (35,22mm) pour les deux temps (Tableau XXVII).

Tableau XXVII : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* FRI 137.

Manipulation 1		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
<i>Alternaria</i> 48	A	0,00
<i>Alternaria</i> 18	A	0,00
<i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
<i>Penicillium</i> 18	A	0,00
<i>Penicillium</i> 48	A	0,00
<i>Aspergillus</i> 18	A	2,67
<i>Aspergillus</i> 48	A	2,89
ATB 48	B	35,22
ATB 18	B	35,22

❖ **Comportement antibactérien des champignons et de l'antibiotique vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 10876.**

Dans la première manipulation, deux groupes se sont formés. Le groupe A qui englobe tous les mycoendophytes testés, avec de faibles moyennes dans les deux temps (18 et 48h d'incubation), mais qui ont légèrement augmenté après 48h. Le groupe B de l'antibiotique a réalisé une importante zone d'inhibition. Deux groupes aussi ont été distingués dans la seconde manipulation, avec les champignons testés dans le groupe A et l'antibiotique (18 et 48) dans le groupe B.

Ces résultats ont montré une augmentation dans la moyenne des diamètres des zones d'inhibitions dans la seconde manipulation pour les champignons endophytes. Par contre, elle a diminué pour l'antibiotique (Tableau XXVIII).

Tableau XXVIII : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Bacillus cereus* ATCC 10876.

Manipulation 1			Manipulation 2		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne	Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Cladosporium</i> 48	A	0,00	<i>Penicillium</i> 48	A	8,00
<i>Cladosporium</i> 18	A	0,00	<i>Penicillium</i> 18	A	8,00
<i>Aspergillus</i> 18	A	2,67	<i>Aspergillus</i> 18	A	8,67
<i>Aspergillus</i> 48	A	3,55	<i>Alternaria</i> 48	A	9,00
<i>Alternaria</i> 18	A	4,00	<i>Alternaria</i> 18	A	9,00
<i>Penicillium</i> 18	A	4,17	<i>Aspergillus</i> 48	A	9,67
<i>Penicillium</i> 48	A	4,33	ATB 18	B	26,00
<i>Alternaria</i> 48	A	4,89	ATB 48	B	26,00
ATB 48	B	32,89			
ATB 18	B	32,89			

❖ **Comportement antibactérien des champignons et de l'antibiotique vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 14579.**

Dans la première manipulation, deux groupes se sont formés. Le groupe A auquel appartient l'ensemble des mycoendophytes avec des moyennes entre 3,11mm et 11,11mm, dont les genres *Aspergillus* (3,11mm) et *Cladosporium* (3,33mm). Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition de ces deux champignons n'ont pas changé avec le temps (18h et 48h d'incubation). Par contre, les moyennes pour *Penicillium* et *Alternaria* ont légèrement augmenté entre 18h et 48h d'incubation, avec des moyennes respectives de 7,67 et 8,33mm pour *Penicillium* et 10,22mm et 11,11mm pour *Alternaria*. Le groupe B de l'antibiotique montre une importante moyenne de 38,66mm. Ici un écart s'est creusé entre les moyennes des champignons et de l'antibiotique. Ce qui a fait que le groupe A a englobé tous les champignons avec des moyennes assez différentes.

Pour la seconde manipulation, il y a eu apparition de trois (3) groupes homogènes : le groupe A qui renferme le genre *Aspergillus* 18 et 48, avec une même moyenne de 7,00mm et le genre *Penicillium* 18 et 48, avec des moyennes respectives de 7,67 et 8,00 mm, le groupe B avec *Alternaria* 18 et 48, avec une moyenne de 10,00 mm et enfin le groupe C de l'antibiotique 18 et 48 (34 et 33mm). Ici aussi les moyennes n'ont pas changé entre 18h et 48h d'incubation (Tableau XXIX).

En confrontant les deux manipulations, nous constatons que les moyennes des différents champignons ont augmenté dans la seconde manipulation, quand ils étaient disposés seuls contre la souche bactérienne. En revanche, la moyenne de l'antibiotique a diminué, mais est restée toujours efficace lors de la seconde manipulation. D'autre part, les moyennes obtenues après 18h d'incubation n'ont pas globalement évolué au bout de 48h. Ainsi, le temps d'incubation n'a pas d'effets notables sur les diamètres des zones d'inhibition contre cette souche bactérienne.

Tableau XXIX : Comparaison des moyennes des zones d'inhibitions des mycoendophytes de la manipulation 1 et 2 et de l'antibiotique et leurs effets sur la croissance des souches bactériennes *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Manipulation 1			Manipulation 2		
Mycoendophyte	Groupe	Moyenne	Mycoendophyte	Groupe	Moyenne
<i>Aspergillus</i> 18	A	3,11	<i>Aspergillus</i> 18	A	7,00
<i>Aspergillus</i> 48	A	3,11	<i>Aspergillus</i> 48	A	7,00
<i>Cladosporium</i> 18	A	3,33	<i>Penicillium</i> 18	A	7,67
<i>Cladosporium</i> 48	A	3,33	<i>Penicillium</i> 48	A	8,00
<i>Penicillium</i> 18	A	7,67	<i>Alternaria</i> 48	B	10,00
<i>Penicillium</i> 48	A	8,33	<i>Alternaria</i> 18	B	10,00
<i>Alternaria</i> 18	A	10,22	ATB 18	C	34,33
<i>Alternaria</i> 48	A	11,11	ATB 48	C	34,33
ATB 18	B	38,66			
ATB 48	B	38,66			

Nos résultats ont montré que les mycoendophytes réagissent différemment vis-à-vis des souches bactériennes, selon qu'ils soient présents simultanément ou séparément dans une même boîte et selon le comportement et la résistance des bactéries. Le genre *Alternaria* par exemple n'a pas réagi vis-à-vis de la souche *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, dans la première manipulation avec les autres champignons et l'antibiotique. Mais quand il a été déposé seul dans la seconde manipulation, il a eu une activité après 18h d'incubation avec une zone d'inhibition de 10,67mm, qui a augmenté après 48h à 14,00mm. Ceci a été observé aussi à l'encontre de *Staphylococcus aureus* FRI 361. En revanche, *Penicillium* a eu une activité dans les deux manipulations vis-à-vis de cette dernière et les zones d'inhibition qui sont apparues n'ont pas changé entre les deux temps d'incubation. Tous les mycoendophytes testés ont réagi vis-à-vis de la souche *Bacillus cereus* 14579, avec des zones d'inhibition plus ou moins importantes dans les deux manipulations. Par ailleurs, leurs activités sont plus

importantes dans la seconde, quand ils ont été déposés seuls. De plus, la durée d'incubation n'a pas modifié les diamètres des zones d'inhibition dans les deux manipulations.

Le fait que les moyennes des zones d'inhibition des champignons endophytes ont légèrement augmenté dans la seconde manipulation vis-à-vis de certaines souches bactériennes peut s'expliquer par le fait que les champignons peuvent entraver mutuellement l'expression de leurs métabolites secondaires bioactifs, quand ils sont dans le même milieu du fait de l'existence d'une activité synergétique ou antagoniste entre ces champignons.

D'autre part, toutes les souches bactériennes ont été sensibles à l'antibiotique chloramphénicol et son efficacité a atteint son maximum après 18 heures d'incubation. Par contre, sa zone d'inhibition était un peu plus importante dans la première manipulation par rapport à la seconde pour toutes les souches, sauf pour *E. faecalis* vis-à-vis de laquelle la zone est restée sensiblement la même dans les deux manipulations et *S. aureus* S6 pour qui la zone a augmenté dans la seconde manipulation. Ceci est peut-être dû aux interactions qui peuvent exister dans la boîte avec les disques des champignons ou à d'éventuels artéfacts durant les manipulations. Ces résultats concordent avec les données décrites par TABUC (2007), où la présence simultanée de plusieurs espèces de mycoendophytes dans le même milieu entraîne une diminution de la production de mycotoxines par chacun de ces derniers et donc le pouvoir antibactérien de ces champignons. Par exemple, la production d'aflatoxine B1 est réduite quand une souche d'*Aspergillus flavus* est introduite dans une culture en même temps qu'une souche d'*Aspergillus parasiticus*. En revanche, la culture simultanée d'*Aspergillus parasiticus* et d'*Aspergillus flavus* ne modifie pas la production d'aflatoxines par ce dernier, alors que la présence des espèces de *Penicillium* diminue la production de cette mycotoxine. Dans le même esprit, la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* est inhibée par la présence d'*Aspergillus niger* (TABUC, 2007). La présence du mycète *Geotrichum candidum* pendant la croissance de *Fusarium langsethiae* affecte la production de la toxine T-2 du groupe des sesquiterpénoïdes de ce dernier et réduit sa production de plus de 90% par rapport à celle en culture pure, donc *Geotrichum candidum* produit un agent actif qui est responsable de l'effet réducteur de la production de la toxine T-2 par *Fusarium langsethiae*. Ces mycotoxines sont des métabolites secondaires, non protéiques toxiques, naturellement produites par les mycètes qui se développent dans plusieurs environnements. Elles sont produites suite à un stress. Les toxines sont retrouvées dans les spores et le mycélium et diffusent dans le substrat qu'elles contaminent, donc dans le milieu de culture par exemple pour entraver le développement d'autres microorganismes ou leurs activités (GASTELUM-MARTINEZ. 2012).

D'un autre côté, COMBES *et al.* (2012) ont prouvé l'existence d'une compétition entre le champignon endophyte *Paraconiothyrium variable* et un champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* et ce par la production d'oxylipines (des composés dérivés de l'oxydation des acides gras polyinsaturés et responsables de la communication chez de nombreux êtres vivants, végétaux et mammifères en particulier, mais peu étudiés chez les champignons). Ces molécules ne sont pas directement impliquées dans l'inhibition de la croissance du phytopathogène, suggérant l'existence d'un langage beaucoup plus complexe, elles sont capables d'inhiber de 90% la production d'une mycotoxine puissante, la beauvéricine, par le phytopathogène. Ces oxylipines auraient donc un rôle signal dans la régulation des cascades métaboliques, agissant comme un véritable langage moléculaire.



SYNTHESE ET DISCUSSION GENERALE

Peganum harmala L. est une plante très utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs troubles tels que : la stérilité féminine, les maladies de l'utérus, les dermatoses (eczémas), les conjonctivites purulentes, la fièvre, l'empoisonnement par les serpents, les diarrhées, l'avortement et même les cancers (FAROUK *et al.*, 2008). Ces vertus sont attribuées essentiellement à la richesse de cette plante en alcaloïdes du groupe β -carbolines, dont les plus importants sont les suivantes : harmine, harmaline, harmol et harmalol (IDRISSI HASSANI et HERMAS, 2008). C'est une espèce qui pousse spontanément dans les régions arides et semi-arides. Aucune étude n'a déjà été faite sur le microbiome qui lui est associé. Une caractérisation de ce dernier permettrait d'expliquer ses propriétés médicinales, mais aussi l'adaptation de cette plante à l'aridité du milieu dans lequel elle vit. En effet, les feuilles des plantes des régions arides sont les plus exposées aux contraintes abiotiques (températures élevées et insolation, en plus du manque d'eau). Elles adoptent alors des stratégies de survie, parmi celle-ci l'établissement de symbioses avec des champignons épiphytes et endophytes au niveau de la phyllosphère (GRBIC *et al.*, 2015). Ces derniers sont généralement thermotolérants et permettent à la plante de résister aux conditions difficiles du milieu de vie. C'est ainsi que depuis la colonisation des terres par des lignées de plantes ancestrales il y a 450 millions d'années, les plantes et leurs microorganismes associés ont interagi les uns avec les autres, formant ainsi un assemblage d'espèces souvent appelé «holobionte». Les fortes densités microbiennes détectées sur les tissus végétaux, ainsi que le temps de génération rapide des microorganismes et leur origine plus ancienne par rapport à leur hôte, suggèrent que les interactions microbe-microbe sont également des forces sélectives importantes pour la formation de complexes microbiens dans la phyllosphère ainsi que dans les compartiments de l'endosphère (HASSANI *et al.*, 2018).

Nous nous sommes donc intéressés au *Peganum harmala* récolté à dayate Aiat (Laghouat, Algérie). Notre étude a révélé que sur le plan quantitatif, la fréquence de colonisation par les épiphytes (100%) est plus élevée que celle des mycoendophytes (39.86%) foliaires de cette plante, alors que le nombre de taxons au niveau des deux microniches a révélé 15 genres pour les épiphytes et 14 genres de champignons endophytes, avec l'existence de genres uniquement endophytes, à savoir : *Exophiala*, *Aureobasidium*, *Verticillium*, *Paraphaesphaeria* et *Absidia*. Pour les genres *Mycoclados*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Phoma*, *Colletotricum* et *Epicoccum*, ils n'existent que comme épiphytes au niveau de ces mêmes feuilles. Le phylum des Ascomycota domine au niveau de la phyllosphère, suivi des Zygomycota pour les épiphytes et des Basidiomycota pour les endophytes foliaires de cette

plante. Cela est en accord avec les travaux de KHAN *et al.* (2010) sur *Withania somnifera* des régions semi-arides (Karachi, Pakistan). En effet, les mycoendophytes des phyla des Zygomycota et des Basidiomycota sont retrouvés beaucoup plus chez les plantes herbacées (PORRAS-ALFARO et BAMYAN, 2011). Nos résultats indiquent que les genres *Cladosporium* et *Alternaria* sont les plus abondants comme endophytes au niveau des feuilles de *Peganum harmala*. Ces deux genres fongiques sont les plus fréquemment enregistrés au niveau de la phyllosphère. KITA (1988) et KUTRZEBA (1993) ont confirmé que ces champignons sont omniprésents dans les limbes des feuilles de nombreuses espèces végétales. Pour PUSZ *et al.* (2015), ces deux genres dominant comme épiphytes au niveau des feuilles d'*Amaranthus spp.* Par ailleurs, notre étude a révélé la dominance des genres *Penicillium* et *Rhizopus* comme épiphytes au niveau des feuilles de *Peganum harmala*.

L'indice de Shannon a révélé une diversité élevée chez les épiphytes par rapport aux endophytes foliaires de *Peganum harmala*. Ceci est dû aux conditions environnementales et climatiques que subissent la surface et l'intérieur des feuilles. En effet, seules certaines espèces microbiennes peuvent activement pénétrer les tissus de la feuille pour devenir endophytes (VIRET *et al.* 1994 ; WILSON *et al.* 1999). Les conditions climatiques à la surface des feuilles varient rapidement en fonction des cycles jour/nuit et des épisodes de pluie. Cependant, les niveaux de température et d'humidité présentent souvent de forts changements, même à l'intérieur de la feuille, limitant ainsi la fréquence des conditions appropriées pour l'infection des tissus végétaux (MONTESINOS *et al.*, 2002). Pour notre étude, la présence de tous ces champignons au niveau de la phyllosphère peut s'expliquer par la période d'échantillonnage (avril). Beaucoup de champignons se développent durant la saison printanière. Cela est en rapport avec les précipitations qui peuvent augmenter la dispersion des spores fongiques, favorisant ainsi la colonisation des tissus végétaux. De ce fait, la saisonnalité est un élément déterminant du statut qualitatif de ces microorganismes, par le fait qu'il détermine en quelque sorte les fluctuations physiologiques de l'hôte (GORE et BUCAK, 2007 ; EL NAGERABI *et al.*, 2013).

Les champignons endophytes sont une source inépuisable de molécules bioactives. Dans notre étude, les extraits de ces derniers se sont avérés contenir des composés biologiquement importants. En combinaison, ces composés bioactifs ont montré une activité antimétabolique sur les cellules méristématiques des racines d'oignon et une activité antiproliférative chez les cellules de levure.

Synthèse et discussion générale

Par ailleurs, l'étude de l'activité antioxydante des extraits bruts des champignons endophytes et de l'extrait foliaire de *Peganum harmala* selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que ces extraits possèdent une activité antioxydante faible. Cette activité est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique. Néanmoins, le champignon endophyte *Penicillium* a montré la meilleure activité antioxydante, malgré sa faible abondance par rapport au genre *Cladosporium*, *Alternaria* et *Aspergillus* au niveau des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*, mais aussi comparativement à la plante elle-même.

Afin d'interpréter la relation entre les différents paramètres (indice mitotique : IM, pourcentage de cytotoxicité : Cyt, concentration inhibitrice : IC50 et le taux de polyphénols : TP), respectivement testés au niveau des activités biologiques (Activité antimitotique, antiproliférative et antioxydante) des extraits bruts des métabolites secondaires fongiques de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*, nous avons réalisé une analyse en composante principale de synthèse (Figure 55). Le plan 1-2 de l'ACP explique 96% du phénomène, avec pour l'axe 2 : 35% et pour l'axe 1 : 61% de l'inertie totale. A partir de la matrice de corrélation, nous relevons des corrélations positives entre le taux de polyphénols et l'indice mitotique (0.59), le taux de polyphénols et le pourcentage de cytotoxicité (0.19). Par ailleurs, la concentration inhibitrice (IC50) possède des corrélations négatives avec le taux de polyphénols (-0.92), avec l'indice mitotique (-0.65) et avec le pourcentage de cytotoxicité (-0.31) (Tableau XXX).

Tableau XXX : Matrice de corrélation des différentes activités biologiques des extraits bruts de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*.

	IC50	TP	IM	Cyt
IC50	1			
TP	-0,92	1		
IM	-0,65	0,59	1	
Cyt	-0,31	0,19	-0,51	1

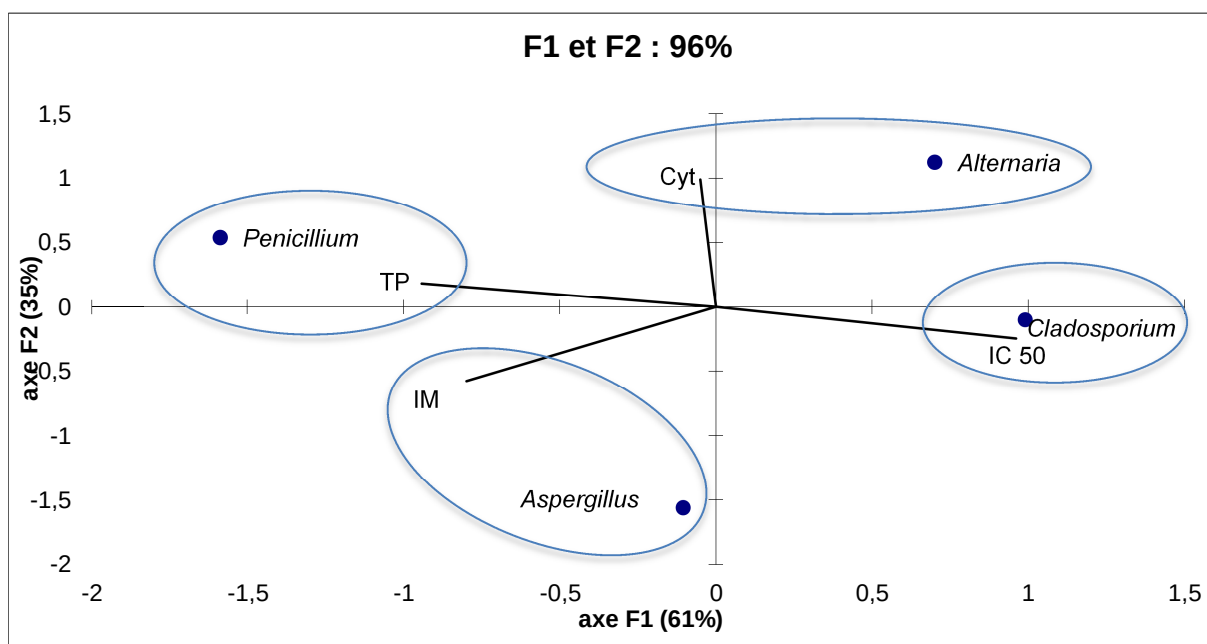


Figure 55 : ACP représentant les différentes activités biologiques des extraits bruts de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* de dayate Aiat (Laghouat, Algérie).

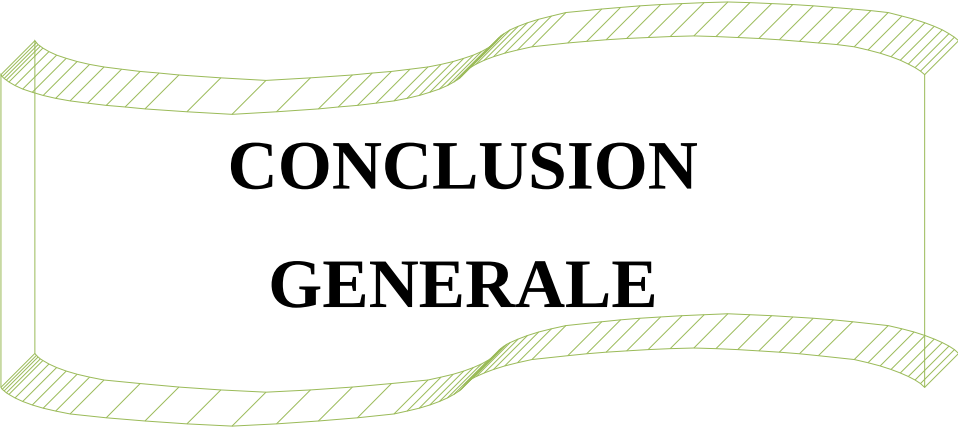
Selon le plan ½ de l'ACP, l'extrait brut du genre *Alternaria* semble lié au pourcentage de cytotoxicité, traduisant ainsi l'effet antiprolifératif et cytotoxique de ce mycoendophyte. En effet, le genre *Alternaria* est capable de produire le taxol à effet cytotoxique à partir des taxanes, tel que rapporté par CARUSO *et al.* (2000). L'extrait brut du genre *Aspergillus* possède un lien avec l'indice mitotique. Ceci confirme que les métabolites secondaires produits par le genre *Aspergillus* : mycoendophyte foliaire de *Peganum harmala* possèdent une activité similaire à celle de la colchicine dans l'inhibition de la mitose, générant ainsi des anomalies chromosomiques et cellulaires. Ceci est observé pour le lapachol produit par *Aspergillus niger* : mycoendophyte isolé de *Tabebuia argentea* (CHANNABASAVA et GOVINDAPPA, 2014). Les abondances des genres *Alternaria* et *Aspergillus* comme mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* confirme l'effet toxique de cette essence, ainsi que la cytotoxicité des métabolites secondaires fongiques de ces champignons endophytes.

Pour l'extrait brut du genre *Cladosporium*, il est lié à la concentration inhibitrice IC₅₀. Ce dernier montre la concentration inhibitrice IC₅₀ la plus élevée. L'extrait brut du genre *Penicillium* est lié aux taux de polyphénols à l'origine de l'activité antioxydante. Les molécules antioxydantes extraites par l'acétate d'éthyle semblent être synthétisées beaucoup

plus par *Penicillium* mycoendophyte foliaire que la feuille de *Peganum harmala* ou les autres champignons endophytes recensés à son niveau. Le faible pouvoir antiradicalaire est dû à la toxicité de cette plante riche en alcaloïdes. SADANANDA *et al.* (2011) GOVINDAPPA *et al.* (2013) ont montré que les champignons endophytes *Aspergillus niger* et *Penicillium sp* de *Tabebuia sp* constituent une source importante de composés phénoliques, qui sont à l'origine de l'activité antioxydante.

D'autre part, ces champignons endophytes isolés à partir des feuilles de *Peganum harmala* : *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Cladosporium* ont été testés pour leurs activités antibactériennes et ce en mettant leurs mycéliums ensemble et séparément dans deux manipulations différentes vis-à-vis des souches bactériennes Gram-positif tests : *Staphylococcus aureus* FRI 137, *Staphylococcus aureus* FRI 326, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* MU 50 mecA, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC10876 et *Bacillus cereus* ATCC 14579. Cette expérience a montré que les champignons endophytes ont manifesté un effet antibiotique plus ou moins important, en fonction de la souche bactérienne et des conditions culturales (la disposition des champignons ensemble ou séparément et le temps d'incubation). Ces résultats concordent avec les données décrites par TABUC (2007), où la présence simultanée de plusieurs espèces de mycoendophytes dans le même milieu entraîne une diminution de la production de mycotoxines par chacun de ces derniers et donc le pouvoir antibactérien de ces champignons.

Les mycoendophytes des feuilles de *Peganum harmala* de dayate Aiat (Laghout, Algérie) ont été reconnus comme sources importantes d'une variété de métabolites secondaires biologiquement actifs. La caractérisation chimique est nécessaire pour identifier ces composés et leur mécanisme d'action. *Peganum harmala* n'est pas brouté par le bétail. Le métabolisme de ces champignons endophytes pourrait être influencé par des composés à rôle répulsif synthétisés par la plante seule, ou avec l'aide des différents champignons symbiotiques potentiels présents dans les contrées arides dans lesquelles elle vit.



CONCLUSION

GENERALE

Conclusion générale

La présente étude a concerné la diversité en Mycètes au niveau de la phyllosphère de *Peganum harmala* de dayate Aiat (Laghouat, Algérie). 14 genres de champignons endophytes et 15 genres d'épiphytes ont été identifiés, avec l'existence des genres uniquement endophytes, à savoir : *Exophiala*, *Aureobasidium*, *Verticillium*, *Paraphaeohermia* et *Absidia*. Pour les genres *Mycoclados*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Phoma*, *Colletotricum* et *Epicoccum*, ils n'existent que comme épiphytes au niveau de ces mêmes feuilles. L'indice de Shannon a révélé une diversité élevée chez les épiphytes par rapport aux endophytes foliaires de *Peganum harmala*. Les quotients de similarité (QS) obtenus indiquent une interaction entre les communautés épiphytiques et endophytiques des feuilles de cette essence. Ceci est dû aux conditions environnementales et climatiques que subissent la surface et l'intérieur des feuilles.

Les champignons endophytes sont une source intarissable de nouveaux produits naturels bioactifs, avec un potentiel d'exploitation dans différents domaines médicaux, agricoles et industriels. Dans la présente recherche, des champignons endophytes isolés à partir des feuilles de *Peganum harmala* : *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Cladosporium* ont été testés pour leurs activités : antimitotiques, antiprolifératives, antioxydantes et antibactériennes.

Les essais antimitotiques ont révélé que les extraits de métabolites secondaires fongiques bruts des différents genres ainsi que les différentes combinaisons présentaient une inhibition de la division des cellules méristématiques à différents stades du cycle cellulaire, au même titre qu'un alcaloïde : la colchicine. De même que pour les essais antiprolifératifs sur *Saccharomyces cerevisiae*, qui ont révélé une inhibition de la croissance cellulaire pour les échantillons traités avec les extraits fongiques ainsi que pour les échantillons traités avec les deux standards (colchicine et quercétine). Le phénomène de nécrose cellulaire a été observé au niveau des levures traitées par l'extrait d'*Alternaria* et l'extrait *Alternaria+Penicillium*. De ce fait, l'extrait du champignon endophyte s'est avéré contenir des composés biologiquement importants. En combinaison, ces composés bioactifs ont montré une activité antimitotique sur les cellules méristématiques des racines d'oignon et une activité antiproliférative chez les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*. D'autres études sont nécessaires pour identifier les composés de l'extrait fongique qui provoquent une cytotoxicité et qui pourraient être testés sur des lignées cellulaires cancéreuses. Ce qui nous incite à exploiter cette voie, afin de trouver des molécules bioactives qui peuvent inhiber la prolifération des cellules tumorales.

Conclusion générale

L'étude de l'activité antioxydante des extraits bruts des champignons endophytes et de l'extrait foliaire de *Peganum harmala* selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que ces extraits possèdent une activité antioxydante faible. Cette activité est nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique. Néanmoins, le champignon endophyte *Penicillium* a montré la meilleure activité antioxydante, comparé aux autres mycoendophytes, mais aussi à la plante elle-même. Ces composés bioactifs sont issus d'un métabolisme associé entre les feuilles et leurs champignons endophytes. Le faible pouvoir antiradicalaire est dû à la toxicité de la plante. Le métabolisme des champignons endophytes pourrait être influencé par des composés à rôle répulsif synthétisés par la plante seule, ou avec l'aide des différents champignons symbiotiques potentiels présents dans les contrées arides dans lesquelles elle vit.

Pour l'activité antibactérienne, les mycéliums de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* : *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* présentent un effet antibactérien, en les mettant ensemble ou séparément dans deux manipulations différentes vis-à-vis des souches bactériennes Gram-positif tests : *Staphylococcus aureus* FRI 137, *Staphylococcus aureus* FRI 326, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* MU 50 mecA, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC10876 et *Bacillus cereus* ATCC 14579. Cette expérience a montré que les champignons endophytes ont manifesté un effet antibiotique plus ou moins important, en fonction de la souche bactérienne et des conditions culturales (la disposition des champignons ensemble ou séparément et le temps d'incubation). Les résultats obtenus montrent que parmi les champignons endophytes étudiés, le genre *Alternaria* est celui qui a montré un large spectre d'activité vis-à-vis des souches bactériennes utilisées. Ainsi, il a présenté une activité antibactérienne significative sur les bactéries Gram-positif : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* FRI 361, *Staphylococcus aureus* FRI S6 et a été le seul à avoir une importante activité à l'encontre de *Staphylococcus aureus* MU 50 mecA. Les souches de *Bacillus cereus* ont été les plus sensibles. Ainsi, tous les champignons testés ont réagi vis-à-vis de cette dernière, de même pour *Enterococcus faecalis* ATCC 49452. Il apparaît aussi que la présence des mycoendophytes ensemble ou séparément vis-à-vis de chaque souche bactérienne influence leurs activités et leurs capacités à produire des composés antibactériens, soit positivement ou négativement. Le temps d'incubation aussi est à prendre en considération.

Conclusion générale

La caractérisation chimique est nécessaire pour identifier ces composés et leur mécanisme d'action. Si une source microbienne d'un médicament était disponible, il pourrait éliminer le besoin de récolter des plantes. Le prix du médicament devrait également être réduit, étant donné que ces molécules peuvent être produites par fermentation de la même manière que la pénicilline. Ainsi, la production de métabolites naturels par les mycoendophytes peut aider à protéger les ressources naturelles et à satisfaire les besoins en produits pharmaceutiques.

Ainsi, d'autres études doivent être mises en œuvre pour obtenir plus de précision et explorer plus en profondeur cet aspect du travail, afin de permettre :

- une compréhension des synergies et des interactions qui peuvent exister entre les champignons endophytes et leur capacité à cohabiter ensemble dans la même plante ;
- détermination de ces champignons endophytes jusqu'au niveau spécifique ;
- comprendre le mécanisme qui a permis aux mycoendophytes de coloniser une plante connue pour sa toxicité (*Peganum harmala*), de synthétiser des métabolites secondaires au sein de cette dernière ;
- comprendre les interactions existantes entre les deux partenaires et découvrir le potentiel d'activités biologiques de ces champignons ;
- une extraction, purification et identification des substances bioactives produites par ces champignons endophytes ;
- une comparaison entre les métabolites secondaires produites par les champignons endophytes et la plante ;
- une exploitation à l'échelle industrielle des composés à activités biologiques issus des mycoendophytes.

La partie I a fait l'objet de quatre communications internationales





La partie II a fait l'objet d'une publication internationale dans *Journal of Fundamental and Applied Sciences* et de deux communications internationales.

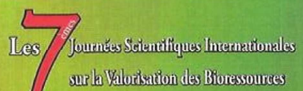
	Journal of Fundamental and Applied Sciences	Research Article
	ISSN 1112-9867	
	Available online at http://www.jfas.info	
	COMPARATIVE STUDY OF <i>IN VITRO</i> ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FOLIAR ENDOPHYTIC FUNGI AND LEAVES EXTRACTS OF <i>PEGANUM HARMALA</i> OF DAYATE AIAT (LAGHOUAT, ALGERIA)	

Y. Ouzid^{1,2}, N. Smail-Saadoun¹ et K. Houali^{*2}

¹Laboratoire Ressources Naturelles, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie

²Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie

Received: 04 May 2017/ Accepted: 28 October 2017 / Published online: 01 January 2018

		LR Bioressources: Biologie Intégrative & Valorisation BIOLIVAL & L'Association Tunisienne pour la Valorisation des Bioressources ATVAB			
					
Attestation					
Le comité d'organisation atteste par la présente que :					
Yasmina OUZID, Noria SMAIL-SAADOUN, Karim HOUALI					
Ont présenté la communication Affichée intitulée :					
Activité antimicrobienne de l'extrait d' <i>Alternaria</i> : mycoendophyte foliaire de <i>Peganum harmala</i> de dayate Aiat (Laghout, Algérie).					
Lors des 7 ^{èmes} Journées Scientifiques Internationales sur la Valorisation des Bioressources les 30 - 29 Avril et le 1 ^{er} Mai 2016 à l'hôtel l'Orient Palace Sousse, Tunisie.					
				Pour le comité d'organisation Professeur Lotfi ACHOUR	
					



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ- BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
LABORATOIRE DE GESTION ET DE VALORISATION DES RESSOURCES NATURELLES ET ASSURANCE QUALITE



ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le président du comité d'organisation du séminaire international « Environnement, Agriculture et Biotechnologie » (SIEAB-2017) : Bouira, les 27 et 28 Novembre 2017,

atteste que

Mme/M. OUZID Yasmina

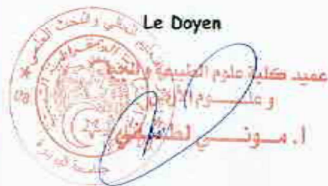
a participé avec une Communication affichée

intitulée:

Evaluation de l'activité antimutotique de l'extrait foliaire de *Peganum harmala* de Dayate Aiat
(Laghout, Algérie).

Co-auteurs: SMAIL-SAADOUN NORIA, HOUALI KARIM.

Le Doyen



Le Président du Comité d'Organisation



**COMPARATIVE STUDY OF *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FOLIAR
ENDOPHYTIC FUNGI AND LEAVES EXTRACTS OF *PEGANUM HARMALA* OF
DAYATE AIAT (LAGHOUAT, ALGERIA)**

Y. Ouzid^{1,2}, N. Smail-Saadoun¹ et K. Houali*²

¹Laboratoire Ressources Naturelles, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie

²Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, Université Mouloud Mammeri,
Tizi-Ouzou, Algérie

Received: 04 May 2017/ Accepted: 28 October 2017 / Published online: 01 January 2018

Abstract

Endophytic fungi that reside in plant tissues are a potential source of secondary metabolites with biological activities. In our study, we investigated the detection of the antioxidant activity of the crude fungal extract of the genera *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Penicillium*: endophytic fungi isolated from the leaves of *Peganum harmala* harvested in Laghouat and extract of these same leaves. The extraction of these metabolites was carried out using ethyl acetate. The antioxidant activity of the latter was carried out by the DPPH test. Our tests reveal that the extracts studied have a low antioxidant activity. The inhibitory concentrations show a higher antioxidant effect for the *Penicillium* extract compared to the other extracts studied. The antioxidant molecules are related to the content of polyphenols. *Penicillium* extract has the highest polyphenol content. Our results confirm that endophytic fungi are a potential and limited source of natural antioxidant compounds, in the same way as plants.

Key words: Leaf extract; Extracts of endophytic fungi; Antioxidant activity; Content of polyphenols and *Peganum harmala*.

Author Correspondence, e-mail: hualitizi@yahoo.fr

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v10i1.10>



1. INTRODUCTION

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de molécules bioactives. Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées [1,2]. Cette recrudescence d'intérêt concerne les effets biologiques des antioxydants naturels inclus dans la lutte contre le stress oxydatif généré par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Celles-ci sont impliquées dans le vieillissement, le déclenchement et la progression de plusieurs maladies, telles que le cancer, l'athérosclérose, les accidents cardiovasculaires (AVC), l'ostéoporose, les maladies inflammatoires ainsi que les maladies neurodégénératives.

Ces plantes médicinales sont colonisées naturellement par des mycoendophytes, champignons mutualistes vivant dans les tissus de la plante et ne causant aucun symptôme de maladie apparent. Ils sont capables de fournir eux aussi des métabolites secondaires, ayant des activités biologiques. Les polyphénols dont les flavonoïdes, sont les principaux métabolites secondaires des plantes médicinales, ainsi que des champignons, responsables de leur activité antioxydante, antimutagène et antitumorale [3,4].

Peganum harmala est une plante vivace de la famille des Zygophyllaceae, connu sous le nom de Harmel. Elle est présente en abondance dans le Moyen-Orient et le Nord de l'Afrique [5]. *Peganum harmala* a été utilisée pendant longtemps en médecine traditionnelle pour le soulagement de la douleur et comme un agent antiseptique. Elle possède également des propriétés anti-bactériennes, anti-fongiques, anti-virales, anti-oxydantes, anti-diabétiques, anti-tumorales, anti-leishmanioses, effet insecticide, une activité cytotoxique, ainsi que des effets hépato-protecteurs [6].

Notre présente étude vise à évaluer *in vitro* l'activité antioxydante, ainsi que la teneur en polyphénols des extraits fongiques bruts des mycoendophytes foliaires préalablement isolés et identifiés, comparativement à l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Peganum harmala* de dayate Aiat (Laghout, Algérie).

2. MATERIELS ET METHODES

Zone d'échantillonnage

Au cœur du pays des dayas (Algérie), au sud de la wilaya de Laghouat, se localise notre zone d'étude, plus exactement dans la région de Timzerth. Dayate Aiat se localise à 50 Km du chef-lieu de la wilaya. Ces coordonnées GPS sont 33°31N pour la latitude, 2°56E pour la longitude. Elle se trouve à 871 m d'altitude. Sur le plan bioclimatique, la zone d'étude se situe dans l'étage aride, avec une saison sèche de 11 mois par an (Figure 1).



Fig.1. Situation géographique de la zone d'étude.

Matériel végétal

Les feuilles de *Peganum harmala* ont été fraîchement récoltées sur dix sujets sains au mois d'avril 2015. L'échantillonnage a été effectué de manière aléatoire. Les échantillons ont été placés dans des sachets en papier et conservés dans une glacière, puis au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation au laboratoire.

Fermentation et extraction des métabolites secondaires fongiques bruts

Les mycoendophytes utilisés dans notre étude ont été isolés à partir des feuilles saines de *Peganum harmala* et identifiés. Ces champignons sont purifiés et mis à croître sur PDA à température ambiante pendant sept jours. En se basant sur les caractères culturels et morphologiques, quatre genres fongiques à savoir : *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont été identifiés à partir des cultures de feuilles de *Peganum harmala*. Deux à

trois pièces (0.5 x 0.5 cm) de chaque champignon ont été inoculées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de PDB (Potato Dextrose Broth) [7]. Deux répétitions sont faites pour chaque champignon. L'incubation se fait à température ambiante pendant trois à quatre semaines, avec une agitation périodique à 150 tours/minute. Par la suite, le contenu est filtré à travers une gaze stérile, afin de séparer le mycélium du bouillon de culture [8,9]. Ce dernier est centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 min et le surnageant a été récupéré [10]. L'extraction a été faite à l'acétate d'éthyle, meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires fongiques selon [11, 12,13]. A chaque filtrat, il faut rajouter un volume égal de solvant et mettre sous agitation pendant 30 min à 40°C. La solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décanter pour séparer les deux phases. La phase organique a été récupérée pour être concentrée sous pression par évaporation du solvant, à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C [9,14].

Préparation de l'extrait de feuilles

Les feuilles récoltées ont été séchées à l'ombre et à température ambiante. Elles sont réduites en une fine poudre. 1g de la poudre de feuilles a été additionné à 10 ml d'une solution aqueuse constituée d'acétate d'éthyle : Eau distillée (8:2 v/v), centrifugée à 4000 tours pendant 15 min pour recueillir le surnageant. Ce processus a été répété trois fois. Ensuite, le solvant a été éliminé par évaporation [15].

Activité antioxydante

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, nous avons utilisé le test de piégeage du radical libre DPPH (Diphénylpicrylhydrazyl) [16], qui est défini par l'indice d'inhibition de l'activité radicalaire en pourcentage, où le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) suivant la formule suivante :

$$I\% = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

Où: A_c : absorbance du contrôle; A_t : absorbance du test.

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, nous avons considéré la concentration inhibitrice IC₅₀ de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est

d'autant plus élevée que son IC50 est faible. L'indice IC50 montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH de 50% [16]. Les valeurs de l'IC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

Dosage des polyphénols

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué en 2007 par LI et ses collaborateurs [17]. 200 µl d'extrait fongique ou foliaire est mélangé avec 1 ml de réactif de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois dans de l'eau distillée. Après 4 minutes, 800 µl de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à concentration de 7,5 g/l sont ajoutés. Après une incubation du mélange réactionnel pendant 1 à 2 heures à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm. La quantité des polyphénols est déterminée par la courbe d'étalonnage, effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0-0.3 mg/ml) dans les mêmes conditions. Dans l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, Y est le taux d'absorption lue à une longueur d'onde de 760 nm et X est la concentration des composés phénoliques en mg /ml (**Figure 2**).

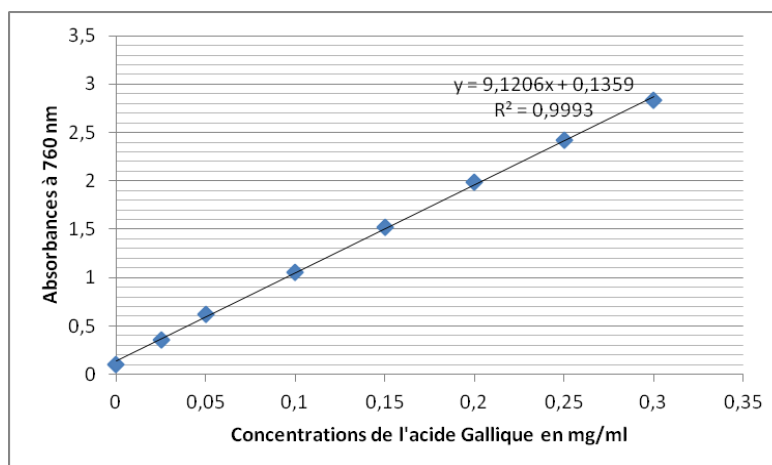


Fig.2. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la détermination de la teneur totale en polyphénols des extraits fongiques et foliaire de *Peganum harmala*.

Analyse statistique

Des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées, afin de mettre en évidence les différences significatives entre les IC50 obtenus, ainsi que les teneurs en polyphénols des différents extraits bruts fongiques et foliaire, à l'aide du logiciel Stat Box 6.40.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Nos essais antioxydants révèlent que les extraits de mycoendophytes foliaires et l'extrait de feuilles de *Peganum harmala* sont dotés d'un pouvoir antiradicalaire faible. *Peganum harmala* est une plante toxique, donc non consommée par les herbivores et encore moins par l'homme. Les IC₅₀ montrent une activité antioxydante plus élevée dans l'extrait fongique de *Penicillium* (IC₅₀=1.065±0.003mg/ml), suivie de celle de l'extrait d'*Aspergillus* (5.95±0.05mg/ml). Pour l'extrait d'*Alternaria*, elle est de 6.14±0.07mg/ml, de même que pour l'extrait foliaire avec une IC₅₀ de 6.15±0.01mg/ml. Par ailleurs, l'extrait de *Cladosporium* montre une faible activité antioxydante avec une IC₅₀ de 8.56±0.14mg/ml (**Tableau I**). Une différence hautement significative (p=0.00) est notée entre les IC₅₀ des extraits fongiques et foliaire avec celle de l'acide ascorbique. Il en est de même pour les IC₅₀ entre les différents extraits fongiques testés. La différence entre l'IC₅₀ de l'extrait de *Cladosporium* et l'extrait foliaire est significative (p=0.01), mais l'analyse de variance faite entre l'IC₅₀ des extraits d'*Alternaria* et d'*Aspergillus* et des feuilles ne révèle aucune différence significative (respectivement p=0.93 pour *Alternaria* et p=0.13 pour *Aspergillus*). Pour l'extrait de *Penicillium*, la différence est hautement significative (p=0.00). Le résultat obtenu pour l'IC₅₀ du genre *Penicillium* est en accord avec les résultats retrouvés par JAKOVLJEVIC et al. (2014) où la valeur IC₅₀ contre le radical DPPH était de 0.974 mg/ml pour *Penicillium fumiculosum* et 1,336 mg/ml pour *Penicillium chrysogenum* [18]. Les molécules antioxydantes extraites par l'acétate d'éthyle semblent être synthétisées beaucoup plus par *Penicillium* mycoendophyte foliaire que la feuille de *Peganum harmala* ou les autres champignons endophytes recensés à son niveau. Néanmoins, cette activité reste relativement faible par rapport à l'acide ascorbique, dont la valeur IC₅₀ est de l'ordre de 0.127±0.002 mg/ml.

Tableau I : les IC 50 des différents extraits.

Différents extraits	Extrait <i>Cladosporium</i>	Extrait <i>Alternaria</i>	Extrait <i>Aspergillus</i>	Extrait <i>Penicillium</i>	Extrait foliaire	Acide Ascorbique
IC ₅₀ ±ES (mg/ml)	8.56±0.14	6.14±0.07	5.95±0.05	1.065±0.003	6.15±0.01	0.127±0.002

ES : Erreur standard.

Le type de solvant joue un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques et des molécules anti-oxydantes. Cependant, nos extraits des genres *Alternaria*, *Aspergillus* et *Cladosporium*, ainsi que l'extrait foliaire de *Peganum harmala* ont montré une activité antioxydante faible par rapport à l'extrait fongique du genre *Penicillium*, et cela peut être dû à la nature des molécules extraites avec l'acétate d'éthyle. C'est un solvant sélectif pour les composés phénoliques de bas poids moléculaires [19]. L'activité antioxydante des extraits de champignons endophytes et l'extrait foliaire peut être due à la présence des composés phénoliques dans ces derniers.

Les teneurs en polyphénols des différents extraits sont différentes. L'extrait de *Penicillium* présente cependant la teneur en polyphénols la plus importante : $4.143 \pm 0.007 \text{ mg/ml}$ (**Figure 3**). Les analyses de variance révèlent une différence hautement significative entre la teneur en polyphénols des extraits d'*Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* et celle de l'extrait foliaire ($p=0.00$). Il en est de même entre les différents extraits fongiques. La différence est juste significative entre la teneur en polyphénols de l'extrait *Cladosporium* et l'extrait foliaire ($p=0.01$).

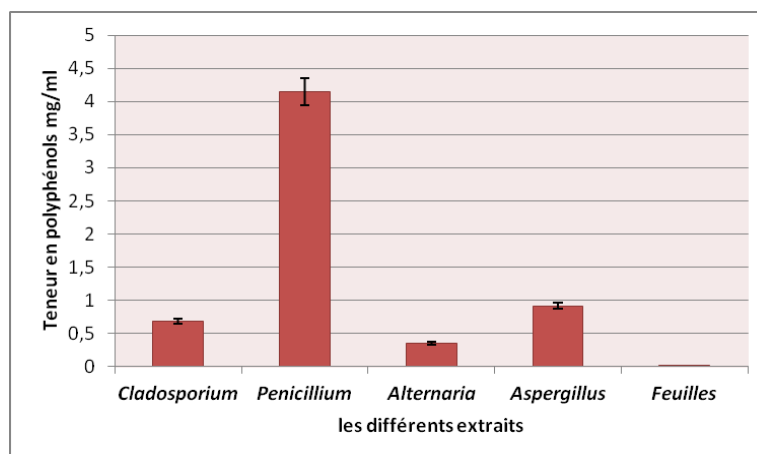


Fig.3. Teneur en polyphénols des extraits fongiques bruts et l'extrait foliaire.

Le champignon du genre *Penicillium* a montré une forte activité antioxydante par rapport aux autres champignons endophytes avec une teneur importante en polyphénols ($4.143 \pm 0.007 \text{ mg/ml}$). SADANANDA *et al.* (2011) ont montré que les champignons endophytes *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* de *Tabebuia sp.* possédaient des propriétés biologiques relatives aux mécanismes antioxydants [20]. Quant à FERNANDES *et al.* (2009), ils ont mis en évidence l'activité antioxydante chez *Alternaria alternata*, mycoendophyte du

Coffea arabica L. [21]. Pour RAVINDRAN et al. (2012), *Aspergillus flavus*, champignon endophyte dominant chez les espèces des mangroves, avait un potentiel antioxydant [22]. De même pour KHENNOUF et al. (2010), qui ont rapporté que les champignons endophytes *Phoma*, *Cladosporium* et *Chaetomium* avaient une activité antioxydante [23].

Nos résultats confirment que les mycoendophytes : *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Aspergillus* sont une source potentielle et limitée de composés naturels antioxydants au même titre que les plantes. Ces métabolites secondaires sont communs à la fois aux plantes et aux microorganismes. Ainsi, ces composés peuvent être produits par des entités associées sur le plan écologique [24]. L'activité antioxydante des extraits végétaux dépend essentiellement du taux des polyphénols accumulés durant le cycle végétatif de la plante [25]. Par ailleurs, il est possible que divers métabolites végétaux pourraient être des produits du métabolisme de leurs endophytes [26].

4. CONCLUSION

L'étude des feuilles de *Peganum harmala* a mis en évidence une richesse au niveau des champignons endophytes qui la colonisent. Quatre genres au total ont été identifiés, il s'agit de *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium*. L'étude de l'activité antioxydante des extraits bruts des champignons endophytes et de l'extrait foliaire de *Peganum harmala* selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que ces extraits possèdent une activité antioxydante faible. Cette activité est nettement inférieure à celle du référent, à savoir l'acide ascorbique. Néanmoins, le champignon endophyte *Penicillium* a montré la meilleure activité antioxydante, comparé aux autres mycoendophytes, mais aussi à la plante elle-même. Ces composés bioactifs sont issus d'un métabolisme associé entre les feuilles et leurs champignons endophytes. Le faible pouvoir antiradicalaire est dû à la toxicité de la plante expliquée par la synthèse d'alcaloïdes par cette dernière. L'activité antioxydante est généralement corrélée à une concentration de composés phénoliques. D'après la bibliographie, seul *Penicillium* est connu pour la synthèse de ces composés. Le métabolisme des champignons endophytes de *Peganum harmala* pourrait être influencé par les composés à rôle répulsif synthétisés par la plante seule, ou avec l'aide de ces mêmes champignons

symbiotiques présents dans les contrées arides dans lesquelles elle vit.

5. REFERENCES

- [1] Suhaj M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19 (6-7):531-537.
- [2] Tadhani M.B, Patel V.H and Subhash R. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 27(3): 323-329.
- [3] Heider E.M, Harper J.K, Grant D.M, Hoffman A, Dugan F, Tomer D.P and O'Neill K.L. Exploring unusual antioxidant activity in a benzoic acid derivative: a proposed mechanism for citrinin, *Tetrahedron*, 2006, 62(6):1199-1208.
- [4] Yawadio Nsimba R, Kikuzaki H and Konishi Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp.* seeds, *Food Chemical*, 2008, 106:760-766.
- [5] Chaieb M. et Boukhris M. (1998). Flore succinte et illustrée des zones arides et sahariennes de Tunisie. Tunis, Tunisia: Imprimerie d'or.
- [6] Jinous A and Fereshteh R. Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala L.* *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, 6(22):1573-1580.
- [7] Xiaoling C, Xiaoli L, Shining Z, Junping G, Shuiping W, Xiaoming L, Zhigang S. and YONGCHENG L. Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *Journal of Ecology and The Natural Environment*, 2010, 2:017-024.
- [8] Barik B. P, Tayung K, Jagadev P. N and Dutta S. K. Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *European Journal of Biological Sciences*, 2010, 2:8-16.
- [9] Mohanta J, Tayung K and Mohapatra U. Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology*, 2007, 2(5):1-8.
- [10] Madki M. A, Manzoor A. S, Powar P. V and Patil K. S. Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 2 :848-858.

-
- [11] Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A and Sabaou N. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Medicale*, 2005, 4(15):211-219.
- [12] Gogoi D.K, Mazumder S, Saikia R and Bora T.C. Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India. *Journal of Medical Mycology*, 2008, 1(18):1-9.
- [13] Qin J.C, Zhang Y.M, Gao J.M, Bai M.S, Yang S.X, Laatsch H and Zhang A.L. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 6(19):1572-1574.
- [14] Oliveira Silva M. R, Sena Xisto K and Buarque Gusumao N. Secondary metabolites produced by endophytic fungus *Paecilomyces variotii* Bainier with antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. In: Mendez-Vilas A.(eds). *Current Research Topics in Applied Microbiology: Proceedings of the II international Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*, 2009, 4:519-520.
- [15] Darabpour E, Motamedi H and Seyyed Nejad S.M. Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2010, 3:124-127.
- [16] a) Sanchez-Moreno C, Larrauri J.A. and Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Science Technology International*, 1998, (8):121-137, b) Lanez T. et al. Antioxidant activity and superoxide anion radical interaction with 2-(ferrocenylmethylamino) benzonitrile and 3-(ferrocenylmethylamino) benzonitrile J. Iran. Chem. Soc., 2016, 13 (9), 1741-1748, c) Lanez T. et al. Spectrophotometrical study of antioxidant standards interacting with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Chemistry & Chemical Technology*, 2016, 10 (3), 255-258.
- [17] Li H.B, Cheng K.W, Wong C.C, Fan K.W, Chen F and Tian Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chimestry*, 2007, 102:771-776.
- [18] Jakovljević Violeta D, Milićević Jasmina M, Stojanović Jelica D, Solujić Slavica R. and

Vivić Miroslav M. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium fumiculosum*. Chemical Industry, 2014, 68(1):43-49.

[19] Premjanu N and Jaynthy C. Antioxydant Activity of endophytic Fungi isolated from *Lannea coromendalica*. International Journal of Research on Pharmaceutical Sciences, 2014, 5(4):304-308.

[20] Sadananda T, Nirupama S, Chaithra R, Govindappa K, M Chandrappa C.P and Vinay Raghavendra B. Antimicrobial and antioxydant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of Anticancer agent (Lapachol). Journal of Medicinal plants Research, 2011, 5(16):3643-3652.

[21] Fernandes M.R.V, Costa-Silva T.A, Pfenning L.H, Costa-Neto C.M, Heinrich T.A, Alencar S.M, Lima M.A and Ikegaki M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea Arabica* L. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, 2009, 45(4):677-685.

[22] Ravindran C, Naveenan T, Govindaswamy, Varatharajan R, Rajasabapathy and R.Meena R.M. Antioxydants in mangrove plants and endophytic fungal associations, *Botanica Marina*, 2012, 5(3):269-279.

[23] Khennouf S, Iratni N, Baghiani A, Harzallah D and Arrar L. Antioxydante and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso leaves and some phenolic compounds. Journal of Medicinal Plant Research, 2010, 4(13):1273-1280.

[24] Nicoletti R and Fiorentino A. Plant Bioactive Metabolites and Drugs Produced by Endophytic Fungi of Spermatophyta. *Agriculture*, 2015, 4(5):918-970.

[25] Burda S and Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Food chemistry*, 2011, 49(6):2774-2779.

[26] Kusari S, Hertweck C and Spiteller M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry and biology*, 2012, 19(7):792-798.

How to cite this article:

Ouzid Y, Smail Saadoun N and Houali K. Comparative study of in vitro antioxidant activity of foliar endophytic fungi and leaves extracts of *peganum harmala* of dayate Aiat (Laghout, Algeria). *J. Fundam. Appl. Sci.*, 2018, 10(1), 147-157.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

ABDALLA M.A., HELMKE E., LAATSCH H., FUJIANMYCIN C. (2010). A Bioactive Angucyclinone from a Marine Derived *Streptomyces* sp. B6219 [1], *Nat. Prod. Comm.*, **5**, 1917-1920.

ABDALLA (1) M.A. , YADAV P.P., DITTRICH B., SCHÜFFLER A. and LAATSCH H.(2011). ent-Homoabyssomicins A and B, two new spirotetronate metabolites from *Streptomyces* sp. Ank 210. *Org Lett.*, **13(9)**, 2156-2159.

ABDALLA (2) M.A. , WIN H.Y. , ISLAM M.T. , VON TIEDEMANN A., SCHÜFFLER A. and LAATSCH H. (2011). Khatmiamycin, a motility inhibitor and zoosporicide against the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* from *Streptomyces* sp. ANK313. *The J. of Antibio.*, **64(10)**, 655-659.

ABDALLA M.A. and MATASYOH J.C. (2014). Endophytes as Producers of Peptides: An Overview About the Recently Discovered Peptides from Endophytic Microbes. *Nat. Prod. Bioprospect.*, **4**, 257–270.

ADHAMI H.R., FARSAM H. and KRENN L. (2011). Screening of Medicinal Plants from Iranian Traditional Medicine for Acetylcholinesterase Inhibition. *Phytother. Res.*, **25**, 1148.

ACHOUR S., SAADI H., TUREANT A., BANANI A., MOKHTARI A., SOULAYMANI A. et SOULAYMANI B. R. (2012). Intoxication au *Peganum harmala* L. et grossesse: deux observations marocaines. *Médecine et Santé Tropicales*, **22**, 84-86.

AHMED M., HUSSAIN M., DHAR M.K. and KAUL S.(2012). Isolation of microbial endophytes from some ethnomedicinal plants of Jammu and Kashmir, Scholars Research Library. *J. Nat. Prod. Plant Resour*, **2 (2)**, 215-220.

AKBARY P., FEREIDOUNI M.S. and AKHLAGHI M. (2014).In vitro antibacterial activity of *Peganum harmala* (L) extract to some fish pathogenic bacteria. *Iranian J. of Aqua. Ani. Health*, **1 (1)**, 7-16.

AKELLO J., DUBOIS T., GOLD C.S., COYNE D., NAKAVUMA J. and PAPARU P. (2007). *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *J. of Invertebrate Pathol.*, **96**, 34–42.

AKIYAMA K., MATSUZAKI K. and HAYASHI H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **435**, 824-827.

ALAM A., NAIK P.K. and MISHRA G.P. (2009). Congruence of rapd and issr markers for evaluation of genomic relationship among 28 populations of *Podophyllum hexandrum* Royle from Himachal Pradesh, India. *Turk. J. Bot.*, **33**, 1–12.

ALVA P., MCKENZIE E.H.C., POINTING S.B., PENA-MURALLA R. and HYDE K.D. (2002). Do sea grasses harbour endophytes? *Fungal Diversity Series*, **7**, 167-178.

ALVIN A., MILLER K.I. and NEILAN B.A. (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimicrobial compounds. *Microbiol Res.*, **169**(7-8), 483-495.

AMEENAH G.F. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Asp. of Med.*, **27**, 1-93.

ANISZEWSKI T. (2007). Definition, Typology and Occurrence of Alkaloids. In: *Alkaloids - Secrets of Life*. Elsevier (Amsterdam), 1-59.

ANONYME 1. (1998). Présentation du secteur forestier de la wilaya de Laghouat, 33 p.

ANONYME 2. (2010). Secteur agricole, wilaya de Laghouat, 11 p.

ARNOLD A.E., MAYNARD Z., GILBERT G.S., COLEY P.D. and KURSAR T.A.. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol. Lett.*, **3**, 267-274.

ARNOLD A. E., MAYNARD Z., GILBERT G.S. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycol. Res.*, **105** (12), 1502-1510.

ARNOLD A. E., MEJIA L. C., KYLLO D., ROJAS E. I., MAYNARD Z., ROBBINS N. and HERRE E. A.(2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. of the National Acad. of Sci. of the USA*, **100**, 15649-15654.

ARNOLD, A.E. (2005). Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. In Current Trends in Mycological Research, D. Deshmukh, ed. (New Delhi, India: *Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.*), 49–68.

ARNOLD A.E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.*, **21(2-3)**, 51–66.

ARNOLD A.E. (2008). Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology. In Tropical Forest Community Ecology, W.P. Carson and S.A. Schnitzer, eds. (West Sussex, UK: *Wiley-Blackwell*), 254–271.

ARNOLD A. E. and LUTZONI. F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? The Ecological Society of America. *Ecology*, **88(3)**, 541-549.

ARIVUDAINAMBI U.S. EZHIL, ANANTHA KOTESWARARAO KANUGULA, KOTAMRAJU S., KARUNAKARAN C., and AAJENDRANA. (2014). Antibacterial effect of an extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* and its cytotoxic activity on MCF-7 and MDA MB-231 tumour cell lines. *Biological Lett*, **51(1)**, 7–17.

ARSHAD N., ZITTERL-EGLESEER K., HASNAIN S. and HESS M. (2008). Effect of *Peganum harmala* or its s-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. *Phytother. Res.*, **22**, 1533.

ASGHARI G. et LOCKWOOD G.B. (2002). Stereospecific biotransformation of phenylethyl propionate by cell cultures of *Peganum harmala* L. *Iran Biomed. J.*, **6**, 43-46.

ASTULLA A., ZAIMA K., MATSUNO Y., HIRASAWA Y., EKASARI W., WIDYAWARUYANTI A. and MORITA H. (2008). Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *J. of Nat. Med.*, **62**, 470.

BACON C.W. and WHITE J.F. (1994). Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

BADJI B., RIBA A., MATHIEU F., LEBRIHI A. and SABAOU N.(2005). Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *J.de Mycol. Med.*, **4 (15)**, 211-219.

- BAHMANI M., RAFIEIAN-KOPAEI M., EFTEKHARI Z., BANIHABIB E., HAJIGHOLIZADEH G., BAHMANI F., AZADZADEH J., ABDOLLAHI R., KHEYRI A., SOTOUDEH A., KARAMATI S. A. and JELODARI M. (2013).** Evaluating the anti-leech effects of methanolic extracts of *Peganum harmala* L. and *Olea europaea* L. on *Limnatis nilotica*. *World's Vet. J.*, **3**(2), 33-37.
- BALDANI J.I., BALDANI V.L.D., SELDIN L. and DÖBEREINER J. (1986).** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Inter. J. of Systematic Bacteriol.*, **36**, 86–93.
- BARRAQUIO W.L., REVILLA L. and LADHA J.K. (1997).** Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*, **194**, 15–24.
- BART P. H. J. T. (2003).** *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. plant pathol.*, **4** (4), 225–236.
- BARTH T., PUPO M.T., BORGES K.B., OKANO L.T. and BONATO P.S. (2010).** Stereoselective determination of midodrine and desglymidodrine in culture medium: application to a biotransformation study employing endophytic fungi. *Electrophoresis*, **31**, 1521–1528.
- BARIK B. P., TAYUNG K., JAGADEV P. N. and DUTTA S. K. (2010).** Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *European J. of Biol. Sci.*, **2**, 8-16.
- BEAU P. (2001).** Thèse de doctorat : Les immunomodulateurs naturels utilisés en prophylaxie et lors du traitement des infections ORL à récides. Université Limoges. 195 p.
- BELHADJ S. (2007).** Etude eco-botanique de *Pistacia atlantica* Desf. (*Anacardiaceae*) en Algérie, préalable à la conservation des ressources génétiques de l'espèce et à sa valorisation. Thèse de doctorat en sciences Agronomiques, option : écologie végétale de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 177p.
- BENFODDIL O. (2015).** Inventaire des champignons endophytes des feuilles de *Pistachia atlantica* Desf. de dayate El Gouffa (Laghouat, Algérie). Mémoire de Magister en sciences biologiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie, 171p.

- BERNARDI-WENZEL J., GARCÍA A., FILHO C.J.R., PRIOLI A.J. and PAMPHILE J.A. (2010).** Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biol Res*, **43**, 375-384.
- BERNICE M. OYEDARE, ADEKUNLE A. BAKARE and AKEEM AKINBORO (2009).** Genotoxicity assessment of water extracts of *Ocimum gratissimum*, *Morinda lucida* and *Citrus medica* using the *Allium cepa* assay. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **8(2)**, 97 – 103.
- BEZERRA J.D.P., NASCIMENTO C.C.F., BARBOSA R.N., DA SILVA D.C.V., SVEDESE V.M., SILVA-NOGUEIRA E.B., GOMES B.S., PAIVA L.M. and SOUZA-MOTTA C.M. (2015).** Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. *Brazilian J. of Microbiol.*, **1(46)**, 49-57.
- BODDEY R.M., URQUIAGA S., ALVES B.J.R. and REIS V. (2003).** Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, **252**, 139–149.
- BOEIRA J.M., DA SILVA J., ERDTMANN B. and HENRIQUES J.A.P. (2001).** Genotoxic Effects of the Alkaloids Harman and Harmine Assessed by Comet Assay and Chromosome Aberration Test in Mammalian Cells in vitro. *Pharmacol. and Toxicol.*, **89**, 287.
- BOLWERK A., LAGOPODI A.L., LUGTENBERG B.J.J. and BLOEMBERG G.V. (2005).** Visualizaition of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 710–721.
- BORGES K.B., BORGES W.S., DURÁN-PATRÓN R., PUPO M.T., BONATO P.S. and COLLADO I.G. (2009).** Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron-Asymmetry*, **20**, 385–397.
- BOUBRIMA A. (2014).** Diversité architecturale du système racinaire du pistachier de l'Atlas en fonction du sol sous-jacent dans deux dayas de la région de Laghouat (Algérie) : dayate Saadi, Hassi Delâa et dayate Aïat, Timzerth. Mémoire de Magister. Université Amar Telidji Laghouat. Faculté des sciences. Département de biologie. P53-55, 302p.

BOUSLIMAN Y., AIT EL CADI M., EL JAUDI R., LAATIRIS A., BOUKLOUZE A. and CHERRAH Y. (2012). Les plantes toxiques au Maroc. *Médecine du Maghreb*. n°196.

BRASE S., ENCINAS A., KECKJ. and NISING C. F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem. Rev.*, **109**, 3903–3990.

BUCK G.W., WEST C.P. and ELBERSEN H.W. (1997). Endophytes effect on drought tolerance in diverse *Festuca* species. In: Bacon C. W. and Hill N. S.(eds). *Neotyphodium/Grass interactions*. *Plenum Press*, NewYork , pp. 141-143.

BUKHARI N., CHOI J.H., JEON C.W., PARK H.W., KIM W.H., KHAN M.A. and LEET S.H. (2008). Phytochemical Studies of the Alkaloids from *Peganum Harmala*. *Appl. Chem.*, **12(1)**, 101-104.

BURDA S. and OLESZEK W.(2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. of Food chem.*, **49**, 2774-2779.

BUTLER M.S. (2008). Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep.*, **25(3)**, 475-516.

CABRAL D., STONE J.K. and CARROLL G.C. (1993). The internal mycobiota of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. *Mycol.Res.*, **97**, 367–376.

CARROLL G. (1988). Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*, **69(1)**, 2–9.

CARUSO M., COLOMBO A.L., FEDELI L., PAVESI A., QUARONI S., SARACCHI M. and VENTRELLA G.(2000). Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Ann. Microbiol.*, **50**, 3–14.

CAO L., HUANG J. and LI J. (2007). Fermentation conditions of *Sinopodophyllum hexandrum* endophytic fungus on production of podophyllotoxin. *Food Fermentation Ind.*, **33**, 28-32.

CHABRIER J.I. (2010). Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Henri Poincare-Nancy1, 230p.

CHANNABASAVA and GOVINDAPPA M. (2014). First report of anticancer agent, lapachol producing endophyte, *Aspergillus niger* of *Tabebuia argentea* and its in vitro cytotoxicity assays. *Bangladesh J Pharmacol.*, **9**, 129-139.

CHEN KO-HSUAN, MIADLIKOWSKA J., MOLNÁR K., ARNOLD A. E, M. U'REN J., GAYA E., GUEIDAN C. and LUTZONI F. (2015). Phylogenetic analyses of eurotiomycetous endophytes reveal their close affinities to Chaetothyriales, Eurotiales, and a new order – Phaeomoniellales. *Mol. Phylogen. and Evol.*, **85**, 117–130.

CHEVALLIER A. (1996). The Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley. London.

CHINGWARU W., MPUCHANE S. F., AND GASHE B. A. (2003). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates from Milk, Beef, and Chicken and Their Antibiotic Resistance. *J. of Food Protect.*, **66(6)**, 931–936.

CHOMCHEON P., WIYAKRUTTA S., SRIUBOLMAS N., NGAMROJANAVANICH N., ISARANGKUL D. and KITTA KOOP P. (2005). 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: is 3-NPA in some plants produced by endophytes? *J. Nat. Prod.*, **68(7)**, 1103-5.

CHRISTINA A., CHRISTAPHER V. and BHOORE S.J. (2013). Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacognosy Reviews*, **7(13)**, 11-16.

CHOI W.Y., RIM S.O., LEE J.H., LEE J.M., LEE I.J., CHO K.J., RHEE I.K., KWON J.B. and KIM J.G. (2005). Isolation of gibberellins producing fungi from the root of several *Sesamum indicum* plants. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 22-28.

CLAY K. (1990). Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecol. and System.*, **21**, 275-297.

CLAY K. and SCHARDL C.(2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, **160(4)**, 99-127.

CLAY K., FUQA C., LIVELY C. and WADE M.J. (2005). Microbial community ecology of tick-borne human pathogens. In: *Disease Ecology: Community Structure and Pathogen Dynamics*, (Ed.): S.K. Collinge and C. Ray. Oxford University Press, Oxford, pp. 41-57.

COMBÈS A., NDOYE I., BANCE C., BRUZAUD J., DJEDIAT C., DUPONT J., NAY B. and PRADO S. (2012). Chemical Communication between the Endophytic Fungus *Paraconiothyrium Variabile* and the Phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS ONE* , **10(7)**. e47313.

CONGO M. (2012). Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (*Salvadoraceae*).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso : 92p.

CUI H.B., MEI W.L., MIAO C.D., LIN H.P., HONG K. and DAI H.F. (2008). Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium* sp. 0935030 of mangrove plant *Acrostichum aureum*. *Chin J Antibiot*, **33**, 407–410.

CURRIE AF, WEARN J, HODGSON S, WENDT H, BROUGHTON S. and JIN L. (2014). Foliar fungal endophytes in herbaceous plants: a marriage of convenience? In: *Advances in endophytic research (Osono T.)*. 61–81.

DAI C.C., TIAN L.S., ZHAO Y.T., CHEN Y. and XIE H. (2010) Degradation of phenanthrene by the endophytic fungus *Ceratobasidium stevensii* found in *Bischofia polycarpa*. *Biodegradation*, **21**, 245–255.

DANGI R., MISAR A., TAMHANKAR S. and RAO S. (2014). Diosgenin content in some *Trigonella* species. *Indian J. Adv. Plant Res.*, **1**, 47–51.

DARABPOUR E., MOTAMEDI H. and SEYYED NEJAD S.M. (2010). Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens. *Asian Pac J Trop Med*, **3**, 124-127.

DARABPOUR E., POSHTKOUHIAN BAVI A., MOTAMEDI H. and SEYYED NEJAD S.M. (2011). Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. *Excl. J.*, **10**, 252-263.

DAS K., TIWARI R. K. S. and SHRIVASTAVA D. K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J.of Med. Plants Res.*, **4(2)**, 104-111.

- DAUREL C., LECLERCQ R. (2008).** Antibigram of *Staphylococcus aureus*, Revue Francophone des Laboratoires, **2008 (407)**, 81–90.
- DENG B.W., LIU K.H., CHEN W.Q., DING X.W. and XIE X.C. (2009).** *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 139-143.
- DE POOTER H.L. and SCHAMP N. (1986).** Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In: Progress in essential oil research. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin., 139- 150.
- DESHMUKH S. K., SHILPA A. VEREKAR and SARITA V. BHAVE. (2015).** Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. *Front Microbiol.*, **5**, 715.
- DEVARAJU R. and SATISH S. (2011).** Endophytic Mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and Studies on Antimicrobial Activity of its Endophytic *Fusarium* sp. *Asian J. Exp. Biol. SCI.*, **2(1)**, 75-79.
- DIRIHAN S. (2016).** Grass-endophyte coevolution and ploidy levels in fescues, Painosalama Oy - Turku, Finland, **29(6)**, 1-42.
- DOBIGNARD A. and CHATELAIN C. (2013).** *Index synonymique de la flore d’Afrique du Nord. Dicotyledoneae : Oleaceae – Zygophyllaceae*. 5. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, ECWP. Genève.
- DOMSCH K.H., GAMS W. and ANDERSON T.H. (2007)** .Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, Eching.
- DREYFUSS M.M. and CHAPELA I.H. (1994).** Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: Gullo VP. (ed.) the discovery of natural products with therapeutic potential. Butterworth- Heinemann, Boston, USA.
- DUBIEF J. (1953).** Essai sur l’hydrologie superficielle au Sahara. Ed : service des études scientifiques, Alger. pp. 26-103.

- DURÁN E.L., PLOPER L.D., RAMALLO G.C., PICCOLO GRANDI R.A., GIANCOLI A.C.H. and AZEVEDO J.L. (2005).** The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina *Revue canadienne de botanique*, **83(4)**, 350-355.
- EATON C.J., COX M.P., AMBROSE B., BECKER M., HESSE U., SCHARDL C.L. and SCOTT B. (2010).** Disruption of signaling in a fungal-grass symbiosis leads to pathogenesis. *Plant Physiol.*, **153**, 1780–1794.
- EATON C.J., COX M.P. and SCOTT B. (2011).** What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Sci.*, **180**, 190–195.
- EISENHAUER N. (2012).** Aboveground-belowground interactions as source of complementary effect in biodiversity experiments. *Plant Soil.*, **351**, 1-22.
- ELBERSEN H.W. and WEST C.P. (1996).** Growth and water relations of field-grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Sci.*, **51**, 333-342.
- ELLIS M.B. (1971).** Dematiaceus hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- ELLOUZ O. (2011).** Thèse. Diversité des champignons endophytes mycorhiziens et de classe II chez le pois chiche, et influence du génotype de la plante. Université de Montréal. pp132.
- EL-NAGERABI S.A., ELSHAFIE A.E. and ALKHANJARI S.S. (2013).** Endophytic fungi associated with *Ziziphus* species and new records from mountainous area of Oman. *Biodiversitas.*, **14 (1)**, 10-16.
- EYBERGER A.L., DONDAPATI R. and PORTER J.R. (2006).** Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.*, **69**, 1121-1124.
- FANO HARANTSOA A.R. (2011).** Métabolites secondaires particuliers des feuilles de cinq populations de masarocoffea et des endophytes des feuilles de *coffea sp a315*. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études approfondies en sciences de la vie. Université d'antananarivo, 103p.
- FAROUK L., LAROUBIA A., ABOUFATIMAA R., BENHARREF A. and CHAIT A. (2008).** Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala L.*: Possible mechanisms involved. *J. of Ethnopharmacol.*, **115**, 449-454.

- FATHIZAD F., AZARMI Y. and KHODAIE L. (2007).** Pharmacological Effects of *Peganum harmala* Seeds Extract on Isolated Rat Uterus. *Iranian J. Pharm. Sci.*, **2(2)**, 81-86.
- FEIFEL S.C., SCHMIEDERER T., HORNBOGEN T., BERG H., SUSSMUTH R.D. and ZOCHER R. (2007).** In Vitro Synthesis of New Enniatins: Probing the α -D-Hydroxy Carboxylic Acid Binding Pocket of the Multienzyme Enniatin Synthetase. *Chem.Bio.Chem*, **15(8)**, 1767–1770.
- FERNANDES M.R.V., COSTA-SILVA T.A., PFENNING L.H., COSTA-NETO C.M., HEINRICH T.A., ALENCAR S.M., LIMA M.A. and IKEGAKI M. (2009).** Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea Arabica* L. *Braz.J.Pharm.Sci.* **45 (4)**, 677-685.
- FERRAR S.C. and FERRAR C.J.F. (1986).** Compartmentation and Fluxes Of Sucrose In Intact Leaf Blades Of Barley. *New Phytol.* **103**, 645-657.
- FISHER P.J., PETRINI O. and LAPPIN-SCOTT H.M. (1992).** The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytopath.* **122(2)**, 299-305.
- FISHER K. AND PHILLIPS C. (2009).** The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol.*, **155**, 1749–1757.
- FIRÁKOVÁ S., ŠTURDÍKOVÁ M. and MÚČKOVÁ M. (2007).** Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia* , **62/3**, 251–257.
- FROHLICH J., HYDE K.D. and PETRINI O. (2000).** Endophytic fungi associated with palms. *Mycol. Res.*, **104**, 1202-1212.
- GAO F-K., DAI C-C. and LIU X-Z. (2010).** Mechanisms of fungal endophytes plant protection against pathogens. *African J.of Microbiol. Res.* **4(13)**, 1346-1351.
- GANGADEVI V. and MUTHUMARY J. (2008).** Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World J. of Microbiol. and Biotech.*, **24**, 717–724.
- GANGADEVI V. and MUTHUMARY J. (2009).** Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotech. and Appl. Biochem.*, **52**, 9–15.

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.

GARCÍA A., RHODEN S.A., RUBIN FILHO C.J., NAKAMURA C.V. and PAMPHILE J.A. (2012). Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. *Biol Res*, **45**, 139-148.

GARRET H. and GRISHAM C.M. (2000). Biochimie, 2ème édition américaine par Bernard Lubochinsky, DeBoeck université.

GASTELUM-MARTINEZ E. (2012). Thèse. Interaction entre *Fusarium langsethiae* et *Geotrichum candidum* pour la réduction de la concentration de la toxine T-2 dans le procédé de brasserie. Université de Toulouse ; pp 170.

GAZIS R., REHNER S. and CHAVERRI P. (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Mol. Ecol.*, **20**, 3001–3013

GENRE A., CHABAUD M., TIMMERS T., BONFANTE P. and BARKER D.G. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell*, **17**, 3489-3499.

GERMAINE K.J., KEOGH E., RYAN D. and DOWLING D.N. (2009). Bacterial endophyte-mediated naphthalene phytoprotection and phytoremediation. *FEMS Microbiol Lett.*, **296**, 226–234.

GIANINAZZI P.V., DUMAS-GAUDOT E., GOLOTTE A., TAHIRI-ALAOUI A. and GIANINAZZI S. (1996). Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **133**, 45–47.

GIMENEZ C., CABRERA R., REINA M. and GONZÁLEZ-COLOMA A. (2007). Bentham Science Publishers Ltd. Fungal Endophytes and their Role in Plant Protection. *Curr. Org. Chem.*, **11**, 707-720.

GLAS J.J., SCHIMMEL B.C.J., ALBA J.M., ESCOBAR-BRAVO R., SCHUURINK R.C. and KANT M.R. (2012). Plant Glandular Trichomes as Targets for Breeding or Engineering of Resistance to Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 17077-17103.

GOEL N., SINGH N. and SAINI R. (2009). Efficient *in vitro* multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala* L.) using 6-benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. *Nat Sci.*, **7**, 129-134.

GOČKLER N., JOFRE G., PAPADOPOULOS C., SOPPA U., TEJEDORAND F.J. and BECKER W. (2009). Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS Journal*, **276**, 6324.

GOGOI D.K., MAZUMDER S., SAIKIA R. and BORA T.C. (2008). Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India. *J. of Med. Mycol.*, **18(1)**, 1–9.

GOVINDAPPA M., CHANNABASAVA R., SUNIL KUMAR K.R. and PUSHPALATHA K.C.(2013). Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Crude Endophytes Extracts of *Tabebuia argentea* Bur. & K. Sch. *American J. of Plant Sci.*, **4**, 1641-1652.

GOVINDAPPA M., CHANNABASAVA R., SADANANDA T.S., CHANDRAPPA C.P. and UMASHANKAR T. (2014). Identification of Bioactive Metabolites By Gc-Ms From An Endophytic Fungus, *Alternaria Alternata* From *Tabebuia Argentea* And Their *In Vitro* Cytotoxic Activity. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*. **6(5)**, 527-534.

GÖRE M.E. and BUCAK C. (2007). Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. *Forest Pathology*, **37(4)**, 281–288.

GRBIC M.L., STUPAR M., UNKOVIC N., VUKOJEVIC J., STEVANOVIC B., GRUBISIC D. (2015). Diversity of microfungi associated with phyllosphere of endemic Serbian plant *Nepeta rtanjensis* Diklic´ & Milojevic. *Braz. J. Bot.*, **38 (3)** 597-603.

GUL KANWAL Z., HAFEEZ A., UL HAQ I., UR-REHMAN T., AUN MUHAMMAD S., SHAZADI I., NIGHAT F. and UR REHMAN N.(2016).Antioxidant, Antimicrobial and Antileishmanial Study of Different Parts of *Peganum harmala*. *Inter. J. of Biosci.*, **9(1)**, 45-58.

- GUNDEL P.E., MASEDA P.H., VILA-AIUB M.M., GHERSA C.M. and BENECH-ARNOLD R. (2006).** Effects of *Neotyphodium* fungi on *Lolium multiflorum* seed germination in relation to water availability. *Annals of Botany*, **97**, 571-577.
- GUO B., LI H. and ZHANG L. (1998).** Isolation of a fungus producing vinblastine. *J. Yunnan Univ. Nat. Sci.*, **20**, 214-215.
- GUO B., DAI J., NG S., HUANG Y., LEONG C., ONG W. and CARTE B.K. (2000).** Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. *J Nat Prod.*, **63**, 602-604.
- GUO B., WANG Y., SUN X. and TANG K. (2008).** Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review¹. *Appl. Biochem. and Microbiol.*, **44**, 136-142.
- HAMMICHE V., MERAD R. and AZZOUZ M. (2013).** Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. ISBN 978-2-8178-0374-6 Springer Paris Berlin Heidelberg New York © Springer-Verlag France, Paris, p391.
- HAMSA T.P. and KUTTAN G. (2011).** Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. *Chinese Medicine*, **6**, 11.
- HARRISON M. J., (2005).** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol.*, **59**, 19-42.
- HARPER J.K., ARIF A.M., FORD E.J., SROBEL G.A., PORCO J.A., TOMER D.P., ONEIL K.L., HEIDER E.M. and GRANT D.M. (2003).** Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron.*, **59**, 2471-2476.
- HASHIZUME Y., SAHASHI N. and FUKUDA K. (2008).** The influence of altitude on endophytic mycobiota in *Quercus acuta* leaves collected in two areas 1000 km apart. *For. Pathol.*, **38**, 218-226.
- HASHIZUME Y., FUKUDA K. and SAHASHI N. (2010).** Effects of summer temperature on fungal endophyte assemblages in Japanese beech (*Fagus crenata*) leaves in pure beech stands. *Botany*. **88**, 266-274.

HASSANI M.A., DURÁN P. and HACQUARD S. (2018). Microbial interactions within the plant Holobiont. *Microbiome*, **6**, 58.

HENDRAWATI O., WOERDENBAG H.J., HILLE J. and KAYSER O. (2012). Metabolic engineering of medicinal plants and microorganisms for the production of natural products. In: Kayser, O., Warzecha, H. (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology: Drug Discovery and Clinical Applications*, Second Edition Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 491–526.

HELLWIG V., GROTHE T., MAYER-BARTSCHMID A., ENDERMANN R., GESCHKE F. U., HENKEL T. and STADLER M. (2002). Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria spp.* Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *Journal of Antibiotics*, **55**, 881-892.

HERRAIZ T., GONZALEZ D., ANCIN-AZPILICUETA C., ARAN V.J. and GUILLEN H. (2010). Beta-carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food Chem.. Toxicol.*, **48(3)**, 839-845.

HERRE E.A., MEJIA L C., KYLLO D.A., ROJAS E., MAYNARD Z., BUTLER A. and VAN BAEL S.A. (2007). Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae ! *the Ecol. Society of America Ecol.* **88 (3)**, 550–558.

HSIANG Y.H., HERTZBERG R., HECHT S. and LIU L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase- I. *J. Biol. Chem.*, **260**, 14873-14878.

HOFFMAN A.M., MAYER S.G., STROBEL G.A., HESS W.M., SOVOCOL G.W., GRANGE A.H., HARPER J.K., ARIF A.M., GRANT D.M. and KELLEY E.G. (2008). Purification, identification and activity of Phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochem.*, **69(4)**, 1049–1056.

HOFFMEISTER D. and KELLER N.P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep.*, **24(2)**, 393-416.

HOFFMAN M. T. and ARNOLD A. E. (2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycol. Res.*, **112(3)**, 331–344.

- HUANG W.H., CAI Y.Z., XING J., CORKE H. and SUN M. (2007).** A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Ecol Bot.*, **61**, 14-30.
- HUANG W.Y., CAI Y. Z., HYDRE K.D., CORKE H. and SUN M. (2008).** Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, **33**, 61-75.
- HYANG B.L., ANDREA P. and NARESH M. (2015).** *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. *Mycobiology*, **43 (2)**, 93-106.
- HYDE K.D. and SOYTONG K. (2008).** The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, **33**, 163–173.
- IDRISSI-HASSANI L. M. and HERMAS J. (2008).** Effets de l'alimentation en *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk. (Orthoptera, Acrididae). *Zool. Baetica.*, **19**, 71-84.
- INACIO J., PEREIRA P., DE CARVALHO M., FONSECA A., AMARAL-COLLACO M.T. and SPENCER MARTINS I. (2002).** Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a mediterranean-type ecosystem in Portugal. *Microb. Ecol.*, **44**, 344-353.
- JAKOVLJEVIĆ VIOLETA D., MILIĆEVIĆ JASMINA M., STOJANOVIĆ JELICA D., SOLUJIĆ SLAVICA R. and VRVIĆ MIROSLAV M. (2014).** Antioxidant activity of ethanolic extract of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium fumiculosum*. *Hem. Ind.* **68 (1)** 43–49.
- JAHAANI F., AHMED EBRAHIMI S., RAHBAR-ROSHANDEL N. and MAHMOUDIAN M. (2005).** Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent. *Phytochem.*, **66**, 1581-1592.
- JAVADIAN F., SAEIDI S. and JAHANI S. (2016).** Antimicrobial Activity of *Peganum harmala* and *Heracleum persicum* Against *Acinetobacter baumannii*. *Int J Infect.*, **3(1)**, 33554.
- JINOUS A. and FERESHTEH R. (2012).** Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afric. J. of Pharm. and Pharmacol.*, **6(22)**, 1573-1580.

- KARTAL M., ALTUN M.L. and KURUCU S. (2003).** HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. *J. of Pharmacol. and Biomed. Anal.*, **31**, 263-269.
- KARUPPUSAMY S. (2009).** A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J. Med. Plants Res.*, **3**, 1222–1239.
- KAUL S., GUPTA S., AHMED M. and DHAR M.K. (2012).** Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev.***11**, 487-505.
- KAYINI A. and PANDEY RR (2010).** Phyllosphere fungi of *Alnus nepalensis*, *Castanopsis hystrix* and *Schima wallichii* in a subtropical forest of North East India. *J Am Sci* (**6**)118–124.
- KEMASSI A., BOUAL Z., BOUZIANE N., OULD EL HADJ-KHELIL A. and OULD EL HADJ M.D. (2013).** Biological activity of essential oils leaves from one Sahara plant: *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) on the locust desert. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **2(8)**, 389-395.
- KHALED H.K., MASMOUDI H., ELLOUZ F., ELFEKI A. and CARREAU S. (2008).** Protective effects of *Peganum harmala* extracts on thiourea-induced diseases in adult male rat. *J. Environ. Biol.*, **29(1)**, 73-77.
- KHAN R., SHAHZAD S., CHOUDHARY M.I., KHAN S.A. and AHMAD A. (2010).** Communities of endophytic fungi in medicinal plant *withania somnifera*. *Pak. J. Bot.*, **42(2)**, 1281-1287
- KHARWAR R.N., VERMA V.C., STROBEL G., and EZRA D. (2008).** The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* L. G. Don. *Curr Sci.*, **95 (2)**, 228-233.
- KHARWAR. R. N., MISHRA A., VIJAY K. SHARMA, GOND S. K., VERMA S. K., KUMAR A., KUMAR J., SINGH D. K. and GOUTAM J. (2014).** Diversity and Biopotential of Endophytic Fungal Flora Isolated from Eight Medicinal Plants of Uttar Pradesh, India. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, **3**, 23-39.

KHASHIMOV K.N., TELEZHENETSKAYA M. and YUNUSOV S. (1969). Desoxypeganine: A new alkaloid from *Peganum harmala*. *Chemistry of Natural Compounds*, **5**, 381-382.

KHASHIMOV K.N., TELEZHENETSKAYA M.V., RASHKES Y.V. and YUNUSOV S.Y. (1970). Peganine: a new alkaloid from *Peganum harmala*. *Khimia prirodnikh soedinenii*, **6(4)**, 453-455.

KHENNOUF S., IRATNI N., BAGHIANI A., HARZALLAH D. and ARRAR L., (2010). Antioxydante and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso leaves and some phenolic compounds. *J. Med. Plant Res.*, **4(13)**, 1273-1280.

KHOSHZABAN F., GHAEFFARIFAR F. and KOOHSARI H.R.J. (2014). *Peganum harmala* Aqueous and Ethanol Extracts Effects on Lesions Caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in BALB/c Mice. *Jundishapur J Microbiol.*, **7(7)**, 10992.

KIM H., SABLIN S.O. and RAMSAY R.R. (1997). Inhibition of Monoamine Oxidase A by β -Carboline Derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **337**, 137.

KINGSTON D.G. (2011). Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J Nat Prod.*, **74(3)** 496-511.

KITA W. (1988). Mycoflora of phyllosphere as sunflower oil protection factor against diseases caused by fungi, depending on the environmental conditions. *Acta Mycol.*, **12**, 205–221.

KNOP M., PACYNA S., VOLOSHCHUK N., KJANT S., MÜLLENBORN C., STEINER U., KIRCHMAIR M., SCHERER H.W. and SCHULZ M. (2007). *Zea mays*: Benzoxalinone Detoxification under sulfur deficiency conditions- A complex allelopathic alliance including endophytic *Fusarium verticillioides*. *Journal of Chemical Ecology*, **33(2)**, 225-237.

KOIDE R.T. and SCHREINER R.P. (1992). Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**, 557–581.

KOUR A., SHAWL A.S., REHMAN S., SULTAN P., QAZI P.H., SUDEN P., KHAJURIA R.K. and VERMA V. (2008). Isolation and identification of an endophytic

strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 1115-1121.

KREBS C.J. (1999). Ecological methodology, 2nd edn. A Wesley Longman, New York.
KROHN K., FAROOQ U., FLÖRKE U., SCHULZ B., DRAEGER S., PESCIPELLI G., SALVADORI P., ANTUS S. and KURTÁN T. (2007). Secondary Metabolites Isolated from an Endophytic *Phoma* sp.-Absolute Configuration of Tetrahydropyrenophorol Using the Solid-State TDDFT CD Methodology. *Eur J Org Chem.*, **7(2)**, 3206-3211.

KULDAN G. and BACON C. (2008). *Clavicipitaceous* endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biological Control*, **46**, 57–71.

KUMARAN R.S., MUTHUMARY J. and HUR B.K. (2008). Production of taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Engineering in Life Sciences*, **8**, 438–446.

KUMARESAN V., SURYANARAYANAN T.S. and JOHNSON J.A. (2002). Ecology of mangrove endophytes. In: Hyde KD (ed) Fungi of marine environments, *fungus diversity res.*, series, **9**, 145–166.

KUSARI S., LAMSHÖFT M., ZÜHLKE S. and SPITELLER M. (2008). An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J. of Nat. Prod.*, **71(2)**, 159–162.

KUSARI S., ZUHLKE S. and SPITELLER M. (2009). An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *J Nat Prod.*, **72**, 2-7.

KUSARI S., KOŠUTH J., ČELLÁROVÁ E. and SPITELLER M. (2011a). Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. *Fungal Ecol.* **4**, 219–223.

KUSARI S., ZÜHLKE S. and SPITELLER M. (2011b). Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. *J. Nat. Prod.*, **74**, 764–775.

KUSARI S. and SPITELLER M. (2012a).Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics.*, **1866**, 241–66.

KUSARI S., and SPITELLER M. (2012b). Camptothecin: recent advances in plantendophyte research. In Natural Resources Conservation and Management, L.R. Patro, ed. New Delhi, India: *Manglam Publications*, 1–32.

KUSARI S., HERTWECK C. and SPITELLER M. (2012c). Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & biology*, **19(7)**, 792-798.

KUSARI S., SINGH S. and JAYABASKARAN C. (2014). Rethinking production of Taxol (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends Biotechnol.*, **32**, 304–311.

KUTRZEBA M. (1993). Mycoflora of the leaves in *Festuca pratensis* Huds. *Biul IHAR.*, **188**, 33–41.

LAMCHOURI F., SETTAF A., CHERRAH Y., ZEMZAMI M., B. LYOUSSI A. ZAID and HASSAR M. (1999). Antitumor principles from *Peganum harmala* seeds. *Thérapie*, **54**, 753-758.

LAMCHOURI F., SETTAF A., CHERRAH Y., HASSAR M., ZEMZAMI M., ATIF N. and LYOUSSI B. (2000). In vitro cell-toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. *Fitoterapia*, **71**, 50.

LAMCHOURI F., SETTAF A., CHERRAH Y., EL HAMIDI M., TLIGUI N. S., LYOUSSI B. and HASSAR M. (2002). Experimental toxicity of *Peganum harmala* seeds. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **60**, 123.

LAMCHOURI F., TOUFIK H., BOUZZINE S.M., HAMIDI M. and BOUACHRINE M. (2010). Experimental and computational study of biological activities of alkaloids isolated from *Peganum harmala* seeds. *Journal of Materials and Environmental Science*, **1**, 343.

LAMCHOURI F. (2014). Antitumor properties and toxicity effects of *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*) *Plant Science Today*, **1(4)**, 192-195.

LARRAN S., ROLLÁN C., ÁNGELES H.B., ALIPPI H.E. and URRUTIA M.I. (2002). Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.*, **17(1)**, 173-178.

LEBRO L., LODGE D.J., LAUREANO S. and BAYMAN P. (2001). Where is the gate to the party? *Inoculum*, **52**, 46.

- LE HOUEROU H.N. (1995).** Bioclimat et biogéographie des steppes arides du Nord de l'Afrique. Diversité biologique, développement durable et désertisation. Options Méditerranéennes, série B, 396 p.
- LEUCHTMANN A., PETRINI O., PETRINI L.E. and CARROLL G.C. (1992).** Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. *Mycol. Res.*, **96**, 287–294.
- LI J.Y., STROBLE G.A., SIDHU R., HESS W.M. and FORD E.J. (1996).** Endophytic Taxol producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiol.*, **142**, 2223–2226.
- LI H.B., CHENG K.W., WONG C.C., FAN K.W., CHEN F. and TIAN, Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chem.*, **102**, 771–776.
- LI E., TIAN R., LIU S., CHEN X., GUO L. and CHE Y. (2008).** Pestalotheols A-D, bioactive metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis theae*. *J Nat Prod.*, **71**(4), 664–8.
- LI H.J., LIN Y.C., YAO J.H., VRIJMOED L.L. and JONES G.E. (2004).** Two new metabolites from the mangrove endophytic fungus no. 2524. *J Asian Nat Prod Res.*, **6**(3), 185–191.
- LI W., ZHOU J., LIN Z. and HU Z. (2007).** Study on fermentation condition for production of huperzine A from endophytic fungus 2F09P03B of *Huperzia serrata*. *Chin. Med. Biotechnol.*, **2**, 254–259.
- LI H.Y., SHEN M., ZHOU Z.P., LI T., WEI Y.I. and LIN L.B. (2012).** Diversity and cold adaptation of endophytic fungi from five dominant plant species collected from the Baima Snow Mountain, Southwest China. *Fungal Divers*, **53**, 1–8.
- LIMANE A., SMAIL-SAADOUN N., BELKEBIR-BOUKAIS A. and KISSOUM-HAMDINI K. (2014).** Root architecture adaptation of *Pistacia atlantica* subsp. *atlantica* according to an increasing climatic and edaphic gradient: case of a north–south transect in Algeria. *Turk. J. of Bot.*, **38**, 536–549.
- LINDOW S.E. and BRANDL M.T. (2003).** Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1875–1883.

- LIU H., HECKMAN J.R. and MURPHY J.A. (1996).** Screening fine fescues for aluminium tolerance. *J. of Plant Nutrition* , **19**, 677-688.
- LIU X., DONG M., CHEN X., JIANG M., LV X. and YAN G. (2007).** Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chem.*, **105**, 548-554.
- LOIRET F.G., ORTEGA D., KLEINER P., ORTEGA R., RODES R. and DONG Z. (2004).** A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J.of Appl.Microbiol.*, **97**, 504–511.
- LORO M., VALERO-JIMÉNEZ C.A., NOZAWAC S. and MÁRQUEZ L.M. (2012).** Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. *J Arid Environ.*, **85**, 46–55.
- MADKI M. A., MANZOOR A. S., POWAR P. V. and PATIL K. S. (2010).** Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. *Intern. J. of Pharmaceut. Sci.*, **2**, 848-858.
- MAGURRAN A.E. (1988).** Ecological diversity and its measurement. Croom Helm Ltd., London.
- MAHESHWARI R. (2006).**What is an endophytic fungus? *Current Science*, **90**, 1039.
- MAHMOUDIAN M., JALILPOUR H. and SALEHIAN P. (2002).** Toxicity of *Peganum harmala*, Review and a Case Report, *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, **11**, 1-4.
- MALIK S., CUSIDÓ R.M., MIRJALILI M.H., MOYANO E., PALAZÓN J. and BONFILL M. (2011).** Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. *Process Biochem.*, **46**, 23–34.
- MALINOWSKI D.P., BRAUER D.K. and BELESKY D.P. (1999).** *Neotyphodium coenophialum*-endophyte affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency. *J. of Agron. and Crop Sci.*, **183**, 53-60.

- MALINOWSKI D.P. and BELESKY D.P. (2000).** Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses: Mechanisms of Drought and Mineral Stress Tolerance. *Crop Science*, **40**, 923–940.
- MALINOWSKI D.P., and BELESKY D.P. (2006).** Ecological importance of *Neotyphodium* spp. Grass endophytes in agroecosystems. *Grassland Science*, **52(1)**, 23-28.
- MANDEEL Q., AL-LAITH A. and MOHSEN L. (1998).** Survey of *fusarium* species in an arid environment of Bahrain. V. Antimicrobial activity of some local and International *fusarium* species. *Pharmaceut. Biol.*, **37(3)**, 181–187.
- MANDYAM K. and JUMPPONEN A. (2005).** Seeking the elusive functions of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*, **53**, 173-189.
- MANGATHAYARU K. (2013).** Pharmacognosy: An Indian perspective. Pearson Education, India.
- MANSOUR M. and SOUDABE N. (2012).** The effect of *Peganum harmala* and *Teucrium polium* halcoholic extracts on growth of *Escherichia coli* 0157. *Jundishapur J. Microbiol.*, **5 (3)**, 511-515.
- MARTIN P., PAJARES J.A., NANOS N. and DIEZ J.J. (2004).** Site and seasonal influences on the fungal community on leaves and stems of *Pinus* and *Quercus* seedlings in forest nurseries. *Sydowia*, **56**, 23-37.
- MARTÍN PINTO P., PAJARES ALONSO J.A., PANDO FERNÁNDEZ V. and DÍEZ CASERO J.J. (2006).** Fungi isolated from diseased nursery seedlings in Spain. *New Forests*, **31**, 41-56.
- MAYAD E.H., IDRISSE HASSANI L.M., FERJI Z. CHEBLI B. and EL HADEK M. (2013).** Quantitative and Qualitative Analysis by HPLC of Major *Peganum harmala* Alkaloids at Different Stages of Development. *J. of Nat. Sci. Res.*, **3(11)**, 1-9.
- McALPINE J.B., BACHMANN B.O., PIRAE M., TREMBLAY S., ALARCO A.M., ZAZOPOULOS E. and FARNET C.M. (2005).** Microbial genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel antifungal agent, as an example. *J Nat Prod.*, **68(4)**, 493-496.

- MILES C.O., DI MENNA M.E., JACOBS S.W., GARTHWAITE I., LANE G.A., PRESTIDGE R.A., MARSHALL S.L., WILKINSON H.H., SCHARDL C.L., BALL O. J. and LATCH G.C. (1998).** Endophytic fungi in indigenous Australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Appl. and Environ.l Microbiol.*, **64**, 601-606.
- MIRZAIE M., NOSRATABADI S.J., AMIN DERAKHSHANFAR A. and SHARIFI I. (2007).** Antileishmanial activity of *Peganum harmala* extract on the in vitro growth of Leishmania major promastigotes in comparison to a trivalent antimony drug. *Veterinarski Arhivir.*, **77(4)**, 365-375.
- MISHRA A., GOND S. K., KUMAR A., SHARMA VIJAY K., VERMA S.K. and KHARWAR R. N. (2013).** Sourcing the Fungal Endophytes: A Beneficial Transaction of Biodiversity, Bioactive Natural Products, Plant Protection and Nanotechnology, Microorganisms in Sustainable. *Agric. and Biotechnol.*, **26**, 2214-2219.
- MOGHADAM M.S., MALEKI S., DARABPOUR E., MOTAMEDI H. and SEYYED NEJAD S.M. (2010).** Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **3**, 262-265.
- MOHANTA J., TAYUNG K. and MOHAPATRA U. (2008).** Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet J. of Microbiol.*, **5(2)**, 145-179.
- MOLOUDIZARGARI M., MIKAILI P., AGHAJANSHAKERI S., ASGHARI M. H. and SHAYEGH J. (2013).** Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids. *Pharmacognosy Reviews*, **7**, 199-212.
- MONSEF H.R., GHOBADI A. and IRANSHAHI M. (2004).** Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkalid extract on mouse formalin test. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **7(1)**, 65-69.
- MONTESINOS E.M., BONATERRA A.B., BADOSA E.B., FRANCES J.F., ALEMANY J.A., LLORENTE I.L. and MORAGREGA C.M. (2002).** Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Inter. Microbiol.*, **5**, 169-175.
- MOORE A. and PINKERTON R. (2009).** Vincristine: can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr. Blood Cancer*, **53**, 1180-1187.

- MORICCA S. and RAGAZZI A. (2008).** Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*, **98**, 380–386.
- MOSHIRI M., ETEMAD L., JAVIDI S. and ALIZADEH A. (2013).** *Peganum harmala* intoxication, a case report. *Avicenna J. of Phytomed.*, **3(3)**, 288-292.
- MOY M., LI H.J.M., SULLIVAN R., WHITE J.F. and BELANGER F.C. (2002).** Endophytic fungal β -1,6-glucanase expression in the infected host grass. *Plant Physiology*, **130**, 1298–1308.
- MU J.H., BOLLON A.P. and SIDHU R.S. (1999).** Analysis of β -tubulin cDNAs from taxol-resistant *Pestalotiopsis microspora* and taxol-sensitive *Pythium ultimum* and comparison of the taxol-binding properties of their products. *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 857–868.
- NAKAMURA C. V., UEDA-NAKAMURA T., BANDO E., NEGRÃO MELO A. F., CORTEZ D. A. G and DIAS FILHO B. P. (1999).** Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **94(5)**, 675-678.
- NARISAWA K., USUKI F. and HASHIBA T. (2004).** Control of verticillium yellows in chinese cabbage by the dark septate endophytic fungus LtVB3. *Phytopathology*, **94**, 412–418.
- NICOLETTI R. and FIORENTINO A. (2015).** Plant Bioactive Metabolites and Drugs Produced by Endophytic Fungi of Spermatophyta. *Agriculture*, **5**, 918-970.
- NIROUMAND M.C., FARZAEI M.H. and AMIN G.(2015).** Medicinal properties of *Peganum harmala* L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: a review. *J Tradit Chin Med.*, **35(1)**, 104-109.
- OGÓREK R., LEJMAN A., PUSZ W., MIŁUCH A., MIODYŃSKA P. (2012).** Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi Charakterystyka i taksonomia grzybów z rodzaju *Cladosporium*. *Mikologia Lekarska*, **19 (2)**, 80-85.
- OLIVEIRA SILVA M. R., SENA XISTO K. and BUARQUE GUSUMAO N. (2009).** Secondary metabolites produced by endophytic fungus *Paecilomyces variotii* Bainier with antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. In: Mendez-Vilas A.(eds). Current

Research Topics in Applied Microbiology: Proceedings of the II international Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (Biomicroworld2007), 519-520.

ORLANDELLI R.C., ALBERTO R.N., RUBIN FILHO C.J. and PAMPHILE J.A. (2012). Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. *Gen. Mol. Res.*, **11** (2), 1575-1585.

OSÉS R., VALENZUELA S., FREER J., SANFUENTES E. and RODRIGUEZ J. (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fung.Diver.*, **33**, 77-86.

OSONO T. and MORI A. (2004). Distribution of phyllosphere fungi within the canopy of giant dogwood. *Mycoscience*, **45**, 161–168.

OSTRY V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs World. *Mycotoxin J.*, **1**(2), 175-188.

OZENDA P. (1983). Flore du Sahara. Deuxième Edition, CNRS, Paris, 622 p.

PAN J.H., JONES E.B.G., SHE Z.G., PANG J.Y. and LIN Y.C. (2008). Review of bioactive compounds from fungi in the South China Sea. *Bot. Mar.*, **51**, 179-190.

PANDI M., MANIKANDAN R. and MUTHUMARY J. (2010). Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague dawley rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **64**, 48–53.

PANGENI R., SAHNI J.K., ALI J., SHARMA S. and BABOOTA S. (2014). Resveratrol: Review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **11**, 1285–1298.

PATWARDHAN D.R.A. (2006). Research and Action in Natural Wealth Administration (RANWA).

PAULUS B., KANOWSKI J., GADEK P. and HYDE K.D. (2006). Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. *Mycol. Res.*, **110**, 1441–1454.

- PAWŁOWSKA J., WILK M., ŚLIWIŃSKA-WYRZYCHOWSKA A., METRAK M. and WRZOSEK M. (2014).** The diversity of endophytic fungi in the above-ground tissue of two *Lycopodium* species in Poland. *Symbiosis* , **63**,87–97.
- PETERS S., DAMMEYER B. and SCHULZ B. (1998).** Endophyte-host interactions I. Plant defense reactions to an endophyte and a pathogenic fungus. *Symbiosis*, **25**, 193–211.
- PETRINI O. (1991).** fungal endophytes of tree leaves in ANDREWS JH, HIRANNO SS (Eds) *Microbial ecology of leaves*. Springer Verlag, New York, 179-187.
- PETRINI O. (1996).** Ecological and Physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. In EndophyticFungi in Grasses and Woody Plants. *American Phytopathological Society Press: St Paul MN.*, p. 87-100.
- PEREZ J., PARDO J. and GOMEZ C. (2002).**Vincristine: an effective treatment of corticoid-resistant life-threatening infantile hemangiomas. *Acta Oncol.*, **41**, 197-199.
- PIMENTEL M.R., MOLINA G., DIONÍSIO A.P., JUNIOR M.R.M. and PASTORE G.M. (2011).** The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. *Biotech. Res.Intern.*, **2011**, 1–11.
- PINHEIRO E.A.A., CARVALHO J.M., SANTOS D.C.P., FEITOSA A.O., MARINHO P.S.B., GUILHON G.M.S.P., SOUZA A.D.L., SILVA F.M.A. and MARINHO A.M.R. (2013).** Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Nat Prod Res.*, **27**, 1633-1638.
- PISOSCHI A.M., CHEREGI M.C. and ANDREI F.D. (2009).** Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. *Molecules*, **14**, 480-493.
- PITRE S. and SRIVASTAVA S.K. (1987).** Two new anthraquinons from the seeds of *Peganum harmala*. *Planta Medica*, **53**(1), 106-107.
- PORRAS-ALFARO A. and BAYMAN P.(2011).** Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol.*, **(49)** 291-315.

- PORTER J.K., BACON C.W. and ROBINS J.D. (1979).** Lysergic acid amide derivatives from *Balansia epichloe* and *Balansia claviceps* (Clavicipitacea). *J Nat Prod.*, **42**, 309-314.
- POUGET M. (1980).** Les relations sol-végétation dans les steppes sud-algéroises. ORSTOM. Paris, 569 p.
- PRASAD R., SHARMA V., CHATTERJEE S., CHAUHAN G., TRIPATHI S., DAS A., KAMAL S., RAWAT A.K.S., BHUTANI K.K., RAI M.K., PUSHPANGDAN P. and VARMA A. (2008).** Interactions of *Piriformospora indica* with Medicinal Plants. *Mycorrhiza*, **17**(2), 655-678.
- PRASHANTH D. and JOHN S. (1999).** Antibacterial activity of *Peganum harmala*. *Fitoterapia*, **70**, 438.
- PREMJANU N. and JAYNTHY C. (2014).** Antioxydant Activity of endophytic Fungi isolated from *Lannea coromendalica*. *Int.J. Res.Pharm.Sci.*, **5**(4), 304-308.
- PURI S.C., NAZIR A., CHAWLA R., ARORA R., RIYAZ-UL-HASAN S., AMNA T., AHMED B., VERMA V., SINGH S., SAGAR R., SHARMA A., KUMAR R., SHARMA R.K. and QAZI G.N. (2006).** The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin ligands. *J. Biotechnol.*, **122**, 494-510.
- PUSZ W., PŁASKOWSKA E., YILDIRIM I. and WEBER R. (2015).** Fungi occurring on the plants of the genus *Amaranthus* L. *Turk. J. of Bot.*, **39**, 147-161.
- QIN J.C., ZHANG Y.M., GAO J.M., BAI M.S., YANG S.X., LAATSCH H. and ZHANG A.L. (2009).** Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **6**(19), 1572-1574.
- RAI M.K., VARMA A. and PANDEY A.K. (2002).** Antifungal potential of *Spilanthes calva* after inoculation of *Piriformospora indica*. *Mycoses*, **47**, 479-481.
- RAI M., GADE A., RATHOD D., DAR M. and VARMA A. (2012).** Mycoendophytes in medicinal plants: Diversity and bioactivities. *Bioscience*, **4**, 86-96.
- RAJA A., LABONTE J., LEBBOS J. and KIRKPATRICK P. (2003).** Daptomycin. *Nat Rev Drug Discov.*, **2** (12), 943-944.

- RAJA H.A., KAUR A., EL-ELIMAT T., FIGUEROA M.S., KUMAR R., DEEP, G., AGARWAL R., FAETH S.H., CECI N.B. and OBERLIES N.H. (2015).** Phylogenetic and Chemical Diversity of Fungal Endophytes isolated from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Milk thistle). *Mycology*, **106 (1)**, 8-27.
- RAVELOMANANTSOA S.H. (2004).** Thèse. Les endophytes de *Eugenia jambolana* Lam. (*Myrtaceae*) : un modèle de relation plante – microorganismes. Université d'Antananarivo. 87p.
- RAVINDRAN C., NAVEENAN T., GOVINDASWAMY, VARATHARAJAN R., RAJASABAPATHY and R.MEENA R.M. (2012).** Antioxydants in mangrove plants and endophytic fungal associations, *Bot. Marina*, **5(3)**, 269-279.
- REDMAN R.S., SHEEHAN K.B., STOUT R.G., RODRIGUEZ R.J. and HENSON J.M. (2002).** Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. *Science*, **298**, 1581.
- REHMAN S., SHAWL A.S., KOUR A., SULTAN P., AHMAD K., KHAJURIA R. and QAZI G.N. (2009).** Comparative studies and identification of camptothecin produced by an endophyte at shake flask and bioreactor. *Nat. Prod. Res.*, **23**, 1050-1057.
- REINERT F. and FONTOURA T. (2005).** Tropical biology and conservation management **VOL. IV** - Epiphytes. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*.
- REPUSSARD C., ZBIB N., TARDIEU D. and GUERRE P. (2013).** Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines : généralités et problématique française. *Revue Méd. Vét.*, **164(12)**, 583-606.
- RODRIGUEZ R.J., REDMAN R.S. and HENSON J.M. (2004).** The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mit. Adap.Strat. Glob. Chang.*, **9**, 261–272.
- RODRIGUEZ R.J., WHITE JR J.F., ARNOLD A.E. and REDMAN R.S. (2009).** Fungal endophytes: diversity and Functional roles. *New phytologist*, **182**, 314-330.
- SAAR D.E., POLANS N.O., SORENSEN P.D. and DUVALL M.R.(2001).**Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Mol. Biol Rep.*, **19**, 249-260.

SADANANDA T.S., NIRUPAMA R., CHAITHRA K., GOVINDAPPA M., CHANDRAPPA C.P. and VINAY RAGHAVENDRA B. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). *J Med Plant Res.*, **5**, 3643-52.

SADANANDA T.S., GOVINDAPPA M. and RAMACHANDRA Y.L. (2013). Isolation and characterization of D -galactose, Nacetylgalactosamine, fructose, maltose specific lectin from eight different endophytic fungi of *Viscum album* L. *Asian Journal of Biomedical and Pharma. Sci.*, **3(26)**, 11-20.

SAIKKONEN K., HELANDER M. and FAETH S. H.(2004a). Fungal endophytes: hitchhikers of the green world. In: Gillings M. and Holmes A. J.(eds). *Plant microbiology*. Garland Science, 81-101.

SAIKKONEN K., WALI P., HELANDER M. and FAETH S. H. (2004b). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Tren. in Plant Sci.*, **9**, 275-280.

SAIKKONEN K., WALI P. R. and HELANDER M. (2010). Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PLoS One*, **5(6)**, e11395.

SAIKKONEN K., MIKOLA J. and HELANDER M. (2015). Endophytic phyllosphere fungi and nutrient cycling in terrestrial ecosystems, Fungal endophytes – biology and bioprospecting. *Curr.Sci.*, **109(1)**, 121-126.

SAMSON R.A., HOUBRAKEN J., THRANE U., FRISVAD J.C. and ANDERSEN B. (2010). Food and indoor fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.

SANCHEZ-MORENO C., LARRAURI J.A. and SAURA-CALIXTO F.(1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Technol. Inter.*, **8**, 121-137.

SANCHEZ-MORENO C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of Foods Sci. Tech.*, **8**, 121-137.

SANCHEZ-AZOFEIFA A., OKI Y., WILSON FERNANDES G., AARON BALL R. and GAMON J. (2012). Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. *Trees*, **26**, 291–299.

SANDHIYA G.S., KUMARI S.T.C., BALACHANDAR D. and KUMAR K. (2005). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice, *Indian J. of Experim. Biol.*, **43**, 802–807.

SANJANA K., SURUCHI G., MAROOF A. and MANOJ K.D. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev.*, **11(4)**, 1-19.

SANTIAGO C., FITCHETT C., MURNO M.H.G., JALIL J. and SANTHANAM J. (2012). Cytotoxic and antifungal activities of 5-Hydroxyramulosin, a compound produced by an endophytic fungus isolated from *Cinnamomum mollisimum*. *Evid Based Complement Alternat Med*, **7**, 32-45.

SCHARDL C.L. (2001). *Epichloe festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fung. Gen. and Biol.*, **33**, 69–82.

SCHARDL C.L., LEUCHTMANN A. and SPIERING M.J. (2004). Symbioses of grasses with seed-borne fungal endophytes. *Ann Rev Plant Biol.*, **55**, 315- 40.

SCHIFF P.B., FANT J. and HORWITZ S.B. (1979). Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature*, **277**, 665-667.

SCHULZ B., WANKE S., DRAEGER S. and AUST H.J. (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.*, **97**, 1447-1450.

SCHULZ B., RÖMMERT A.K., DAMMANN U., AUST H.J. and STRACK D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycol. Res.*, **103**, 1275–1283.

SCHULZ B., BOYLE C., DRAEGER S., ROMMERT A.K. and KROHN K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. The British Mycological Society. *Mycol. Res.*, **106 (9)**, 996-1004.

SCHULZ B. and BOYLE C. (2005). The endophytic continuum. *Mycol. Res.*, **109**, 661–686.

SCHULZ B.J.E. and BOYLE C.J.C. (2006). What are endophytes? In Microbial Root Endophytes, B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, and T.N. Sieber, eds. *Berlin: Springer-Verlag*, **8**, 1–13.

SCHULZ B., BOYLE C., SIEBER T. N. (2006). What are Endophytes? Microbial Root Endophytes, *Soil Biol.*, **9**, 1-15.

SCHWARZ M.J., HOUGHTON P.J., ROSE S., JENNER P. and LEES A.D. (2003). Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. *Pharmacol. Biochem and Behav.*, **75**, 627.

SCHWARZER D. and MARAHIEL M.A.(2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften.*, **88(3)**, 93-101.

SEHGAL R., ROY S. and KUMAR V.L. (2006). Evaluation of cytotoxic potential of latex of *Calotropis procera* and *Podophyllotoxin* in *Allum cepa* root model. *J Biocell.*, **30**, 9-13.

SEIFRIED H.E., ANDERSON D.E., FISHER E.I. and MILNER J.A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutrit Biochem.*, **18**, 567-579.

SELIM K.A., EL-BEIH A.A., ABDEL-RAHMAN T.M. and EL-DIWANY A.I. (2012). Biology of Endophytic Fungi. *Curr. Res. Environ.& Appl. Mycol.*, **2(1)**, 31–82.

SELOSSE M. A., and SCHARDL C. L. (2007). Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission. An evolutionary perspective. *New Phytologist*, **173**, 452-458.

SETO Y., TAKAHASHI K., MATSUURA H., KOGAMI Y., YADA H., YOSHIHARA T. and NABETA K.(2007). Novel cyclic peptide, epichlicin, from the endophytic fungus, *Epichloe typhina*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **71(6)**, 1470- 1475.

SCORZONI L.1, BENADUCCI T., ALMEIDA A.M.F., SILVA D.H.S., BOLZANI, V.S. MENDES-GIANNINI, M.J.S. (2007). Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **28(1)**, 25-34.

SHARAF M., EL-ANSARI M.A., MATLIN S.A. and SALEH N.A. (1997). Four flavonoid glycosides from *Peganum harmala*. *Phytochem.*, **44(3)**, 533-536.

SHI J., ZENG Q., LIU Y. and PAN Z. (2012). *Alternaria* sp. MG1, a resveratrol-producing fungus: Isolation, identification, and optimal cultivation conditions for resveratrol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 369–379.

SHIONO Y., TSUCHINARI M., SHIMANUKI K., MIYAJIMA T., MURAYAMA T., KOSEKI T., LAATSCH H., FUNAKOSHI T., TAKANAMI K. and SUZUKI K.(2007). Fusaristatins A and B, two new cyclic lipopeptides from an endophytic *Fusarium* sp. *J Antibiot*, **60 (5)**, 309-316.

SHUKLA S. T., HABBU P. V., KULKARNI V. H., JAGADISH K. S., PANDEY A. R., and SUTARIYA V. N. (2014). Endophytic microbes: a novel source for biologically/pharmacologically active secondary metabolites. *Asian J. Pharmacol. Toxicol.*, **2**, 1–16.

SHWETA S., ZUEHLKE S., RAMESHA B.T., PRITI V., MOHANA KUMAR P., RAVIKANTH G., SPITELLER M., VASUDEVA R. and UMA SHAANKER R. (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochem.*, **71 (1)**, 117-122.

SHWETA S., KHADABADI S. and GANESH T.G. (2012). *In vitro* antimitotic, antiproliferative, DNA fragmentation and anticancer activity of chloroform and ethanol extract of *Revia hypocrarerformis*. *Asian Pacific J Trop Dis*, **12**, 503-506.

SIEBER T.N., SIEBER-CANAVESI F. and DORWORTH C.E. (1991). Endophytic fungi on red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. *Canadian Journal of Botany*, **69**, 407–411.

SINGH A.B., CHATURVEDI J.P., NARENDER T. and SRIVASTAVA A.K. (2008). Preliminary studied on the hypoglycemic effect of *Peganum harmala* seeds ethanol extract on normal and streptozocine induced diabetic rats. *Indian J. Clin. Biochem.*, **23(4)**, 391-393.

SIQUEIRA V.M., CONTI R., ARAUJO J.M., SOUZA-MOTTA C.M. (2011). Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis*, **53**, 89-95.

- STAMFORD T.L., STAMFORD N.P., COELHO L.C. and ARAUJO J.M. (2002).** Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology*, **83**, 105–109.
- STANIEK A., WOERDENBAG H.J. and KAYSER O. (2008).** Endophytes exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *J. Plant Inter.*, **3**, 75-98.
- STAPLETON A.E. and SIMMONS S.J. (2006).** Plant control of phyllosphere diversity: genotype interactions with ultraviolet- B radiation. In: *Microbial Ecology of the Aerial Plant Surface*. (eds.) Bailey, M.J., A.K. Lilley, P.T.N. Timms-Wilson and P.T.N. Spencer-Phillips. CABI International, Wallingford, UK, pp. 223–238.
- STEINITE I. and IEVINSH G. (2003).** Possible role of trichomes in resistance of strawberry cultivars against spider mite. *Acta Universitatis Latviensis*, **662**, 59–65.
- STIERLE A., STROBEL G. and STIERLE D. (1993).** Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, **260**, 214–216.
- STONE J.K., BACON C.W. and WHITE J.F. (2000).** An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, 3–30.
- STONE J.K., POLISHOOK J.D. and WHITE J.F. (2004).** Endophytic fungi. in MUELLER G.M., BILLS G.F. et FOSTER M.S.(eds) *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic, 241-269.
- STROBEL G.A., HESS W.M., FORD E., SIDHU R.S. and YANG X. (1996).** Taxol from fungal endophytes and issue of biodiversity. *J. Ind. Microbiol.*, **17**, 417-423.
- STROBEL G., FORD E. and WORAPONG J. (2002).** Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochem.*, **60**, 179-183.
- STROBEL G. and DAISY B. (2003).** Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **67(4)**, 491–502.

STROBEL G. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microb. and Infect.*, **5**, 535–544.

SUBHADRADEVI V., KHAIRUNISSA K., ASOKKUMAR K., UMAMAHESWARI M., SIVASHANMUGAM A. and JAGANNATH P. (2011). Induction of apoptosis and cytotoxic activities of *Apium graveolens* Linn. using *in vitro* models. *Middle-East J Sci Res.*, **9**, 90-94.

SUN D., RAN X. and WANG J. (2008). Isolation and identification of a taxolproducing endophytic fungus from *Podocarpus*. *Acta Microbiol.Sin.*, **48**, 589-595.

SUN X., GUO L.D. and HYDE K.D. (2011). Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fung. Diver.*, **47**, 85-95.

SUN Y., WANG Q., LU X., OKANE I. and KAKISHIMA M. (2012) Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. *Mycol Prog.*, **11**, 781–790.

SURYANARAYANAN T.S., KUMARESAN V., JOHNSON J.A. (1998). Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Can J Microbiol.*, **44**, 1003–1006.

SURYANARAYANAN T.S., MURALI T.S. and VENKATESAN G. (2002). Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forest across a rainfall gradient. *Can. J. Bot.*, **80**, 818-826.

SURYANARAYANAN T.S., VENKATESAN G. and MURALI T.S. (2003). Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Curr. Sci.*, **4 (85)**, 489-493.

SURYANARAYANAN T.S., WITTLINGER S.K. and FAETH S.H. (2005). Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycol. Res.*, **109**, 635-639.

SURYANARAYANAN T.S., THIRUNAVUKKARASU N., GOVINDARAJULU M.B. and GOPALAN V. (2012). Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fung. Diver.*, **54**, 19–30.

TABUC C. (2007). Thèse. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. INPT de Toulouse et de l'Université de Bucarest. 190p.

TAN R.X. and ZOU W.X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 448–459.

TANWEER A.J., CHAND N., KHAN S., QURESHI M. S., AKHTAR A. and NIAMATULLAH M. (2012). Impact of methanolic extract of *Peganum harmala* on the weight gain, feed conservation ratio, feed cost and gross return of broiler chicks. *The J. of Animal & Plant Sci.*, **22 (2)**, 264-267.

TAYLOR L. (2005). The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals. *Square One Publishers*, New York.

TENGURIA R.K., KHAN F.N. and QUERESHI S. (2011). Endophytes- Mines of Pharmacological Therapeutics. *World Journal of Science and Technology*, **1(5)**, 127-149.

TEYSSOU R., HANCE P., NICAND E., NIZOU J.Y., BUISSON Y. (1998). Les infections à *Bacillus cereus* : bactériologie, clinique et traitement, La Lettre de l'Infectiologie - Tome XIII - n° 3.

TINTJER T., LEUCHTMANN A. and CLAY K. (2008). Variation in horizontal and vertical transmission of the endophyte *Epichloë elymi* infecting the grass *Elymus hystrix*, *New Phytologist*, **179(1)**, 236-246.

THOMMA. B. P. H. J. (2003). Pathogen profile *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.*, **4**, 225–236.

TIAN R., YANG Q., ZHOU G., TAN J., ZHANG L. and FANG C. (2006). Taxonomic study on a taxol producing fungus isolated from bark of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *J. Wuhan Bot. Res.*, **24**, 541- 545.

TSUGE T., HARIMOTO Y., AKIMITSU K., OHTANI K., KODAMA M., AKAGI Y., EGUSA M., YAMAMOTO M. and OTANI H. (2013). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **37**, 44–66.

TÜRK M., KAYA B., MENEMEN Y. and OĞUZTÜZÜN S. (2011). Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to the genus *Alchemilla* L. species on HeLa cells *in vitro*. *J Med Plants Res.*, **5**, 4566-71.

- UMA S.R., RAMESHA B.T., RAVIKANTH G., RAJESH P.G., VASUDEVA R. and GANESHAIAH K.N. (2008).** Chemical profiling of *N. nimmoniana* for camptothecin, an important anticancer alkaloid: towards the development of a sustainable production system. In: Ramawat KG, Merillion J (eds) Bioactive molecules and medicinal plants. Springer, Berlin.
- VALGAS C., MACHADO DE SOUZA S., SMANIA E.F.A. and SMANIA JR A. (2007).** Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol.*, **38**(2), 1678-4405.
- VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J., CRONIN M.T.D., MAZUR M. and TELSER J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Inter J Biochem Cell Bio.*, **39**, 44-84.
- VAN TYNE D., MARTIN M. J. AND GILMORE M. S. (2013).** Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Toxins*, **5**, 895-911.
- VAN AKEN B., YOON J.M. and SCHNOOR J.L. (2004).** Biodegradation of nitrosubstituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5- trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5- tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Appl. and Environ. Microbiol.*, **70**, 508–517.
- VARVAS T., KASEKAMP K. and KULLMAN B. (2013).** Preliminary study of endophytic fungi in timothy (*Phleum pratense*) in Estonia. *Acta Mycol.*, **48** (1), 41–49.
- VIRET O., SCHEIDEGGER C. and PETRINI O. (1994).** Infection of Beech Leaves (*Fagus-Sylvatica*) by the Endophyte *Discula-Umbrinella* (Teleomorph, *Apiognomonia-Errabunda*) - Low- Temperature Scanning Electron-Microscopy Studies. *Canadian J. Bot.*, **71**, 1520-1527.
- VENUGOPALAN A. and SRIVASTAVA S. (2015).** Endophytes as *in vitro* production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv.*, **33**(6), 873–887.
- VIEU G. (2014).** Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Etude de 37 cas de patients à

l'hôpital des enfants. Université Toulouse III – Paul Sabatier, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Thèse n° 2014-TOU3-2073.

VISALAKCHI S. and MUTHUMARY J. (2010). Taxol (anticancer drug) producing endophytic fungi: An overview. *Int J Pharma Bio Sci.*, **1**, 1-9.

VON DOHREN H., KELLER U., VATER J. and ZOCHER R.(1997). Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem. Rev.*, **97 (7)**, 2675–2706.

WAGENAAR M., CORWIN J., STROBEL G.A. and CLARDY J. (2000). Three new chytocalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinoeladiella*. *J Nat Prod.*, **63**, 1692-95.

WALL M.E., WANI M.C., COOK C.E., PALMER K.H., MCPHAIL A.T. and SIM G.A. (1966). Plant antitumor agents. I—the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 3888-3890.

WALLER F., ACHATZ B., BALTRUSCHAT H., FODOR J., BECKER K., FISCHER M, HEIER T., HU CKELHOVEN R., NEUMANN C. and VON WETTSTEIN D.(2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc Natl Acad Sci.*, **102(38)**, 13386-13391.

WANG L.G., LIU X.M., KREIS W. and BUDMAN D.R. (1999).The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother. Pharm.*, **44**, 355-361.

WANG Q., YUAN F., PAN Q., LI M., WANG G., ZHAO J. and TANG K. (2010).Isolation and functional analysis of the *Catharanthus roseus* deacetylvindoline- 4-O-acetyltransferase gene promoter. *Plant Cell Rep.*, **29**, 185-192.

WATANABE T. (2002). Soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. CRC press, London.

WEBER R.W.S., STENGER E., MEFFERT A. and HAHN M. (2004). Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for resource conquest? *Mycol Res.*, **108 (6)**, 662-671.

WEST C.P. (1994). *Physiology and drought tolerance of endophyte-infected grasses.* In *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*, Bacon C.W. and WHITE J.F. Jr. (Eds). CRC. Press Boca Raton, 87-99.

WIESER W. (1955). The attractiveness of plants to larvae of root knot nematode. I. The effect of tomato seedlings and excised roots on *Meloidogyne hapla*. *Proc Helm Soc Wash.*, **22**, 106–112.

WILSON M., HIRANO S.S. and LINDOW S.E. (1999). Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **65**, 1435-1443.

WILSON S.A. and ROBERTS S.C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J.*, **10**(3), 249–68.

WIYAKRUTTA S., SRIUBOLMAS N., PANPHUT W., THONGON N., DANWISSETKANJANA K., RUANGRUNGSI N. and MEEVOOTISOM V. (2004). Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World J Microbiol Biotech.*, **20**, 265-272.

XIAOLING C., XIAOLI L., SHINING Z., JUNPING G., SHUIPING W., XIAOMING L., ZHIGANG S. and YONGCHENG L.(2010). Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *J. Ecol. and The Nat. Environ.*, **2**, 017-024.

YA-LI L.V., FU-SHENG Z., JUAN C., JIN-LONG C., YONG-MEI X., XIANG-DONG L., and SHUN-XING G. (2010). Diversity and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Associated with the Alpine Plant *Saussurea involucre*. *Biol Pharm Bull.*, **33** (8), 1300-306.

YANG X., GUO S., ZHANG L. and SHAO H. (2003). Selection of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant. *Nat. Prod. Res. Dev.*, **15**, 419-422.

YANG X., ZHANG L., GUO B. and GUO S. (2004). Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. *Zhongcaoyao, Chin. Tradit. Herbal Drug*, **35**, 79-81.

- YANG H., WANG Y., ZHANG Z., YAN R. and ZHU D. (2014a).** Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Shiraia* sp. strain Slf14, a novel endophytic fungus producing huperzine A and hypocrellin A. *Genome Announc.*, **2**, 00011–00014.
- YA-TUAN M., LI-RUI Q., WEN-QUAN S., AN-LING Z. and JIN-MING G. (2010).** Metabolites produced by an endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Maytenus hookeri*. *Chem. Nat. Compd.*, **46**, 3.
- YOUSEFI R., GHAFARIFAR F. and DALIMI A.A. (2009).** The Effect of *Alkanna tinctoria* and *Peganum harmala* Extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) *in vitro*. *Iranian J. Parasitol.*, **4**, 40-47.
- YU S.F., CHEN T.M. and CHEN Y.H. (2007).** Apoptosis and necrosis are involved in the toxicity of *Sauropus androgynus* in an *in vitro* study. *J Formos Med Assoc.*, **106**, 537-47.
- ZABALGOGEAZCOA I. (2008).** Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish J. Agric Res.*, **6**, 138-146.
- ZAFERANLOO B., QUANG T. D., DAUMOO S., GHORBANI M. M., MAHON P. J. and PALOMBO E. A. (2014).** Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from an Australian native plant. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Doi:10.1007/s11274-014-1598-z. Unauthenticated.
- ZAKER F., OODY A. and ARJMAND A. (2007).** A study on the antitumoral and differentiation effects of *Peganum harmala* derivatives in combination with ATRA on leukaemic cells. *Arch. Pharm. Res.*, **30(7)**, 844-849.
- ZAREB A. (2014).** Contribution à l'étude des mycoendophytes foliaires du pistachier de l'Atlas (*Pistachia atlantica* Desf.) de dayate Ait (Timzerth, Laghouat, Algérie). Mémoire de Magister en sciences agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie, 143p.
- ZAUROV D.E., BONOS S., MURPHY J.A., RICHARDSON M.D. and BELANGER F.C. (2001).** Endophyte infection can contribute to aluminium tolerance in fine fescues. *Corp Science* , **41**, 1981-1984.

- ZHANG L., GUO B., LI H., ZENG S., SHAO H., GU S. and WEI R. (2000).** Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value. *Chin. Tradit. Herbal Drug.*, **31**, 805-807.
- ZHANG H.W., SONG Y. C. and TAN R. X. (2006).** Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 753-771.
- ZHANG P., ZHOU P.P. and YU L.J. (2009b).** An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Curr. Microbiol.*, **59**, 227–232.
- ZHANG A.H., WANG X.Q., HAN W.B., SUN Y., GUO Y., WU Q., GE H.M., SONG Y.C., NG S.W., XU Q. and TAN R.X. (2013).** Discovery of a new class of immunosuppressants from *Trichothecium roseum* co-inspired by cross-kingdom similarity in innate immunity and pharmacophore motif. *Chem-Asian J*, **8**, 3101–3107.
- ZHANG X, WEI W and RENXIANG TAN. (2015).** Symbionts, a promising source of bioactive natural products. *Sci.China Chem.*, **58(7)**, 1097-1109.
- ZHAREKEEV B., KHASHIMOV K., TELEZHENETSKAYA M. and YUNUSOV S. (1974).** New alkaloids from *Peganum harmala*. *Chem. of Nat. Comp.*, **10**, 282-283.
- ZHAO K., ZHAO L., JIN Y., WEI H., PING W. and ZHOU D. (2008).** Isolation of a taxol-producing endophytic fungus and inhibiting effect of the fungus metabolites on HeLa cell. *Mycosystema*, **27**, 735-744.
- ZHAO J., ZHOU L., WANG J., SHAN T., ZHONG L., LIU X. and GAO X. (2010a).** Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Current Research, Technology Education Topics in App. Microbiol. and Microbial biotechnol.*, **1**, 567–576.
- ZHAO J., MOU Y., SHAN T., LI Y., ZHOU L., WANG M. and WANG J. (2010b).** Antimicrobial Metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Molecules*, **15 (11)**, 7961-7970.
- ZHAO J., SHAN T., MOU Y. and ZHOU L. (2011).** Plant-Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi. *Mini-Reviews in Med. Chem.*, **11**, 159-168.

ZHAO J., FU Y., LUO M., ZU Y., WANG W., ZHAO C. and GU C. (2012). Endophytic fungi from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) produce antioxidant cajaninstilbene acid. *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 4314–4319.

ZHENG H., YODIM M.B.H. and FRIDKIN M.J. (2009). Site-Activated Multifunctional Chelator with Acetylcholinesterase and Neuroprotective-Neurorestorative Moieties for Alzheimer's Therapy. *J. of Med. Chem.*, **52**, 4095.

ZIKMUNDOVA M., DRANDAROV K., BIGLER L., HESSE M. and WERNER C. (2002). Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hydroxy-1,4- benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 4863–4870.

ZOU W.X. and TAN R.X. (1999).Advances in Plant Sciences. Beijing: China Higher Education Press, 183–190. *In: Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review*1 (Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K. 2008. *App. Biochem and Microbiol.*, **44**, 136–142.

ZOU. W. X., J. C. MENG , H. LU , G. X. CHEN ,G. X. SHI , T. Y. ZHANG and R. X. TAN. (2000). Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*. *J. Nat. Prod.*, **63 (11)**, 1529–1530.



ANNEXES

Annexe

Annexe 1

Composition et préparation des différents milieux de cultures et solutions utilisées

- **Eau physiologique**

NaCl	09g
Eau distillée	1000 ml

- **Milieu PDA (Potato-Dextrose-Agar)**

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	20g
Agar-agar.....	20g
Eau distillée	1000 ml

- **Milieu PDB (Potato-Dextrose- Broth)**

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

- **Milieu Brain Heart Infusion (BHIB)**

Protéose peptone.....	10g
Infusion de cervelle de veau.....	12,5g
Infusion de coeur de boeuf	05g
Chlorure de sodium.....	05g
Phosphate disodique.....	2,5g
Glucose.....	02g
Eau distillée.....	1000 ml
pH final 7,4±0,2	

- **Milieu BHI-Agar**

BHI.....	18,5g
Agar-agar.....	7,5 g
Eau distillée.....	1000ml

Annexe

- **Milieu Muller Hinton (MH)**

Extrait de viande.....	03g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1,5g
Agar-agar.....	16g
Eau distillée.....	1000 ml
pH final 7,3	

Annexe

Annexe 2

Tableaux analyse ANOVA

Tableau d'analyse ANOVA des fréquences de colonisations des sujets échantillonnés par les mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*

	ddl	SC	CM	F	Proba
Sujet	9,00	71277,33	7919,70	3,97	0,00
Var.résiduelle	140,00	279520,00	1996,57		
Total	149,00	350797,33			

Tableau d'analyse ANOVA des indices mitotiques des extraits de métabolites secondaires fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*

	ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	11,00	10967,94	997,09	77,95	0,00
Var.résiduelle	48,00	613,98	12,79		
Total	59,00	11581,91			

Tableau d'analyse ANOVA des indices de cytotoxicité des extraits de métabolites secondaires fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*

	ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	11,00	3566,38	324,22	17,35	0,00
Var.résiduelle	84,00	1569,95	18,69		
Total	95,00	5136,33			

Tableau d'analyse ANOVA des IC 50 des extraits de métabolites secondaires fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*

	ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	3,00	576,81	192,27	78,23	0,00
Var.résiduelle	4,00	9,83	2,46		
Total	7,00	586,64			

Tableau d'analyse ANOVA des teneurs en polyphénols des extraits de métabolites secondaires fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*

	ddl	SC	CM	F	Proba
Essai	3,00	18,65	6,22	2446,33	0,00
Var.résiduelle	4,00	0,01	0,00		
Total	7,00	18,66			

Annexe

Tableau d'analyse ANOVA pour la souche bactérienne *Bacillus cereus* ATCC 10876 qui montre une valeur « p » inférieure à 0,05%.

<i>Tableau d'analyse de variance</i>					
	ddl	SC	CM	F	Proba
Champignon	11,00	1108,97	100,82	78,90	0,00
Var.résiduelle	24,00	30,67	1,28		
Total	35,00	1139,64			

Annexe

Annexe 3

Informations concernant les souches de références

Numéro de référence	Origine	Gènes codant pour les entérotoxines staphylococciques par PCR conventionnelle
<i>S. aureus</i> FRI 361	Poulet, Collection FRI USA	<i>sec, sed, ser, seg, sei, sej</i>
<i>S. aureus</i> FRI S6	Collection FRI USA	<i>sea, seb</i>
<i>S. aureus</i> FRI 137	Abcès (ATCC 19095)	<i>seg, seh, sei</i>
<i>S. aureus</i> FRI 326	Chicken tetrazzini, Collection FRI USA	<i>see</i>
<i>S. aureus</i> MU 50 11CEB145 STA	Pus d'enfant japonais avec une blessure chirurgicale	<i>sea, sec, seg, sei</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Collection USA	-----
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10878	ATCC, Collection USA	-----
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	ATCC, Collection USA	-----
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	ATCC, Collection USA	-----
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	ATCC, Collection USA	-----

FRI: Food Research Institute

Se : Staphylococcal enterotoxin (gène codant pour les enterotoxines staphylococciques)

ATCC : American Type Culture Collection

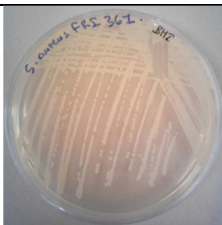
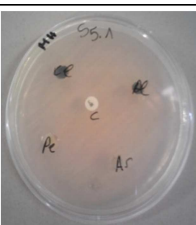
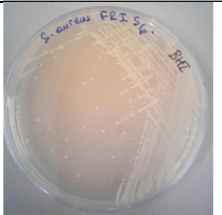
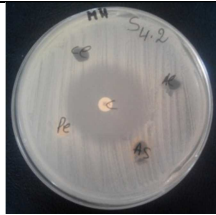
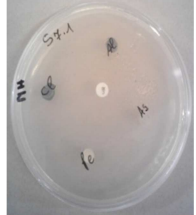
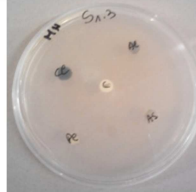
MU50, ATCC 43300 : Sont des souches MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

MU50 : porte le gène *mecA*

Annexe

Annexe 4

Détection préliminaire de l'activité antibactérienne des champignons endophytes et de l'antibiotique (Chloramphénicol) vis-à-vis de quelques souches bactériennes.

Souches	Inoculum	Inoculation	24h	48h
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 361 (S5)				
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI S6 (S4)				
<i>Staphylococcus aureus</i> MU50 mecA (S7)				
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 (S1)				
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 (S9)				
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (S10)				

Abstract

Epiphytic and endophytic fungi live in complex interaction with plants where both partners benefit. Medicinal plants are an inexhaustible source of bioactive molecules. They can be produced by the various organs of the plant or by mutual mycoendophytes present within the latter. Our study was carried out on a spontaneous medicinal plant of the region of Laghouat (Algeria): *Peganum harmala* L. Our interest in this work focused on the diversity of mycoendophytes and epiphytes in the leaves of *Peganum harmala* L, as well as on the demonstration of the different biological activities (antimitotic, antiproliferative, antioxidant and antibacterial) of fungal secondary metabolites raw endophytic fungi of this species. Microscopic identification revealed an abundance of *Penicillium* and *Rhizopus* genera for epiphytes, *Cladosporium* and *Alternaria* for mycoendophytes. Significant interactions are described between different fungal taxa indicating the impact of these interactions on fungal biodiversity in the leaves of *Peganum harmala*. In addition, the antimitotic and antiproliferative tests confirm the action of the crude fungal secondary metabolites of these mycoendophytes in the inhibition of mitosis, as well as for the combinations of extracts produced, thus producing chromosomal and cell abnormalities as well as a cytotoxic effect. The antioxidant activity of the latter was carried out by diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) test. The antioxidant molecules extracted by ethyl acetate are related to the polyphenol content found in the different extracts of crude fungal secondary metabolites as well as the leaf extract in *Peganum harmala* L. In addition, the evaluation of the activity Antibacterial revealed a difference in the susceptibility of bacterial strains to the secondary metabolites of fungus mycoendophytes of *Peganum harmala* L according to their cultural conditions and their presence together or separately with respect to each bacterial strain and the time incubation.

Key words: Endophytic fungi, *Peganum harmala*, antimitotic, antiproliferative, antioxidant, antibacterial, Laghouat (Algeria).

Résumé

Les champignons épiphytes et endophytes vivent en interaction complexe avec les plantes où les deux partenaires tirent profit. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de molécules bioactives. Elles peuvent être produites par les différents organes de la plante ou par des mycoendophytes mutualistes présents au sein de cette dernière. Notre étude a été réalisée sur une plante médicinale spontanée de la région de Laghouat (Algérie) : *Peganum harmala* L. Notre intérêt dans ce travail s'est porté sur la diversité des mycoendophytes et des épiphytes au niveau des feuilles de *Peganum harmala* L, ainsi que sur la mise en évidence des différentes activités biologiques (antimitotique, antiproliférative, antioxydante et antibactérienne) des métabolites secondaires fongiques bruts des mycoendophytes foliaires de cette essence. L'identification microscopique a révélé une abondance des genres *Penicillium* et *Rhizopus* pour les épiphytes, *Cladosporium* et *Alternaria* pour les mycoendophytes. Des interactions importantes sont décrites entre les différents taxons fongiques indiquant ainsi l'impact de ces interactions sur la biodiversité fongique au niveau des feuilles de *Peganum harmala*. Par ailleurs les essais antimitotiques et antiprolifératifs confirment l'action des métabolites secondaires fongiques bruts de ces mycoendophytes dans l'inhibition de la mitose, de même pour les combinaisons d'extraits réalisées, produisant ainsi des anomalies chromosomiques, cellulaires ainsi qu'un effet cytotoxique. L'activité antioxydante de ces derniers a été réalisée par le test Diphénylpicrylhydrazyl (DPPH). Les molécules antioxydantes extraites par l'acétate d'éthyle sont en relation avec la teneur en polyphénols retrouvée dans les différents extraits de métabolites secondaires fongiques bruts ainsi que l'extrait foliaire chez *Peganum harmala* L. En outre, l'évaluation de l'activité antibactérienne a révélé une différence dans la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des métabolites secondaires des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* L selon leurs conditions culturales à savoir : leurs présence ensemble ou séparément vis-à-vis de chaque souche bactérienne et le temps d'incubation.

Mots clés : Mycoendophytes foliaires, *Peganum harmala*, antimitotique, antiproliférative, antioxydante, antibactérienne, Laghouat (Algérie).

ملخص

تعيش الفطريات في تفاعل كبير مع النباتات، حيث يستفيد من هذه العلاقة كلا الطرفين. هذه النباتات و خاصة منها الطبية مصدر مهم للجزيئات النشطة. يمكن إنتاج هذه الأخيرة من قبل مختلف أعضاء النباتات أو عن طريق الفطريات الموجودة بداخلها في تعايش سلمي و مدعوة mycoendophytes. في هذه الدراسة، ركزنا اهتمامنا على نبتة الحرمل (*Peganum harmala*) التي نجدها بكثرة في منطقة الأغواط (الجزائر). أول اهتمامنا هو تنوع تلك الفطريات الموجودة فوق و داخل أوراقها (épiphytes et endophytes). اهتمينا كذلك بكشف الأنشطة البيولوجية المختلفة لهذه الفطريات (antimitotique, antiproliférative, antioxydante et antibactérienne). أثبت الكشف المجهرى عن وجود أنواع كثيرة من الفطريات فوق و داخل أوراق الحرمل. *Penicillium* et *Rhizopus* شائعتان فوق الأوراق. *Alternaria* و *Cladosporium* داخلها. تفاعلات كثيرة توجد بين هذه الأنواع من الفطر .

أما فيما يخص نشاطات هذه الفطريات، فقد أثبتنا أن مركباتها الثانوية لها دخل في وقف الانقسامات الخلوية (activité antimitotique) و انتشار الخلايا (activité antiproliférative). كما تم تحقيق نشاط مضاد الأكسدة (anti oxydante) بواسطة اختبار DPPH. نتائج نشاط مضاد الأكسدة متعلق بكمية البليفينول (polyphénols) المتواجدة في مختلف المستخرجات الفطرية و كذلك المستخرج المتحصل من أوراق الحرمل. أما عن النشاطات المضادة للجراثيم، فلقد تحصلنا على نتائج مختلفة اعتمادا عليها إذا كانت الفطريات معا أو منفصلة و ذلك حسب الجراثيم طبعا.

الكلمات المفتاحية

مضاد للانتشار، مضاد للتكاثر، mycoendophytes، *Peganum harmala* مضاد للأكسدة، مضاد للبكتيريا، الأغواط (الجزائر).