

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Mémoire
De fin d'études
En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité : Diversité et Adaptation de la Flore Méditerranéenne

Thème

Etude de l'activité antibactérienne de
champignons endophytes foliaires de *Peganum*
harmala de la région de Laghouat (Algérie)

Présenté par : **M^{elle} KARAOUI Siliya**

Le 24/09/2017

Devant le jury :

M. MEDJKOUNE N.

MAA à l'UMMTO

Président

M^{me} SMAIL-SAADOUN N.

Professeur à l'UMMTO

Promotrice

M^{elle} OUZID Y.

Doctorante à l'UMMTO

Co-promotrice

M^{elle} ASMANI K.

MCB à l'UMMTO

Examinatrice

2017/2018

Dédicace

Je dédie ce modeste travail aux personnes qui comptent le plus pour moi, qui ont été présentes et j'espère y resteront tout au long de mon parcours.

Remerciements

J'exprime en premier lieu ma gratitude à madame SMAIL-SAADDOUNN Noria (Professeur à l'UMMTO) pour, m'avoir donné la chance d'intégrer son Master. Je lui suis reconnaissante pour la confiance qu'elle a témoignée à mon égard en acceptant d'encadrer mon travail.

Mes sincères remerciements vont tout particulièrement à mademoiselle Yasmina OUZID qui a bien voulu me Co-encadrer et a su me superviser et guidé tout au long de mon mémoire.

J'aimerais également remercier monsieur TITOUCHE Y. (MAA à l'UMMTO) pour sa précieuse aide et sa contribution.

Je souhaite exprimer ici mes remerciements à monsieur MEDJKOUNE N. d'avoir accepté de présider le jury de la soutenance et d'examiner mon travail. Melle ASMANI K. qui a accepté de faire partie du jury afin d'examiner ce travail. Qu'ils en soient remerciés.

Je voulais également remercier le personnel et les doctorantes du laboratoire « Ressources Naturelles » de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour leurs conseils et encouragements et surtout pour leur soutien moral, tout au long de mon travail.

Liste des figures

Figure 1 : représentation schématique du cycle de vie des champignons endophytes du genre <i>Neotyphodium</i> transmis verticalement	8
Figure 2 : représentation schématique du cycle de vie des mycoendophytes foliaires transmis horizontalement chez les plantes tropicales	9
Figure 3 : hypothèses de la balance d'antagonismes entre les champignons endophytes et leurs plantes hôtes, permettant la colonisation asymptomatique	11
Figure 4 : structure chimique de l'auxine.....	16
Figure 5 : technique de diffusion des mycéliums de mycoendophytes foliaires <i>Peganum harmala</i> sur gélose	36
Figure 6 : technique de diffusion des disques de mycéliums de mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i> sur gélose (un seul mycélium par boîte).....	36
Figure 7 : schéma récapitulatif de la technique de double diffusion sur gélose	38
Figure 8 : 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.....	41
Figure 9: 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.....	42
Figure 10 : activité antibactérienne du genre <i>Aspergillus</i> et de l'antibiotique dans la seconde manipulation sur <i>S. aureus</i> FRI 6.....	43
Figure 11 : 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	44

Liste des tableaux

Tableau 1 : critères symbiotiques qui caractérisent les classes des champignons endophytes.	6
Tableau 2 : structures chimiques de quelques composés antiparasitaires.....	18
Tableau 3 : structures chimiques de quelques composés anticancéreux.....	21
Tableau 4: quelques structures chimiques de composés antibactériens et antifongiques	24
Tableau 5 : quelques structures chimiques de composés antioxydants	25
Tableau 6 : quelques composés bioactifs immunosuppresseurs	26
Tableau 7 : quelques structures chimiques de composés antiviraux.....	28
Tableau 8 : applications industrielles d'enzymes mycoendophytiques	29
Tableau 9 : caractères généraux des champignons endophytes utilisés.....	31
Tableau 10 : Normes utilisées dans l'expression de la sensibilité des microbes à l'antibiotique avec des disques de 6 mm de diamètre	37
Tableau 11 : inhibition de la croissance des souches bactériennes par les mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i> dans le premier screening	44
Tableau 12 : inhibition de la croissance des souches bactériennes par les mycoendophytes dans le second dépistage	44
Tableau 13 : 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	47
Tableau 14 : 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	48
Tableau 15 : 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	49
Tableau 16 : 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> S6.....	50
Tableau 17 : 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	51

Tableau 18 : 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	52
Tableau 19 : 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	53
Tableau 20 : 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 137	54
Tableau 21 : 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>Bacillus cereus</i> 10876	55
Tableau 22 : 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>Bacillus cereus</i> 14579	56

Liste des abréviations

BHIA	Brain Heart Infusion Agar
C	Chloramphénicol
DO	Densité optique
IAA	Indole-3-acetic acid (acide indole 3-acétique)
ITS	Internal transcribed spacer
MH	milieu Mueller Hinton
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PDA	Potato dextrose agar
UFC	Unité formant colonie
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
μl	Microlitre
μg	Microgramme

Sommaire

Introduction générale	2
------------------------------------	----------

Chapitre I. Mycoendophytes

1. Introduction	5
2. Classification des champignons endophytes	5
2.1. Mycoendophytes Clavicipitaceae (C- endophytes).....	6
2.2. Mycoendophytes non-Clavicipitaceae	7
3. Mode de reproduction et de transmission	7
3.1. Transmission verticale.....	7
3.2. Transmission horizontale	8
4. Interaction champignon endophyte-hôte.....	9
5. Diversité des champignons endophytes	11
6. Spécificité des tissus	12
7. Variabilité spatiale et géographique.....	12
8. Facteurs de diversité des champignons endophytes.....	13
9. Obstacles rencontrés dans la découverte de la biodiversité des mycoendophytes.....	14
10. Rôles des champignons endophytes.....	15
10.1. Rôle dans la nutrition et la croissance	15
10.2. Rôle de défense contre les différents stress environnementaux	16
10.3. Rôle écologique et environnemental (phytoremédiation.....	18
10.4. Champignons endophytes comme source de molécules bioactives pharmacologiques....	19
10.4.1. Composés anticancéreux	19
10.4.2. Composés antibactériens et antifongiques	22
10.4.3. Composés antioxydants	24
10.4.4. Composés immunomodulateurs	26
10.4.5. Composés antiviraux	27
10.4.6. Composés enzymatiques	28

Chapitre II. Matériels et méthodes

1. Matériels	32
1.1. Les mycéliums des mycoendophytes foliaires de <i>Peganum harmala</i>	32
1.2. Matériel microbien.....	33
1.3. Autre matériel utilisé.....	35
2. Méthodes.....	35
2.1. Double culture de diffusion sur gélose	35
2.1.1. Préparation de l'inoculum et ajustement de la turbidité.....	35
2.1.2. Préparation de l'inoculum et ajustement de la turbidité	35
2.1.3. Screening préliminaire de l'activité antibactérienne des mycoendophytes	36
2.1.4. Dépistage de l'activité antibactérienne des mycoendophytes foliaires sélectionnés par le screening	37
3. Analyse statistique	40

Chapitre III. Résultats et discussion

1. Dépistage de l'activité antibactérienne	42
2. Analyse statistiques : test de l'ANOVA	47
3. Test de comparaison des groupes homogène de Newman-Keuls.....	48
3.1.Comportement antibactérien des champignons et l'antibiotique vis-à-vis d' <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	48
3.2.Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> TCC 25923	49
3.3.Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> FRI 326.....	50
3.4.Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> S6.....	51
3.5.Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de <i>S. aureus</i> FRI 361.....	52
3.6.Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> TCC 43300	53
3.7.Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> MU 50 mecA	54

3.8.Comportement antibactérien des mycoendophytes foliaires et de l'antibiotique vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> FRI 137	55
3.9.Comportement antibactérien des champignons et de l'antibiotique vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i> 10876	56
3.10. Comportement antibactérien des champignons et de l'antibiotique vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i> 14579	57
Conclusion générale	62
Références bibliographiques	65
Annexes	74

Introduction générale

Les soins par les plantes sont connus depuis l'antiquité et leur pouvoir de guérison n'est plus à démontrer. 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). Bien des recherches ont montré un immense potentiel des plantes médicinales comme source de composés bioactifs (Das *et al.*, 2010 ; Tenguria *et al.*, 2011). Ces recherches ont été menées pour pallier à l'apparition de microorganismes multi-résistants et l'urgence de trouver de nouveaux antibiotiques, des agents thérapeutiques et agrochimiques plus efficaces, moins toxiques, avec un impact environnemental mineur (Tenguria *et al.*, 2011).

Les plantes médicinales 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 représentés par des bactéries et des 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) et peuvent développer avec elle diverses interactions (Ravelomanantsoa, 2004). Les mycoendophytes peuvent contribuer à la croissance de la plante et à 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. Dans 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.*, 2010).

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à une plante médicinale des régions arides d'Algérie : *Peganum harmala* (Harmel), une plante de la famille des Zygophyllaceae. C'est une espèce cosmopolite, qui pousse de manière spontanée dans les régions semi-arides, les steppes et les sols sablonneux et salins (Darabpour *et al.*, 2011 ; Hammiche *et al.*, 2013 ; Niroumand *et al.*, 2015). Elle a été 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). Les feuilles et les graines de *P.harmala* sont connues pour avoir des propriétés hypothermiques et hallucinogènes.

Beaucoup d'études scientifiques 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).

Le Harmel est une plante toxique et sa toxicité est due aux différents alcaloïdes qui la constituent. Ces derniers sont les principaux composés bioactifs de *P. harmala*, ils sont connus pour leurs effets antimicrobiens et hypothermiques (Hammiche *et al.*, 2013). Les propriétés désinfectant des fumigations des graines de *Peganum* utilisées traditionnellement en Iran, ont été démontrées par une étude chromatographique, sur les différentes fractions d'un extrait organique de condensat de fumée. Cette étude a permis d'avancer que l'harmine un composé bioactif de *P. harmala* aurait une activité antimicrobienne très élevée sur les différentes souches microbiennes testées. Cet alcaloïde s'est avéré le composé le plus actif sur *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Cependant, le mélange d'alcaloïdes potentialise son action (Hammiche *et al.*, 2013). Ainsi, Shahverdi *et al.* (2005) ont démontré que les extraits dichlorométhane riches en harmine ont une importante activité antibactérienne. Différents extraits des parties aériennes de *P. harmala* ont démontré d'importants effets antibactériens en particulier l'extrait chloroformique vis-à-vis des bactéries Gram positif (Edziri *et al.*, 2010). De même, l'extrait méthanolique de la graine a montré une activité antibactérienne significative. D'autres travaux ont mis en évidence les activités antibactériennes et antifongiques des alcaloïdes de la bêtacarboline du Harmel (Hammiche *et al.*, 2013).

Notre objectif dans cette étude vise à évaluer l'activité antibactérienne de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* par la technique de double diffusion sur gélose. Dans cette optique, nous avons organisé notre travail comme suite : le chapitre I est consacré à l'étude bibliographique des champignons endophytes. Le matériel et les méthodes utilisés sont donnés dans le chapitre II et le chapitre III est dédié aux résultats et discussion et nous terminerons par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I

Mycoendophytes

1. Introduction

Le terme « endophyte » a été introduit pour la première fois par Leveille et De Bary (1866). Il a été appliqué à tout microorganisme opérant asymptomatiquement dans les tissus vivants et sains des plantes (Gimenez *et al.*, 2007 ; Hyde et Soyong, 2008 ; Kharwar *et al.*, 2014). Son origine étymologique provient du grec « *endo* », qui signifie dedans et « *phyton* » plante : « à l'intérieur de la plante ». L'usage de ce terme est large (Schulz et Boyle, 2006), il inclut les bactéries, les champignons, les Algues, les virus et les nématodes (Gimenez *et al.*, 2007 ; Kharwar *et al.*, 2014).

La définition la plus communément utilisée est celle de Petrini (1991), qui a décrit les endophytes comme étant tout microorganisme occupant les organes d'une plante, qui à un stade de leur vie peuvent coloniser les tissus internes de cette dernière sans lui causer de dommages apparents (Hyde et Soyong, 2008 ; Osés *et al.*, 2008).

Les champignons endophytes ou mycoendophytes sont des microorganismes symbiotes, habitant les tissus vivants des plantes (Rodriguez *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2015). Ils colonisent l'espace intercellulaire ou intracellulaire de leurs plantes hôtes, sans manifester de symptômes ou de dommages apparents, pendant tout ou une partie de leur cycle de vie (Schulz et Boyle, 2006 ; Huang *et al.*, 2008 ; Gao *et al.*, 2010 ; Nagam *et al.*, 2015 ; Masumi *et al.*, 2015).

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 Soyong, 2008 ; Raja *et al.*, 2015) et le groupe des mycoendophytes non-Clavicipitaceae qui colonisent toutes les plantes terrestres et aquatiques (Hyde et Soyong, 2008 ; Raja *et al.*, 2015).

Les différentes classes des mycoendophytes sont mentionnées dans le tableau 1. 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 1 : 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.

- **Nonhabitat-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.

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 qui se transmettent verticalement (Tintjer *et al.*, 2008 ; Raja *et al.*, 2015).

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 transmis horizontalement (Hyde et Soyong, 2008 ; Raja *et al.*, 2015), 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).

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.

3.1. Transmission verticale

Les mycoendophytes transmis verticalement ont été décrit par Carroll (1988) comme des « mutualistes constitutifs », associés systématiquement à leur plante hôte (Saikkonen, 2007). Ils sont transmis d'une plante à sa descendance par l'intermédiaire de leurs graines (Sanjana *et al.*, 2012 ; 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 puis l'embryon, ainsi infectent une nouvelle génération de graines (Clay *et al.*, 1990 ; Gimenez *et al.*, 2007 ; Dirihan, 2016) (Figure 1).

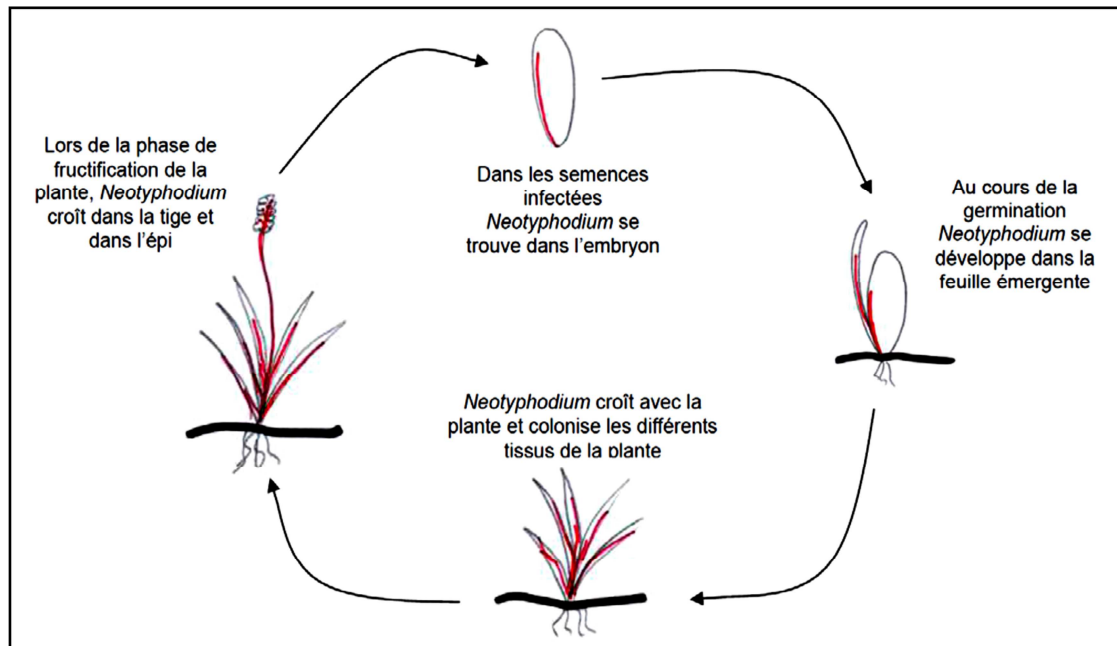


Figure 1 : représentation schématique du cycle de vie des champignons endophytes du genre *Neotyphodium* transmis verticalement (—) (Repussard *et al.*, 2013). [(—) Les parties de la plante colonisées par le *Neotyphodium*]

3.2. Transmission horizontale

Ce mode de transmission se fait par transfert de spores sexuées (ascospores) ou asexuées (conidies) des parties aériennes d'une plante à l'autre avec l'aide de différents vecteur comme l'air, le vent, les insectes, etc ... (Caroll, 1988 ; Sanjana *et al.*, 2012). 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 contaminer par ces derniers, tel qu'il est mentionné au niveau de la figure 2, qui schématise le mode de transmission horizontale chez des plantes tropicales (Herre *et al.*, 2007 ; Saikkonen, 2007).

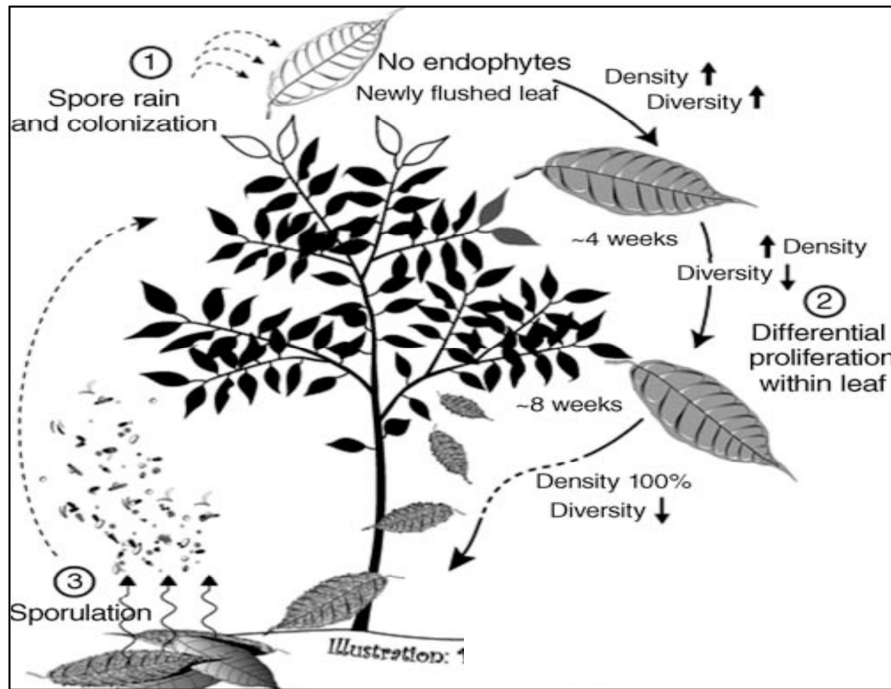


Figure 2 : représentation schématique du cycle de vie des mycoendophytes foliaires transmis horizontalement chez les plantes tropicales (Herre *et al.*, 2007).

4. Interaction hôte-champignons endophytes

Il existe une relation complexe entre les champignons endophytes et leurs plantes hôtes. Elle représente un continuum d'associations variables, qui va du mutualisme à l'antagonisme en passant par le pathogène latent (Schulz et Boyle, 2006 ; Arnold et Lutzoni, 2007; Huang *et al.*, 2008). Cette relation est flexible, varie dans le temps et l'espace, suivant l'état de croissance, la genèse, la stratégie de vie des champignons, l'architecture tissulaire de l'hôte, l'adaptation morphologique, chimique entre le champignon et l'hôte. Elle varie aussi par rapport aux conditions environnementales et géographiques (Schulz et Boyle, 2006 ; Sánchez Márquez *et al.*, 2008 ; Selim *et al.*, 2012 ; Saikkonen *et al.*, 2015 ; Compant *et al.*, 2016).

Le mode de transmission joue aussi un rôle dans la nature de l'interaction, où les espèces systémiques d'*Epichloë*, transmises verticalement par les graines de leur hôte ont des interactions plus mutualistes avec ce dernier que les asystémiques, transmises horizontalement (Compant *et al.*, 2016). Par ailleurs, la compatibilité génétique influence la nature de l'interaction de ces deux partenaires. Une étude sur les espèces de *Colletotrichum* a démontré que les différents isolats expriment des styles de vie parasites ou mutualistes selon le génome de la plante hôte colonisée (Rodriguez et Redman, 2008).

En effet, plus récemment Hacquard *et al.* (2016) ont démontré que les gènes codant pour des protéines nécessaires à l'infection de la plante sont 50 % moins nombreux chez l'espèce *Colletotrichum tofieldiae* présente asymptomatiquement chez *Arabidopsis thaliana* que chez son homologue pathogène *Colletotrichum incanum* (133 contre 189). Plus encore, la majorité des gènes codant pour des facteurs de pathogénicité, qu'il s'agisse d'effecteurs, enzymes clés du métabolisme secondaire ou encore transporteurs, sont exprimés très tardivement, voire pas du tout activés chez *Colletotrichum tofieldiae*, alors qu'ils sont fortement induits chez *C. incanum* lors de l'infection de la plante hôte. De son côté, la plante aussi réagit différemment vis-à-vis de ces deux espèces. Elle active les gènes codant pour différents éléments de défense contre *Colletotrichum incanum*. Alors qu'en présence de *C. tofieldiae*, la réponse d'*A. thaliana* varie selon la concentration en phosphore du milieu. Si celui-ci est présent en quantité importante, les gènes codant pour différents éléments de défense de la plante, telle la synthèse de composés antimicrobiens, sont activés. Plante et champignon ne peuvent alors interagir. Par contre, si le milieu est carencé en phosphore, ces gènes ne sont pas activés. Les deux parties peuvent interagir pour le plus grand bénéfice de la plante en matière de nutrition, d'autant que les gènes liés au transport du phosphore ou à la différenciation des cellules racinaires sont alors activés.

La colonisation asymptomatique de la plante hôte par le mycoendophyte est un équilibre d'antagonisme entre les deux partenaires (Schulz et Boyle, 2006). Cet équilibre s'est établi durant une longue période de co-évolution. Ainsi, le vrai champignon endophyte s'installe et se maintient au niveau des tissus de la plante aussi longtemps que la virulence endophytique et la défense de la plante hôte sont équilibrées et l'interaction reste asymptomatique (Schulz et Boyle, 2006 ; Gimenez *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2010).

Les mycoendophytes et les organismes pathogènes possèdent plusieurs facteurs semblables de virulence et sont étroitement liés entre eux (Caroll, 1988 ; Schulz et Boyle, 2006). Pour leur colonisation, les mycoendophytes doivent synthétiser des métabolites phytotoxiques de défense, comme des exoenzymes pour concurrencer les épiphytes et les microorganismes pathogènes, mais également pour réguler le métabolisme de la plante hôte et contourner sa défense chimique dans les tissus en créant un équilibre d'antagonisme (Schulz *et al.*, 2002 ; Schulz et Boyle, 2006 ; Suryanarayanan *et al.*, 2012). En réponse à cette éventuelle agression, l'hôte de son côté peut répondre par une réaction similaire, c'est-à-dire en produisant des métabolites de défense préformés.

Cet équilibre d'antagonisme souvent fragile est un statut momentané et dépend de l'état général des associés, de la virulence du champignon endophyte, des défenses de l'hôte, des facteurs environnementaux, du statut alimentaire, ainsi que des étapes développementales des associés (Schulz et Boyle, 2006).

D'une manière générale, l'interaction mutualiste entre les champignons endophytes et la plante hôte est décrite comme un équilibre contrôlé par les conditions physiologiques et génétiques des deux partenaires et de leur environnement (Selim *et al.*, 2012).

L'hypothèse de l'équilibre antagonisme / mutualisme qui permet la colonisation asymptomatique entre les champignons endophytes et leur plantes hôtes, par l'équilibre qui existe entre le mycoendophyte comme un corps étranger virulent et la réponse de défense de la plante est illustrée dans la figure 3.

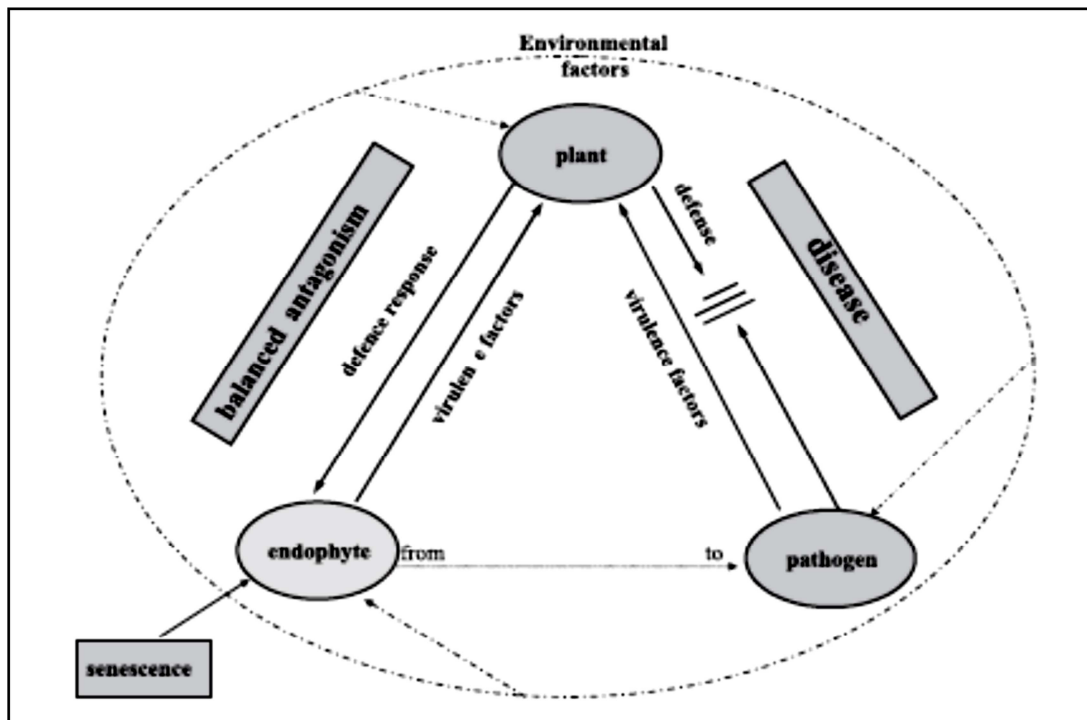


Figure 3: hypothèses de la balance d'antagonismes entre les champignons endophytes et leurs plantes hôtes, permettant la colonisation asymptomatique (Schulz et Boyle, 2006).

5. Diversité des champignons endophytes

Les champignons endophytes sont une importante composante de la diversité fongique (Gao *et al.*, 2010 ; Nagam *et al.*, 2015). Beaucoup d'études ont rapportées leur extrême biodiversité dans les tissus asymptomatiques de la majorité des plantes ligneuses et des espèces herbacées (Arnold et Lutzoni, 2007 ; Zabalgoitia, 2008 ; Rodriguez *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2015).

Les champignons endophytes ont été isolés à partir de toutes les plantes étudiées à ce jour (Rodriguez *et al.*, 2009). Ils se rencontrent chez les Algues, les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et les Angiospermes (Hyde et Soyong, 2008 ; Suryanarayanan *et al.*, 2012).

Les mycoendophytes sont omniprésents et représentent un groupe écologique polyphylétique, phylogénétiquement et écologiquement variés (Raja *et al.*, 2015). Dreyfuss et Chapela (1994) ont estimé qu'ils sont au moins un million d'espèces et la majorité de ces champignons appartiennent aux Ascomycètes ou aux champignons anamorphes. Quant aux Basidiomycètes, ils sont peu fréquemment isolés et étudiés du fait de leur longue période d'incubation (8 semaines) (Strobel et Daisy, 2003 ; Gimenez *et al.*, 2007 ; Hyde et Soyong, 2008 ; Selim *et al.*, 2012 ; Mishra *et al.*, 2013). L'usage de nouvelles techniques moléculaires a permis d'identifier des associations de plus de 100 espèces de mycoendophytes avec une seule espèce de plante (Sánchez Márquez *et al.*, 2008).

6. Spécificité des tissus

Les champignons endophytes peuvent se rencontrer au niveau des différents tissus aériens de la plante tel que les parenchymes, les tissus conducteurs, les tissus protecteurs (Gimenez *et al.*, 2007) des feuilles, des pétioles, incluant les épines, l'écorce, le bois et les fruits de presque toutes les espèces de plantes vasculaires (Oses *et al.*, 2008). Les mycoendophytes sont significativement plus diversifiés au niveau des feuilles que des tiges. Ce qui est attribué au fait qu'ils ont une spécificité très étroite pour les tissus foliaires (Khan *et al.*, 2016). Masumi *et al.* (2015) ont observé la spécificité des tissus chez quelques genres de champignons endophytes comme *Aspergillus* et *Ulocladium* qui ont été isolés respectivement des feuilles et tiges du thym (*Thymus*).

La variabilité des assemblages des mycoendophytes au niveau des tissus indique que ces champignons ont chacun une affinité pour un type de tissus. Cela peut être le reflet des différences de textures et compositions chimiques de ces derniers (Arnold *et al.*,

2003 ; Huang *et al.*, 2008 ; Compant *et al.*, 2016). Petrini *et al.* (1991) ont suggéré que cette spécificité est liée aux conditions physiologiques et microécologiques des organes de la plante hôte (Masumi *et al.*, 2015).

7. Variabilité spatiale et géographique

Une différence est retrouvée dans la composition et l'abondance des communautés mycoendophytiques entre différents habitats. Cette variabilité peut avoir un lien avec la préférence de l'hôte. Quelques sites hébergent plus de mycoendophytes que d'autres et quelques champignons endophytes sont retrouvés seulement dans un seul emplacement (Huang *et al.*, 2008). L'hétérogénéité spatiale dans la distribution des mycoendophytes et leur nombre peut être aussi due aux différences des conditions environnementales incluant l'humidité, la température et la pluviosité (Huang *et al.*, 2008 ; Selim *et al.*, 2012).

Les champignons endophytes sont très abondants chez les plantes des régions tempérées et des forêts tropicales, avec un taux d'infection proche de 100% pour ces dernières (Arnold et Lutzoni, 2007). Les forêts tropicales sont connues pour leur biodiversité riche incluant la biodiversité endophytique comparé aux régions tempérées. Toutefois, les endophytes tropicaux sont moins spécifiques de leurs plantes hôtes que ceux des régions tempérées, où les endophytes sont restreints à une famille ou à un genre d'hôte (Gimenez *et al.*, 2007). La diversité des mycoendophytes chez les plantes des climats froids est plus faible (Arnold et Lutzoni, 2007). De ce fait, le taux de mycoendophytes dépend des conditions environnementales. Leur nombre est fonction de la qualité de l'échantillonnage, des sites et des plantes hôtes échantillonnés (Arnold et Lutzoni, 2007 ; Hyde et Soyong, 2008 ; Sánchez Márquez *et al.*, 2008).

8. Facteurs de diversité des champignons endophytes

Des données ont démontré 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). Zamora *et al.* (2008) ont suggéré que 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 plus riches dans les tropiques, que dans les zones tempérées ou froides du monde (Zabalgogezcoa, 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 que, les parties âgées des plantes peuvent arborer plus de mycoendophytes que les plus jeunes (Zabalgogezcoa, 2008).
- Les assemblages endophytiques semblent être en corrélation avec la chimie de l'hôte et sa physiologie. Ainsi, une étude a montré l'influence de la teneur totale en flavonoïdes et en composés phénoliques chez des plantes médicinales chinoises sur le nombre de taxa de mycoendophytes isolés (Huang *et al.*, 2008).
- L'utilisation de méthodes d'identification génomique a permis une meilleure identification et une distinction des cultures stériles (Zabalgogezcoa, 2008).

9. 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 ne sont pas encore explorés et c'est en partie pour les raisons suivantes:

- 1- quelques endophytes ne peuvent pas être mis en culture (Arnold et Lutzoni, 2007 ; Chen *et al.*, 2015) ;
- 2- 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 sexuées ou asexuées (Gazis *et al.*, 2011) ; en outre, le critère Reconnaissance Biologiques 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) ;

- 3- 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 la détermination de l'uniformité phénotypique, les manifestations asexuées et les lignées de champignons incultivables (Gazis *et al.*, 2011). Cette transcription n'est pas favorable à des analyses phylogénétiques de grande envergure, ou utilise de courtes interprétations qui prouveraient la limite de la puissance de résolution (Gazis *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2015) ;
- 4- de plus, la grande majorité des espèces mycoendophytiques n'ont pas été décrites, même si beaucoup de séquences génétiques ont été consignées dans la base de données GenBank, ce qui prouve la limite des informations taxonomiques (Chen *et al.*, 2015).

10. Rôles des champignons endophytes

Les mycoendophytes jouent un rôle important dans la vie de leur plante hôte ; son développement et sa défense (Gimenez *et al.*, 2007). Ils stimulent la croissance de la plante et augmentent sa résistance aux différents stress environnementaux biotiques ou abiotiques. Ainsi, ils préviennent l'installation d'autres microorganismes pathogènes et le broutage des herbivores. Ils peuvent aussi jouer un rôle de recycleurs, en synthétisant des enzymes, pour survivre comme des saprophytes dans les feuilles en sénescence au niveau de la litière (Gimenez *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2010 ; Suryanarayanan *et al.*, 2012; Sudha *et al.*, 2016).

10.1. Rôle dans la nutrition et la croissance de la plante hôte

Les plantes qui cohabitent avec des mycoendophytes se développent plus rapidement et deviennent plus compétitives et dominantes dans leurs environnements respectifs (Kaul *et al.*, 2012). En effet, les champignons endophytes peuvent promouvoir activement ou passivement la croissance de la plante par divers mécanismes, en produisant des métabolites de défense contre les différents stress et des métabolites qui contribuent à la croissance de la plante hôte (Selim *et al.*, 2012). Les genres *Neotyphodium* et *Epichloë* produisent des enzymes comme des glycosidases et des protéases qui peuvent reprogrammer le métabolisme de leur plante hôte, tel que la voie de la photosynthèse, la conductance stomatique et l'ajustement osmotique; Saikkonen *et al.*, 2015). Beaucoup de ces champignons sont capables de produire des phytohormones (régulateurs de croissance) tels que l'auxine, l'acide abscissique, l'éthylène, les gibbérellines et bien d'autres composés indispensables à la croissance de la plante (Selim *et al.*, 2012 ; Khan *et al.*, 2016).

Différentes études effectuées sur *Neotyphodium coenophialum* et *Neotyphodium lolii* respectivement en symbiose avec de la fétuque élevée et du ray grass anglais ont montré une amélioration de la production des graines et de leur germination pour les plantes endophytées (Repussard *et al.*, 2013). Ainsi, un analogue de la pestalotine extrait de *Pestalotiopsis microspora* un endophyte des rameaux de *Taxus chinensis*, a exhibé une activité synergétique avec la gibbérelline vis-à-vis des graines du *Distylium chinense* et a augmenté leur taux de germination jusqu'à 85,56% (Li *et al.*, 2015). Khan et ses collaborateurs (2016) ont extrait de l'auxine des espèces d'*Aureobasidium*. D'autres mycoendophytes tels que *Chaetomium* sp., *Penicillium citrinum*, *Thielavia arenaria*, *Phoma medicaginis* et *Dothideomycetes* sp. ont aussi le pouvoir de produire l'auxine (une famille représentée par l'acide indole 3-acétique -AIA). Cette dernière est un régulateur de croissance, elle a une action à court terme sur la plasticité pariétale et à plus long terme sur l'expression des gènes qui participent aux divers événements du métabolisme nécessaires à la croissance (Roussel, 1974) (Figure 4).

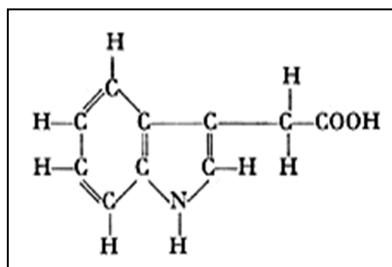


Figure 4 : structure chimique de l'auxine (Roussel, 1974).

10.2. Rôle de défense de la plante hôte contre les différents stress environnementaux

Les mycoendophytes vivent en synergie avec leur plante hôte et jouent un rôle de mutualisme défensif (Strobel et Daisy, 2003 ; Kaul *et al.*, 2012 ; Vinale *et al.*, 2017). Ainsi, les métabolites secondaires synthétisés par ces mycoendophytes contribuent à la résistance de leur plante hôte aux champignons pathogènes, aux parasites et la protègent des attaques des nématodes, d'insectes et de bétail (Strobel and Daisy, 2003 ; Kaul *et al.*, 2012).

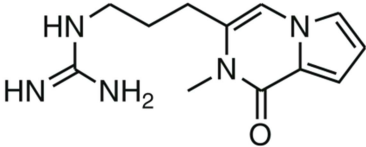
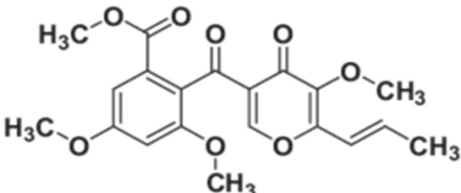
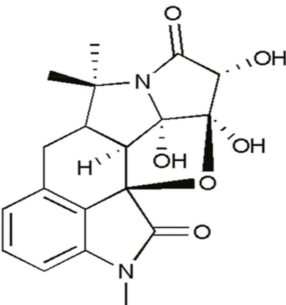
Les mycoendophytes synthétisent des métabolites bioactifs, tel que des alcaloïdes qui rendent la plante toxique et indigeste aux herbivores et aux pathogènes (Clay *et al.*, 1990). L'acide 3-Hydroxypropionique qui a été extrait de *Phomopsis phaseoli*, un endophyte de *Betula pendula* et de *Betula pubescens*, a montré une activité nématocide sélective contre un nématode parasite (Kharwar *et al.*, 2014). Un autre alcaloïde, la peramine (C₁₂H₁₇NO₅), tue les insectes sans affecter les Mammifères. Ce composé a été isolé de mycoendophytes tels que *Neotyphodium coenophialum*, *Neotyphodium lolii*, *Epichloë festucae* et *Epichloë typhina* colonisant les tiges et feuilles de la fétuque élevée, l'ivraie et d'autres Graminées (Kaul *et al.*, 2012). De plus, Vinale *et al.* (2017) ont extrait le 3-O-methylfunicone un composé bioactif d'un endophyte *Talaromyces pinophilus* isolé de l'arbousier (*Arbutus unedo*), qui a une activité insecticide avérée contre les pucerons (Tableau 2).

D'autre part, Arnold (2003) et ses collaborateurs ont démontré que l'inoculation de feuilles exemptes de mycoendophytes avec des mycoendophytes isolés de feuilles naturellement infectées, montre que les hôtes asymptomatiques voient diminuer la nécrose des feuilles et leur mortalité chez des plantules de *Theobroma cacao* infectés par un champignon pathogène *Phytophthora* sp. D'autres composés comme les Aspergillines A, B,

C, D et E, des alcaloïdes iso-indole extraits de l'espèce *Aspergillus versicolor* ont une activité contre le virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Zhang *et al.*, 2015) (Tableau 2).

En outre, les métabolites bioactifs des mycoendophytes, comme les hormones augmentent la résistance de la plante hôte au stress due à la sécheresse et une tolérance aux mauvaises conditions des sols, par la régulation du stockage et de la sécrétion des sucres et des alcools, mais aussi en modifiant les caractères de la feuille pour réduire sa transpiration (Zhang *et al.*, 2006 ; Schulz et Boyle, 2006 ; Gao *et al.*, 2010 ; Nicoletti *et al.*, 2015).

Tableau 2 : structures chimiques de quelques composés antiparasitaires.

Nom du composé	Structure chimique	Référence
Peramine		Kaul <i>et al.</i> (2012)
3-O-methylfunicone		Vinale <i>et al.</i> (2017)
Aspergilline A		Zhang <i>et al.</i> (2015)

10.3. Rôle écologique et environnemental (phytoremédiation)

Les mycoendophytes jouent aussi un rôle important dans la phytoremédiation. Des Graminées de l'espèce *Festuca arundinacea* et *Festuca pratensis* infectées par des mycoendophyte du genre *Neotyphodium* ont montré une plus grande production de

biomasse et une importante accumulation du cadmium (Cd) dans leurs racines et tiges. Ce mycoendophyte réduit ainsi le stress causé par ce métal chez ces plantes (Soleimani *et al.*, 2010a). Ces dernières infectées par *Neotyphodium coenophialum* et *Neotyphodium uncinatum* ont montré aussi un potentiel dans l'assainissement des sols contaminés par les Hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) (Sleimani *et al.*, 2010b). Une autre expérience menée par Zamani *et al.* (2014) sur les Graminées *Festuca arundinacea* et *Lolium perenne* et leur tolérance au zinc (Zn) en présence du mycoendophyte *Neotyphodium* a montré que ces plantes sont plus tolérantes aux concentrations élevées du zinc dans le sol et l'accumulent mieux. Ce qui peut contribuer à la phytoremédiation des sols contaminés par ces métaux lourds.

10.4. Champignons endophytes comme source de molécules bioactives à usage pharmacologique

Les mycoendophytes arborent une grande variété de métabolites secondaires bioactifs avec une grande diversité structurale comprenant des alcaloïdes, des terpénoïdes, des stéroïdes, des quinones, des lignanes, des phénols, des lactones, des isocoumarines, des acides phénoliques, des phénylpropanoïdes, ainsi que des métabolites aliphatiques et bien d'autres composés (Zhang *et al.*, 2006 ; Zhao *et al.*, 2010). Ces composés bioactifs ont des activités pharmacologiques avec une large gamme d'applications comme agents antibactériens, antifongiques, antiviraux, immunomodulateurs, antiparasitiques, antioxydants et anticancéreux (Deshmukh *et al.*, 2015).

10.4.1. Composés anticancéreux

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anormale et anarchique des cellules, qui mène à la formation de tissus non contrôlés. Il est la principale cause de mortalité dans le monde (Pimentel *et al.*, 2011). Plus de 100 composés anticancéreux ont été isolés et identifiés à partir des champignons endophytes (Kharwar *et al.*, 2014). Ces composés bioactifs semblent être une nouvelle alternative pour la découverte de nouveaux médicaments anti-cancer et ce après l'extraction du taxol d'un mycoendophyte *Taxomyces andreanae* (Kaul *et al.*, 2012 ; Selim *et al.*, 2012).

Le taxol (paclitaxel) (C₄₇H₅₁NO₁₄), connu sous le nom de tétracycline diterpénoïde (Selim *et al.*, 2012), est un puissant composé anticancéreux, qui interfère dans la multiplication des cellules cancéreuses et leur prolifération en empêchant la

dépolymérisation de la microtubuline lors de la division cellulaire, interrompant ainsi leur croissance et propagation (Pimentel *et al.*, 2011 ; Tenguria *et al.*, 2011) (Tableau 3). Le taxol a été extrait originellement de l'écorce de l'if du pacifique *Taxus brevifolia* (Zhao *et al.*, 2010), puis d'un champignon endophyte (*Taxomyces andreanae*) hébergé par cette même plante (Zhao *et al.*, 2010 ; Selim *et al.*, 2012). D'autres mycoendophytes appartenant aux Ascomycètes tel que *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* etc... (Zhao *et al.*, 2010 ; Selim *et al.*, 2012 ; Vasundhara *et al.*, 2016) hébergés par différentes plantes tels que *Podocarpus* sp., *Taxus media*, etc... synthétisent ce composé bioactif (Zhao *et al.*, 2010). D'autre part, Gangadevi et Muthumary (2008) ont isolé un mycoendophyte *Colletotrichum gloeosporioides* synthétisant du taxol d'une plante *Justicia gendarussa* qui n'était pas connue pour la synthèse de ce dernier (Vasundhara *et al.*, 2016).

Ainsi, le nombre de mycoendophytes qui synthétisent le taxol atteint temporairement presque 100 souches endophytiques, appartenant à 72 espèces fongiques hébergés par 32 plantes hôtes différentes (Nicoletti *et al.*, 2015).

La podophyllotoxine ($C_{22}H_{22}O_8$) (Tableau 3) est un précurseur chimique des composés anticancéreux comme l'etoposide ($C_{29}H_{32}O_{13}$), teniposide ($C_{32}H_{32}O_{13}S$) et l'etopophos phosphate ($C_{29}H_{33}O_{16}P$) (Kaul *et al.*, 2012). Plus connue sous le nom d'aryltetraline lignane, la podophyllotoxine (PDT) est un puissant anticancéreux, antiviral, antioxydant, antibactérien, immunostimulant et antirhumatique. Elle présente une action antinéoplasique prononcée (Liang *et al.*, 2016). Elle est connue pour interagir avec la topoisomérase II et inhiber l'activité de cette enzyme indispensable à la réplication de l'ADN et la division cellulaire (Vasundhara *et al.*, 2016).

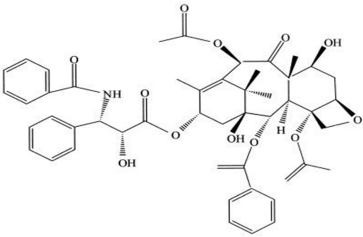
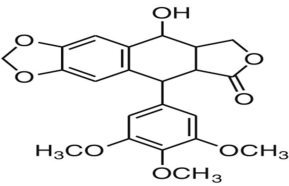
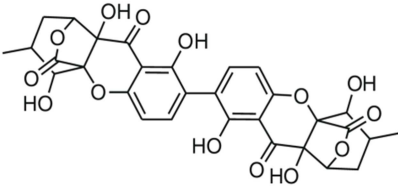
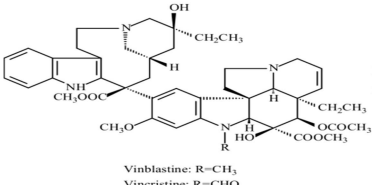
La podophyllotoxine a été extraite de différents genres et espèces de champignons endophytes, tels que *Alternaria* sp., un endophyte isolé de *Sabina recurva* (*Juniperus recurva*) et *Sabina vulgaris*, ainsi que *Fusarium oxysporum* et *Trametes hirsuta* isolés de la plante *Sinopodophyllum hexandrum* (Zhao *et al.*, 2010 ; Nicoletti *et al.*, 2015). Liang *et al.* (2016) l'ont extrait d'*Alternaria tenuissima*, un mycoendophyte isolé d'une plante médicinale d'Asie : *Sinopodophyllum emodi*.

L'Ergoflavine ($C_{30}H_{26}O_{14}$) (Tableau 3) un dimère xanthène, est un agent anticancer qui a été isolé d'un endophyte foliaire d'une plante médicinale Indienne *Mimusops elengi* (Kaul *et al.*, 2012; Wani *et al.*, 2016).

On peut citer aussi la vinblastine et la vincristine (Tableau 3), qui sont des terpénoïdes indole alcaloïdes, possédant une activité anticancéreuse. La vinblastine a été extraite des mycoendophytes *Alternaria* sp. isolé du phloème de *Catharanthus roseus* et la vincristine de *Fusarium oxysporum*, ainsi qu'un mycoendophyte à mycélium stérile, non identifié isolé respectivement du phloème et des feuilles de *Catharanthus roseus* (Zhao *et al.*, 2010). La vincristine ($C_{46}H_{56}N_4O_{10}$) par exemple montre une activité cytotoxique qui est utilisé en chimiothérapie dans la leucémie lymphoblastique aiguë et le néphroblastome (Kaul *et al.*, 2012). Son action se fait au niveau des microtubules des faisceaux mitotiques des cellules anormales, de plus elle joue un rôle d'angiogénèse, en perturbant et diminuant le transport intracellulaire et le flux sanguin vers les tumeurs (Zhao *et al.*, 2010).

D'autre part, des extraits d'acétate d'éthyle de l'endophyte *Alternaria alternata* ont montré une grande cytotoxicité et une activité anticancéreuse contre les lignées cellulaires humaines du cancer du sein (Arivudainambi *et al.*, 2014).

Tableau 3 : structure chimique de quelques composés anticancéreux.

Nom du composé	Structure chimique	Référence
Taxol		Strobel et Daisy (2003)
Podophyllotoxine		Kaul <i>et al.</i> (2012)
Ergoflavine		Kaul <i>et al.</i> (2012)
Vinblastine et vincristine	 Vinblastine: R=CH ₃ Vincristine: R=CHO	Zhao <i>et al.</i> (2010)

10.4.2. Composés antibactériens et antifongiques

La recrudescence des maladies infectieuses, l'apparition de bactéries multi-résistantes et d'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). Ainsi, les mycoendophytes avec leur richesse en métabolites secondaires 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 montré 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, 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 (Concentrations Moyennes Inhibitrices) respectives de 20 et 10 µg/ml (Deshmukh *et al.*, 2015) (Figure 4).

L'altercetine, un nouvel alcaloïde isolé des endophytes *Alternaria* spp. a montré une activité antibactérienne contre différentes bactéries pathogènes gram-positif (Hellwig *et al.*, 2002 ; Gao *et al.*, 2010) (Tableau 4). En outre, Arivudainambi *et al.* (2014) ont souligné l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'espèce endophytique *Alternaria alternata* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* avec un maximum de zone d'inhibition de $21,4 \pm 0,07$ mm. Cette même espèce produit de l'acide tenuazonique, qui s'est avéré actif contre *Mycobacterium tuberculosis* à une CMI de 250 µg/ml (Kaul *et al.*, 2012).

De plus, 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 lutea*, aussi bien que vis-à-vis d'un champignon saprophyte de plantes *Helminthosporium sativum*.

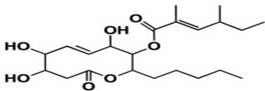
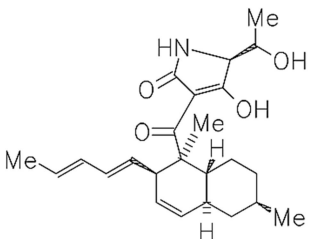
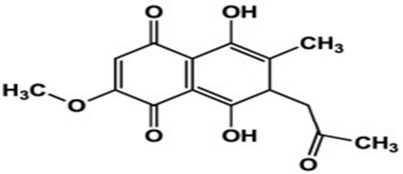
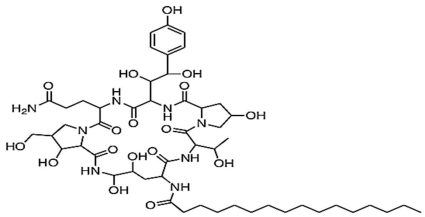
La javanicine extraite de *Chloridium* sp., un champignon endophyte isolé de *Azadirachta indica*, a montré une forte propriété antibactérienne vis-à-vis de *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ce composé est aussi actif contre les champignons pathogènes (Kharwar *et al.* 2014) (Tableau 4).

Le dothideomycetide A est un autre composé antibactérien extrait de *Dothideomycete* sp., un endophyte d'une plante médicinale Thaïlandaise *Tiliacora triandra*, actif contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et MRSA (ATCC 33591) avec des CMI respectives de 128 et 256 µg/ mL (Deshmukh *et al.*, 2015).

Le 3,11,12-trihydroxycadalene un dérivé de cadinane sesquiterpènes, extrait de *Phomopsis cassiae* un mycoendophyte isolé des *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).

La cryptocandine (Tableau 4) extraite de l'endophyte *Cryptosporiopsis quercina* a présenté des activités antifongiques 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).

Tableau 4 : quelques structures chimiques de composés antibactériens et antifongiques.

Nom du composé	Structure chimique	Référence
Phomol		Deshmukh <i>et al.</i> (2015)
Altersetine		Hellwig <i>et al.</i> (2002)
Javanicine		Deshmukh <i>et al.</i> (2015)
Cryptocandine		Kaul <i>et al.</i> (2012)

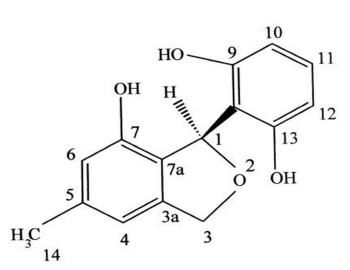
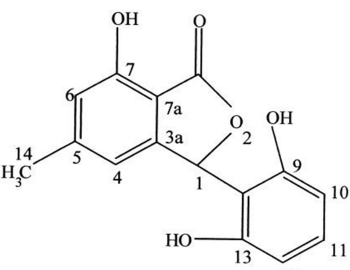
10.4.3. Composés antioxydants

Les composés antioxydants sont des substances qui peuvent protéger les cellules de dommages causés par des molécules instables (radicaux libres) (Kaul *et al.*, 2012). Les composés à activité antioxydante sont fortement actifs contre des dommages provoqués par l'espèce réactive de l'oxygène (ROS) ; l'oxygène dérivé des radicaux libres, qui sont à l'origine de différents effets pathologiques, tel que des dommages au niveau de l'ADN, la carcinogenèse et la dégénérescence cellulaire (Pimentel *et al.*, 2011). Ainsi, les antioxydants ont été considérés comme des thérapies prometteuses pour la prévention et le traitement des maladies liées aux ROSs comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, l'hypertension, les maladies neuro-dégénératives (les maladies comme l'Alzheimer et de Parkinson), l'arthrite rhumatoïde et le vieillissement (Pimentel *et al.*, 2011).

Strobel *et al.* (2002) ont identifié deux composés extraits de *Pestalotiopsis microspora* un endophyte qui colonise *Terminalia morobensis*, qui sont la pestacine (1, 3-dihydro isobenzofurane) ($C_{15}H_{14}O_4$) et l'isopestacine ($C_{15}H_{12}O_5$) (Tableau 5) qui jouent un rôle antioxydant (Kharwar *et al.*, 2014). Des mycoendophytes, tels que *Xylaria* sp. isolés du *Ginkgo biloba* et *Chaetomium* sp. un endophyte retrouvé chez *Nerium oleander*, exhibent une grande activité antioxydante, due à leurs richesse en composés phénoliques et flavonoïdes (Kaul *et al.*, 2012).

Quant à Sadrati (2013) et ses collaborateurs, ils ont démontré le pouvoir antioxydant des mycoendophytes *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Phoma*, *Cladosporium* et *Chaetomium* qui ont été isolés du blé (*Triticum durum*).

Tableau 5 : quelques structures chimiques de composés antioxydants.

Nom du composé	Structure chimique	Référence
Pestacine		Strobel et Daisy (2003)
Isopestacine		Strobel et Daisy (2003)

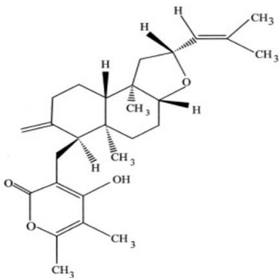
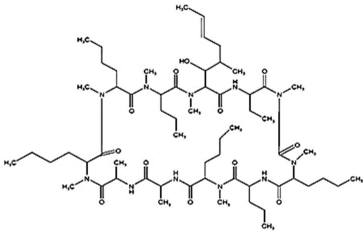
10.4.4. Composés immunomodulateurs

Les immunomodulateurs sont des substances qui modifient la réponse immune de l'organisme en la 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 et l'arthrite rhumatoïde (Tenguria *et al.*, 2011 ; Wani *et al.*, 2016). Les immunorégulateurs ont le pouvoir de renforcer le système immunitaire et les défenses de l'organisme. Ils sont utilisés pour le traitement des allergies, des cancers et des maladies infectieuses (Beau, 2001).

Un nombre important d'immunomodulateurs ont été isolés des mycoendophytes ; (Kaul *et al.*, 2012). Le subglutinol-A ($C_{27}H_{38}O_4$) et le subglutinol-B sont d'importants composés immunosuppresseurs qui sont des diterpènes pyrones non-cytotoxiques. Ils ont été isolés et caractérisés de l'endophyte *Fusarium subglutinans*, qui colonise le *Tripterygium wilfordii* (Kaul *et al.*, 2012 ; Kharwar *et al.*, 2014) (Tableau 6).

La cyclosporine-A ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$) (Tableau 6) 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*, *Byssosclamyces* et *Septoria* (Kaul *et al.*, 2012). Le mycoendophyte *Trichothecium roseum* produit des cyclopeptides trichomides A et B possédant aussi un pouvoir immunosuppresseur (Zhang *et al.*, 2015).

Tableau 6 : quelques composés bioactifs immunosuppresseurs.

Nom du composé	Structure chimique	Référence
Subglutinol A		Strobel et Daisy (2003)
cyclosporine A		Kaul <i>et al.</i> (2012)

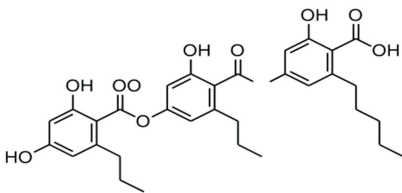
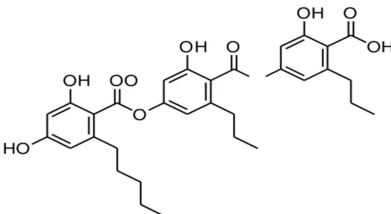
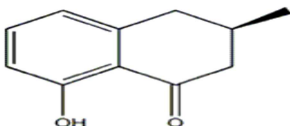
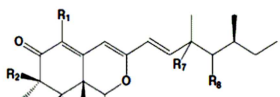
10.4.5. Composés antiviraux

Bien des recherches ont démontrées l'importance des mycoendophytes dans la production d'agents antiviraux, tel que l'acide cytonique A ($C_{32}H_{36}O_{10}$) et B ($C_{32}H_{36}O_{10}$) (Tableau 7) qui ont été extraits de *Cytospora* sp. un champignon endophyte isolé de *Quercus* sp. Ces composés sont des inhibiteurs des protéases du Cytomégalo virus Humain (hCMV) (Tenguria *et al.*, 2011 ; Kaul *et al.*, 2012 ; Kharwar *et al.*, 2014).

Florke *et al.* (2006) ont rapporté une activité anti-hépatite C (HCV) du dihydroisocoumarin (R)-(-)-mellein (Tableau 7), qui a le pouvoir d'inhiber les protéases. Ce composé a été isolé d'un grand nombre de mycoendophytes, tel que *Pezizula livida*, *Plectrophomella* sp. et *Cryptosporiopsis malicoticis* (Selim *et al.*, 2012).

Arunpanichlert *et al.* (2010) ont extrait un composé (la (+)-Sclerotiorine) (Tableau 7) d'un mycoendophyte *Penicillium sclerotiorum*, qui a non seulement une activité anti-VIH-1 intégrase et une activité protéase, mais aussi un pouvoir antifongique contre *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* (Selim *et al.*, 2012).

Tableau 7 : quelques structures chimiques de composés antiviraux.

Nom du composé	Structure chimique	Référence
L'acide Cytonique A		Kaul <i>et al.</i> (2012)
L'acide Cytonique B		Kaul <i>et al.</i> (2012)
dihydroiso-coumarin (R)- (-)-mellein		Selim <i>et al.</i> (2012)
(+)-Sclerotiorine	 (+)-Sclerotiorin: R1= Cl, R2= OAc, R3+R4= O, R5+R6= R7+R8 = Double bond	Selim <i>et al.</i> (2012)

10.4.6. Composés enzymatiques

Des recherches ont montré que des espèces de *Penicillium* et *Preussia* synthétisent une grande quantité d'enzymes telles que des cellulases, phosphatases et des glucosidases. *Phoma* sp. est connue aussi pour la production des pectinases, cellulases, xylanases et des protéases (Khan *et al.*, 2016).

Suryanarayanan *et al.* (2012) ont identifié des mycoendophytes foliaires d'arbres des forêts du sud de l'Inde qui produisent des exoenzymes incluant des amylases, cellulases, chitinases, chitosanases, laccases (Tableau 8), lipases, pectinases et des protéases, qui sont utilisées comme un arsenal de biocatalyseurs pour infecter la plante et vivre en équilibre avec elle. D'autres enzymes sont synthétisées pour survivre dans les feuilles en sénescence (Suryanarayanan *et al.*, 2012).

Des enzymes tel que la tannase (appelée aussi tannin acylhydrolase) (Tableau 8) induite de l'acide tannique chez des mycoendophytes tel que *Aspergillus*, *Penicillium* peuvent être utiliser dans l'industrie alimentaire comme des agents clarifiants dans la fabrication de thé instantané, de vin et de jus (Suryanarayanan *et al.*, 2012).

Les mycoendophytes peuvent aussi métaboliser des substances trouvées dans la plante hôte et produire des enzymes telles que les protéases, amylases, phénol oxydases, lipases, polyphénol oxydases, cellulases, mannanases, xylanases et la pectine lyase (Khan *et al.*, 2016). Le tableau ci après nous donne un résumé de quelques enzymes endophytiques et de leurs usages.

Tableau 8 : applications industrielles d'enzymes mycoendophytiques (Suryanarayanan *et al.*, 2012).

Enzymes	Applications	Référence
Chitine diacétyle	Préparation de la chitosane à partir de la chitine, le contrôle biologique des insectes parasite et les pathogènes de l'homme et des plantes.	Zhao <i>et al.</i> (2010)
Chitinase et chitosanase	Des traitements contre l'asthme, les cancers, les diabètes, l'inflammation, les plaies, les infections bactériennes et fongiques, modulation immunitaire, production de l'acide sialique, anti-inflammatoire, les cosmétiques et le traitement des eaux usées.	Hartl <i>et al.</i> (2012)
Protéase alcaline	Médiation des médicaments relaxants, les nettoyants dentaire, production de protéines hydrolysées, cuisson, la nourriture des animaux, traitement des eaux usées, dégommer la soie, additif des détergents et entre dans le processus de tannage.	Guta <i>et al.</i> (2002)
Protéase acide	Facilite la digestion, préparation des aliments fermentés et assaisonnement de la matière.	Rao <i>et al.</i> (1998)
Tannase	Des agents clarifiants du thé, du vin et jus de fruits.	Ramirez-Coronel <i>et al.</i> (2003)
Asparaginase	Traitement de la leucémie lymphoblastique aigue.	Schrey <i>et al.</i> (2010)
Laccase	Entre dans le processus de fabrication du vin, jus de fruits et bière, la cuisson, la délignification, la bioremédiation des composés phénoliques et bio-décoloration.	Kunamneni <i>et al.</i> (2008)
Bêta-glucosidase	Production du bio-fuel de la biomasse ligno-cellulosique.	Chauve <i>et al.</i> (2010)

Chapitre II

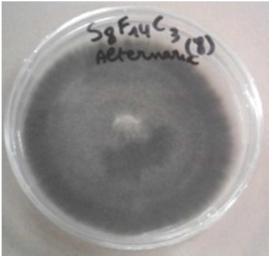
Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Mycéliums des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*

Quatre genres de mycoendophytes (*Cladosporium* (Cl), *Alternaria* (Al), *Aspergillus* (As) et *Penicillium* (Pe)) sélectionnés parmi ceux qui ont été isolés, identifiés et purifiés à partir de feuilles de *Peganum harmala*, récoltées dans la région aride de Laghouat au mois d'avril 2015, ont été utilisés dans notre expérimentation (Tableau 9). Ces champignons ont été fournis par le laboratoire Ressources Naturelles de l'Université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou.

Tableau 9 : caractères généraux des champignons endophytes utilisés.

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) (Ogórek <i>et al.</i> , 2012).	
<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. Ce genre résiste à la sécheresse (Thomma, 2003). Les espèces d' <i>Alternaria</i> produisent des toxines tel que l'alternariol, l'alternariol monométhyle éther, altenuene, altertoxins I, II, III, tenuazonic acid et bien d'autres métabolites toxiques (Ostry, 2008).	
<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).	
<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 confère 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 des 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).	

1.2. Matériel bactérien

Les souches bactériennes utilisées sont des souches pures de références connues, fournies par monsieur TITOUCHE Y. du laboratoire microbiologique 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), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) (Annexe 2).

Staphylococcus aureus

Cocci Gram-positif, c'est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est impliquée dans une très grande variété d'infections communautaires ou nosocomiales : furoncles, abcès, arthrites septiques, septicémies, pneumopathies, diarrhées infectieuses, endocardites, méningites etc (Vieu, 2014). *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 (*S. aureus*) ne possède aucune résistance naturelle aux antibiotiques mais l'utilisation massive des pénicillines G et V a conduit à l'émergence de souches résistantes à ces molécules (Vieu, 2014). 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). Ainsi plus de 80 % des souches produisent une pénicillinase (Daurel et Leclercq, 2008). 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, ils possèdent une cytochrome oxydase, une lécithinase et une gélatinase, très hémolytique et résistent à la pénicilline G (Teyssou *et al.*, 1998).

Les infections à *B. cereus* peuvent se traduire par des infections digestives qui surviennent dans le cadre de toxi-infections alimentaires collectives. Elles déterminent deux tableaux cliniques distincts en fonction du type de la toxine produite par la bactérie : syndrome diarrhéique lié à la production d'une entérotoxine, ou vomissements diffus dus à la présence d'une toxine émétrisante thermostable préformée dans l'aliment. Ou des infections locales et systémiques survenant 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. Elle 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. *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, où sa présence est considérée comme un indice de contamination fécale (Chingwaru *et al.*, 2003; Fisher et Phillips, 2009). L'*E. faecalis* n'intervient que comme pathogène occasionnel, entraînant des infections urinaires ou des suppurations profondes et plus rarement, des endocardites ou des septicémies. En outre, les *E. faecalis* sont des bactéries multi-résistantes aux glycopeptides ou aminoglycosides (comme les vancomycin-resistant enterococcus) et les souches virulentes expriment une

exotoxine, appelée cytolsine, qui peut provoquer la lyse des cellules bactériennes ou eucaryotiques (Van Tyne *et al.*, 2013).

1.3. Autre matériel utilisé

- 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.
- écouvillons.
- eau distillée.
- marqueur.
- gants.
- deux bacs benzène.
- un spectrophotomètre (UVmini-1240, uv-vis spectrophotometer, SHIMADZU).

2. Méthodes

2.1. Double culture de diffusion sur gélose (diffusion de disque d'agar)

La technique de diffusion des disques d'agar a été décrite par Mandeel *et al.* (1998) et Devaraju et Satish (2011).

2.1.1. Préparation des mycoendophytes tests

Les champignons endophytes foliaires de *Peganum harmala* préalablement isolés, identifiés et purifiés sont repiqués aseptiquement entre deux bacs benzène dans des boîtes de pétri contenant le milieu PDA (Annexe 1), exempt d'antibiotiques et incubés à température ambiante pendant 8 jours.

2.1.2. Préparation de l'inoculum et ajustement de la turbidité

Les souches bactériennes sélectionnées ont été revivifiées, en les repiquant aseptiquement sur un milieu nutritif BHI (Annexe 1), puis incubées à 37°C pendant 18h avant d'être utilisées.

2.1.3. Préparation de l'inoculum et ajustement de la turbidité

L'inoculum est préparé à partir des cultures pures et jeunes de 18h, qui ont été préalablement réalisées. Nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien distinctes, puis déchargé l'inoculum dans 100 µl 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, l'équivalent de 10^8 unité formant colonie (UFC)/mL). L'inoculum est utilisé dans les 15 mn de sa préparation (Nakamura *et al.*, 1999 ; Valgas *et al.*, 2007; Devaraju et Satish, 2011).

2.1.4. Screening préliminaire de l'activité antibactérienne des mycoendophytes

Tout d'abord, la suspension bactérienne a étéensemencée aseptiquement à l'aide d'un écouvillon stérile dans des boîtes de Pétri contenant le milieu MH (Annexe 1). L'écouvillon a été 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'excédant. Le milieu MH a été frotté sur la totalité de sa surface gélosée de haut en bas, en stries serrées en tournant à chaque fois la boîte d'environ 60°, puis autour des bords de la boîte pour une distribution uniforme de l'inoculum (Scorzoni *et al.*, 2007).

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

Les boîtes de Pétri ont été laissées 10 mn à température ambiante pour permettre la diffusion des métabolites bioactifs sécrétés par les mycoendophytes, puis mises à incuber à 37°C pendant 18 heures (Mandeel *et al.*, 1998 ; Devaraju et Satish, 2011), puis laissées jusqu'à 48 heures à température ambiante. L'expérience a été répétée trois fois et les diamètres des zones d'inhibitions autour des blocs de gélose correspondant à l'activité antibactérienne ont été mesurés en mm, puis consignés. Les résultats ont été exprimés en moyenne $\pm$ écart type et les mesures ont été répétées trois fois (n=3) (Figure 7).

Dans ce premier screening, les disques des quatre mycoendophytes foliaires ont été disposés ensemble dans chaque boîte inoculée par les souches bactériennes, ainsi que le disque d'antibiotique control (Figure 5).



Figure 5 : technique de diffusion sur gélose de disque de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala*.

2.1.5. Dépistage de l'activité antibactérienne des mycoendophytes foliaires sélectionnés par le screening

Pour cette seconde manipulation, nous avons suivi le même protocole que le premier. Par contre, nous avons sélectionné seulement trois champignons endophytes foliaires, à savoir *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium*, avec cinq des dix souches bactériennes qui présentaient une zone d'inhibition significative pour certains mycoendophytes. Les mycoendophytes ont été disposés chacun seul dans une boîte de Pétri (Figure 6).

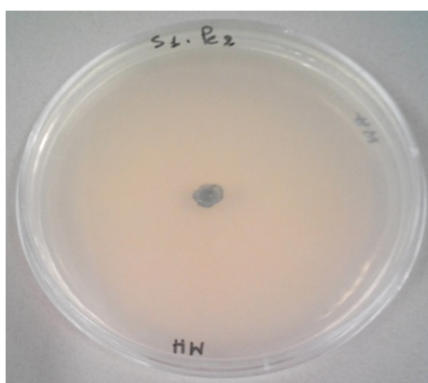


Figure 6 : technique de diffusion des disques sur gélose de mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* (un seul disque par boîte).

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. Le tableau 10 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 10 : Normes utilisées dans l'expression de la sensibilité des microbes à l'antibiotique avec des disques de 6 mm de diamètre (Ravelomanantsoa, 2004).

Diamètre de la zone d'inhibition (Z.i) en mm.	Sensibilité des microbes
Z.i < 7	Résistant
7 < Z.i < 9	Sensible
Z.i > 9	Très sensible

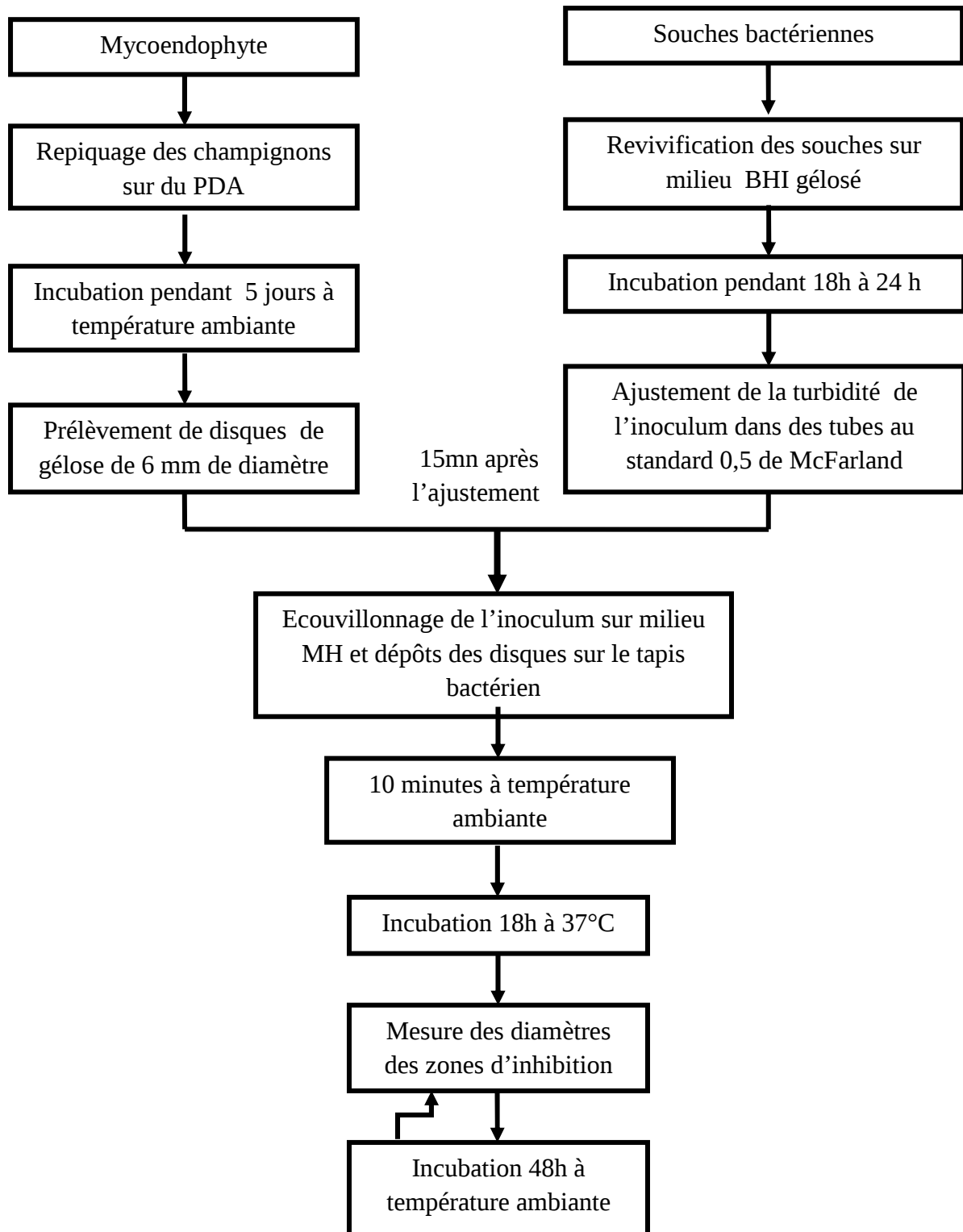


Figure 7 : schéma récapitulatif de la technique de double diffusion sur gélose

3. Analyse statistique

L'étude statistique a été faite en utilisant le logiciel d'analyse et de traitement statistique : STATBOX 6.40.

Une analyse statistique de type ANOVA a été réalisée afin de 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 3). 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 avoir entre ces mycoendophytes.

Chapitre III

Résultats et discussion

1. Dépistage 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 dans le cas des deux manipulations (Tableaux 10 et 11).

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 poussé 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) (Figure 8). 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 8, tableaux 10 et 11).

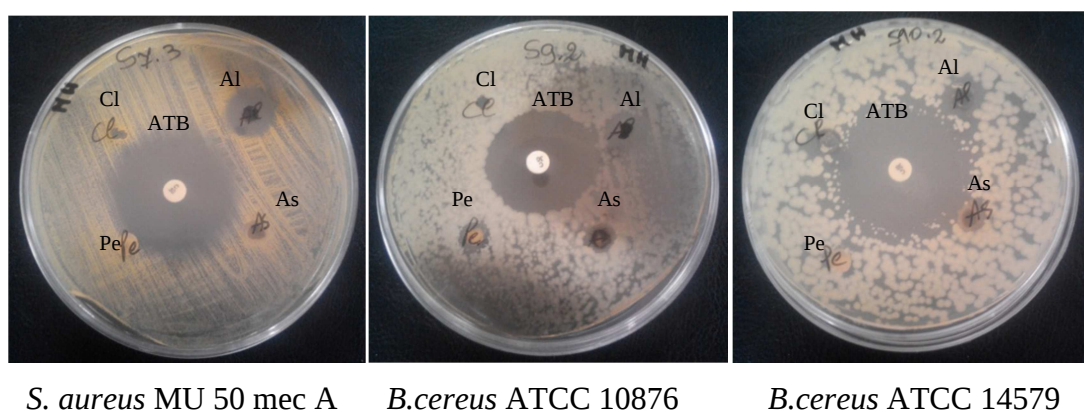


Figure 8 : activité antibactérienne des quatre champignons endophytes et de l'antibiotique sur *S. aureus* MU 50 mec A, *B. cereus* ATCC 10876 et *B. cereus* ATCC 14579 dans la première manipulation.

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 9, tableaux 10 et 11).

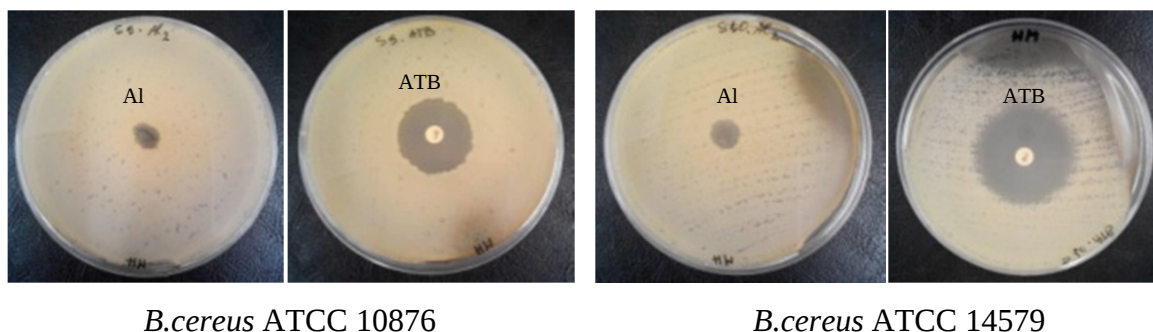


Figure 9: activité antibactérienne du genre *Alternaria* et de l'antibiotique dans la seconde manipulation sur *B.cereus* ATCC10876 et *B.cereus* ATCC 14579.

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 ± 0.81 mm, 9.66 ± 1.24 mm et 8.66 ± 0.46 mm.

Ces résultats suggèrent que le mycoendophyte du genre *Alternaria* produit des composés bioactifs qui possèdent des activités antibactériennes vis-à-vis de ces dernières et qui inhibent leur développement, 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 ont été 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 et interactions 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 contre ces dernières. 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 11 : inhibition de la croissance des souches bactériennes par les mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* dans le premier screening. (n=3, moyenne $\pm$ écart type).

Champignons endophytes	Zone d'inhibition (mm)									
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> FRI 326	<i>S. aureus</i> FRI S6	<i>S. aureus</i> FRI 361	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. aureus</i> MU 50 mec A	<i>S. aureus</i> FRI 137	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
<i>Cladosporium</i>	-	-	-	-	7.00 $\pm$ 00	-	-	-	-	10 $\pm$ 00
<i>Alternaria</i>	-	-	-	-	-	-	14,33 $\pm$ 00	-	12 $\pm$ 00	15,33 $\pm$ 3,32
<i>Aspergillus</i>	8.00 $\pm$ 00	7.00 $\pm$ 00	-	6,66 $\pm$ 00	-	-	-	8.00 $\pm$ 00	8.00 $\pm$ 00	9,33 $\pm$ 00
<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	9,33 $\pm$ 1,33	-	-	-	12,16 $\pm$ 3,83	7,66 $\pm$ 00
ATB 18	29.10 $\pm$ 0,31	33.44 $\pm$ 2,67	34.77 $\pm$ 2,43	34.77 $\pm$ 0,15	35.11 $\pm$ 1,76	35.44 $\pm$ 2,31	32.32 $\pm$ 0,46	35.21 $\pm$ 0,78	32.88 $\pm$ 4,56	38,66 $\pm$ 2,67

Tableau 12 : inhibition de la croissance des souches bactériennes par les mycoendophytes dans le second dépistage. (n=3, moyenne $\pm$ écart type).

Champignons endophytes	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 au 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 $\pm$ 00 mm. 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 10) et *Bacillus cereus* ATCC 10876 (10.66 $\pm$ 1.24 et 10.00 $\pm$ 1.81, 8.66 $\pm$ 0.46 mm respectivement). L'activité d'*Aspergillus* a légèrement diminué vis-à-vis de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Tableaux 10 et 11). 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 10 et 11).

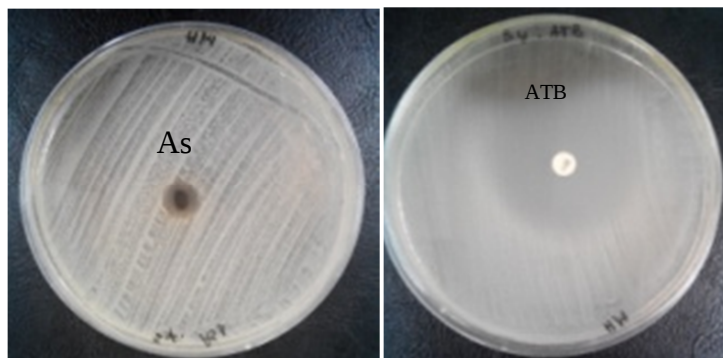


Figure 10 : activité antibactérienne du genre *Aspergillus* et de l'antibiotique dans la seconde manipulation sur *S. aureus* FRI 6.

Quant au genre *Penicillium*, il n'a montré un effet antibiotique qu'à l'encontre des souches *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.

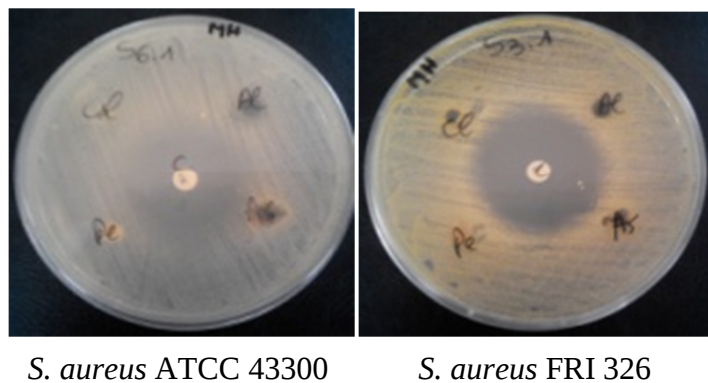


Figure 11 : activité des quatre champignons endophytes et de l'antibiotique vis-à-vis des souches *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* FRI 326, dans la première manipulation.

La souche *S. aureus* MU 50 mecA n'a été sensible qu'au genre *Alternaria* avec une zone de 14±00 mm. De même pour la *S. aureus* FRI 137, qui elle n'a réagi qu'à l'encontre du genre *Aspergillus*, avec une faible zone d'inhibition (8±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 µg) avec des zones d'inhibition très importantes (Tableaux 10 et 11).

Le fait que certains champignons se sont mieux exprimés dans la première manipulation que dans la seconde vis-à-vis de certaines souches bactériennes, ou n'ont pas réagi dans la première manipulation et se sont ensuite exprimés dans la seconde, comme c'est le cas du genre *Alternaria*, peut-être dû au fait que ce dernier 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.

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* lui seul a eu un effet antibactérien contre un autre MRSA (*Staphylococcus aureus* MU50 mecA).

D'une manière générale, les mycoendophytes excrètent dans leurs milieux de culture des métabolites secondaires bioactifs (Gimenez *et al.*, 2007). L'acide 3-nitropopionique par exemple, excrété 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), qui diffusent

directement des disques d'agar et qui 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 leur 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).

De même que pour les résultats obtenus par Devaraju et Satish (2011). Ces derniers ont testé l'activité antibactérienne des métabolites secondaires de *Fusarium* sp. isolés 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* par exemple 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 plus part 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 et antibactériens 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* et le pouvoir antibactérien de cette dernière aurait un lien avec celui de ses champignons endophytes. Une voie qu'il est intéressant d'explorer.

2. Analyse de variance

Une analyse statistique de type ANOVA a été réalisée grâce au logiciel d'analyse et de traitement statistique : STATBOX 6.40, afin de mettre en évidence les différences entre les zones d'inhibitions des différents mycoendophytes et de l'antibiotique, vis-à-vis de chacune des souches bactériennes testées. L'analyse 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 3).

3. Test de comparaison des groupes homogène de Newman-Keuls

Un test complémentaire de comparaisons multiples des moyennes Newman-Keuls a été réalisé pour classer les champignons en groupes homogènes. Chaque groupe est représenté par une lettre différente et les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes. Le test a été réalisé 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 avoir entre ces mycoendophytes. Dans ce test, nous avons obtenu des groupes en fonction des moyennes de zones d'inhibition de chaque champignon et de l'antibiotique après deux temps 18 heures et 48 heures d'incubation (*Alternaria* 18 et 48, *Aspergillus* 18 et 48, *Penicillium* 18 et 48, *Cladosporium* 18 et 48, ATB 18 et 48).

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

Dans la première manipulation (Tableau 13), 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 qui est très significative. Dans cette première manipulation, nous avons constaté que l'efficacité des champignons du genre *Aspergillus* a augmenté de 2,67mm après 18 heures à 4,67mm 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 13), cinq (5) groupes se sont formés (A, B, BC, C, D) en fonction du comportement antibactérien des mycoendophytes testés. Le groupe A auquel appartient le genre *Penicillium* (18 et 48) avec des moyennes nulles. Le groupe B avec une moyenne assez significative (10,67 mm) correspondant à *Aspergillus* 18. Le groupe BC avec des moyennes qui ne sont pas significativement différentes des moyennes des groupes B et C représenté par *Alternaria* 18 et 48 avec des moyennes respectives de 11,67 mm et 14,00 mm. Le groupe C comporte *Aspergillus* 48 (16,67 mm). Enfin le groupe D est réduit à l'antibiotique ATB (18 et 48) avec une moyenne de 30,67 mm. Dans cette seconde manipulation, la moyenne du genre *Aspergillus* a augmenté entre 18 heures et 48 heures d'incubation de 10,67 mm à 16,67 mm. La même constatation a été notée pour *Alternaria* après 18 h et 48h avec des moyennes respectives de 11,67 mm et 14,00 mm. La moyenne de l'antibiotique est restée quant à elle la même.

Si nous comparons les deux manipulations (Tableau 13), nous constaterons 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 lorsque il était 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, mais de manière non significative.

Tableau 13 : 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		
Mycoendophytes	Groupe	Moyenne		Groupe	Moyenne
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	0,00	Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	0,00	Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Aspergillus</i> 18	B	10,67
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Alternaria</i> 18	BC	11,67
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Alternaria</i> 48	BC	14,00
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	0,00	Niveau <i>Aspergillus</i> 48	C	16,67
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	2,67	Niveau ATB 48	D	30,67
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	4,67	Niveau ATB 18	D	30,67
Niveau ATB 18	B	29,11			
Niveau ATB 48	B	29,11			

3.2. 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 encontre. 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 non significative de 2,33 mm, qui est restée la même entre 18h et 48 h 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 14).

Tableau 14 : 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		
Mycoendophytes	Groupe	Moyenne
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	2,33
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	2,33
Niveau ATB 18	B	33,44
Niveau ATB 48	B	33,44

3.3. 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 48 h 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 15).

Tableau 15 : 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		
Mycoendophytes	Groupe	Moyenne
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	0,00
Niveau ATB 48	B	34,77
Niveau ATB 18	B	34,77

3.4. 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 non significatives de 2,22 mm après 18h et qui n'a pas changé à 48h d'incubation et *Alternaria* 48 avec une moyenne de 5,77 mm. Le groupe B avec une moyenne de 34,77 mm 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, 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 qui rassemble les genres *Alternaria* 18 (9,69mm), *Aspergillus* 18 (10,00mm), *Aspergillus* 48 (10,00mm) et *Alternaria* 48 (10,69mm), enfin le groupe C de l'antibiotique avec une moyenne très importante de 37,33mm. Ici la moyenne de la zone d'inhibition d'*Alternaria* a légèrement augmentée après 48 heures d'incubation,

ceci veut dire que l'efficacité du champignon augmente avec le temps donc ses composés bioactifs diffusent progressivement. Alors que 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 chez *Alternaria*, alors que dans la première manipulation la moyenne de zone d'inhibition était nulle. Ces résultats peuvent suggérer que l'activité antibactérienne des mycoendophytes n'a pas pu s'exprimer et leur métabolites bioactifs respectifs ont réagi négativement les uns envers les autres et ont pu entraver leurs activités antibactériennes (Tableau 16).

Tableau 16 : 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		
Mycoendophytes	Groupe	Moyenne	Mycoendophytes	Groupe	Moyenne
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	0,00	Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Alternaria</i> 18	B	9,67
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Aspergillus</i> 18	B	10,00
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	0,00	Niveau <i>Aspergillus</i> 48	B	10,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Alternaria</i> 48	B	10,67
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	2,22	Niveau ATB 18	C	37,33
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	2,22	Niveau ATB 48	C	37,33
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	5,22			
Niveau ATB 48	B	34,77			
Niveau ATB 18	B	34,77			

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

Lors de la première manipulation, deux groupes se sont formés. Le groupe A des mycoendophytes avec *Penicillium* 18 et 48 d'une valeur de 10,66 mm, mais qui est peu significative par rapport à l'antibiotique (18 et 48) qui lui a une moyenne de zone

d'inhibition de 35,11 mm et donc appartient à un autre groupe : le groupe B. Ces valeurs n'ont pas changé dans l'intervalle du temps.

En outre, la seconde manipulation a vu l'apparition de trois (3) groupes homogènes. Le groupe A auquel appartient le genre *Aspergillus* (18 et 48), qui n'a réalisé 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 du genre *Penicillium* a légèrement diminué lors de la deuxième manipulation par rapport à la première. Ici les moyennes des zones d'inhibitions 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 17).

Tableau 17 : 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	Mycoendophytes	Groupe	Moyenne
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	0,00	Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Alternaria</i> 18	B	8,67
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	0,00	Niveau <i>Penicillium</i> 18	B	9,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	2,33	Niveau <i>Penicillium</i> 48	B	9,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	2,33	Niveau <i>Alternaria</i> 48	B	10,00
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	10,66	Niveau ATB 48	C	32,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	10,66	Niveau ATB 18	C	32,00
Niveau ATB 48	B	35,11			
Niveau ATB 18	B	35,11			

3.6. 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 18 heures (35,44 mm). Ainsi, cette souche n'a pas été réutilisée dans la seconde manipulation, vu qu'elle n'a montré aucune sensibilité pour les quatre champignons (Tableau 18).

Tableau 18 : 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		
Mycoendophytes	Groupe	Moyenne
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	0,00
Niveau ATB 48	B	35,44
Niveau ATB 18	B	35,44

3.7. 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 32,33 mm pour 18 et 48 h d'incubation (Tableau 19).

Tableau 19 : 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		
Mycoendophytes	Groupe	Moyenne
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	4,78
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	5,00
Niveau ATB 48	B	32,33
Niveau ATB 18	B	32,33

3.8. 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 qui n'est pas significative réalisée par le genre *Aspergillus*. Le groupe B de l'antibiotique avec une moyenne très représentative de son efficacité (35,22 mm) pour les deux temps (Tableau 20).

Tableau 20 : 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		
Mycoendophytes	Groupe	Moyenne
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	0,00
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	0,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	2,67
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	2,89
Niveau ATB 48	B	35,22
Niveau ATB 18	B	35,22

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

Dans la première manipulation, deux (2) groupes se sont formés. Le groupe A qui regroupe tous les mycoendophytes testés avec de faibles moyennes dans les deux temps (18 h et 48 h d'incubation), mais qui ont légèrement augmentées après 48 h. Le groupe B de l'antibiotique a réalisé une importante zone d'inhibition.

Deux groupes (2) 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 21).

Tableau 21 : 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		
Mycoendophytes	Groupe	Moyenne	Mycoendophytes	Groupe	Moyenne
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	0,00	Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	8,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	0,00	Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	8,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	2,67	Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	8,67
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	3,55	Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	9,00
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	4,00	Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	9,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	4,17	Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	9,67
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	4,33	Niveau ATB 18	B	26,00
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	4,89	Niveau ATB 48	B	26,00
Niveau ATB 48	B	32,89			
Niveau ATB 18	B	32,89			

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

Dans la première manipulation, deux (2) groupes se sont formés. Le groupe A auquel appartient l'ensemble des mycoendophytes avec des moyennes entre 3,11 mm et 11,11 mm, dont les genres *Aspergillus* (3,11 mm) et *Cladosporium* (3,33 mm). 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 18 heures et 48 heures d'incubation avec des moyennes respectives de 7,67 et 8,33 mm pour *Penicillium* et 10,22 et 11,11 mm pour *Alternaria*. Le groupe B de l'antibiotique montre une importante moyenne de 38,66 mm. 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.

En outre dans 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 7,00 mm 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, 33 mm). Ici aussi les moyennes n'ont pas changé entre 18 heures et 48 heures d'incubation (Tableau 22).

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 18 heures d'incubation n'ont pas globalement évolué au bout de 48 heures. Ainsi, le temps d'incubation n'a pas d'effets notables sur les diamètres des zones d'inhibitions contre cette souche bactérienne.

Tableau 22 : 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		
Mycoendophytes	Groupe	Moyenne	Mycoendophytes	Groupe	Moyenne
Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	3,11	Niveau <i>Aspergillus</i> 18	A	7,00
Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	3,11	Niveau <i>Aspergillus</i> 48	A	7,00
Niveau <i>Cladosporium</i> 18	A	3,33	Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	7,67
Niveau <i>Cladosporium</i> 48	A	3,33	Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	8,00
Niveau <i>Penicillium</i> 18	A	7,67	Niveau <i>Alternaria</i> 48	B	10,00
Niveau <i>Penicillium</i> 48	A	8,33	Niveau <i>Alternaria</i> 18	B	10,00
Niveau <i>Alternaria</i> 18	A	10,22	Niveau ATB 18	C	34,33
Niveau <i>Alternaria</i> 48	A	11,11	Niveau ATB 48	C	34,33
Niveau ATB 18	B	38,66			
Niveau 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 18 heures d'incubation avec une zone d'inhibition de 10,67 mm, qui a augmenté après 48 heures à 14,00 mm. 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 significativement modifié les diamètres des zones d'inhibitions dans les deux manipulations.

Le fait que les moyennes des zones d'inhibitions 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 d'une existence d'une activité synergétiques allélopathique 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'éventuelles artefacts 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. De même, Pfohl-Leszkowicz (2001) a démontré que 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 outre, Mislivec (1988) a démontré expérimentalement que 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, Combès *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.

Conclusion générale

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 le présent travail, des 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 les mettant 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, *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 apparait 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.

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 ;
- 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 pouvoir antimicrobien de ces champignons ;
- une extraction, purification et l'identification des substances bioactives à caractère antibactérien produits 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 antibactériens.

Références bibliographiques

Bibliographie

- Abdel-Motaal F., Nassar Mortada S. M., El-Zayat S.A., El-Sayed M.A., and Ito S-I.(2010). Antifungal activity of endophytic fungi isolated from Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.), Pak. J. Bot., 42(4): 2883-2894.
- 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, ISSN : 2231 – 3184.
- Akbary P., Fereidouni M.S., Akhlaghi M.(2014).In vitro antibacterial activity of *Peganum harmala* (L) extract to some fish pathogenic bacteria, Iranian Journal of Aquatic Animal Health 1 (1) 7-16.
- Aly A.H., Debbab A., Proksch P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. Appl Microbiol Biotechnol. 90(6):1829-45. doi: 10.1007/s00253-011-3270-y.
- Arivudainambi U.S. E, 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. DOI: 10.1515/biolet-2015-0002.
- Arnold. A. E., Lutzoni. F.(2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? the Ecological Society of America, Ecology, 88(3), pp. 541-549.
- Arnold A. E., Mejía 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. The National Academy of Sciences, vol. 100 no. 26, 15649–15654, doi: 10.1073/pnas.2533483100.
- Arnold A. E., Maynard Z., Gilbert G.S.(2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity, Mycological Research Volume 105, Issue 12, P 1502-150.
- Ashwini S. and Rajagopal K.(2016). Bioactivity of the extract from an endophytic fungi *Nigrospora Oryza* isolated from *Pterolobium* International Journal of Pharma and Bio Sciences7(4): (B) 167 – 170. ISSN 0975-6299.
- Beau P.(2001). Thèse : Les immunomodulateurs naturels utilisés en prophylaxie et lors du traitement des infections ORL à récides. Université Limoges. Pp 195.
- Blackwell M.(2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? American Journal of Botany 98(3): 426–438.
- Bousliman Y., Ait El Cadi M., El Jaoudi R., Laatiris A., Bouklouze A., Cherrah Y. (2012). Les plantes toxiques au Maroc. Médecine du Maghreb. n°196.
- Carroll G.(1988). Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont, doi: 10.2307/1943154. Volume 69, Issue1, Pages 2–9.
- Chen Ko-Hsuan, Miadlikowska J., Molnár K., Arnold A. E, M. U'Ren J., Gaya E., Gueidan C., Lutzoni F.(2015).Phylogenetic analyses of eurotiomycetous endophytes

- reveal their close affinities to Chaetothyriales, Eurotiales, and a new order – Phaeomoniellales, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 85, 117–130.
- 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. *Journal of Food Protection*, Vol. 66, No. 6, Pages 931–936.
 - Chomcheon P., Wiyakrutta S., Sriubolmas N., Ngamrojanavanich N., Isarangkul D., Kittakoop 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.
 - Clay K. (1990). Fungal endophytes of grasses, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21:275-97.
 - Compant S., Saikkonen K, Mitter B., Campisano A., Mercado-Blanco J.(2016). Editorial special issue: soil, plants and endophytes. *Plant Soil* 405:1–11, doi 10.1007/s11104-016-2927-9.
 - Combès A., Ndoeye I., Bance C., Bruzard J., Djediat C., Dupont J., Nay B., Prado S. (2012). Chemical Communication between the Endophytic Fungus *Paraconiothyrium Variabile* and the Phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS ONE* 7(10): e47313. doi:10.1371/journal.pone.0047313.
 - Darabpour E., Bavi A.P., Motamedi H., Nejad S. M. S.(2011). Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. Growing in Iran against Multi-Drug Resistant Bacteria. *EXCLI Journal*; 10:252-263 – ISSN 1611-2156.
 - Daurel C., Leclercq R. (2008). Antibigram of *Staphylococcus aureus*, *Revue Francophone des Laboratoires* Volume 2008, Issue 407, Pages 81–90. [http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X\(08\)74870-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(08)74870-6).
 - 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. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(2), pp. 104-111, DOI: 10.5897/JMPR09.030, ISSN 1996-0875.
 - Deshmukh S. K., Shilpa A. Verekar, and Sarita V. Bhavé. (2015). Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials *Front Microbiol.* 5: 715. PMID: PMC4288058. doi: 10.3389/fmicb.2014.00715.
 - 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.* Vol 2(1): 75-79. ISSN 0975- 5845.
 - Dirihan S.(2016). Grass-endophyte coevolution and ploidy levels in fescues, *Painosalama Oy - Turku, Finland*, ISBN 978-951-29-6466-6.
 - Edziri H., Mastouri M., Mahjoub M. A., Patrich, G., Matieu M., Ammar S., Ali S. M., Laurent G., Zine M. and Aouni M.(2010). Antibacterial, antiviral and antioxidant activities of aerial part extracts of *Peganum harmala* L. grown in Tunisia, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92: 7, 1283 — 1292
 - Egan J.M., Kaur A., Raja H.A., Kellogg J.J., Oberlies N.H., Cech N.B.(2016). Antimicrobial fungal endophytes from the botanical medicine goldenseal (*Hydrastis canadensis*), *Phytochemistry Letters* 17, 219–225, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2016.07.031>.

- Elbah D., Habbachi W., Ouakid M.L. and Tahraoui A. (2016). Sublethal effects of *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) on sexual behavior and oviposition in fruit fly *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) Journal of Entomology and Zoology Studies; 4(6): 638-642.
- 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.
- Faeth, S. H.(2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists? – Oikos 98:25–36.
- Faeth S.H., Fagan W.F.(2002). Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists. Integr Comp Biol; 42 (2): 360-368. doi: 10.1093/icb/42.2.360.
- Fisher K. and Phillips C.(2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology, 155, 1749–1757. doi 10.1099/mic.0.026385-0.
- Gao F-K., Dai C-C., Liu X-Z.(2010). Mechanisms of fungal endophytes plant protection against pathogens, African Journal of Microbiology Research Vol. 4(13) pp. 1346-1351, ISSN 1996-0808.
- 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., Chaverri P. (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences, Molecular Ecology 20, 3001–3013. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05110.x.
- Gimenez C., Cabrera R., Reina M., and González-Coloma A.(2007). Bentham Science Publishers Ltd. Fungal Endophytes and their Role in Plant Protection.Current Organic Chemistry. 11,707-720.
- Gouda. S, Gitishree D., Sen. Sandeep K., Han-Seung S., and Kumar P.J.(2016). Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. Front Microbiol; 7: 1538. doi: 10.3389/fmicb.2016.01538.
- Gul Kanwal Z., Hafeez A., Ul Haq I., Ur-Rehman T., Aun Muhammad S., Shazadi I., Nighat F., Ur Rehman N.(2016).Antioxidant, Antimicrobial and Antileishmanial Study of Different Parts of *Peganum harmala*, International Journal of Biosciences | IJB | ISSN: 2220-6655. Vol. 9, No. 1, p. 45-58.
- Gupta. S. et Chaturvedi P. (2015). Phytochemical Screening and Extracellular Enzymatic Enumeration of Foliar Endophytic Fungal Isolates of *Centella asiatica* (L.). Urban. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 35(1), Article No. 06, Pp: 21-24 ISSN 0976 – 044x.
- Hacquard S., Kracher B., Hiruma K., Munch P.C., Garrido-Oter R., Thon M. R., Weimann A., Damm U., Dallery J-F., Hainaut M., Henrissat B., Lespinet O., Sacristan S., van Themaat E. V. L., Kemen E., McHardy A. C., Schulze-Lefert P. & O’Connell R.J.(2016). Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. Nature Communications 7: 11362; doi: 10.1038/ncomms11362.

- Hammiche V., Merad R., 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.
- Hellwig V., Grothe T., Mayer-Bartschmid A., Endermann R., Geschke F. U., Henkel T. and Stadler M. Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *Journal of Antibiotics* 2002; 55: 881-892.
- Herre E.A., MejiA L C., Kyllö 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 Ecological Society of America Ecology, 88(3), 2007, pp. 550–558.
- Hoffman M. T., Arnold A. E.(2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees, *Mycological Research*, Vol 112, Issue 3, Pp 331–344.
- 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.
- Hyde, K.D. and Soytong, K.(2008). in “The fungal endophyte dilemma”. *Fungal Diversity* 33: 163-173.
- Javadian F., Saeidi S., and Jahani S.(2016).Antimicrobial Activity of *Peganum harmala* and *Heracleum persicum* Against *Acinetobacter baumannii*, *Int J Infect.* 3(1): e33554. doi: 10.17795/iji-33554.
- Kalyanasundaram I., Nagamuth J. and Muthumaraswamy S.(2015). Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated and identified from salt marsh plant in Vellar Estuary, *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, Vol. 7 (2), pp. 13- 20, doi: 10.3897/JMA2014.0334 . ISSN 2141- 2308.
- Kauppinen, M., Saikkonen, K., Helander, M., Pirttilä, A.M. and Wäli, P.R. (2016). *Epichloë* grass endophytes in sustainable agriculture. *Nature Plants* 2, Article number: 15224. Doi:10.1038/nplants.2015.224.
- Kaur Rajandeep, Kapoor Karan, Kaur Harpreet.(2011) Plants as a source of anticancer agents, *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 1 (1): 119-124.
- Kaul S., Gupta S., Ahmed M., Dhar M.K.(2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunts for bioactive metabolites *Phytochem Rev* doi: 10.1007/s11101-012-9260-6.
- Khan A.L., Al-Harrasi A., Al-Rawahi A., Al- Farsi Z., Al-Mamari A., Waqas M. (2016). Endophytic Fungi from Frankincense Tree Improves Host Growth and Produces Extracellular Enzymes and Indole Acetic Acid. *Plos one* 11(6): e0158207. doi:10.1371/journal.pone.0158207.
- 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*, doi 10.1007/978-81-322-1801-2_3, pp.23-39.

- Lamchouri, F.(2014). Antitumor properties and toxicity effects of *Peganum harmala* L.(Zygophyllaceae). Plant Science Today, 1(4), 192-195. <http://dx.doi.org/10.14719/pst.2014.1.4.71>.
- Li W.C., Zhou J., Guo S.Y. and Guo L.D.(2007). Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. Fungal Diversity 25: 69-80.
- Li. X., Guo Z., Deng Z., YangJ. and Zou K.(2015). A New α -Pyrone Derivative from Endophytic Fungus *Pestalotiopsis microspora*. Rec. Nat. Prod. 9:4, 503-508
- Liang Z., Zhang J., Zhang X., Li J., Zhang X., and Zhao C.(2016). Endophytic Fungus from *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying that Produces Podophyllotoxin, Journal of Chromatographic Science, Vol. 54, No. 2, 175–178. doi: 10.1093/chromsci/bmv124.
- 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. Pharmaceutical Biology, Vol. 37, No. 3, pp. 181–187.
- Manoharachary C., Sridhar K., Singh R., Adholeya A., Suryanarayanan T. S., Rawat S., Johri B. N.(2005). Fungal biodiversity: Distribution, conservation and prospecting of fungi from India, Microbial Diversity, Current Science, Vol. 89, No. 1.
- Masumi S., Mirzaei S., Zafari D., Kalvandi R.(2015). Isolation, identification and biodiversity of endophytic fungi of *Thymus*, Progress in Biological Sciences, Vol. 5, Number 1, 43-50.
- 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 Agriculture and Biotechnology, doi: 10.1007/978-94-007-2214-9_26.
- Murali M., Mahendra C., Hema P., Rajashekar N., Nataraju A., Sudarshana M. S. & Amruthesh K. N.(2017). Molecular profiling and bioactive potential of an endophytic fungus *Aspergillus sulphureus* isolated from *Sida acuta*: a medicinal plant, Pharmaceutical Biology, 55:1, 1623-1630, doi: 10.1080/13880209.2017.1315435.
- Narayan Chandra Paul, Won Ki Kim, Sung Kyoong Woo, Myung Soo Park, Seung Hun Yu.(2006). Diversity of Endophytic Fungi Associated with *Taraxacum coreanum* and Their Antifungal Activity, Mycobiology. 34 (4): 185-19 doi: 10.4489/MYCO.2006.34.4.185.
- Nagam Venkateswarlu, Vasudeva reddy N., Vijaya T., kanth shama K.(2015). Antimicrobial and anti oxidant activities of an Endophytic fungi isolated from an endemic medicinal plant *Pterocarpus santalinus*, International Journal of Phytomedicine 6 523-528, ISSN: 0975-0185.
- Nakamura C. V., Ueda-Nakamura T., Bando E., Negrão Melo A. F., Cortez D. A. G, Dias Filho B. P.(1999). Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 94(5): 675-678. ISSN 1678-8060. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000500022>.

- Nicoletti R. and Fiorentino A.(2015). Plant Bioactive Metabolites and Drugs Produced by Endophytic Fungi of Spermatophyta, *Agriculture*, 5, 918-970; doi:10.3390/agriculture5040918, ISSN 2077-0472.
- Niroumand M.C., Farzaei M.H., 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 ISSN 0255-2922.
- 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. ISSN 1232-986X.
- Ostry V.(2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs *World Mycotoxin Journal*,1(2): 175-188, ISSN 1875-0710 print, ISSN 1875-0796 online 175.
- Ohgushi T, Craig T.P., and Price P.W.(2007). *Ecological Communities: Plant Mediation in Indirect Interaction Webs*. ISBN-13 978-0-511-26909-7.
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Sanfuentes, E. and Rodriguez, J.(2008). Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity* 33: 77-86.
- Pimentel M.R., Molina G., Dionísio A.P., Marostica Junior M.R., and Pastore G.M.(2011). The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. *Research Biotechnology Research International*, Article ID 576286, 11 pages, doi:10.4061/2011/576286.
- Raja H.A., Kaur A., El-Elmat T., Figueroa M.S., Kumar R., Deep, G., Agarwal R., Faeth S.H., Cech 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. <http://dx.doi.org/10.1080/21501203.2015.1009186>.
- Ravelomanantsoa S.H.(2004). Thèse. Les endophytes de *Eugenia jambolana* Lam. (*Myrtaceae*) : un modèle de relation plante – microorganismes. Université d'Antananarivo. Pp87.
- Repussard C., Zbib N., Tardieu D., 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., White Jr J.F., Arnold A.E., Redman R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and Functional roles. *New phytologist*. Vol (182) : 314-330.
- Rodriguez R., Redman R. 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J Exp Bot.* 59(5):1109-14. doi: 10.1093/jxb/erm342.
- Roland J-C, El Maarouf-Bouteau H., Bouteaudunod F.(2008). *Atlas biologie végétale 1. organisation des plantes sans fleurs, algues et champignons* 7e édition, Paris, ISBN 978-2-10-053795-2.
- Roussel L.(1974). Les auxines, agents essentiels de la croissance des végétaux. *Revue Bois et Forêts des tropiques*, n° 158, p51.
- Rungjindamai, N., Pinruan, U., Choeyklin, R., Hattori, T. and Jones, E.B.G.(2008). Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis

- and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. Fungal Diversity 33: 139-161.
- Sadrati N, Daoud H., Zerroug A., Dahamna S., Bouharati S.(2013). Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). Journal of Plant Protection Research vol. 53, no. 2.
 - Saikkonen K. (2007). Forest structure and fungal endophytes, Fungal Biology Reviews 21, 67 – 74, doi:10.1016/j.fbr.2007.05.001.
 - Saikkonen K., Mikola J. and Helander M.(2015). Endophytic phyllosphere fungi and nutrient cycling in terrestrial ecosystems, Fungal endophytes – biology and bioprospecting. Current Science, Vol. 109, NO. 1.
 - Sánchez Márquez, S., Bills, G.F., Zabalgogezcoa, I. (2008). Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. Fungal Diversity.
 - Selim K.A., El-Beih A. A., AbdEl-Rahman T.M, El-Diwany A.I. (2012). Biology of Endophytic Fungi. Current Research in Environmental & Applied Mycology 2(1), 31–82, Doi 10.5943/cream/2/1/3.
 - Schulz B., Boyle C., Draeger S., Rommert A.K., and Krohn K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically activessecondary metabolites. The British Mycological Society, Mycol. Res. 106 (9): 996-1004, doi: 10.1017/S0953756202006342.
 - Schulz B., Boyle C., Sieber T. N. (Eds.).(2006). What are Endophytes?, Microbial Root Endophytes, Soil Biology, Volume 9.
 - 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., v. 28, n.1, p.25-34, ISSN 1808-4532.
 - Shahverdi AR., Monsef-Esfahani HR., Nickavar B., Bitarafan L., Khodae S., Khoshakhlagh N.(2005). Antimicrobial activity and main chemical composition of two smoke condensates from *Peganum harmala* seeds. Z Naturforsch C, 60(9-10): 707-10.
 - Soleimani M., Hajabbasi M.A., Afyuni M., Mirlohi A. , Borggaard O.K., et Holm P.E.(2010). Effect of Endophytic Fungi on Cadmium Tolerance and Bioaccumulation by *Festuca Arundinacea* and *Festuca Pratensis*. International journal of phytoremediation. Vol12. 535-549.
 - Soleimani M., Afyuni M., Hajabbasi MA., Nourbakhsh F., Sabzalian MR., Christensen JH. (2010). Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. Chemosphere 81(9):1084-90. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.034.
 - Strobel G. and Daisy B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiol Mol Biol Rev. 67(4): 491–502, doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.

- Sudha V., Govindaraj R., Baskar K., Al-Dhabi N A., Duraipandiyan V. (2016). Biological properties of Endophytic Fungi. Biological and Applied Sciences Braz. arch. biol. technol. vol.59. ISSN 1678-4324. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150436>.
- Suryanarayanan. Trichur S., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu M. B., Gopalan V. (2012). Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts, Fungal Diversity 54:19–30. doi 10.1007/s13225-012-0168-7.
- 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. Pp 190.
- 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 ISSN: 2231 – 2587.
- 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.
- Thomma. B. P. H. J.(2003). Pathogen profile *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology, (4), 225–236, doi: 10.1046/J.1364-3703.2003.00173.X.
- 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, doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02441.x.
- Valgas C., Machado de Souza S., Smânia E.F.A., Smânia Jr A.(2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Braz. J. Microbiol. vol.38 no.2 São Paulo. ISSN 1678-4405. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>.
- Van Tyne D., Martin M. J. and Gilmore M. S.(2013). Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Toxins*, 5, 895-911; ISSN 2072-6651. doi:10.3390/toxins5050895.
- Varvas T., Kasekamp K., Kullman B.(2013). Preliminary study of endophytic fungi in timothy (*Phleum pratense*) in Estonia. Acta Mycol. 48 (1): 41–49.
- Vasundhara M., Kumar A, and M. Sudhakara Reddy.(2016). Molecular Approaches to Screen Bioactive Compounds from Endophytic Fungi. Front Microbiol. 7:1774. PMID: PMC5108243, doi: 10.3389/fmicb.2016.01774.
- Vieu G., Thèse 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.(2014). Université Toulouse III – Paul Sabatier, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, n° 2014-TOU3-2073.
- Vinale F., Nicoletti R., Lacatena F., Marra R., Sacco A., Lombardi N., d'Errico G., Digilio M. C., Lorito M. & Woo S. L.(2017). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus*, Natural Product Research. ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1290624>.

- Wani K., Saboo S., Solanke P., Tidke P.(2016). Production of Novel Secondary Metabolites from Endophytic Fungi by Using Fermentation Process. Indo American Journal of Pharmaceutical Research. 6(03).
- Zabalgogezcoa I.(2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens, Spanish Journal of Agricultural Research, 6 (Special issue), 138-146. ISSN: 1695-971-X.
- Zamani N., Sabzalian M.R., Khoshgoftarmanesh A. and Afyuni M.(2010). *Neotyphodium* Endophyte Changes Phytoextraction of Zinc in *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. International journal of phytoremediation. Vol17. 456-463 <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2014.922919>.
- Zhang HW., Song YC., Tan RX.(2006) Biology and chemistry of endophytes. Nat Prod Rep 23:753–771, doi: 10.1039/b609472b.
- Zhang X., Wei W. and Tan R.(2015). Symbionts, a promising source of bioactive natural products. Science China Chemistry 58, 1097, doi: 10.1007/s11426-015-5398-6.
- Zhao J., Zhou L., Wang J., Shan T., Zhong L., Liu X., and Gao X.(2010). Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants, Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. Méndez-Vilas (Ed), 567-576.
- Zou W. X., Meng J. C., Lu H., Chen G. X., Shi G. X. , Zhang T. Y. , and Tan R. X.(2000). Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*. J. Nat. Prod., 63 (11), pp 1529–1530, doi: 10.1021/np000204t.

Annexes

Annexe 1

Composition et préparation des différents milieux de cultures utilisés

Eaux physiologique :

NaCl	09g
Eau distillée	1000 ml

Le milieu PDA (Potato-dextrose-agar)

C'est un milieu semi-synthétique :

Pomme de terre.....	200g
Glucose	20g
Agar-agar	20g
Eau distillée	1000 ml.

Préparation du milieu PDA

Les pommes de terre sont pelées, lavées et coupées en tranches minces. Elles sont ensuite cuites dans 200 ml d'eau pendant 15 à 20 mn. Le mélange obtenu est écrasé et filtré. Le filtrat est versé dans un erlen meyer gradué d'un litre de volume. Puis, du glucose et l'agar-agar est rajouté au filtrat, en suite le volume est complété à 1000 ml et placé sur un agitateur magnétique chauffé. Après son homogénéisation, le milieu est versé dans des flacons hermétiquement fermés afin de les autoclaver à 120°C pendant 20 mn.

Brain Heart Infusion (BHI) Agar

Infusion cœur-cerveau (matières solides)	8,0 g
Digestion peptique de tissu animal	5,0 g
Digestion pancréatique de caséine	16,0 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g
Glucose	2,0 g
Phosphate d'hydrogène disodique	2,5 g
Gélose	13,5 g
Eau distillée	1000 ml
pH final 7,4 ± 0,2	

Préparation du milieu BHI :

Nous avons mélangé 18,5g de BHI en poudre du commerce avec 7,5g d'agar et ajusté à 1000ml avec de l'eau physiologique dans un Erlenmeyer. Le mélange est agité et chauffé puis versé dans des bouteilles en verre bien fermé et autoclavé à 120°C pendant 20mn.

Muller Hinton (MH):

Extrait de viande.....	300g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon.....	1,5g
Agar.....	16g
Eau distillée.....	1000 ml
pH final 7,3	

Préparation du MH

Nous avons mélangé 21g de MH en poudre avec 15g d'agar et ajusté à 1000 ml avec de l'eau physiologique. Puis chauffé en agitant et le mélange est versé dans des bouteilles en verre et stérilisé dans un autoclave à 120°C pendant 20mn.

Annexe 2

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*

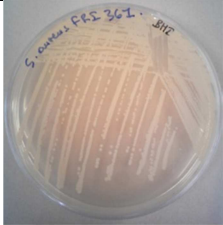
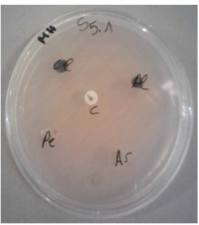
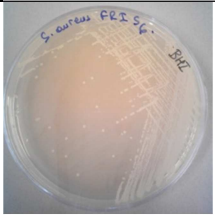
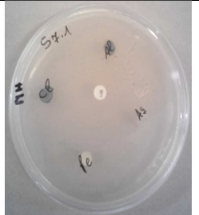
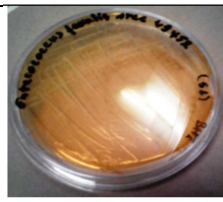
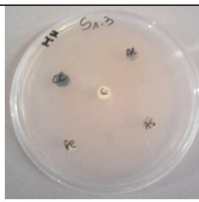
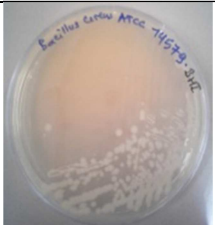
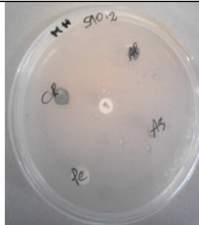
Annexe 3

Tableau d'analyse de la variance de l'ANOVA pour la souche bactériennes *Bacillus cereus* ATCC 10876 qui montre une p-value inférieure à 0,05%.

Tableau d'analyse de variance					
	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 4

Tableau : dépistage préliminaire de l'activité antibactérienne des champignons endophytes et de l'antibiotique 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)				

Résumé

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de molécules bioactives possédant des propriétés thérapeutiques. Elles sont colonisées par des mycoendophytes, des champignons mutualistes vivant dans leurs tissus sans manifester de symptômes ou de dommages apparents. Ces champignons sont capables de fournir eux aussi des métabolites secondaires ayant des activités biologiques. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à une plante spontanée de la région des dayas (Laghouat, Algérie) : *Peganum harmala* ou Harmel, une plante médicinale toxique appartenant à la famille des Zygophyllaceae. Notre étude vise à mettre en évidence l'activité antibactérienne de quatre genres de mycoendophytes : *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* isolés des feuilles de cette plante. Ainsi l'activité antimicrobienne a été évaluée par la technique de la double diffusion de disque sur gélose vis-à-vis des souches bactériennes, Gram positif, *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), *Bacillus cereus* (ATCC 14579). Les résultats ont montré une différence dans la sensibilité des souches microbiennes aux substances bioactives des mycoendophytes étudiés. Ces derniers ont créé des zones d'inhibitions plus ou moins importantes selon la souche, elles varient entre 0 et 15 mm. Le genre *Alternaria* a montré l'activité la plus significative des quatre genres utilisés. Des ANOVA réalisées entre les moyennes des diamètres des zones d'inhibitions des différents mycoendophytes et le disque antibiotique test : Chloramphénicol ont montré une différence hautement significative entre ces deux mesures. Par conséquent, le test des groupes homogènes (Newman-Keuls) a révélé une différence dans la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des métabolites secondaires des mycoendophytes foliaires de *Peganum harmala* 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, métabolites secondaires, activité antibactérienne, *Peganum harmala*, Laghouat (Algérie).

Abstract:

The medicinal plants constitute an inexhaustible source of bioactive compounds with therapeutic properties. These plants are colonized by endophytic fungal, those live asymptotically within their living tissues without causing any immediate, overt negative effects and establish mutualistic symbiosis. Many are capable of synthesizing bioactive compounds. It is accordingly that we were interested in a spontaneous plant of the area of dayas (Laghouat, Algeria): *Peganum harmala*, that is also called Harmal, a toxic medicinal plant belonging to a family *Zygophyllaceae*. The aim of this study was to consider antibacterial effects of four most dominant endophytic fungal genus (*Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, and *Penicillium*) isolated from the leaves of this plant. In this respect, we evaluated by an agar disc diffusion technique against selected Gram-positive human pathogenic bacteria stocks, (*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* (50 mecA), *Staphylococcus aureus* (FRI 137), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Bacillus cereus* (ATCC 14579). ANOVA carried out between the diameters averages of inhibitions zones of the various myceliums and the standard antibiotic disc: Chloramphenicol show a highly significant difference between these two measurements. Consequently, the test of the homogeneous groups (Newman-Keuls) revealed a difference in the sensitivity of the bacterial stocks towards the secondary metabolites of the foliar mycoendophytes of *Peganum harmala* according to their cultural conditions to know: their presence together or separately with each bacterial and the incubation time.

Key words: endophytic fungi, secondary metabolites, antimicrobial activity, *Peganum harmala*.