

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie**



Thèse

Présentée par SALMI Djouza

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée aux Bio-industries

Thème

**Isolement et identification de champignons
endophytes foliaires d'*Urtica dioica* L. et étude de
leur activité biologique.**

Devant le jury :

M. MATI Abderrahmane

M. HOUALI Karim

M^{me} SMAIL SAADOUN Noria

M. NABTI El Hafid

M^{me} HALOUANE SAHIR Fatma

M^{me} SAIDI Fairouz

Professeur à l'UMMTO

Professeur à l'UMMTO

Professeur à l'UMMTO

Professeur à l'UAMB

Professeur à l'UMBB

Professeur à l'USDB

Président

Directeur de thèse

Co-Directrice de thèse

Examineur

Examinatrice

Examinatrice

Remerciements

Je tiens avant tout à exprimer ma profonde gratitude à monsieur HOUALI Karim Professeur à l'UMMTO, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et mis à ma disposition le nécessaire pour parvenir à mener à bien ce travail, pour m'avoir permis de mettre un pied dans le monde de la science et de m'y avoir entouré avec toute la ferveur scientifique et toute la modestie qui lui sont propres. Qu'il trouve ici l'expression d'un respect absolu et d'une estime sans faille,

Qu'il me soit aussi permis d'exprimer mes vifs remerciements à madame SMAIL-SAADOUN Noria, Professeur à l'UMMTO, de m'avoir proposé un sujet aussi intéressant et fort passionnant, d'avoir mis à ma disposition tout le nécessaire pour mener à bien ce travail de thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect, de ma reconnaissance et toute ma gratitude.

J'adresse aussi mes plus vifs remerciements à madame RIOU Catherine, Maitre de conférences à l'université de Limoge, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour tous les conseils prodigieux qu'elle m'a toujours apporté, pour son soutien moral, pour toutes les instructions apportées, les encouragements incessants et son esprit d'équipe. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent aussi à monsieur MATI Abderrahmane Professeur à l'UMMTO qui nous fait l'honneur de présider ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Mes sincères dévouements aux membres de jury : madame HALOUANE-SAHIR Fatma, Professeur à l'UMBB ; madame SAIDI Fairouz, Professeur à l'USDB ainsi que monsieur NABTI El Hafid, Professeur à l'UAMB, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à messieurs Issawi Mohammad et Titouche Yacine pour leurs partages scientifiques, leur esprit d'équipe ainsi que leur soutien moral.

Mes remerciements les plus chaleureux à toutes ces personnes qui m'ont soutenue tout au long de la réalisation de ce travail, je pense plus particulièrement à toute l'équipe du laboratoire LABAB pour toute l'écoute et l'attention apportée et toutes les informations partagées.

Dédicaces

- ✓ A ma très chère regrettée maman ;
- ✓ A mon très cher papa ;
- ✓ A mes anges Aris et Djura.

Résumé

Résumé

La présente étude a examiné les molécules antioxydantes (thiols totaux, contenu phénolique total) et les enzymes de détoxification des espèces réactives d'oxygène (catalase et superoxyde dismutase) des endophytes du genre *Alternaria* et de ses feuilles hôtes *Urtica dioica*. Nous avons constaté que les activités catalase et superoxyde dismutase étaient plus élevées dans les feuilles d'ortie (50 mmol de protéine $\text{mn}^{-1}\text{mg}^{-1}$ et 54,66 U/mg de protéine respectivement) par rapport aux champignons endophytes. La présente étude a également portée sur la composition chimique des extraits aqueux et à l'acétate d'éthyle des champignons endophytes du genre *Alternaria* et de leur hôte les feuilles d'*U. dioica*.

Une analyse comparative des activités antibactériennes et antioxydantes des extraits aqueux et à l'acétate d'éthyle a également été menée. L'activité antibactérienne des extraits a été évaluée par rapport à des souches de référence et isolées du lait cru et acidifié, y compris *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM).

Les extraits d'*Alternaria sorghi* ont montré un large éventail d'activités antimicrobiennes et ont présenté la même efficacité antimicrobienne que les extraits de feuilles d'ortie. De plus, les extraits avaient un effet antimicrobien plus important contre les bactéries Gram-positives que les bactéries Gram-négatives. Ensuite, les feuilles d'ortie et les extraits d'*Alternaria sorghi* ont montré une activité antibactérienne importante contre les souches de SARM.

L'activité antioxydante de tous les extraits a également été étudiée par un test de piégeage des radicaux DPPH et le pouvoir réducteur a été déterminé. Le potentiel de réduction le plus élevé a été observé avec les extraits aqueux de feuilles d'*U. dioica*, tandis que la plus grande activité antioxydante avec le piégeage des radicaux libres DPPH a été démontrée par les extraits d'acétate d'éthyle, en particulier les extraits d'*A. sorghi* et de feuilles d'ortie.

L'analyse LC/MS a révélé les métabolites secondaires phénoliques présents dans les extraits de plantes ainsi que dans le métabolisme endophyte et la capacité des champignons endophytes à biosynthétiser de nouveaux composés non répertoriés chez leur hôte.

En conclusion, nos résultats suggèrent que les champignons endophytes des feuilles d'*Urtica dioica* sont une source importante de substances bioactives. De plus, il est possible qu'ils contribuent aux mécanismes de défense de la plante contre le stress oxydatif.

Mots clé : *Alternaria*, catalase, superoxyde dismutase, *U. dioica*.

Abstract

Abstract

The present study investigated the antioxidative molecules (total thiols, total phenolic content) and detoxification enzymes of reactive oxygen species (catalase and superoxide dismutase) of the endophytic *Alternaria* species and its host *Urtica dioica* leaves. We found that catalase and superoxide dismutase activities were higher in nettle leaves (50 mmol mn⁻¹ mg⁻¹ protein and 54.66 U/mg protein respectively) compared with endophytic fungi. The present study are also investigated the chemical composition of water and ethyl acetate extracts from *Alternaria* endophytic fungi and its host *U. dioica* leaves.

A comparative analysis of the antibacterial and antioxidant properties of water and ethyl acetate extracts was also conducted. Antibacterial activity of the extracts were evaluated against reference and isolated strains from raw milk and acidified milk including Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

The *Alternaria sorghi* extracts showed a wide range of antimicrobial activities and presented the same antimicrobial effectiveness than the nettle leaves extracts. Furthermore, the extracts had greater antimicrobial effect against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria. Then nettle leaves and *Alternaria sorghi* extracts were exhibited an important antibacterial activity against MRSA strains.

The antioxidant activity of all extracts was also investigated by DPPH radical scavenging assay and the reducing power was determined. Highest reduction potential was seen with water extracts *U. dioica* leaves, whereas the greatest antioxidant activity with DPPH free radical scavenging was demonstrated by ethyl acetate extracts, especially *A. sorghi* and nettle leaves extracts.

LC/MS analysis revealed the phenolic secondary metabolites found in the plants extracts and also in their endophytes metabolism and the capacity of endophytic fungi to biosynthesize of novel compounds not listed at their host.

In conclusion, our results suggest that the endophytic fungi of *Urtica dioica* leaves are an important source of bioactive substances. Moreover, it is possible that they contribute to the plant's defense mechanisms against oxidative stress.

Key word: Endophytic *Alternaria* species, catalase, superoxide dismutase, *U. dioica*.



Table des matières

Table des matières

1-1-6.6. Activité antiproliférative et anticancéreuse d' <i>U. dioica</i> L.....	24
1-1-6.7. Efficacité de l' <i>U. dioica</i> L. dans l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP).....	25
1-2. Champignons endophytes.....	26
1-2-1. Définition	26
1-2-2. Historique.....	26
1-2-3. Mode de transmission des champignons endophytes.....	27
1-2-4. Classification des champignons endophytes.....	27
1-2-5. Ecologie des champignons endophytes.....	29
1-2-5.1. Influence des environnements écologiques sur les champignons endophytes.....	29
1-2-5.2. Influence du génotype des plantes hôtes sur les champignons endophytes.....	30
1-2-6. Rôles physiologiques des champignons endophytes et protection des végétaux	31
1-2-6.1. Tolérance au stress biotique et aux maladies.....	32
1-2-6.2. Tolérance au stress abiotique et croissance des plantes.....	35
1-2-7. Activité biologique des champignons endophytes	39
1-2-7.1. Potentiel anticancéreux des champignons endophytes.....	39
1-2-7.2. Potentiel antioxydant des champignons endophytes.....	41
1-2-7.3. Potentiel antimicrobien des champignons endophytes.....	43
1-2-7.4. Autres activités biologiques des champignons endophytes.....	45
2. Matériel et méthodes.....	49
2-1. Matériel.....	49
2-1-1. Appareillage.....	49
2-1-2. Réactifs et produits chimiques.....	50

Table des matières

2-1-3. Matériel biologique.....	51
2-2. Méthodes	54
2-2-1. Coloration des feuilles d' <i>U. dioica</i> pour la mise en évidence des champignons endophytes foliaires.....	54
2-2-2. Isolement et purification des champignons endophytes foliaires...	55
2-2-2.1. Stérilisation superficielle des feuilles et mise en culture.....	55
2-2-2.2. Validation du protocole de stérilisation superficielle des feuilles.....	55
2-2-3. Identification macroscopiques et microscopiques des champignons endophytes foliaires	55
2-2-4. Identification moléculaire de quelques isolats fongiques.....	56
2-2-5. Analyse de l'activité des champignons endophytes en présence d'un stress biotique.....	56
2-2-5.1. Antagonisme in vitro des champignons endophytes à l'égard des bactéries pathogènes.....	57
2-2-5.2. Antagonisme in vitro des champignons endophytes à l'égard des champignons phytopathogènes.....	58
2-2-6. Préparation des extractions végétales.....	58
2-2-7. Préparation des extraits fongiques	59
2-2-8. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits.....	59
2-2-8.1. Méthode de diffusion sur gélose.....	60
2-2-8.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI / CMB) des extraits.....	60
2-2-9. Systèmes anti-oxydatifs enzymatique.....	61
2-2-9.1. Extraction et dosage des protéines	62
2-2-9.2. Dosage de l'activité de la Superoxide dismutase (SOD).....	62
2-2-9.3. Dosage de l'activité de la Catalase (CAT).....	62

Table des matières

2-2-10. Systèmes anti-oxydatifs non enzymatique.....	63
2-2-10.1. Dosage des thiols totaux	64
2-2-10.2. Dosage des composés phénoliques totaux.....	64
2-2-11. Détermination de l'activité anti-oxydante des extraits.....	64
2-2-11.1. Test de piégeage du radical DPPH.....	64
2-2-11.2. Pouvoir réducteur	65
2-2-12. Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse	66
2-2-13. Analyse statistique.....	67
3. Résultats et discussion	67
3-1. Localisation des champignons endophytes dans le tissu foliaire d' <i>Urtica dioica</i>	68
3-2. Fréquence de colonisation du tissu foliaire d' <i>Urtica dioica</i> par les champignons endophytes	68
3-3. Diversité des champignons endophytes dans le tissu foliaire d' <i>Urtica dioica</i>	72
3-4. Activité des champignons endophytes foliaire d' <i>Urtica dioica</i> en présence d'un stress biotique.....	75
3-4-1. Activité des champignons endophytes foliaire d' <i>Urtica dioica</i> à l'égard des champignons phytopathogènes	83
3-4-2. Activité des champignons endophytes foliaire d' <i>Urtica dioica</i> à l'égard des bactéries pathogènes	83
3-5. Caractérisation moléculaire de quelques souches de champignons endophytes du tissu foliaire d' <i>Urtica dioica</i>	91
3-6. Activité antibactérienne des extraits végétaux et fongiques.....	96
3-7. Evaluation des systèmes anti-oxydatifs.....	98
3-7-1. Evaluation des systèmes anti-oxydatifs enzymatiques.....	110
3-7-1.1. Activité de la superoxide dismutase (SOD) et de la catalase (CAT).....	111
3-7-2. Evaluation des systèmes anti-oxydatifs non enzymatique.....	111
3-7-2.1. Taux des thiols totaux et le taux des composés phénoliques totaux.....	114
3-8. Activité anti-oxydantes des extraits	117
3-8-1. Piégeage du radical DPPH.....	117

Table des matières

3-8-2. Pouvoir réducteur	119
3-9. LC/MS/MS.....	121
.	
Conclusion.....	132
Références bibliographiques	135
Annexes	

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ABA :	Acide abscissique
APG :	« Angiosperms Phylogeny Group »
BHI :	« Brain Heart Infusion »
BHIB :	« Brain Heart Infusion Bouillon »
BSA :	Albumine sérique bovine
CAT :	Catalase
CMB :	concentrations minimales bactéricides
CMI :	Concentrations minimales inhibitrices
COX :	Cyclooxygénases
CP :	contenu phénolique
DETAPAC :	Acide di éthylène tri amine penta acétique
DGGE :	denaturing gradient gel electrophoresis
DMSO :	Diméthyle sulfoxyde
DPPH :	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
DTNB :	Acide dithiobis 2-nitro benzoïque
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra-acétique
GA :	Acide gallique
GA :	Gibbérellines
H1N1 :	Hémagglutinine 1 Neuraminidase 1
HBP :	Hyperplasie bénigne de la prostate
HDL :	« High density lipoprotein »
HMT :	Teintures homéopathiques matricielles
HPGDS :	Hématopoïétiques Prostaglandine D Synthase
IAA :	Acide indole-3-acétique
IC50 :	Inhibitory Concentration 50
IFN :	Interféron
IL :	Interleukine
ITS :	« Internal transcribed spacer »
LC/MS :	«Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LDH :	Lactate déshydrogénase
LDL :	«Low density lipoprotein»

Liste des abréviations

MCF-7 :	«Michigan Cancer Foundation-7»
MHA :	«Mueller Hinton Agar»
MHB :	«Mueller Hinton Bouillon»
MS :	Mycélium stérile
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT :	«Nitroblue tetrazolium»
NF-kappaB :	«Nuclear factor-kappa B
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
PAF :	«Platelet Activating Factor»
PC :	Pourcentage de colonisation
PCR :	«Polymerase Chain Reaction»
PDA :	Potato Dextrose Agar
PDB :	Potato Dextrose Bouillon
PGPR :	«Plant Growth-Promoting Rhizobacteria»
pH :	Potentiel Hydrogène
POD :	Peroxydase
PR-1a :	«Pathogenesis-related protein 1a»
ROS :	«Reactive oxygen species»
RSA :	Résistance systémique acquise
RSI :	Résistance systémique induite
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SHBG :	«Sex Hormone Binding Globulin»
SOD :	Superoxyde dismutase
TCA :	Acide Trichloroacétique
TNF :	«Tumor Necrosis Factor»
TR :	temps de rétention
UDA :	<i>U. dioica</i> agglutinine
UV :	Ultra violet
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
XO :	Xantine oxydase

Liste des figures

Liste des figures

N° des Figures		Page
Figure 1 :	Planche botanique d' <i>Urtica dioica</i> L.	05
Figure 2 :	Racines d' <i>U. dioica</i> L.	06
Figure 3 :	(a) : Tige d' <i>U. dioica</i> L. avec poils avec des poils courts et des poils urticants, (b) : poils urticant caractéristique d' <i>U. dioica</i> L...	07
Figure 4 :	Vue dorsal de la feuille d' <i>Urtica dioica</i> L.....	08
Figure 5 :	(a) : pied femelle, (b) : détail des fleurs femelles, (c) : pied male, (d) : détail des fleurs males	09
Figure 6 :	Diagrammes floraux des fleurs mâles et femelles d' <i>U. dioica</i> L..	10
Figure 7 :	Fruit d' <i>U. dioica</i> L.	10
Figure 8 :	Représentation schématique de l'association endophyte fongique avec son hôte	28
Figure 9 :	Localisation géographique de Larbaâ Nath Irathen, lieu de la récolte d' <i>U. dioica</i>	52
Figure 10 :	Structure du DPPH• et sa réduction par l'antioxydant AH.....	65
Figure 11 :	Réactions mises en jeu dans le test au ferrocyanure de potassium	70
Figure 12 :	Observations microscopiques (X 400) d'une colonisation inter et intracellulaire du tissu foliaire d' <i>Urtica dioica</i> par les champignons endophytes	69
Figure 12 (suite) :	Observations microscopiques (X 400) d'une colonisation inter et intracellulaire du tissu foliaire d' <i>Urtica dioica</i> par les champignons endophytes	70
Figure 13 :	Fréquence de colonisation (%) par les champignons endophytes foliaires d' <i>Urtica dioica</i> chez les sujets analysés.....	73
Figure 14 :	Champignons endophytes colonisant le tissu foliaire d' <i>Urtica dioica</i> sous microscope optique (X 400) et en culture sur milieu PDA	78
Figure 14 (suite) :	Champignons endophytes colonisant le tissu foliaire d' <i>Urtica dioica</i> sous microscope optique (X 400) et en culture sur milieu PDA	79
Figure 14 (suite) :	Champignons endophytes colonisant le tissu foliaire d' <i>Urtica</i>	

Liste des figures

	<i>dioica</i> sous microscope optique (X 400) et en culture sur milieu PDA	80
Figure 15 :	Effet de quelques endophytes fongiques sur la croissance des champignons phytopathogènes	85-89
Figure 16 :	Activité antibactérienne de quelques champignons endophytes évaluée par le test direct à l'égard de bactéries pathogènes.....	93-95
Figure 17 :	Séquences obtenues après séquençages des régions ITS des isolats.....	97
Figure 18 :	Activité antibactérienne des extraits aqueux de champignons endophytes et de feuilles d' <i>Urtica dioica</i> , obtenues par la méthode de diffusion sur gélose	100-102
Figure 19 :	Activité antibactérienne des extraits à l'acétate d'éthyle de champignons endophytes et de feuilles d' <i>Urtica dioica</i> , obtenues par la méthode de diffusion sur gélose	104-106
Figure 20 :	Activités spécifiques des enzymes de détoxification des ROS dans les feuilles d' <i>Urtica dioica</i> et ses champignons endophytes, CAT : catalase, SOD : superoxyde dismutase.....	112
Figure 21 :	Teneur en molécules antioxydantes des feuilles d' <i>Urtica dioica</i> et de ses champignons endophytes	115
Figure 22 :	Activité de piégeage des radicaux DPPH des extraits aqueux des champignons endophytes et des feuilles d' <i>U. dioica</i> comparativement à l'acide ascorbique.....	118
Figure 23 :	Activité de piégeage des radicaux DPPH des extraits à l'acétate d'éthyl des champignons endophytes et des feuilles d' <i>U. dioica</i> comparativement à l'acide ascorbique	118
Figure 24 :	Dosage du pouvoir réducteur des extraits aqueux des champignons endophytes et des feuilles d' <i>U. dioica</i> comparativement à l'acide ascorbique.....	120

Liste des tableaux

Liste des tableaux

N° des tableaux		Page
Tableau I :	Position systématique de l'espèce <i>Urtica dioica</i> L.....	04
Tableau II :	Molécules bioactives d' <i>U. dioica</i> L.....	14
Tableau III :	Composition des acides aminés libres et liés dans les feuilles d' <i>U. dioica</i> (%).	16
Tableau IV :	Composition nutritionnelle d' <i>U. dioica</i>	17
Tableau V :	Amélioration des défenses des plantes hôtes par les champignons endophytes	38
Tableau VI :	Champignons endophytes producteurs de paclitaxel (taxol) et leurs plantes hôtes	42
Tableau VII :	Champignons endophytes producteurs de métabolites secondaires dans les plantes hôtes.....	47
Tableau VIII :	Caractérisation phénotypique et génotypique des souches <i>S. aureus</i> isolées.....	53
Tableau IX :	Comparaison des moyennes des fréquences de colonisations par les champignons endophytes foliaires d' <i>Urtica dioica</i> des différents sujets analysés.....	73
Tableau X :	Abondance en pourcentage (%) des champignons endophytes dans le tissu foliaire d' <i>Urtica dioica</i>	77
Tableau XI :	Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne des agents pathogènes étudiés à l'égard des souches endophytes testées.....	84
Tableau XII :	Activité antibactérienne de quelques champignons endophytes évaluée par test direct à l'égard de bactéries pathogènes.....	92
Tableau XIII :	Les contigs obtenus et blastés sur les banques de données des séquences champignons de NCBI.....	98
Tableau XIV :	Activité antibactérienne des extraits aqueux de champignons endophytes et de feuilles d'ortie, évaluée par la méthode de diffusion sur gélose.....	99
Tableau XV :	Activité antibactérienne des extraits d'acétate d'éthyle de	

Liste des tableaux

	champignons endophytes et de feuilles d'ortie, évaluée par la méthode de diffusion sur gélose.....	103
Tableau XVI :	CMI et CMB (mg.mL^{-1}) des extraits aqueux de champignons endophytes et de feuilles d'ortie déterminées par la méthode de macro-dilution.....	107
Tableau XVII :	CMI et CMB (mg.mL^{-1}) des extraits d'acétate d'éthyle de champignons endophytes et de feuilles d'ortie déterminées par la méthode de macro-dilution.....	107
Tableau XVIII :	Composés phénoliques identifiés par LC/MS dans les extraits à l'acétate d'éthyles des champignons endophytes et des feuilles d'ortie.....	123
Tableau XIX :	Composés phénoliques identifiés par LC/MS dans les extraits aqueux des champignons endophytes et des feuilles d'ortie.....	124



Introduction

Introduction

L'utilisation des plantes à des fins curatives est aussi ancienne que l'histoire humaine. L'Homme s'est toujours intéressé à la phytothérapie et à tout ce que peuvent véhiculer les plantes médicinales comme ressources et solutions miracles. La phytothérapie est à l'origine de la médecine moderne, d'ailleurs, de nombreux médicaments de tout genre ont comme origine les plantes. La quête de nouvelles molécules thérapeutiques extraites à partir des plantes est toujours d'actualité, les nombreuses recherches entreprises dans ce domaine ont conduit à une découverte très intéressante et qui a mis en évidence la présence de microorganismes appelés endophytes. Les microorganismes endophytes colonisent toutes les parties de la plante hôte lui procurant ainsi une certaine résistance aux stress biotiques et abiotiques (Strobel, 2003).

Parmi les plantes médicinales du bassin méditerranéen, la grande ortie (*Urtica dioica* L.) appartenant à la famille des Urticaceae, est une espèce bien connue et commune, répandue dans les zones tempérées et tropicales d'Europe, d'Asie, d'Amérique et d'Afrique du nord, adaptée à une variété de conditions climatiques (Orcic et al., 2014). *Urtica dioica* L., a longtemps été utilisée comme plante curative en raison de ses effets considérables sur la santé humaine. Diverses études ont rapporté l'utilisation des feuilles d'*Urtica dioica* L. pour le traitement du diabète, de l'eczéma, des hémorroïdes, de l'inflammation du foie, de l'anémie, du rhumatisme et du cancer de la prostate (Sezik et al., 2001 ; Durak et al., 2004 ; Gülcin et al., 2004).

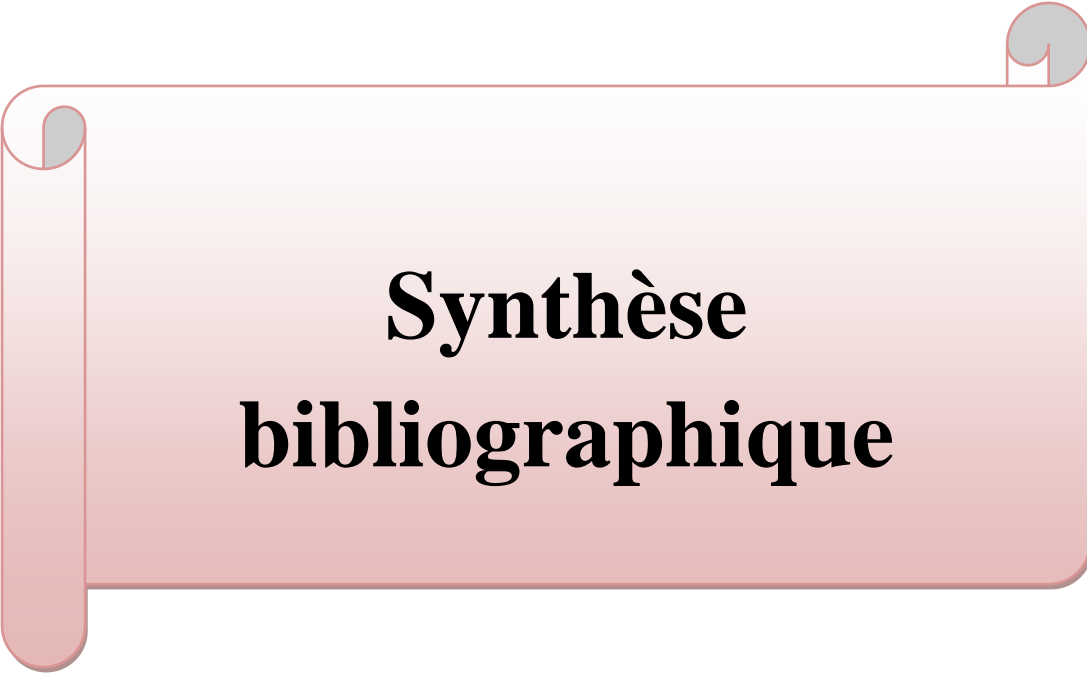
Les champignons endophytes sont les membres à dominante fonctionnelle du microbiome de la plante qu'ils colonisent (Khan et al., 2010). Chaque espèce de plante examinée jusqu'à ce jour abrite des champignons endophytes qui fournissent une large gamme de biomolécules d'intérêt pharmaceutique ou agricole, agissant comme activateurs de la croissance de la plante en favorisant sa défense contre les agents pathogènes et divers types de stress (Strobel, 2004 ; Kumaret al., 2011). Un grand nombre de composés bioactifs isolés et identifiés à partir de champignons endophytes ont des activités biologiques toutes aussi similaires à celles produites par la plante hôte. (Strobel et Daisy, 2003 ; Strobel et al., 2004 ; Sonaimuthu et al., 2010).

Toutes ces moléculaires issues du métabolisme secondaire des plantes ont été longtemps étudiées pour leur rôle dans le piégeage des radicaux libres. Ces derniers, sont des espèces réactives de l'oxygène souvent générées par diverses réactions biologiques dans notre corps

Introduction

ou par des facteurs exogènes. Ces radicaux libres provoquent un stress oxydatif qui endommage les membranes lipidiques, les protéines, les enzymes et l'ADN ce qui conduit à l'apparition de nombreuses maladies dégénératives chez l'Homme, telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le vieillissement, l'athérosclérose et les maladies inflammatoires (Fatimah et *al.*, 1998). En plus d'être une source importante de composés bioactifs à activité antioxydante, des études ont révélé que les champignons endophytes ont la capacité de rehausser l'activité des enzymes de détoxification des ROS telles que la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et la peroxydase (POD), ce qui favorise la résistance de la plante hôte à différents stress tels que la sécheresse et la salinité des sols (Zhang et *al.*, 2016 ; Zhang et *al.*, 2018).

Ce travail de thèse a pour objectif principal, d'étudier les activités biologiques des feuilles d'*Urtica dioica* et des champignons endophytes la colonisant. Nous nous proposons d'évaluer l'activité antibactérienne, antioxydante, la contenance en composés phénoliques et thiols totaux ainsi que le dosage de l'activité des enzymes de détoxification des ROS (CAT et SOD) de ces deux entités. Les activités biologiques des champignons endophytes et de leur hôte, les feuilles d'*Urtica dioica*, peuvent probablement être attribuées à la présence de biomolécules secondaires, notamment les composés phénoliques. Cette étude va également entreprendre l'indentification préliminaire par LC/MS des composés phénoliques des différents extraits étudiés ainsi que la comparaison des constituants bioactifs de ces différents organismes. Cette étude a pour visée de déterminer le potentiel pharmacologique des champignons endophytes colonisant les feuilles d'*Urtica dioica* et la mise en évidence d'une éventuelle corrélation entre cette colonisation et certaines des vertus thérapeutiques de l'ortie.



Synthèse bibliographique

1. Synthèse bibliographique

1-1. Présentation d'*Urtica dioica* L.

1-1-1. Etymologie

Le nom latin universel de la grande ortie est *Urtica dioica* Linné. Le terme *Urtica* vient du mot latin « urere » qui signifie « brûler » et qui fait allusion à ses poils urticants, dont le contact est très irritant (Brabant-Hamonic, 2004). Le nom d'espèce *dioica* donne le mot dioïque et vient du grec « dis » qui signifie deux fois et « oikos » qui signifie maison. Ce terme désigne donc un végétal dont les fleurs mâles et femelles sont portées par des pieds différents (Valnet, 1983 ; Bertrand, 2002). Par extension, le terme «urticaire» désigne toute démangeaison similaire à celle provoquée par les piqûres d'orties. Dans *Urtica dioica* L. le « L » fait référence à la classification de Carl Von Linné, fondateur de la nomenclature binominale.

Selon Bertrand, (2002), plusieurs noms vernaculaires sont attribués à cette plante :

- ✓ Appellation berbère : Azegtouf ;
- ✓ Appellation arabe : Harayig ;
- ✓ Appellation française : Ortie piquante, ortie commune, ortie dioïque, grande ortie, ortie élevée ;
- ✓ Appellation anglaise : Nettle, Common Nettle, Stinging Nettle, Tall Nettle, Slender Nettle, Great Nettle.

1-1-2. Répartition géographique d'*U. dioica* L.

L'ortie dioïque est d'origine eurasiatique ; elle est aujourd'hui retrouvée dans toute la Méditerranée et à travers le monde, dans les zones tempérées et tropicales, notamment dans toute l'Europe, ainsi qu'en Asie, en Amérique et en Afrique. Elle est même présente jusqu'à 2500 mètres d'altitude (Bertrand, 2010). L'ortie dioïque pousse en particulier près des habitations, en bordure des chemins, des routes, dans les fossés, jardins et prairies agricoles. C'est une plante qui est donc qualifiée de «rudérale» et qui forme la plupart du temps d'importants groupements (Bertrand, 2002).

Urtica dioica L. est une plante nitrophile (surtout des nitrates NO_3^-), elle est en mesure de rééquilibrer les terrains qu'elle habite, de ce fait elle est utilisée en agriculture pour améliorer les sols sur-fertilisés en azote et en phosphate. Elle est également qualifiée de plante ferreuse, régularisant ainsi la teneur en fer du sol. Elle est adaptée à une variété de conditions

Synthèse bibliographique

climatiques, grâce à son appareil photosynthétique, elle est en mesure de subsister dans des conditions de luminosité très variables (Cecchiniet Tecli, 2008). *Urtica dioica* L. est un indicateur fidèle des lieux riches en fumure, avec un pH de 6 à 7, voire plus acide. Elle apprécie les sols plutôt humides, bien drainés (plante hydrophile), à tendance argileuse, mais peut s'accommoder de tout type de sol pas trop sec (calcaire, sablonneux ou siliceux). Elle a surtout besoin d'eau au début de sa croissance. Une fois son système racinaire développé, elle résiste bien à la sécheresse (Moutsie, 2003 ; Fleurentin et Hayon, 2008).

1-1-3. Description botanique d'*U. dioica* L.

L'ortie est une plante herbacée vivace appartenant à la famille des Urticacées. Cette famille compte environ 50 genres différents et plus de 1000 espèces répertoriées dans le monde. Parmi la trentaine d'espèces du genre *Urtica*, l'une des plus connues est *Urtica dioica* L (ortie commune ou ortie dioïque) (Fennane et al., 1999) (tableau I, figure 1). Les autres principales espèces du genre *Urtica* sont : *Urtica urens* L. (ortie brûlante ou petite ortie) ; *Urtica pilulifera* L. (ortie romaine ou ortie à pilules) ; *Urtica cannabina* L. (ortie à feuille de chanvre) ; *Urtica atrovirens* (ortie noirâtre, ortie de dodart) ; *Urtica membranacea* Poire (ortie douteuse ou ortie à membranes). Seules les espèces *U. dioica* et *U. urens* sont connues pour posséder des propriétés médicinales (Fennane et al., 1999).

Tableau I : Position systématique de l'espèce *Urtica dioica* L. (*Angiosperms Phylogeny Group* (APGIII), 2009).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta (phanérogames)
Sous-embranchement	Magnoliophytina (angiospermes)
Classe	Rosidae (Magnoliopsida)
Sous classe	Rosidae dialycarpellées
Ordre	Rosales
Famille	Urticaceae
Genre	<i>Urtica</i>
Espèce	<i>Urtica dioica</i>

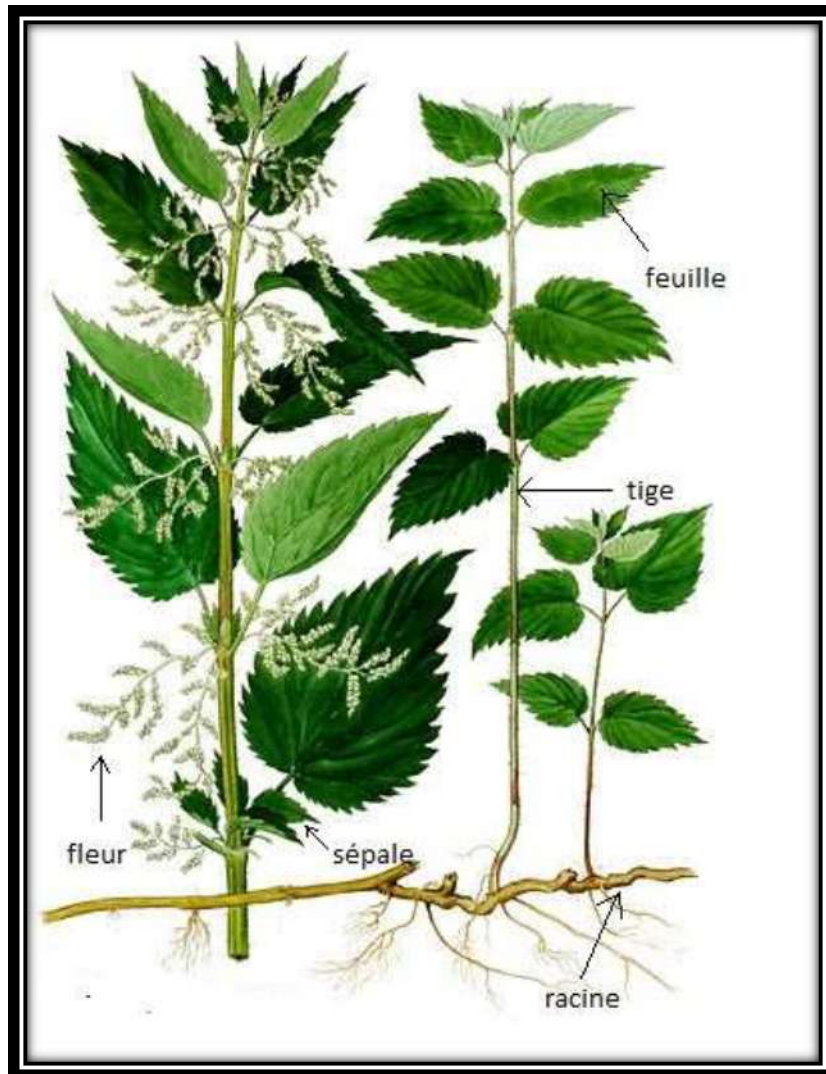


Figure 1: Planche botanique d'*Urtica dioica* L. (Reaume, 2010).

1-1-3.1. Appareil végétatif d'*U. dioica* L.

L'ortie est une plante vivace herbacée. Elle est qualifiée de dioïque, c'est-à-dire unisexuée avec des pieds mâles ou des pieds femelles, mesurant de 60 à 90cm de haut et pouvant dépasser 1m50. Elle se caractérise par ses feuilles opposées et ses petites fleurs en grappes ou en « boulettes » de couleur verdâtre (Bertrand, 2010 ; Upton, 2013).

✓ Les organes souterrains

La grande ortie est vivace, elle se propage rapidement grâce à ses organes souterrains constitués par des rhizomes cylindriques de 3 à 10 mm d'épaisseur et de longues racines de 1 à 5 mm d'épaisseur, jaunâtres et pourvues d'un chevelu de fines racines adventives (Anton et *al.*, 2003) (Figure 2).

Synthèse bibliographique

Avec les graines, les rhizomes participent à la propagation de l'ortie. Ceci est possible grâce aux stolons, des tiges rampantes qui forment des nœuds donnant naissance à de nouvelles plantes, ou grâce aux rhizomes, des tiges souterraines horizontales qui peuvent se ramifier et redonner des tiges aériennes. Ils permettent à la plante une propagation rapide de la couche superficielle d'humus. Chaque année, ils développent de nouvelles pousses (Bertrand, 2010). C'est pourquoi les massifs d'ortie peuvent devenir envahissants. Ces jeunes pousses passeront l'hiver et recommenceront à croître au début du printemps et cela, jusqu'à ce que les parties aériennes flétrissent. En cas de sécheresse, les rhizomes sont capables de s'adapter afin d'améliorer l'apport en eau à la plante (Anton et al., 2003).



Figure 2 : Racines d'*U. dioica* L. (Anton et al., 2003).

✓ La tige

La tige de la grande ortie est robuste, dressée et carrée, pleine et à section quadrangulaire et peut atteindre 1m50 de hauteur (Wichtl et Anton, 2003). Pour se protéger des insectes ravageurs, ces tiges sont couvertes de longs poils urticants et de petits poils souples (Figure 3a). Les poils tecteurs sont unicellulaires et à paroi épaisse, alors que la paroi des poils urticants possède une structure cassante et fragile comme du verre.

Le poil long est constitué d'une longue cellule, dont la base est renflée et enfoncée dans une petite excroissance de tissus épidermique et sous-épidermique (Figure 3b). Cette cellule longue et allongée ressemble à une aiguille conique. Elle est surmontée d'une boule asymétrique. Ce sont donc de minuscules ampoules transparentes, qui possèdent une paroi cellulosique et calcaire assez épaisse mais souple et qui s'affine à son extrémité (Anton et al.,

Synthèse bibliographique

2003). Leur pointe, composée de silice, se brise au moindre contact, libérant alors un liquide urticant, contenant du formiate de sodium (ou sel de sodium de l'acide formique), de l'acétylcholine, de la sérotonine et de l'histamine (Anton et *al.*, 2003).

La molécule principalement en cause de cet effet irritant chez l'ortie est l'acide formique. L'acide formique pur est liquide, incolore, d'une odeur piquante. Il est très corrosif et engendre de fortes brûlures sur la peau. La démangeaison, est quant à elle provoquée par l'histamine. La densité de piquants augmente chez les plantes broutées ou fauchées. Cela montre bien que ces micro-seringues hypodermiques lui servent à se défendre. Plus la plante se sentira menacée, plus elle fabriquera de poils. Cependant, l'ortie perd ses propriétés urticantes une quinzaine d'heures après avoir été coupée. De même, la plante est moins piquante après une pluie abondante (Anton et *al.*, 2003).

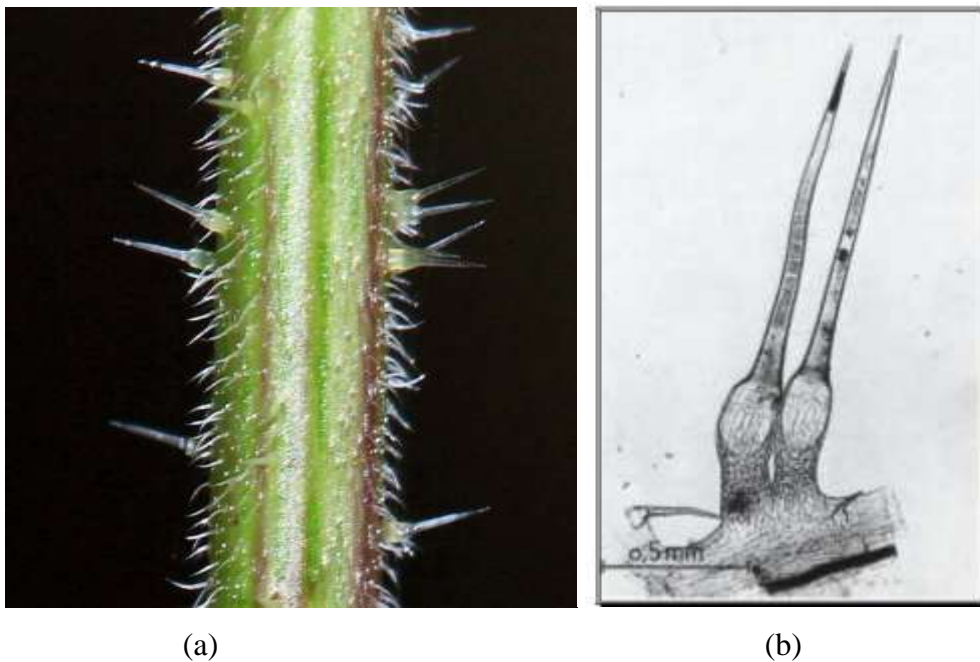


Figure 3 : (a) : Tige d'*U. dioica* L. avec des poils tecteurs et des poils urticants, (b) : poils urticants caractéristique d'*U. dioica* L. (Anton et *al.*, 2003).

✓ Les feuilles

Les feuilles de la grande ortie sont de couleur vert foncé (riche en chlorophylle), alternes ou opposées deux à deux, ovales à lancéolées, cordiformes, simples, charnues et pointues à l'extrémité du limbe (Figure 4). Elles sont en général deux fois plus longues que larges, environ 1,5-20 cm de long par 0.6-12cm de largeur. Elles sont bordées de fortes dents

Synthèse bibliographique

triangulaires. Les nervures sont proéminentes sur la face inférieure. Les cellules épidermiques renferment des corpuscules calcifiés appelés cystolithes. La forme plus ou moins allongée des cystolithes est un caractère propre aux Urticacées (Reaume, 2010 ; Upton, 2013). Ces cystolithes correspondent à des amas de cristaux de carbonate de calcium, qui sont portés par un pédicelle relié à l'épiderme de certaines feuilles ou situés également à la base de poils tecteurs (Botineau, 2010). Elles répandent une faible odeur herbacée ; leur saveur est aigrelette et astringente (Botineau, 2010).

Selon Ghedira *et al.*, (2009), le limbe et le pétiole sont couverts de trois sortes de poils : les poils urticants ; les poils tecteurs non urticants qui sont longs, coniques unicellulaires, dont la partie basilaire fortement renflée contient des cristaux de carbonates de calcium ; les poils glandulaires courts, constitués par un court pédicelle. Ces poils glandulaires et tecteurs sont surtout localisés à la face supérieure du limbe.

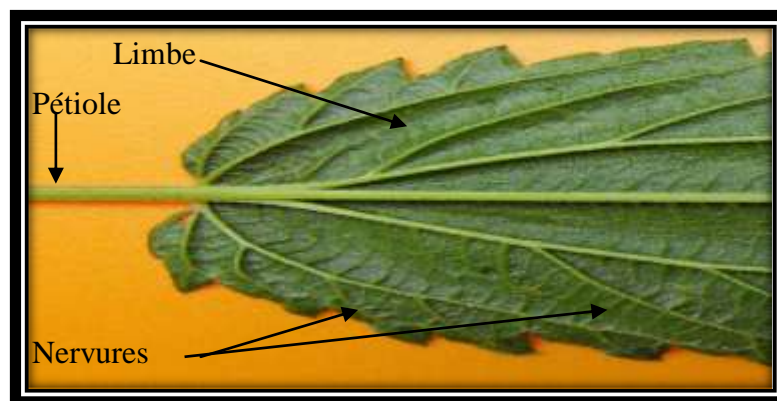


Figure 4 : Vue dorsale de la feuille d'*Urtica dioica* L. (Reaume, 2010).

1-1-3.2. Appareil reproducteur d'*U. dioica* L.

L'ortie dioïque peut se multiplier par reproduction sexuée faisant intervenir les fleurs mâles et femelles portées par des pieds différents. La pollinisation est anémophile (par le vent), grâce à des anthères explosives, qui projettent le pollen (Fleurentin et Hayon, 2008).

✓ Les fleurs

La floraison est estivale, les fleurs fleurissent de juin à octobre. Les fleurs sont petites, verdâtres, unisexuées, en grappes ramifiées bien plus longues que le pétiole avec des fructifères pendantes (Figure 5). Les fleurs mâles et femelles possèdent un périanthe apétale

Synthèse bibliographique

composé de 4 sépales réduits à de petits appendices herbacés (Figure 6). Ce périanthe est pubescent, c'est-à-dire couvert d'un duvet de poils fins et courts (Fennane et *al.*, 1999). Les fleurs femelles sont constituées de quatre sépales et d'un carpelle qui forme un ovaire supère, hérissé d'un grand stigmate nacré en pinceau (Figure 6). Ces fleurs forment des grappes retombant vers le sol (Tissier, 2009). Les fleurs mâles déployées sont de couleur jaunâtre, en forme de croix et comportent quatre étamines superposées aux sépales. Ces étamines sont différenciées en filets et en anthères (Figure 5 et 6). Les anthères s'ouvrent par des fentes longitudinales et se redressent d'un seul coup à l'éclosion de la fleur, en libérant une nuée de pollen (Fennane et *al.*, 1999 ; Tissier, 2009). Ces fleurs mâles se présentent sous forme de chatons.

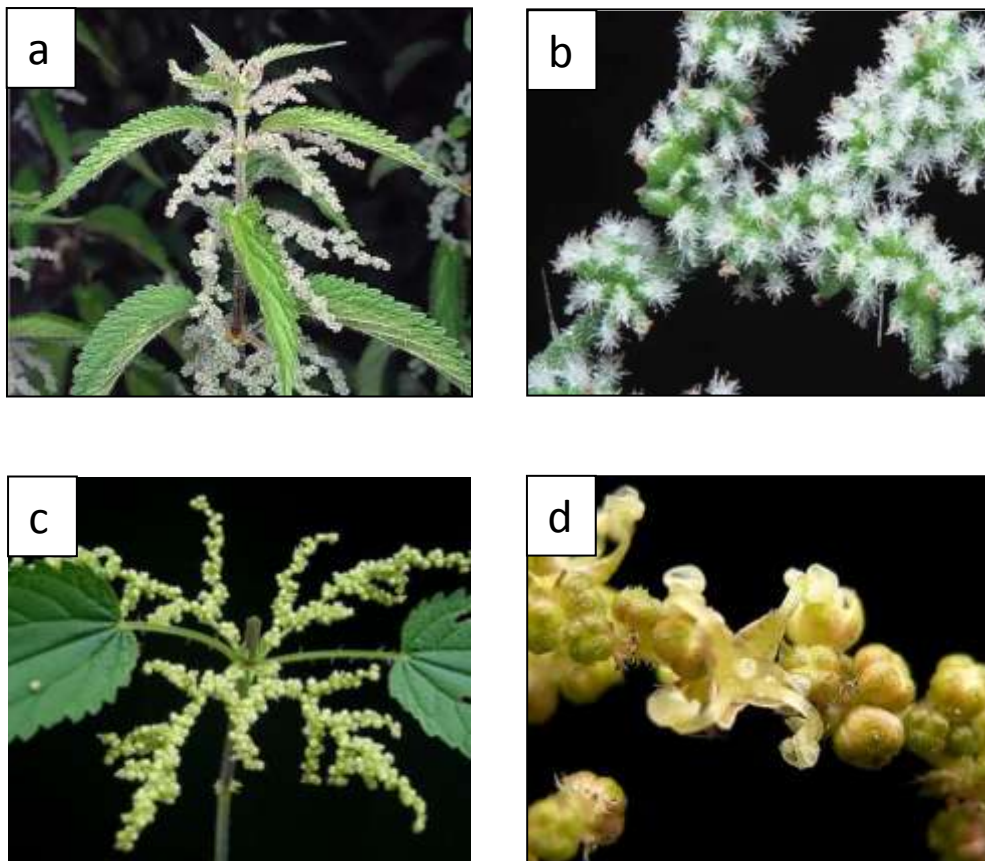


Figure 5 : (a) : pied femelle, (b) : détail des fleurs femelles, (c) : pied male, (d) : détail des fleurs males (Ghedira et *al.*, 2009).

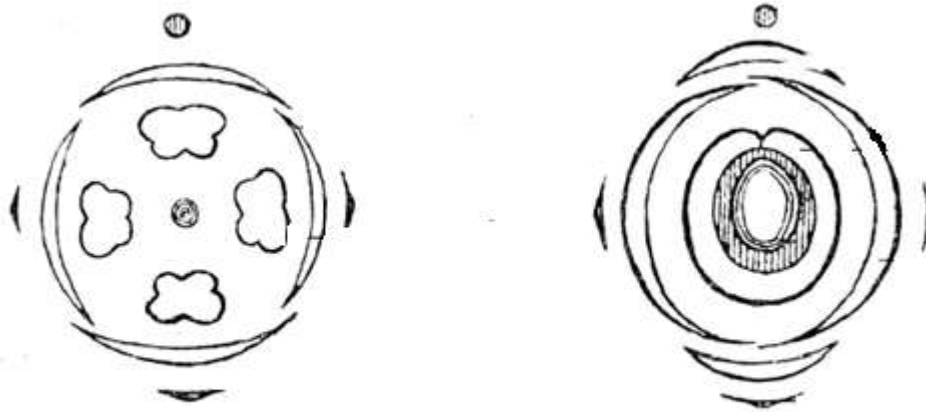


Figure 6 : Diagrammes floraux des fleurs mâles et femelles d'*U. dioica* L. (Ghedira et *al.*, 2009).

✓ Le fruit

Le fruit est une petite noix (akène), avec un calice persistant (Figure 7). Il est monosperme ovoïde, aplati, de couleur sable, marron clair à marron-verdâtre. Généralement, les fruits sont entourés de petites feuilles vertes : deux feuilles extérieures étroites et deux feuilles intérieures plus larges et plus longues. Elles s'ouvrent à maturité pour laisser tomber l'akène. Le fruit mesure 1 à 1,5 mm de longueur et 0,7 à 1 mm de largeur (Anton et *al.*, 2003 ; Ghedira et *al.*, 2009).



Figure 7 : Fruit d'*U. dioica* L. (Reaume, 2010).

1-1-4. Utilisation d'*U. dioica* L.

L'ortie est utilisée depuis plus de 2000 ans comme remède naturel pour ses propriétés thérapeutiques. Cependant, ce n'est qu'au début du XXe siècle que son importance médicinale a été largement étudiée et considérablement renforcée, à commencer par la détermination de la structure chimique des principaux agents chimiquement actifs et de leurs propriétés pharmacologiques. Il faut souligner que la plupart des indications de la médecine traditionnelle ont été validées et de nouvelles propriétés ont été découvertes (Ait Haj Said et *al.*, 2015).

De plus, compte tenu de sa composition équilibrée en protéines et de sa forte teneur en minéraux et vitamines, l'ortie s'est également révélée d'un grand intérêt nutritionnel. L'utilisation de l'ortie comme légume remonte au Ier siècle après JC (Wetherilt, 1992 ; Wetherilt, 2003). Les jeunes feuilles et les pousses tendres sont cuites comme légumes verts après blanchiment ; l'ortie était également mangée crue ou incluse dans des omelettes, de la soupe et divers plats (Wetherilt, 2003 ; Menendez-Baceta et *al.*, 2012).

Son effet piquant est largement connu (Grieve, 1931). Depuis les temps anciens, les gens ont profité de cette piqûre en frappant des membres arthritiques ou paralytiques avec de l'ortie fraîche pour stimuler la circulation et apporter de la chaleur aux articulations et extrémités dans un traitement appelé «urtication» (Green, 1824). Les romans disaient que les troupes se battaient avec de l'ortie gardée au chaud (Grieve, 1931). Cette pratique de l'urtication ou la rubéfaction est devenue une norme en médecine populaire comme remède pour l'arthrite, les rhumatismes et la paralysie musculaire et est peut-être l'usage médicinal le plus ancien de l'ortie.

L'ortie était traditionnellement utilisée pour traiter les maux d'estomac dans la médecine populaire turque (Sezik et *al.*, 2001). Les pays des Balkans utilisent les feuilles sous forme d'infusion comme remède pour le traitement de la diarrhée, des pertes vaginales et des saignements externes (Sezik et *al.*, 2001). Apparemment les anciens Égyptiens auraient également utilisé l'infusion d'ortie pour le soulagement de l'arthrite et lumbago (Harrison, 1966). En plus de tout cela, elle était également utilisée pour soulager les douleurs de la goutte, l'eczéma, l'anémie, les infections des voies urinaires, les calculs rénaux, le rhume des foies et les premiers stades d'une hypertrophie de la prostate (hyperplasie bénigne de la prostate ou HBP), soulageant les symptômes urinaires tels qu'un débit urinaire réduit, une

vidange incomplète de la vessie, un ruissellement après la miction et une constante envie d'uriner (Sökeland, 2000).

L'ortie peut être utilisée pour améliorer les sols sur-fertilisés en azote et en phosphate, pour promouvoir la biodiversité de la flore et de la faune locales, afin de produire de nouvelles matières premières agricoles de haute qualité pour la teinture, le textile et l'énergie (Dreyer et Müssing, 2000). La première tentative de considérer l'ortie comme une culture industrielle a eu lieu dans les années 1940, lorsque 150 à 200 ha étaient cultivés pour la production de fibres en Allemagne (Bredemann et Garber, 1959), et lorsqu'un programme de croisement de plantes sauvages pour la production de fibres a été établi à l'institut de botanique appliquée de Hambourg, qui a publié plusieurs clones à haute teneur en fibres (Dreyer et Müssing, 2000 ; Vogl et Hartl, 2003).

1-1-5. Composition chimique d'*U. dioica* L.

1-1-5.1. Molécules bioactives d'*U. dioica* L.

De nos jours, il est généralement admis que les effets thérapeutiques de nombreuses espèces végétales sont dus à la présence de molécules bioactives dans leurs tissus. Ces composés représentent un mécanisme de défense des plantes contre les rayons UV, les insectes et les microorganismes, mais peuvent également agir comme des pigments végétaux (Di Maro et al., 2013 ; Pacifico et al., 2019). Ces composés ont attiré une attention considérable en tant que composés thérapeutiques et agents prophylactiques dans le traitement des maladies chroniques et dégénératives (Del Rio et al., 2013 ; Pacifico et al., 2015). Il est intéressant de souligner que leur teneur est plus élevée dans les plantes spontanées que dans les plantes cultivées (Spina et al., 2008 ; Otles et Yalcin, 2015) (Tableau II). Cependant, le profil de ces molécules semble dépendre fortement des parties de la plante étudiée mais aussi du site et de la saison de récolte.

Les premières études phytochimiques sur la composition chimique de l'ortie ont été réalisées sur les extraits de racines, car ils étaient traditionnellement utilisés dans la cure de l'hyperplasie prostatique (Chaurasia et Wichtl, 1986). Les échantillons de racines provenant de cultivars méditerranéens contiendraient des composés phénoliques, tels que l'acide férulique et les polyphénols comme la naringine, l'acide ellagique, la myricétine et la rutine. Les racines contiennent également des lignanes (sécoisolaricirésinol, 9,90-bisacétyl-néo-olivil et leurs glucosides), phytostérols (par exemple, -sitostérol), isolectines, principalement l'*U. dioica* agglutinine, coumarines (par exemple, scopolétine), phénols simples (par exemple, p-

Synthèse bibliographique

hydroxy-benzaldéhyde), les acides triterpénoïques et les monoterpénoïdiols (Krauss et Spitteler, 1990 ; Otles et Yalcin, 2015). Les racines d'ortie contiennent également isolectines, principalement *U. dioica* agglutinine (UDA). Cette lectine est quelque peu unique. Elle a un faible poids moléculaire (8 à 9 kDa) et se compose d'une seule chaîne polypeptidique de moins de 100 acides aminés (Van Damme et *al.*, 1988). L'UDA a une activité immunomodulatrice et semble limiter les manifestations auto-immunes (Saul et *al.*, 2000).

Outre une analyse phytochimique approfondie des racines d'*U. dioica*, d'autres parties de l'ortie ont été largement étudiées pour leur composition chimique. Les feuilles d'*U. dioica* sont constituées par des glycosides flavonoïdes, principalement des flavonolsrutinosyl, ainsi que par différents dépôts d'acide hydroxycinnamique et d'acide quinique ou malique. L'acide chlorogénique et l'acide caffeoyl malique représentaient environ 76,5% des composés phénoliques totaux, tandis que la rutine était le dérivé de flavonol le plus abondant (Otles et Yalcin, 2015 ; Pinelli et *al.*, 2008). L'isorhamnetin-3-O-rutinoside a été trouvé, ainsi que la rutine, la quercétine-3-O-glucoside et le kaempférol-3-O-glucoside dans des extraits méthanoliques de feuilles et de tiges d'*U. dioica* (Akabay et *al.*, 2003).

Les premières études faites sur les constituants des poils urticants des feuilles fraîches d'*U. dioica* ont identifié la 5- hydroxytryptamine (sérotonine) (Collier et Chesher, 1956 ; Vialli et *al.*, 1973), acétylcholine, histamine et de petites quantités de leucotriènes (Czarnetzki et *al.*, 1990). Frank et *al.* (1998) ont confirmé la présence de sérotonine (5 ng par poil, 0,2 mg / kg de feuille fraîche), d'histamine (0,01 g par poil, 30 mg / kg de feuille fraîche) et d'acétylcholine (0,1–0,2 g par poil, 20 mg / kg de feuilles fraîches). En association avec la choline acétyl transférase, l'acétylcholine se trouve dans les homogénats de feuilles d'*U. dioica* (Barlow et Dixon, 1973). L'activité enzymatique de la choline acétyl transférase, qui produit de l'acétylcholine, est environ deux fois supérieure chez *U. dioica* à celle des autres plantes contenant de l'acétylcholine (Smallman et Maneckjee, 1981). L'histamine et l'acétylcholine des poils urticants se retrouvent également dans les feuilles d'*Urtica* se séparant des poils (Emmelin et Felfberg, 1947).

Tableau II : Molécules bioactives d'*U. dioica* L. (Ait Haj Said et al., 2015)

Partie de la plante utilisée	Composition chimique	
Parties aériennes	Flavonoïdes	Quercétine-3-O-rutinoside (rutine), kaempférol-3-O-rutinoside et isorhamnetin-3-O-glucoside.
	Acides organiques	Acide caféique et ses esters, acide férulique, acides chlorogénique, citrique, fumarique et phosphorique
	Huile essentielle	Carvacol, carvone, naphthalène, (E) -anethol, hexahydrofarnesyl acetone, (E) -geranyl cétone, (E) - β -ionone et phytol
	Vitamines	Vitamine A (rétinol), vitamine B2 (riboflavine), vitamine B5 (acide pantothénique), vitamine B9 (acide folique), vitamine C (acide ascorbique), vitamine K (phylloquinone).
	Autres constituants	Tanins, chlorophylle et caroténoïdes.
Racines	Flavonoïdes	Myricétine, quercétine, kaempférol, quercétine-3-O-rutinoside (rutine), kaempférol-3-O-rutinoside et isorhamnetin
	Lectines	Agglutinine <i>Urtica dioica</i> (UDA)
	Phytostérols	β -sitostérol ; β -sitostérol-3-O- β -glucoside, (6'-O-palmitoyl)-sitostérol-3-O- β -D-glucoside ; 7β – hydroxysitostérol; 7α -hydroxysitostérol; 7β -hydroxysitostérol- β -D-glucoside; 7α -hydroxysitostérol- β -glucoside; 24R-éthyl-5 α -cholestane-3 β , 6 α -diol; stigmastérol, campestérol, stigmast-4-en-3-on, hécogénine.
	Lignanes	éo-olivil, sécoisolaricirésinol, alcool déshydrodiconiférylique, isolaricirésinol, pinorésinol et 3,4-divanillyltétrahydrofurane
	Coumarines	Scopolétine
Fruits (graines)	Caroténoïdes	β -carotène, lutéine et violaxantine

1-1-5.2. Valeur nutritionnelle d'*U. dioica* L.

L'aspect nutritionnel d'*U. dioica* est essentiellement dû à deux parties de plante : les feuilles et les graines vertes. Il est cependant nécessaire de signaler que de grandes variations ont été observées dans le contenu nutritionnel de la plante en raison de la variation des saisons et régions des récoltes. Les feuilles sont riches en protéines, matières grasses, glucides, vitamines, minéraux et oligo-éléments (Tableau IV). Les protéines peuvent représenter jusqu'à 30% de la masse sèche (Pradhan et *al.*, 2015), dont 70% sont des protéines digestibles (Bombardelli et Morazzoni, 1997). En outre, la teneur en protéines des feuilles couvre largement les besoins en acides aminés, en particulier les acides aminés essentiels pour l'homme (Wetherilt, 1992 ; Rutto et *al.*, 2013).

Les fractions lipophiles des teintures homéopathiques matricielles (HMT) d'*U. dioica* a été étudiée pour déterminer les caractéristiques qualitatives et le contenu quantitatif des acides aminés (Tableau III). 18 acides aminés ont été identifiés dans les feuilles, le rhizome et les graines dont la teneur totale variait de 0,23 à 13,5%. L'acide aspartique, la thréonine, la sérine et l'alanine dominaient dans les feuilles, l'acide aspartique et l'alanine dans les racines, l'acide aspartique, la thréonine et la sérine dans les graines. La plupart des acides aminés étaient présents sous forme libre ou liée. Acide aspartique, asparagine, acide glutamique, l'alanine et la thréonine étaient les plus dominants, l'histidine a été trouvée sous forme liée, tandis que le tryptophane n'a pas été observé dans tous les échantillons analysés (Rafajlovska et *al.*, 2013).

La biomasse déprotéinée de l'ortie peut constituer jusqu'à 52,4% de la biomasse de la plante sèche, 69,5 g / kg de polysaccharides non amylacés tels que la pectine, l'hémicellulose et la cellulose ont été retrouvés à 196,7, 334,5 et 128,5 g / kg, respectivement. L'ortie peut être une source importante de fibres alimentaires en raison de sa forte teneur en pectine (DeLeo et *al.*, 1993). Les feuilles d'*U. dioica* contiennent également de la chlorophylle dont 75% de α -chlorophylle et 25% de β -chlorophylle (Lezhneva et *al.*, 1986).

Tableau III : Composition des acides aminés libres et liés dans les feuilles d'*U. dioica* (%)
(Yunuskhodzhaeva et *al.*, 2014).

Acides aminés	Libres	Liés
Asp	0,11	0,58
Thr*	0,01	0,20
Ser	0,09	0,25
Glu	0,07	0,97
Pro	0,015	0,16
Gly	0,021	0,30
Ala	0,032	0,31
Val*	0,052	0,37
Met*	0,008	0,02
Ile*	0,1	0,15
Leu*	0,14	0,48
Tyr	0,040	0,14
Phe*	0,074	0,19
His*	0,004	0,14
Lys*	0,014	0,12
Arg	0,134	0,49
Total, %	1,238	4,87

(*) : Acides aminés essentiels.

La grande ortie contient également des acides gras qui étaient principalement présents sous forme d'éthyle esters (Peumans et *al.*, 1984). L'acide palmitique, stéarique, oléique, linoléique et linoléique ont été trouvés. Guil-Guerrero et *al.*, (2003) ont constaté que l'acide linoléique était l'acide gras prédominant dans les feuilles, tandis que les graines sont plus riches en l'acide linoléique.

La teneur en substances minérales est d'environ 20% de la masse sèche (Chrubasiket *al.*, 2007 ; Pradhanet *al.*, 2015). L'ortie est riche en fer, zinc, magnésium, calcium, phosphore et potassium (Tableau IV). La teneur en feuilles de cobalt, nickel, molybdène et sélénium a également été déterminée (Mihaljevet *al.*, 2014). La composition en vitamines est très variée (Tableau IV). Elle contient à la fois des vitamines liposolubles A, D, E et K, ainsi que des quantités importantes de vitamines hydrosolubles, telles que la vitamine C et les vitamines B (B1, B2, B3, B9) (Wetherilt, 1992).

Tableau IV : Composition nutritionnelle d'*U. dioica* (Wetherilt, 1992 ; Kavalali, 2003 ; Sekeroglu et *al.*, 2006 ; Rutto et *al.*, 2013 ; Pradhan et *al.*, 2015).

Energie		99.7 kcal
Eau		65%
Protéines		8,9%
Lipides		2%
Carbohydrates		16,5%
Fibres		5,3%
Minéraux mg / 100 g de matière sèche	Magnésium, Mg	3560
	Phosphore, P	75
	Potassium, K	917,2
	Sodium, Na	16
	Calcium, Ca	5090
	Fer, Fe	30,30
Oligo-éléments mg / 100 g de matière sèche	Zinc, Zn	3,033
	Cobalt, Co	0,018
	Cuivre, Cu	1.747
	Manganèse, Mn	5,784
	Molybdène, Mo	0,4265
	Sélénium, Se	0,0074
Vitamines mg / 100 g de feuilles fraîches	Thiamine	0,01
	Riboflavine	0,23
	Niacine	0,62
	Vitamine B6	0,068
	Vitamine C	238
	Pro-Vitamine A	5
	Vitamine E	14,4

1-1-6. Activité biologique d'*U. dioica* L.

1-1-6.1. Activité antioxydante d'*U. dioica* L.

Les radicaux libres ont été associés aux troubles de la pathogenèse comme le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires, les maladies auto-immunes, les troubles neuro-dégénératifs et sont impliqués dans le vieillissement. Les antioxydants apparaissent comme des agents prophylactiques et thérapeutiques piégeant les radicaux libres ou les espèces réactives d'oxygène et empêchent leur effet néfaste (Ratnam et *al.*, 2006).

L'aspect fonctionnel le plus important et le mieux caractérisé d'*U. dioica* est l'activité antioxydante. C'est une bonne source de polyphénols et de composés phytochimiques liés à sa forte activité antioxydante. Plusieurs tests antioxydants comme le pouvoir réducteur, le piégeage du peroxyde d'hydrogène, le piégeage des radicaux libres, le piégeage des anions superoxydes, et les activités de chélation des métaux ont été utilisés pour évaluer ses propriétés antioxydantes. Leur activité antiradicalaire sur l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$, le radical hydroxyle OH° et le radical oxyde nitrique NO° a été déterminée par spectrophotométrie. De nombreuses études ont montré que les extraits méthanoliques et éthanoliques de feuilles ont un effet antioxydant remarquable sur le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) (Gulcin et *al.*, 2004 ; Katakai et *al.*, 2012 ; Khare et *al.*, 2012). La chélation du fer ferreux a été évaluée à l'aide de ferrozine, qui forme un chromophore rouge avec le fer résiduel (Fe^{2+} -ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. L'absorbance obtenue montre que l'ortie a une activité chélatante importante des ions ferreux (Gulcin et *al.*, 2004).

La peroxydation lipidique entraîne le développement de rancissement, d'odeurs et de goûts désagréables provoquant ainsi des changements de couleur et des pertes nutritionnelles. L'extrait aqueux de l'ortie a montré une inhibition importante sur la peroxydation lipidique de l'acide linoléique. Ainsi, cet extrait s'est révélé avoir une puissante activité antioxydante et peut être utilisé comme additif alimentaire possible ou dans l'industrie pharmaceutique (Gulcin et *al.*, 2004).

Seules quelques expérimentations animales ont été menées pour déterminer l'activité antioxydante de l'ortie et de nombreuses recherches sont nécessaires dans ce domaine en soutenant la vaste littérature disponible sur l'activité antioxydante *in vitro* de l'ortie. Dans une étude, des rats albinos Wistar ont été traités avec du tétrachlorure de carbone (CCl_4) pendant 60 jours. Le traitement par CCl_4 a entraîné une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution des niveaux d'enzyme antioxydante. Cependant, le traitement par l'ortie

pendant 60 jours a diminué la peroxydation lipidique élevée et a également augmenté les niveaux d'enzyme antioxydante réduits chez les rats traités au CCl₄, jouant ainsi un rôle protecteur contre l'hépatotoxicité, Cette activité antioxydante est essentiellement corrélée à la teneur en composés phénoliques (Kanter et *al.*, 2005 ; Ofokansi et *al.*, 2005 ; Kataki et *al.*, 2012). Dans une autre étude, des rats Wistar en bonne santé ont été utilisés et nourris avec de l'ortie séchée et hachée mélangée à de la nourriture de laboratoire normale. La résonance de spin électronique a été utilisée pour mesurer le niveau de stress oxydatif. On a constaté que la supplémentation en ortie diminue la concentration de radicaux libres dans cervelet ainsi que le lobe frontal du cerveau du rat et donc a été considéré comme un antioxydant efficace (Toldy et *al.*, 2005).

De nombreuses études indiquent que les flavonoïdes sont capables de moduler le système immunitaire. Cet effet modulateur des parties aériennes de l'ortie a été étudié sur des souris, à l'aide d'un extrait éthanolique, pris par voie orale pendant 14 jours. Les activités d'enzymes telles que le cytochrome P450, la lactate déshydrogénase (LDH) et la NADPH-cytochrome P450 réductase ont montré une diminution significative tandis que les enzymes antioxydantes ont montré une augmentation significative. En outre, la plante a également montré un effet modulateur sur les enzymes du rein, du poumon et de l'estomac, telles que la glutathion-S-transférase, la superoxyde dismutase et la catalase (Ozen et Korkmaz, 2003). La quercétine-3-O-rutinoside, le kaempférol-3-O-rutinoside et l'isorhamnetin-3-O-glucoside présents dans les parties aériennes de l'ortie contribuent à l'activité immunomodulatrice (Akabay et *al.*, 2003 ; Bhuwan et *al.*, 2014). De plus, l'effet immunomodulateur de l'UDA isolé des racines a été démontré dans plusieurs études qui élucident leur action sur les lymphocytes T, les macrophages, les thymocytes et sur la libération de TNF α (Wagner et *al.*, 1994).

1-1-6.2. Activité antimicrobienne d'*U. dioica* L.

La présence de composés phénoliques dans les plantes indique que ces plantes peuvent être des agents antimicrobiens (Ofokansi et *al.*, 2005). Plusieurs études faites sur différents extraits de la plante rapportent que l'ortie présente une activité antimicrobienne notable contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* IP 5832, *Lactobacillus plantarum* 299v (*Lp299v*)) les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*) et certaines levures (*Candida albicans*), par rapport aux composés antimicrobiens standard tels que

l'ofloxacine, le nitrate de miconazole, l'acide amoxicilline-clavulanique et la netilmicine (Brantner et Grein, 1994 ; Keles et *al.*, 2001 ; Gulcin et *al.*, 2004 ; Dar et *al.*, 2012 ; Kukric et *al.*, 2012 ; Singh et *al.*, 2012 ; Mahmoudi et *al.*, 2014). L'extrait alcoolique d'*U. dioica* a montré une activité fongicide contre *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* (Hadizadeh et *al.*, 2009 ; Yigit et *al.*, 2009). L'ortie a également montré une activité nématodocide contre les larves de *Haemonchus contortus* (Lopez-Aroche et *al.*, 2008).

En ce qui concerne l'activité antivirale, il s'avère que la lectine spécifique à la N-acétyl glucosamine d'*Urtica dioica* est un puissant inhibiteur de la formation de syncytium entre les cellules HUT-78 et les cellules CD4 + Molt / 4, infectées en permanence par le VIH-1 et le VIH-2 (Balzarini et *al.*, 1992). Le site de liaison au mannose du virus VIH est très sensible après une mutation du VIH. Cependant, la région N-acétyl glucosamine est le site conservé. Par conséquent, l'extrait d'*U. dioica* possède une affinité pour la région N-acétyl glucosamine présentant une meilleure activité anti-VIH. D'autres extraits de plantes présentent une spécificité pour la N-glycosylation du GP-120 ce qui peut servir de meilleure alternative pour empêcher le développement d'une résistance aux médicaments (Balzarini et *al.*, 2005). L'extrait aqueux de la plante indique une inhibition significative du développement de syncytia à faibles doses (0,5-1µg/ml) et a augmenté lorsque la concentration a augmenté jusqu'à atteindre un niveau d'inhibition de 84% qui a cependant commencé à montrer des effets cytotoxiques (Uncini et *al.*, 2005).

1-1-6.3. Activité antidiabétique et antihyperlipidémique d'*U. dioica* L.

Une étude menée pour évaluer l'activité antidiabétique *in vivo*, a montré l'effet hypoglycémiant d'extraits aqueux des feuilles d'ortie sur des rats diabétiques. Ces résultats s'expliquent par l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose (Bnouham et *al.*, 2003). De plus les extraits aqueux et méthanolique des feuilles (250mg/kg) ont montré un effet hypoglycémiant significatif dans le diabète induit par l'alloxane chez le rat (Bnouham et *al.*, 2003 ; Al-Wasfi et *al.*, 2012). Il a également été démontré que l'administration d'extrait hydro-alcoolique de feuilles chez le rat mâle avec une résistance à l'insuline induite par le fructose diminue le taux de glucose sérique (Ahangarpour et *al.*, 2012). En parallèle, des études réalisées sur les îlots de Langerhans ont démontré l'action stimulante de l'ortie sur la sécrétion d'insuline, accompagnée d'une baisse de la glycémie. Des tests réalisés sur des rats

diabétiques normaux et des rats dont le diabète a été induit par la streptozotocine, après injection intra péritonéale d'extraits aqueux, ont confirmé ce résultat (Farzami et *al.*, 2003).

La plante présente aussi une activité antihyperlipidémique potentielle car elle abaisse les concentrations de lipides et de lipoprotéines dans le sang. L'extrait aqueux à 150 mg / kg administré pendant 30 jours à des rats nourris avec une alimentation normale ou enrichie en graisses, a amélioré le profil lipidique sanguin. L'extrait a entraîné une diminution du cholestérol total et une diminution des ratios du cholestérol faible densité / cholestérol haute densité (LDL/HDL) en abaissant la teneur en LDL et en apoprotéine plasmatique totale B (Daher et *al.*, 2006). L'extrait éthanolique de la plante à des doses de 100 et 300 mg / kg a montré une réduction significative du taux de cholestérol total et de LDL chez les rats hypercholestérolémiques (Nassiri-Asl et *al.*, 2009 ; Saad et *al.*, 2017).

1-1-6.4. Activité analgésique, anti-inflammatoire et antiarthritique d'*U. dioica* L.

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de l'ortie à diminuer la réponse inflammatoire, à travers de multiples mécanismes dont les conséquences sont la réduction de la synthèse des médiateurs lipidiques et des cytokines pro-inflammatoires. En effet, les extraits de feuilles inhibent la biosynthèse des enzymes en cascade de l'acide arachidonique, en particulier les cyclooxygénases COX-1 et COX-2, bloquant ainsi la biosynthèse des prostaglandines et des thromboxanes (Roschek et *al.*, 2009). De plus, un effet inhibiteur a été démontré sur le système NF-kappaB, une famille de facteurs de transcription qui sont essentiels pour l'expression inductible de nombreux gènes impliqués dans les réponses inflammatoires, (Riehemann et *al.*, 1999 ; Farahpour et Khoshgozaran, 2015) et le PAF (Platelet Activating Factor) (Roschek et *al.*, 2009). Il a été démontré que l'extrait méthanolique de l'ortie aux doses de 200 et 400mg/kg inhibe les contractions abdominales induites par l'acide acétique et l'œdème de la patte induit par la carraghénane chez le rats et la souris (Hajhashemi et Klooshani, 2013). L'injection de N-méthyl-D-aspartate (NMDA) a montré une lésion cérébrale et une inflammation subséquente chez les rats Wistar, la perfusion de suppléments en feuilles d'*Urtica dioica* réduit de manière significative l'activité de liaison du facteur nucléaire kappa B (NF-kB) à l'ADN, ce qui suggère un effet anti-inflammatoire (Obertreis et *al.*, 1996 ; Toldy et *al.*, 2009).

Les extraits de feuilles d'ortie, sont utilisés comme remède anti-inflammatoire dans la polyarthrite rhumatoïde. Le traitement avec l'extrait inhibe fortement le facteur de

transcription NF- κ B. Un effet inhibiteur est montré dans différents types de cellules, y compris les cellules T, les macrophages, le fibrosarcome et les cellules épithéliales, ainsi qu'en réponse à plusieurs stimuli, suggérant que les extraits d'*Urtica* interféraient avec une cible commune dans la voie NF- κ B. Cette étude révèle que les extraits d'*Urtica* stabilisent l'inhibiteur NF- κ B- α en empêchant sa dégradation protéolytique. Les processus inflammatoires étant strictement dépendants de l'activité de NF- κ B, ces résultats suggèrent une base moléculaire pour les effets anti-inflammatoires des extraits d'*Urtica* (Riehemann et *al.*, 1999).

En parallèle, d'autres études ont montré que l'extrait de feuilles réduit la libération des interleukines IL-2 et IL-1 β , de l'interféron γ (IFN γ) et des facteurs de nécrose tumorale TNF- α et TNF- κ (Konrad et *al.*, 2005 ; Yilmaz et *al.*, 2014). Par conséquent, l'effet anti-inflammatoire des feuilles d'ortie suggère qu'il peut être utile dans les maladies inflammatoires aiguës mais également dans les maladies chroniques, comme la polyarthrite rhumatoïde. Dans une étude (*in-vitro*), la préparation commerciale des feuilles d'*U. dioica* (IDS-23) ont été ajoutées au sang humain total, ce qui a entraîné une inhibition de la sécrétion de TNF α et IL-1 β stimulée par le LPS, en corrélation avec l'ingestion de médicament. Cette préparation a également inhibé la production stimulée par la phytohémogglutinine de l'interleukine-2 (IL-2) spécifique à la cellule T auxiliaire 1 (Th1) et de l'interféron- γ (IFN γ) en culture en fonction de la dose jusqu'à 74%. Ce qui suggère que l'extrait de feuille d'ortie agit en médiant un changement dans les profils de cytokines dérivées des cellules T auxiliaires et peut inhiber la cascade inflammatoire dans les maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde (Klingelhoef et *al.*, 1999).

De plus, les constituants bioactifs de l'extrait d'ortie inhibent les enzymes hématopoïétiques prostaglandine D2 (HPGDS), cyclooxygénase-1 (COX-1), cyclooxygénase-2 (COX-2), inhibant ainsi la production de prostaglandine (Roschek et *al.*, 2009). L'effet anti-inflammatoire d'*U. dioica* peut être dû à la présence de quercétine. Ce qui semble être dû aux effets inhibiteurs et antioxydants de la quercétine sur les enzymes produisant l'inflammation comme la cyclooxygénase, la lipoxygénase et également à l'inhibition des médiateurs inflammatoires, y compris les leucotriènes et les prostaglandines (Koch et *al.*, 1995). L'activité anti-inflammatoire de l'ortie peut aussi être due à l'inhibition de l'élastase leucocytaire humaine, ainsi l'extrait éthanolique des racines d'ortie inhibe l'élastase des leucocytes bovins (IC₅₀ 68 μ g/mL) (Starvic, 1994).

Comme il a été démontré que l'activité anti-inflammatoire *in vitro* d'extrait d'ortie a entraîné l'inhibition de plusieurs événements inflammatoires clés qui provoquent les symptômes d'allergies saisonnières. L'activité antiallergique de l'ortie est principalement due à deux mécanismes. En plus de son inhibition des récepteurs histaminiques H1, l'ortie inhibe la tryptase des mastocytes en empêchant la dégranulation et la libération ultérieure d'une gamme de médiateurs pro-inflammatoires qui provoquent des symptômes allergiques liés au rhume des foins tels que les éternuements, la congestion nasale, démangeaisons et larmoiements (Roschek et *al.*, 2009). Dans une étude randomisée en double aveugle chez des patients allergiques atteints de rhinite allergique, une amélioration des symptômes a été observée après une semaine de traitement (Mittman, 1990).

En plus de son action anti-inflammatoire, l'ortie a un effet analgésique, prouvé *in vivo* chez le rat et la souris. L'extrait aqueux des feuilles à la dose de 1200 mg/kg est capable de réduire la stimulation thermique dans le test de la plaque chauffante à 55°C et provoque une plus grande résistance à la douleur (Tita et *al.*, 1993).

1-1-6.5. Activité diurétique et hypotensive d'*U. dioica* L.

Il a été rapporté que l'extrait aqueux de plante produisait des effets diurétiques et natriurétiques chez le lapin (Dizaye et *al.*, 2013). L'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante a été administré à faible dose (4 mg / kg / h) et à forte dose (24 mg / kg / h), ce qui a montré un effet de diurèse par augmentation de la diurèse (11 et 84% respectivement) et de la natriurèse (28 et 143% respectivement). Par conséquent, la plante s'est avérée avoir un effet diurétique potentiel (Tahri et *al.*, 2000). A cet effet, 32 patients atteints d'insuffisance veineuse myocardique ou chronique ont été traités avec 15 ml de jus d'ortie trois fois par jour pendant 2 semaines. Une augmentation significative du volume quotidien d'urine a été observée tout au long de l'étude, le volume au jour 2 étant de 9,2 % supérieur à la valeur de base chez les patients atteints d'insuffisance myocardique et de 23,9% supérieur à la valeur de base chez ceux souffrant d'insuffisance veineuse chronique. Il a été proposé que l'activité diurétique des extraits aqueux d'ortie puisse être attribuée à la forte teneur en potassium (Szentmihalyi et *al.*, 1998).

Dans une autre étude *in vivo*, 18 lapins domestiques ont été utilisés. Une augmentation significative du volume d'urine et de l'excrétion urinaire de Na⁺ et sans modification significative des taux d'excrétion de K⁺ chez les lapins expérimentaux a été observée, en raison d'une perfusion intraveineuse de 20mg/ml d'extrait de feuilles séchées d'*U. dioica*.

Aucune vasodilatation ou vasoconstriction des artères pulmonaires isolées du lapin ne s'est produite après l'application de l'extrait aqueux d'*U. dioica* (Dizaye et al., 2013).

Une enquête a été entreprise dans différentes régions du Maroc oriental pour sélectionner les principales plantes médicinales utilisées pour l'hypertension artérielle, et *U. dioica* faisait partie des 18 espèces végétales utilisées pour l'hypertension artérielle (Ziyyat et al., 1997). Le résultat hypotenseur pourrait être dû à la propriété diurétique de l'extrait végétal (Brenner, 2001). Le diurétique est considéré comme l'un des meilleurs choix pour le traitement et la gestion de l'hypertension non compliquée. Et c'est dans le même contexte que des injections intraveineuses d'un extrait aqueux des parties aériennes de l'ortie, utilisant deux concentrations : 4 et 24mg/kg/h, ont entraîné une chute de la pression artérielle de 15% et 38% proportionnellement à la dose administrée. Cette diminution était corrélée à une augmentation de la diurèse et de la natriurèse. Cependant, l'effet hypotenseur était réversible après une heure si une faible concentration (4mg/kg/h) avait été utilisée, alors qu'il persistait lors de l'utilisation d'une concentration élevée (24mg/kg/h) (Tahri et al., 2000). De plus, les extraits de racines testés sur des morceaux isolés d'aorte vaso-rétrécie ont montré une activité relaxante. Cet effet vasodilatateur est dû à la libération de l'oxyde endothélial d'azote, à l'ouverture des canaux potassiques et à une action inotrope négative (Testai et al., 2002).

1-1-6.6. Activité antiproliférative et anticancéreuse d'*U. dioica* L.

L'extrait aqueux de plante a été étudié pour son activité cytotoxique contre les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 et MDA-231 en utilisant le test de cytotoxicité des cellules XTT. Sur les cellules MCF-7, la valeur de la IC50 à la 48ème heure était de 34µg/ml, une augmentation de la concentration l'extrait aqueux jusqu'à 29,2µg/ml a été utilisée pour réduire la viabilité des cellules MDA-231 à 43% (Guler, 2013). L'extrait aqueux des racines des plantes a démontré une inhibition, dose dépendante, de la liaison de la globuline à son récepteur et inhibition directe de la prolifération cellulaire des cellules HeLa, tout en bloquant la liaison du facteur de croissance épidermique à son récepteur (Durak et al., 2004).

D'autres études ont révélées que les lignanes de l'extrait de racines inhibent non seulement la liaison des androgènes à leurs protéines transporteuses SHBG (Sex Hormone Binding Globulin), mais également la liaison de ces protéines aux récepteurs membranaires de la prostate, inhibant ainsi leur activité proliférative sur les tissus de la prostate (Hryb et al., 1995 ; Schöttner et al., 1997 ; Chrubasik et al., 2007). L'extrait de racine réduit la production d'œstrogènes par inhibition de l'aromatase, diminuant ainsi la conversion des androgènes en

œstrogènes (Gansser et Spiteller, 1995). En outre, il a été mentionné que les extraits de racines inhibent l'activité enzymatique de la membrane des cellules de la prostate, ce qui arrêterait sa croissance (Hirano et *al.*, 1994 ; Chrubasik et *al.*, 2007).

1-1-6.7. Efficacité de l'*U. dioica* L. dans l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP)

Dans l'hypertrophie non cancéreuse de la prostate, appelée hyperplasie bénigne de la prostate, plusieurs rapports affirment que jusqu'à 80% des hommes européens atteints d'HBP ont le choix entre des remèdes à base de plantes pour leurs symptômes, y compris le palmier nain et les racines d'ortie, plutôt que des médicaments ou une intervention chirurgicale. Des études chez l'homme suggèrent que la racine de l'ortie, en combinaison avec d'autres herbes, en particulier le palmier nain, peut être un traitement efficace pour l'HBP, soulageant les symptômes urinaires tels que la réduction du débit urinaire, la vidange incomplète de la vessie, le ruissellement après la miction et l'envie constante d'uriner (Sökeland, 2000).

Certaines études réalisées chez l'animal indiquent que des préparations à base des racines d'ortie dioïque peuvent inhiber l'augmentation de taille de la prostate. Au niveau cellulaire, les extraits d'*Urtica dioica* semblent inhiber la prolifération et le métabolisme cellulaire, et cela se reflète sur le plan histologique par l'augmentation du volume des noyaux cellulaires. (Chrubasik et *al.*, 2007).

D'autres études ont montré que l'efficacité de la racine de l'ortie dans le traitement des symptômes de HBP est due à ses propriétés antiprolifératives, qui se caractérisent entre autre par une inhibition des facteurs de croissance, ainsi qu'une inhibition de l'enzyme aromatase et une interaction avec la protéine de transport des hormones sexuelles SHBG. En 1995, Ganber et Spiteller ont étudié les extraits méthanoliques de racines d'ortie dioïque pour leur effet inhibiteur, *in vitro*, sur l'aromatase. L'inhibition de l'enzyme était détectée seulement après séparation par chromatographie. Les effets inhibiteurs sur l'aromatase ont pu être démontrés pour une variété de composés appartenant à différentes classes. Ces composés sont les suivants : le secoisolariciresinol, l'acide oléanique, l'acide ursolique, l'acide (9Z, 11E)-13-hydroxy-9, 11-octadécadiénoïque et le 14-octacosanol (Ganber et Spiteller, 1995). Dans une autre étude, Schmidt, en 1983 a montré que l'extrait éthanolique de racine d'ortie inhibe de façon compétitive la liaison de dihydrotestostérone aux SHBG. Les constituants de l'extrait responsables de cet effet ont été identifiés, ce sont des molécules appartenant à la famille des lignanes dont le secoisolaricirésinol et le néoolivil (Schmidt, 1983).

1-2. Champignons endophytes

1-2-1. Définition

Les champignons endophytes sont un groupe dominant de micro-organismes qui colonisent les tissus internes de la plante sans provoquer de symptômes dans leur cycle de vie (Carroll, 1986 ; Azevedo et *al.*, 2000).

Toutes les plantes semblent avoir une association mutualiste avec les endophytes dans les écosystèmes naturels (Krings et *al.*, 2007). Les endophytes fongiques peuvent avoir de profondes répercussions sur les communautés végétales, augmentation de la biomasse végétale, réduisent la consommation d'eau et améliorent l'aptitude de la plante hôte, en lui conférant une tolérance au stress dans les conditions extrêmes (Khan et *al.*, 2018), une protection contre l'attaque par des agents pathogènes, des insectes ravageurs et même une défense contre les herbivores (Malinowski et Belesky, 2006 ; Shiomi et *al.*, 2006).

1-2-2. Historique

Au XIX^{ème} siècle, le terme endophyte est apparu dans la littérature de la mycologie pour décrire et explorer le mycota qui réside dans les plantes (Krings et *al.*, 2007). Cette interaction endophyte-plante semble avoir surgi avec l'apparition des plantes supérieures, remontant à des millions d'années (Pamphile et Azevedo, 2002). Ce qui fait que ces micro-organismes endophytes peuvent avoir développé une association génétique avec les plantes supérieures, suggérant qu'ils ont co-évolué avec elles (Pamphile et Azevedo, 2002 ; Jasinski et Payette, 2007). De plus, ils ont été signalés dans les tissus fossilisés des plantes, ce qui révèle une relation primitive avec les plantes (Parfrey et *al.*, 2011).

L'intérêt porté aux champignons endophytes a connu son essor après la découverte de la pénicilline obtenue de *Penicillium notatum* par Alexander Fleming en 1929 et du taxol produit par *Taxomyces andreanae* utilisé en chimiothérapie depuis 1990 (Strobel et *al.*, 1993). Ces molécules ont ouvert une nouvelle ère en recherche médicale, celle des d'origine biologique.

Les champignons endophytes retiennent de plus en plus l'attention de la communauté scientifique pour les molécules qu'ils produisent et qui présentent de nombreuses activités biologiques, telles que des activités antioxydantes, antifongiques, anticancéreuses, antivirales, immunomodulatrices, antituberculeuses, insecticides et antiparasitaires (Strobel, 2003 ; Frattarelli et *al.*, 2004 ; Strobel et *al.*, 2004 ; Sonaimuthu et *al.*, 2010).

1-2-3. Mode de transmission des champignons endophytes

Les champignons endophytes utilisent généralement deux modes de transmission : la transmission verticale et la transmission horizontale. Dans la transmission verticale les champignons endophytes sont transférés des plantes maternelles à la descendance en pénétrant leurs hyphes dans l'embryon des graines. La graine est donc le principal mécanisme par lequel la progéniture est infectée (Gagic et *al.*, 2018). Lorsque les graines germent dans des conditions appropriées, les champignons endophytes entrent dans les plantes nouvellement formées pendant la germination de ces dernières, réalisant ainsi la transmission des champignons endophytes du parent à la progéniture (Hodgson et *al.*, 2014). La transmission horizontale, quant à elle, se produit entre les plantes individuelles en développant des spores asexuées ou sexuées (Suryanarayanan, 2013). Ces spores pénètrent dans la plante hôte par les ouvertures stomatiques (Roos et Hattingh, 1983), hydathodes (Horino, 1984), coupures et blessures (Lamb et *al.*, 1996), lenticelles (Fox et *al.*, 1971) ou grâce à des insectes et d'autres vecteurs animaux (Juniper, 1991). Les spores en germination pénètrent dans une plante hôte, en traversant l'épiderme ou la cuticule, par digestion enzymatique (Petrini et *al.*, 1992).

1-2-4. Classification des champignons endophytes

Les champignons endophytes appartiennent aux Ascomycètes, Basidiomycètes, Zygomycètes ou Oomycètes. Cependant, les Ascomycètes (principalement Diaporthales et Helotiales dans les Angiospermes et Gymnospermes, respectivement) prédominent par rapport aux autres groupes (Sinclair et Cerkauskas, 1996 ; Sieber, 2007).

Sur la base de leur écologie, diversité et des rôles fonctionnels, les champignons endophytes sont classés en quatre classes et sont divisés en deux groupes : les endophytes Clavicipitaceae (classe 1) et les endophytes non Clavicipitaceae (les classes 2, 3 et 4) (Rodriguez et *al.*, 2009). Chaque classe d'endophyte fongique suit un mode de transmission spécial. Les classes 1 et 2 peuvent être transmises par transmission horizontale ou verticale, alors que les classes 3 et 4 ne suivent que la transmission horizontale (figure 8).

Les champignons endophytes de la classe 1 contiennent de nombreuses espèces, mais sont limitées à certaines Graminées (Stone et *al.*, 2004 ; Bischoff et White, 2005). Les endophytes fongiques de cette classe sont principalement résistants à la sécheresse et

augmentent la tolérance des plantes hôtes, la biomasse végétale et produisent des substances chimiques toxiques, offrant ainsi une protection contre les herbivores (Davis *et al.*, 2003).

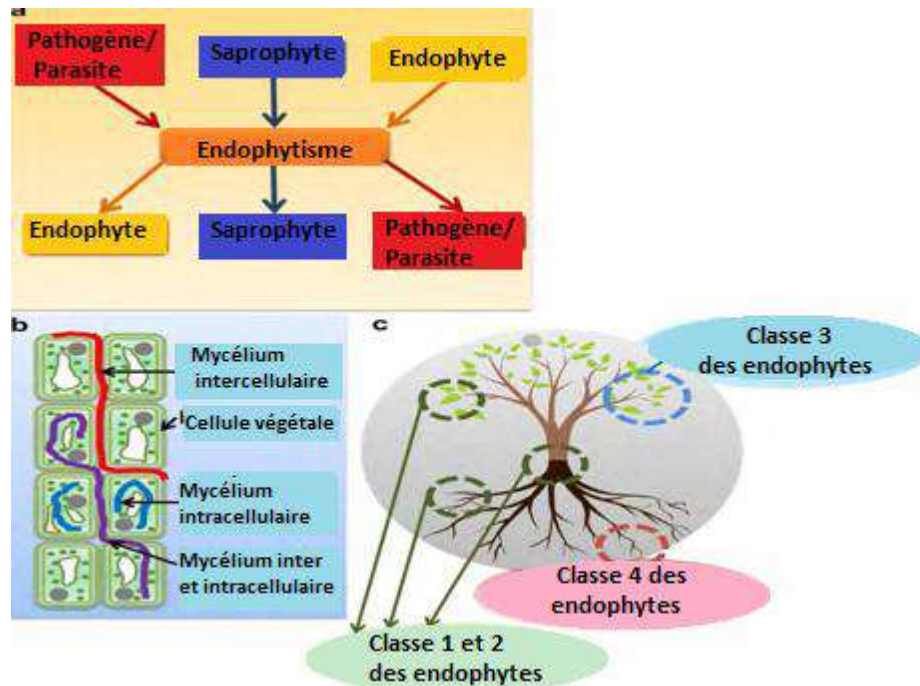


Figure 8 : Représentation schématique de l'association endophyte fongique avec son hôte (Kusari *et al.*, 2012).

Les endophytes de classe 2 représentent des champignons, colonisant différentes parties de la plante y compris le tégument. Ces endophytes ont une diversité rare d'espèces fongiques appartenant à Ascomycota ou Basidiomycota. Ils ont la capacité de conférer aux plantes hôtes un habitat spécifique et une tolérance au stress (Davis *et al.*, 2003).

Les endophytes de classe 3 sont particulièrement connus pour leur grande diversité au sein des tissus hôtes individuels, des plantes et des populations. Les feuilles individuelles peuvent héberger jusqu'à un isolat par 2 mm² de tissu foliaire et contiennent un certain nombre d'espèces. Une seule plante peut abriter des centaines de champignons endophytes différents (Bills *et al.*, 2002).

Les endophytes de classe 4 ont des cloisons mélanisées sombres et limités aux racines des plantes. Ce sont généralement des champignons Ascomycètes qui forment des structures mélanisées, comme les hyphes inter et intracellulaires et les microsclérotés dans les racines (Bills *et al.*, 2002). Les endophytes de classe 4 se trouvent généralement dans différents

plantes hôtes et différents habitats, allant des zones antarctiques, arctiques, alpines, subalpines, tempérées aux écosystèmes tropicaux (Khan et *al.*, 2019).

1-2-5. Ecologie des champignons endophytes

Les endophytes fongiques ont été signalés dans toutes les espèces végétales étudiées jusqu'à présent. Des recherches détaillées sur le microbiote interne des plantes révèlent fréquemment de nouveaux taxons et de nouvelles distributions d'espèces fongiques. Ils sont généralement situés dans l'espace intercellulaire (apoplaste) et intracellulaire (symplaste) (Belanger, 1996).

Il a été signalé que la colonisation d'un endophyte fongique d'une plante n'est pas aléatoire, mais plutôt contrôlée par les facteurs de l'habitat végétal, le type de sol et les micro-organismes environnementaux. Cependant, des études ont montré que des plantes poussant sur des sites similaires peuvent également avoir des assemblages fongiques distincts, ce qui serait dû à la spécificité de l'hôte (Petrini et Fisher, 1988 ; Toju et *al.*, 2013 ; Bonito et *al.*, 2014 ; Gundale et *al.*, 2016 ; Le Van et *al.*, 2017). C'est dans le même contexte que des études ont révélé que la communauté de champignons endophytes racinaires du genre *Microthlaspi* ont été fortement affectés par les facteurs climatiques et spatiaux, qui l'emportaient sur les caractéristiques du sol, le génotype de l'hôte et l'emplacement géographique (Glynou et *al.*, 2016).

Toutefois, leur présence est complète dans les végétaux, certains champignons étant spécifiques à l'organe (feuille, pétiole, tige ou racine). Cela pourrait être dû à l'adaptation aux conditions micro-écologiques et physiologiques, conditions présentes dans un organe (Carroll et *al.*, 1977).

1-2-5.1. Influence des environnements écologiques sur les champignons endophytes

Il a été constaté que certaines conditions environnementales, telles que la température, l'humidité, la lumière, l'emplacement géographique, la quantité et la qualité des éléments nutritifs du sol et la végétation affectent de manière significative le schéma de distribution des champignons endophytes (Suryanarayanan et *al.*, 2005 ; Song et *al.*, 2007).

La variation d'un schéma saisonnier pourrait être notamment associée à la variation de la diversité des endophytes fongiques dans les plantes hôtes. Par exemple, une plus grande

diversité de champignons endophytes a été observée dans les rameaux et l'écorce de *Terminalia arjuna* (Tejesvi et *al.*, 2005) et les feuilles de *Centella asiatica* (Gupta et Chaturvedi, 2017) pendant les saisons des pluies. Ainsi, des études ont suggéré que dans des conditions de faible ensoleillement annuel et un taux d'humidité annuelle élevé, les plantes produiraient plus de nutriments adaptés à la colonisation, à la reproduction et à la dissémination des champignons endophytes (Wu et *al.*, 2013). En revanche, des conditions climatiques froides et des concentrations en oxygène et de pH particulières jouent le rôle de facteurs limitants entraînant la sélection d'un nombre restreint de champignons endophytes pouvant coloniser les plantes hôtes correspondantes (Jiang et *al.*, 2010 ; Fang et *al.*, 2013).

De ce fait, la répartition des champignons endophytes des mêmes régions présentait un degré élevé de similitude en terme de taxonomie des espèces (D'Amico et *al.*, 2008). À l'inverse, les espèces de champignons endophytes, même dans les mêmes espèces de plantes hôtes de différentes régions, présenteraient un très faible degré de similitude (Jiang et *al.*, 2010).

1-2-5.2. Influence du génotype des plantes hôtes sur les champignons endophytes

Des études suggèrent que la distribution de certaines populations fongiques endophytes n'était limitée qu'à des espèces (ou familles) de plantes hôtes particulières et au fond génétique particulier (génotypes) (Dai et *al.*, 2003 ; D'Amico et *al.*, 2008). Ainsi, l'étude des relations entre les génotypes de l'hôte et l'expression du mode de vie symbiotique a en outre révélé que les isolats individuels de certaines espèces de champignons endophytes pouvaient exprimer des modes de vie parasites ou mutualistes, selon le génotype de l'hôte colonisé (Redman et *al.*, 2001; Unterseher et Schnittler, 2010). Par conséquent, les relations champignon - plante hôte doivent être considérées comme une interaction flexible, dont l'issue est déterminée par de légères différences dans l'expression des gènes fongiques, en réponse à la réaction de l'hôte, ou inversement, par la reconnaissance de l'hôte et la réponse aux champignons. Ainsi, de légères différences génétiques dans les génomes des deux partenaires contrôleraient l'issue (positive, négative ou neutre) de la symbiose (Moricca et Ragazzi, 2008), ce qui suggère que les plantes hôtes ont largement déterminé la colonisation et la distribution des champignons endophytes (Saikkonen et *al.*, 2004).

De plus, la disposition des phases des plantes et tissus hôtes peut également influencer la composition spécifique de la communauté endophytique (Sieber, 2007). Par exemple,

Synthèse bibliographique

différentes espèces d'endophytes ont été trouvées dans différents tissus, tels que le parenchyme, les vaisseaux conducteurs, et l'épiderme d'une plante hôte d'âges différents (Rodrigues, 1994).

L'âge des plantes et des tissus végétaux peut, lui aussi, influencer la colonisation et la diversité des champignons endophytes, car les parties végétales plus jeunes sont biochimiquement différentes des parties végétales matures et anciennes. Par exemple, la fréquence d'établissement des endophytes s'est améliorée avec l'âge des feuilles chez *Calotropis procera* (Nascimento et al., 2015) et *Coscinium fenestratum* (Goveas et al., 2011). Une augmentation du nombre d'endophytes fongiques dans les feuilles matures pourrait être due à la période prolongée d'exposition des tissus à l'environnement (Arnold et Herre, 2003).

1-2-6. Rôles physiologiques des champignons endophytes et protection des végétaux

Jusqu'en 1970, les endophytes étaient considérés comme neutres et n'étaient pas connus pour présenter des effets nocifs ou bénéfiques pour les plantes (Azevedo, 1998). Une enquête détaillée sur les endophytes a mis en lumière leur rôle important contre les prédateurs et les agents pathogènes. Ces agents pathogènes et herbivores sont les menaces les plus importantes pour les plantes et causent des pertes économiques importantes dans l'agriculture. L'utilisation de champignons endophytes est devenue un axe de développement, en tant qu'agents de lutte biologique pour le processus agricole durable (Rosier et al., 2016). Les champignons endophytes offrent à la plante hôte une résistance accrue aux maladies, aux insectes nuisibles et aux stress biotiques et abiotiques (Tableau V) (Waller et al., 2005 ; Clement et al., 2005 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009). Les endophytes sont connus pour augmenter l'approvisionnement en nutriments qui contribue à la promotion de la croissance des plantes (Rodriguez et al., 2009).

1-2-6.1. Tolérance au stress biotique et aux maladies

Différents mécanismes de lutte biologique, seuls ou combinés, peuvent être utilisés par les champignons endophytes pour supprimer les maladies des plantes directement ou indirectement grâce à :

- ✓ l'antibiose ;
- ✓ la résistance systémique induite (RSI) ;
- ✓ la concurrence avec des agents pathogènes pour l'espace et les nutriments.

Il a été constaté que la plante symbiotique active le système de défense plus rapidement que les plantes non symbiotiques, après une provocation par un pathogène. La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour garantir l'efficacité et la durabilité des programmes de bio-contrôle (Strakowska et *al.*, 2014).

✓ **Antibiose**

L'antibiose implique la production de divers composés antimicrobiens par les endophytes, qui suppriment ou réduisent la croissance et/ou la prolifération des phytopathogènes. Ce phénomène a été observé chez divers champignons, dont *Trichoderma*, qui peut produire une multitude de composés aux propriétés antagonistes, notamment des enzymes dégradant la paroi comme la cellulase, xylanase, pectinase, glucanase, lipase, amylase, arabinase et protéase, des composés volatiles et un certain nombre d'antibiotiques, tels que trichodermine, trichodermol, gliovirine, gliotoxine, viridine, herzianolide, pyrones, peptaibols ainsi que de l'éthylène et de l'aldéhyde formique (Howell, 2003 ; Harman et *al.*, 2004 ; Jelen et *al.*, 2013 ; Hermosa et *al.*, 2014 ; Strakowska et *al.*, 2014).

Les endophytes fongiques produisent également divers métabolites secondaires, dont certains présentent des propriétés antifongiques qui inhibent la croissance et l'activité des phytopathogènes (Gunatilaka, 2006). A titre d'exemple, le genre *Cryptosporiopsis* qui est un champignon endophyte produit un acide tétramique unique avec des propriétés antifongiques appelées cryptocine, qui inhibe la croissance de plusieurs agents pathogènes fongiques (Li et *al.*, 2000).

✓ **Résistance systémique induite (RSI)**

Il existe une multitude de voies de défense chez les plantes qui peuvent prévenir ou atténuer l'impact négatif des agents pathogènes. Ces voies peuvent être stimulées après une

Synthèse bibliographique

exposition à des parasites, des agents pathogènes, des microbes utiles ou certaines substances chimiques. Deux types différents de résistance systémique peuvent être conférés aux plantes hôtes par des micro-organismes nommés résistance systémique acquise (RSA) et résistance systémique induite (RSI), qui sont différenciés par les voies biochimiques impliquées (Birkenbihl *et al.*, 2017).

Lorsque les plantes sont exposées à des agents pathogènes, des microbes non pathogènes ou à certains produits chimiques, la RSA est déclenchée par l'accumulation systémique d'acide salicylique (une hormone végétale) et de protéines liées à la pathogénèse dans toute la plante. L'acide salicylique active les gènes RSA et prépare les plantes à une future infection potentielle par divers agents pathogènes de manière rapide et efficace. La RSI, quant à elle, est déclenchée par des microbes non pathogènes qui activent les voies de l'acide jasmonique et de l'éthylène. La production d'acide jasmonique indique également une blessure chez les plantes et peut déclencher des protéines liées à la pathogénèse. La voie induite par le salicylate implique la production de protéines liées à la pathogénèse antifongique, telles que les chitinases, les glucanases et les thaumatines, tandis que la voie induite par le jasmonate implique la production d'enzymes oxydantes, telles que les peroxydases, les polyphénols oxydases et les lipoxygénases (Stein *et al.*, 2008 ; Cameron *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2018). Par exemple, il a été démontré que la RSI conférée à *Arabidopsis* par l'endophyte sébacinale *Piriformospora indica* contre l'oïdium (*Golovinomyces orontii*) est régulé par la voie de signalisation de l'acide jasmonique (Hossain *et al.*, 2008 ; Stein *et al.*, 2008).

Bien que les agents pathogènes déclenchent généralement la voie RSA et que les microbes utiles déclenchent souvent la voie RSI, ce n'est pas une tendance générale et des exceptions ont été signalées. Par exemple, il a été démontré que le PGPR *Bacillus cereus* AR156 induit une RSA contre le pathogène foliaire *Pseudomonas syringae* pv. tomate chez *Arabidopsis*, qui dépendait de l'acide salicylique (Niu *et al.*, 2016). Pour le riz, il a été démontré que le champignon AM *Glomus intraradices* induit les gènes de défense de la voie de l'acide salicylique (Campos-Soriano *et al.*, 2012). De plus, une activation simultanée des voies RSA et SRI a été rapportée chez *Arabidopsis thaliana*, ce qui a entraîné une protection contre l'agent pathogène foliaire *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Van Wees *et al.*, 2000).

La RSI est l'un des mécanismes de lutte biologique utilisés par les champignons endophytes. Ces derniers peuvent déclencher les voies de signalisation de la défense, avant

l'infection par des agents pathogènes et conférer une RSI aux plantes hôtes, qui est principalement régulée par les hormones végétales.

Au cours des interactions initiales entre les champignons endophytes et les plantes, la suppression locale des réponses immunitaires des racines a été proposée comme caractéristique commune des micro-organismes bénéfiques provoquant la RSI, qui peuvent éventuellement faciliter leur hébergement dans les racines (Pieterse et Zamioudis, 2014). Divers groupes de métabolites peuvent servir d'éliciteurs ou d'inducteurs dits de résistance dans les interactions de *Trichoderma* avec les plantes. Ces métabolites comprennent des protéines présentant une activité enzymatique (par exemple xylanases, chitinases, phénylalanine ammoniac lyase et glucanases), des produits géniques ressemblant à des protéines codées par des gènes avirulents, des composés de faible poids moléculaire libérés des parois cellulaires des champignons ou des plantes par des enzymes hydrolytiques fongiques et une accumulation de phytoalexine dans plantes hôtes (Błaszczuk et al., 2014 ; Tuão Gava et Pinto, 2016).

À travers ces diverses voies, *Trichoderma* induit des réponses de défense systémique chez les plantes hôtes apprêtées à répondre plus rapidement et dans une plus large mesure aux agents pathogènes envahisseurs (Hermosa et al., 2013 ; Rubio et al., 2014 ; Kumar, 2013 ; You et al., 2016). La RSI conférée par *Trichoderma* a été proposée comme mode d'action fonctionnel à la fois pour les agents pathogènes transmis par le sol, tels que *Phytophthora* (Hoitink et al., 2006) et pour les agents pathogènes foliaires tels que *Bacillus cinerea* (De Meyer et al., 1998 ; Rubio et al., 2014).

✓ **La concurrence avec des agents pathogènes pour l'espace et les nutriments**

Les champignons endophytes peuvent priver les pathogènes d'espace et de nutriments en colonisant l'habitat partagé, c'est-à-dire, les tissus végétaux, la rhizosphère ou la phyllosphère (Tableau V). Théoriquement, tous les agents fongiques peuvent utiliser ce mode d'action en fonction de leurs propriétés et adaptation à la plante hôte et l'environnement (Chet et Inbar, 1994 ; Harman et al., 2004).

Pour surpasser de manière significative les agents pathogènes envahisseurs, les champignons endophytes doivent posséder des stratégies efficaces de colonisation des plantes. Par exemple, certaines souches de *Trichoderma* peuvent produire des sidérophores, qui chélatent le fer. En piégeant les ions ferriques, les espèces de *Trichoderma* peuvent

inhiber la croissance et l'activité d'agents pathogènes, tels que *Botrytis cinerea* (Chet et Inbar, 1994 ; Harman et al., 2004). Ceci est un exemple où l'épuisement d'un seul nutriment peut être un mécanisme fonctionnel de bio-contrôle. Des études *in-vitro* sur les interactions entre *Trichoderma harzianum* et certains agents pathogènes des racines ont démontré que la « famine » était l'une des causes de décès des champignons pathogènes testés (Mokhtar et Aid, 2013).

L'accès restreint des agents pathogènes aux plantes, aux tissus et aux nutriments pourrait également provenir de l'influence du *Trichoderma* sur la physiologie et l'anatomie. Les espèces de *Trichoderma* peuvent modifier le transcriptome végétal et l'architecture des cellules hôtes, conduisant à une progression limitée des pathogènes fongiques dans l'épiderme et le cortex intercellulaire (Hermosa et al., 2012 ; Kumar et al., 2014). Ces altérations comprennent l'amélioration de la lignification de la masse racinaire, l'épaississement de la paroi cellulaire hôte avec de la pectine, l'induction d'une activité chitinase et diriger également la protéine liée à la pathogénèse-1a (PR-1a) vers le site infecté par le pathogène intracellulaire (Malik et al., 2016).

1-2-6.2. Tolérance au stress abiotique et croissance des plantes

Les champignons endophytes affectent la croissance des plantes soit directement ou indirectement. La promotion directe de la croissance des plantes se produit lorsque les endophytes facilitent soit l'acquisition de ressources de l'environnement, notamment l'azote, le phosphore et le fer (Jha et Kumar, 2009), soit en modulant la croissance des plantes en produisant une variété d'hormones végétales telles que les gibbérellines (GA), les auxines, l'acide abscissique (ABA), la cytokinine ou l'éthylène (Khan et al., 2008). Une promotion indirecte de la croissance des plantes a été mise en évidence, lorsque les endophytes ont limité ou empêché la croissance de différentes bactéries, champignons et nématodes pathogènes. Les endophytes ont indirectement favorisé la croissance des plantes, en utilisant divers mécanismes comme la production d'antibiotiques, des enzymes dégradant la paroi cellulaire, l'activation de la solubilisation des phosphates, la baisse des niveaux d'éthylène des plantes, la résistance systémique induite, la diminution de la quantité de fer disponible pour les agents pathogènes (Verma et al., 2001 ; Wakelin et al., 2004), fournissant des vitamines essentielles aux plantes (Pirttilä et al., 2004) et une production accrue de sidérophores (Costa et Loper, 1994 ; Lee et al., 2004).

Synthèse bibliographique

Les auxines sont des hormones végétales parmi lesquelles, l'acide indole-3-acétique (IAA) s'est révélé stimulant diverses actions de croissance et de développement, comme la division cellulaire, l'allongement cellulaire et la différenciation cellulaire (Asgher et *al.*, 2015). La gibbérelline est un régulateur vital de la croissance des plantes, avec un rôle important dans la croissance et la germination des graines, des organes floraux et la formation de pousses latérales (Olszewski et *al.*, 2012). L'acide gibbérellique améliore l'absorption de l'eau et la ségrégation des ions dans la plante, conduisant à l'amélioration de la croissance et du maintien du taux métabolique des plantes dans des circonstances normales et/ou stressantes (Alloush et *al.*, 2004 ; Khan et *al.*, 2019).

Les stress abiotiques ont un impact négatif sur la physiologie et la morphologie des plantes, en endommageant la régulation génétique des voies cellulaires, ce qui entraîne toujours une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), un dysfonctionnement des membranes et un déséquilibre hormonal (Egamberdieva et *al.*, 2017). La découverte d'hyphes et de spores fongiques fossilisées a indiqué que l'association endophytique était essentielle pour la survie des plantes terrestres ancestrales aux stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinité, les rayonnements UV et les fluctuations de température qui caractérisaient le début du Paléozoïque (Venugopalan et Srivastava, 2015). Les champignons endophytes peuvent donc aider leurs plantes hôtes à s'adapter aux stress abiotiques et favoriser la croissance des plantes, via la biosynthèse des hormones végétales suscitées et l'acquisition de nutriments (Tableau V).

La sécheresse est l'un des principaux facteurs influençant la productivité agricole dans le monde, son incidence devrait augmenter chaque année en réponse au changement climatique. Les champignons endophytes peuvent jouer un rôle important dans l'amélioration de la tolérance des plantes à la sécheresse (Tableau V). Il a été démontré que l'ABA peut protéger les plantes des dommages oxydatifs induits par la sécheresse, en activant des gènes sensibles au stress et en améliorant le système antioxydant des plantes (Bano et *al.*, 2012 ; Khan et *al.*, 2013). Actuellement, l'application exogène d'ABA est devenue une méthode efficace pour soulager le stress lié à la sécheresse. En outre, de nombreux rapports ont révélé que l'ABA régule la croissance des racines et l'absorption de l'eau dans des situations de stress dû à la sécheresse (Wilkinson et Davies, 2002). En dehors de l'ABA, l'application exogène de SA pourrait atténuer l'effet négatif causé par la sécheresse (Silva et *al.*, 2017). De plus, l'acide gibbérellique en association avec d'autres hormones végétales facilite les mécanismes de

Synthèse bibliographique

résistance (Wolbang et *al.*, 2004). Les gibbérellines ont un impact direct sur la croissance, la nutrition minérale et le métabolisme de l'azote, ainsi que sur le rendement (Khan et *al.*, 2004).

De plus, les plantes symbiotiques produisent plusieurs métabolites secondaires pour réguler le stress lié à la sécheresse. Par exemple, par rapport à un groupe témoin (plantes non inoculées), *Glycyrrhiza uralensis* inoculé par *Bacillus pumilus* a montré une augmentation significative en flavonoïdes totaux, en polysaccharides, en acide glycyrrhizique, et en antioxydants. L'expression d'enzymes clés pour la synthèse de l'acide glycyrrhizique a également été significativement augmentée par l'inoculation de *Bacillus pumilus* (Xie et *al.*, 2019).

Le stress salin limite aussi considérablement la croissance de la plante, en particulier chez le blé ; la toxicité induit le retard de la croissance et la réduction de la biomasse (Khan et *al.*, 2018). A cet effet, certains rapports ont signifié l'impact positive que pourrait avoir l'ABA exogène dans la suppression des effets négatifs causés par la salinité (Khan et *al.*, 2017).

L'autre grand problème auquel sont confrontées les plantes est celui de l'accumulation des métaux lourds dans les sols (Zaurov et *al.*, 2001 ; Rattan et *al.*, 2005). De plus, ces métaux lourds entraînent une diminution de la fertilité du sol, une réduction du rendement et une augmentation de la toxicité chez les plantes (Thounaojam et *al.*, 2012 ; Ikram et *al.*, 2018).

Un nombre croissant de travaux indiquent que les champignons endophytes des plantes ont une grande tolérance aux métaux et une capacité d'atténuation dans les sols contaminés. Par exemple, les champignons endophytes *Exophiala pisciphila* associés aux racines de *Zeamays* présentent une tolérance marquée au Cadmium (Cd), conduisant à une diminution notable de la phytotoxicité du Cd et à une augmentation significative de la croissance du maïs (Wang et *al.*, 2016). Les phytohormones endophytes jouent un rôle important dans l'amélioration de la tolérance des plantes aux stress des métaux lourds. Il a été rapporté que l'effet toxique du plomb sur la croissance du tournesol a été atténué par l'ajout d'AIA, qui a stimulé l'augmentation du volume, de la surface et du diamètre des racines (Fässler et *al.*, 2010).

Tableau V : Amélioration des défenses des plantes hôtes par les champignons endophytes (Jia et al., 2016 ; Ikram et al., 2019)

Plante hôte	Champignon endophyte	Type de stress	Mécanisme
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	Augmentation du stress salin	Activité POD
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	<i>Arbuscular mycorrhiza</i>	Sécheresse	Augmentation de l'absorption des nutriments
<i>Cordia alliodora</i>	<i>Leucocoprinus gongylophorus</i>	Insectes	Antagonisme du symbiote fongique des fourmis
<i>Phoenix dactylifera</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Insectes : ravageurs des palmiers dattiers	Expression de protéines liées à la division cellulaire chez l'hôte
<i>Cirsium arvense</i>	<i>Chaetomium cochliodes</i>	Insectes : alimentation foliaire	Produits toxiques pour les pathogènes
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Chaetomium Ch1001</i>	Insectes	Acide abscisique
<i>Atractylodes lancea</i>	<i>Gilmaniella sp.</i>	Insecte pathogène	L'acide jasmonique induisant des réponses de défense
<i>Curcuma wenyujin</i>	<i>Chaetomium globosum</i> L18	Champignons pathogènes	Produits chimiques toxiques pour les agents pathogènes
<i>Maytenus hookeri</i>	<i>Trichothecium roseum</i>	Champignons pathogènes	Production de la trichothécine, toxique pour les agents pathogènes
<i>Hordeum vulgare var</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Champignons pathogènes	Inhibition de la propagation des agents pathogènes
<i>Tripterygium wilfordii</i>	<i>Cryptosporiopsis cf. quercina</i>	Champignons pathogènes	Cryptocine, cryptocandine toxiques aux agents pathogènes
<i>Capsicum annuum</i>	<i>Penicillium resedanum</i> LK6	Stress thermique	Améliore les teneurs en nutriments, proline et flavonoïdes, module le métabolisme des acides aminés

Divers mécanismes sont utilisés par les endophytes pour affecter la mobilité et la disponibilité des métaux lourds dans la plante, tels que l'acidification, la solubilisation des phosphates, la modification du pH du sol et la libération de chélateurs, avec de multiples propriétés enzymatiques (Yan-de et *al.*, 2007 ; Gadd, 2010). Ces endophytes impliqués dans le processus de phytoremédiation en réduisant la disponibilité des métaux notamment par l'exclusion, la biosorption, l'élimination active, la précipitation ou la bioaccumulation (Rajkumar et *al.*, 2009).

1-2-7. Activité biologique des champignons endophytes

Les champignons endophytes sont de plus en plus reconnus comme une nouvelle source de métabolites bioactifs avec un potentiel thérapeutique (Tableau VII). Il a été suggéré que l'association biologique étroite entre les endophytes et leur hôte végétal entraîne la production d'un plus grand nombre et d'une plus grande diversité de molécules biologiques, par rapport aux épiphytes ou aux microorganismes liés au sol. De plus, la nature symbiotique de cette relation indique que les composés bioactifs des endophytes sont susceptibles de présenter une toxicité cellulaire réduite, car les produits chimiques ne tuent pas le système hôte eucaryote. Ceci est important pour la communauté médicale, les médicaments potentiels pourraient ainsi ne pas nuire aux cellules humaines (Strobel, 2002 ; Strobel et Daisy, 2003). Les métabolites secondaires produits par les endophytes associés aux plantes médicinales peuvent être exploités pour guérir de nombreuses maladies (Tejesvi et *al.*, 2007).

1-2-7.1. Potentiel anticancéreux des champignons endophytes

Le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde, avec un nombre croissant de cas signalés chaque année. Ce fardeau mondial a été estimé à 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès en 2018. Un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développent un cancer dans leur vie et un homme sur huit et une femme sur 11 en meurent (IARC Global Cancer Observatory, 2018). A cet effet, de nombreuses études ont tenté de trouver des inhibiteurs potentiels pour le traitement du cancer.

Le « taxol » un diterpénoïde (paclitaxel) a suscité plus d'attention et d'intérêt que tout autre nouveau médicament depuis sa découverte, en raison de son mode d'action unique par rapport à d'autres agents anticancéreux. En réalité, le paclitaxel agit en réduisant ou en interrompant la croissance et la propagation des cellules cancéreuses (Wall et Wani, 1995). Le taxol est un médicament approuvé pour le traitement du cancer du sein avancé, du cancer du

Synthèse bibliographique

poumon et du cancer réfractaire de l'ovaire. Ce médicament anticancéreux exceptionnel a d'abord été isolé de *Taxus brevifolia* et d'autres plantes du genre *Taxus* (les ifs), qui sont non seulement rares et à croissance lente, mais produisent de petites quantités de taxol (Cragg et Snader, 2005). Heureusement, l'isolement et l'identification de l'endophyte *Taxomyces andreanae* (isolé de l'écorce de l'if du Pacifique *Taxus brevifolia*), producteur de taxol a fourni au monde une approche alternative pour obtenir un meilleur marché et un produit plus disponible par fermentation de microorganismes (Stierle et al., 1993). Cela a également mis en évidence que les champignons endophytes d'autres plantes médicinales peuvent produire du paclitaxel (Tableau VI). Entre 1993 et 2017, 73 genres de champignons endophytes ont été rapportés comme producteurs du taxol, la plupart de ces genres appartiennent aux Gymnospermes (69,86%) et peu aux Angiospermes (30,13%). Ces endophytes étaient principalement isolés soit des feuilles ou de l'écorce.

Depuis que Stierle et al., en 1993 ont signalé la production du taxol par un champignon endophyte, de nombreux métabolites bioactifs possédant des propriétés cytotoxiques (tels que la camptothécine, la vinblastine, la vincristine, Podophyllotoxine, Rohitukine, Piperine, Acide torreyanique, Cytochalasin 1-3, Cytochalasine E, Graphis lactone A, Botrallin, Hypericine, Ergoflavine, émodine, Scoparazine C, Pénochalasin I, Pénochalasin J, Malformine E, Fusarithioamide A, Peniproline A, Penochalasin K) ont été isolés des champignons endophytes. Les composés cytotoxiques isolés de ces champignons appartiennent à diverses classes chimiques (par exemple: aldéhydes, alcaloïdes, Chromones, benzo[j]fluoranthènes, cyclohexanones, depsidones, depsipeptides, ergochromes, Esters, lignanes, polycétides, quinones, spirobisnaphthalènes, diterpènes, sesquiterpènes et Xanthonés) (Kharwar et al., 2011 ; Chen et al., 2016 ; Uzma et al., 2018).

Plus de 100 composés anticancéreux ont été décrits à partir de champignons endophytes entre 1993 et 2010 (Kharwar et al., 2011). Ces composés ont été testés pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro*, contre diverses lignées cellulaires (par exemple, lignée cellulaire de leucémie monocyttaire aiguë, lignée cellulaire tumorale A2780, lignée cellulaire tumorale du côlon SW-620, lignée cellulaire tumorale du côlon HCT-116, lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7, une lignée cellulaire de cancer du poumon A549, lignée cellulaire Vero et lignées cellulaires de glioblastome U138MG et U87MG) et ont montré une activité cytotoxique puissante (Kharwar et al., 2011 ; Uzma et al., 2018 ; Zaferanloo et al., 2018). Les valeurs IC50 de ces composés anticancéreux sont analogues à celles des médicaments de référence (taxol, vincristine, vinblastine et podophyllotoxine), indiquant le potentiel des

champignons endophytes dans la découverte de médicaments anticancéreux (Kharwar et *al.*, 2011).

1-2-7.2. Potentiel antioxydant des champignons endophytes

Chez l'homme, les dommages oxydatifs et les radicaux libres sont associés à un certain nombre de maladies, notamment l'athérosclérose (Bagchi et Puri, 1998), la maladie d'Alzheimer (Nunomura et *al.*, 2006), le cancer (Tamimi et *al.*, 2005), la maladie oculaire (Hoffman, 1997), le diabète (Davì et *al.*, 2005), l'arthrite rhumatoïde (Hitchon et El-Gabalawy, 2004) et les maladies neuro-dégénératives (Cookson et Shaw, 1999). Des antioxydants sont donc nécessaires pour prévenir la toxicité induite par le stress oxydatif, causée par les radicaux libres d'oxygène (Hajhashemi et *al.*, 2010).

Les métabolites secondaires tels que la pestacine, l'isopestacine, la 2,3,6,8-tétrahydroxy-1-méthylxanthone, 5- (hydroxyméthyl) -2-furanocarboxylique, la rutine, Corynesidones A et B, Bornéol, Lapachol, Coumarine, 2,14-dihydroxy-7-drimen-12,11-olide, Phloroglucinol, Le salidroside et le p-tyrosol provenant d'endophytes fongiques peuvent être une source potentielle d'antioxydants naturels connus ou nouveaux (Harper et *al.*, 2003 ; Huang et *al.*, 2007). Ces antioxydants naturels peuvent posséder des activités anti-inflammatoires, antimutagènes ou anticarcinogènes (Kawanishi et *al.*, 2005).

Les deux composés, la pestacine et l'isopestacine, ont été les premiers à être décrits, obtenus à partir de cultures de *Pestalotiopsis microspora*, un endophyte isolé de *Terminalia morobensis*, qui se développe dans un drainage de la rivière Sepik, en Papouasie-Nouvelle-Guinée, et qui présente une activité antimicrobienne et antioxydante (Harper et *al.*, 2003 ; Strobel et *al.*, 2002). L'isopestacine était suspectée d'avoir une activité antioxydante, en raison de sa similitude structurelle avec les flavonoïdes, ce composé est capable de piéger l'ion superoxyde et le radical hydroxyle libres en solution (Strobel et *al.*, 2002). La pestacine a été décrite plus tard à partir de la même culture, qui se produit naturellement sous forme de mélange racémique et qui possède également une puissante activité antioxydante (Harper et *al.*, 2003). L'activité antioxydante de la pestacine est supérieure à celle du trolox, un dérivé de la vitamine E (Harper et *al.*, 2003).

Tableau VI : Champignons endophytes producteurs de paclitaxel (taxol) et leurs plantes hôtes (Zhao et al., 2011)

Champignon endophyte	Souche fongique	Plante hôte	Rendement en Paclitaxel (µg/L)
<i>Alternaria sp.</i>	Ja-69	<i>Taxus cuspidata</i>	0.16
<i>Alternaria sp.</i>	–	<i>Ginkgo biloba</i>	0.12-0.26
<i>Alternaria alternata</i>	TPF6	<i>Taxus chinensis var. mairei</i>	84.5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EPTP-1	<i>Podocarpus sp.</i>	557.8
<i>Aspergillus niger var. taxi</i>	HD86-9	<i>Taxus cuspidata</i>	273.6
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	BT115	<i>Taxus baccata</i>	280.5
<i>Botrytis sp.</i>	XT2	<i>Taxus chinensis var. mairei</i>	161.24
<i>Botrytis sp.</i>	HD181-23	<i>Taxus cuspidata</i>	206.34
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MD2	<i>Taxus media</i>	800
<i>Ectostroma sp.</i>	XT5	<i>Taxus chinensis var. mairei</i>	276.75
<i>Fusarium arthrosporioides</i>	F-40	<i>Taxus cuspidata</i>	131
<i>Fusarium lateritium</i>	Tbp-9	<i>Taxus baccata</i>	0.13
<i>Fusarium mairei</i>	Y1117	<i>Taxus chinensis var. mairei</i>	2.7
<i>Fusarium mairei</i>	UH23	<i>Taxus chinensis var. mairei</i>	286.4
<i>Fusarium solani</i>	–	<i>Taxus celebica</i>	1.6
<i>Fusarium solani</i>	Tax-3	<i>Taxus chinensis</i>	163.35
<i>Metarhizium anisopliae</i>	H-27	<i>Taxus chinensis</i>	846.1
<i>Periconia sp.</i>	No. 2026	<i>Torreya grandifolia</i>	0.03-0.83
<i>Pestalotiopsis breviseta</i>	–	<i>Ervatamia divaricata</i>	64
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	W-1f-2	<i>Wollemia nobilis</i>	0.49
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	CHP-11	<i>Cardiospermum halicacabum</i>	113.3
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	W-1f-1	<i>Wollemia nobilis</i>	0.17
<i>Pestalotiopsis terminaliae</i>	TAP-15	<i>Terminalia arjuna</i>	211.1
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	No.598	<i>Citrus medica</i>	265
<i>Phyllosticta dioscoreae</i>	No.605	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	298
<i>Phyllosticta spinarum</i>	No.625	<i>Cupressus sp.</i>	235

1-2-7.3. Potentiel antimicrobien des champignons endophytes

Les antibiotiques sont définis comme des produits naturels organiques, de faible poids moléculaire, fabriqués par des micro-organismes à faible concentration, contre d'autres micro-organismes (Demain, 1981). En raison de la capacité croissante des bactéries à résister aux antibiotiques, la recherche de nouvelles sources d'antibiotiques est toujours d'actualité. Les champignons endophytes sont connus pour protéger leur plante hôte d'une variété d'agents pathogènes (bactéries, champignons, virus et protozoaires), en produisant des métabolites bioactifs. De nombreux champignons endophytes produisent des composés antibiotiques dans une culture axénique ayant une activité contre les bactéries pathogènes humaines et végétales (Tableau VII) (Zhang et al., 2010 ; Alvin et al., 2014 ; Zhang et al., 2015a ; Pamphile et al., 2017). Les produits naturels obtenus à partir de ces champignons possèdent une activité à large spectre et une toxicité inférieure par rapport aux molécules de synthèse. Dreyfuss et Chapela (1994) ont signalé que les champignons endophytes xylophiles (vivant en association avec des organes de plantes ligneuses) sont de meilleurs producteurs de composés antimicrobiens (Dreyfuss et Chapela, 1994).

Les composés isolés des champignons endophytes tels que Piperine, Altersolanol A, 2-hydroxy-6-méthylbenzoïque, Enfumafungin, Colletotric acid, Jesterone, Hydroxy-jesterone, Guignardic acide, Pestacine, Isopestacine, Rutine, Fusapyridon A, Hypericine, 7-amino-4-méthylcoumarine, Xylarénone A, Xylarénone B, acide xylarénique, Phomopsin A, Clavatul, Chaetomugilin D, Javanicin, Z-roquefortine C, Viridicatol, Penitrem A, la pénijanthine A, le fusarithioamide A, le pestalone, le fusaripeptide A possèdent tous une activité antimicrobienne (Dreyfuss et Chapela, 1994).

Cryptosporiopsis quercina est un champignon communément associé aux espèces de feuillus en Europe. Il a été isolé en tant qu'endophyte de *Tripterygium wilfordii*, une plante médicinale originaire d'Eurasie (Strobel et al., 1999). *In-vitro*, *Cryptosporiopsis quercina* a démontré une excellente activité antifongique contre *Candida albicans* et *Trichophyton sp.* Un type unique de peptide antimycotique appelé cryptocandine a été isolé et caractérisé à partir de *Cryptosporiopsis quercina* (Strobel et al., 1999). Ce composé contient un certain nombre d'acides aminés hydroxylés particuliers et un nouvel acide aminé : le 3-hydroxy-4-hydroxy-méthylproline. Le composé bioactif est apparenté aux antimycotiques connus, aux échinocandines et aux pneumocandines (Miller et al., 1998).

Synthèse bibliographique

La cryptocandine est également active contre un certain nombre de champignons phytopathogènes, notamment *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea*. La cryptocandine et ses composés apparentés sont actuellement envisagés pour une utilisation contre un certain nombre de champignons provoquant des maladies de la peau et des ongles. La cryptocine, un acide tétramique unique, est également produite par *Cryptosporiopsis quercina*. Ce composé inhabituel possède une activité puissante contre *Pyricularia oryzae*, ainsi qu'un certain nombre d'autres champignons phytopathogènes (Li et al., 2000).

Les écomycines représentent une famille de nouveaux lipopeptides. Outre les acides aminés courants, certains acides aminés inhabituels sont également impliqués dans la structure des écomycines, qui comprennent l'homosérine et l'acide β -hydroxyaspartique. Cette écomycine est active contre les champignons pathogènes pour l'homme, tels que *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans* (Li et al., 2000).

Un autre groupe de composés antifongiques est celui des pseudomycines qui sont produites par une Pseudomonade associée à une plante (Ballio et al., 1994). Les pseudomycines représentent une famille de lipopeptides actifs contre une variété de champignons attaquant les végétaux et pathogènes pour l'Homme. Certains des organismes cibles comprennent *Candida albicans*, *Candida neoformans* et une variété de champignons phytopathogènes, notamment *Ceratocystis ulmi* (l'agent pathogène de la maladie hollandaise de l'orme) et *Mycosphaerella fijiensis* (l'agent causal de la maladie de la cercosporiose noire du bananier) (Harrison et al., 1991). Ces molécules sont des candidats potentiels pour une utilisation en médecine humaine, après que la modification structurelle a réussi à éliminer leur toxicité chez les mammifères (Zhang et al., 2001). Vu que les pseudomycines sont efficaces contre un certain nombre de champignons Ascomycètes, elles sont envisagées pour une utilisation agricole.

La phomopsichalasin est un métabolite secondaire issu d'un endophyte *Phomopsis sp.*, qui représente le premier composé de type cytochalasique avec un système à trois cycles, remplaçant le cycle macrolide de la cytochalasine. Ce métabolite présente principalement une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* et *Staphylococcus aureus*. *Colletotrichum sp.*, un endophyte isolé d'*Artemisia annua*, a synthétisé des métabolites bioactifs qui ont également montré une activité antimicrobienne variée. *Artemisia annua* est une herbe chinoise traditionnelle, capable d'habiter de nombreuses régions

géographiquement différentes, est bien connue pour la synthèse d'artémisinine (un médicament antipaludéen) (Horn et *al.*, 1995).

1-2-7.4. Autres activités biologiques des champignons endophytes

Outre leur capacité à produire des métabolites ayant une activité antimicrobienne, antioxydante et anticancéreuse, les champignons endophytes peuvent également produire des métabolites à activité antivirale, antidiabétique, insecticide et autres (Tableau VII).

L'inhibition des virus par les métabolites bioactifs des champignons endophytes est à la fois fascinante et intrigante. Le potentiel de découverte de composés antiviraux à partir de ces champignons n'est qu'à ses débuts. L'absence de programmes de dépistage antiviral appropriés, dans la plupart des programmes de découverte de composés, est une contrainte majeure dans la découverte de composés antiviraux à partir de champignons endophytes. Néanmoins, peu de composés antiviraux prometteurs par exemple podophyllotoxine, S 39163 / FI, CR377, acide cytonique A et B, séquoiatones C-F, cytosporone U ont été signalés chez des endophytes fongiques. Les composés antiviraux des champignons endophytes auraient une activité contre le cytomégalovirus humain (Guo et *al.*, 2008), le virus de la grippe A (H1N1) (Zhang et *al.*, 2011), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Zhang et *al.*, 2015b) et le virus de la dengue (Raekiansyah et *al.*, 2017).

Une autre utilisation toute aussi prometteuse des métabolites secondaires des champignons endophytes est l'inhibition de la glucosidase. En effet, en raison des effets secondaires (à savoir diarrhée, inconfort abdominal) des inhibiteurs de la glycosidase déjà existants (acarbose, voglibose et miglitol), il existe un besoin mondial de nouveaux composés ayant moins ou pas d'effets secondaires (Bischoff et *al.*, 1985 ; Lebovitz, 1997). Les produits biosynthétiques des champignons endophytes *Cladosporium sp.*, *Tinospora cordifolia* et *Xylaria sp.* présentent une forte activité inhibitrice contre l'alpha-glucosidase (Indriarningsih et Tachibana, 2017). Govindappa et *al.*, (2015) ont isolé de la lectine à partir des espèces *Alternaria* de la plante *Viscum album* (Gui) et ont découvert que cette dernière possède une puissante activité antidiabétique chez les rats diabétiques. Un métabolite fongique non peptidique Demethylasterriquinone B-1 (L-783,281) provenant d'un champignon endophytique *Pseudomassaria sp.*, a montré une activité similaire à l'insuline (Zhang et *al.*, 1999).

Synthèse bibliographique

Plusieurs endophytes sont aussi connus pour avoir des propriétés insecticides. Il a été démontré l'existence d'une protection des plantes contre les insectes herbivores conférée par ces champignons. Webber et Gibbs (1984) ont été probablement les premiers chercheurs à rapporter un exemple de protection des plantes par un champignon endophyte, *Phomopsis oblonga*, qui protégeait les ormes contre le scarabée *Physocnemum brevilineum*, en réduisant la propagation dans les ormes de *Ceratocystis ulmi*, l'agent causal de la maladie hollandaise.

Ces auteurs ont associé l'effet répulsif observé chez l'insecte envers les composés toxiques produits par ces champignons endophytes. Un autre champignon endophyte, *Muscodor vitigenus*, isolé de *Paullina paullinioides*, produit du naphthalène, un insectifuge largement exploité (Daisy et al., 2002). Des acides nodulisporiques, qui sont des diterpènes indoliques présentent également de puissantes propriétés insecticides contre les larves de la mouche (Strobel et Daisy, 2003). Au cours des dernières années, un certain nombre d'alcaloïdes, qui présentaient d'excellentes activités insecticides, ont été découverts à partir de champignons endophytes (Zhang et al., 2012).

Les champignons endophytes de collecte de *Terminalia catappa* et *Terminalia mantaly* ont également été étudiés pour leur capacité à produire des enzymes industrielles. Les résultats ont montré que les isolats étaient capables de produire de l'amylase, de la cellulase, de la lipase et de la laccase (Toghueo et al., 2017a). Les champignons endophytes *Penicillium* sp. 51 et *Penicillium chermesimum* présentent une forte activité cellulase (Toghueo et al., 2017b), ce qui démontre que ces champignons pourraient être utiles pour la production d'enzymes d'importance industrielle.

Tableau VII: Champignons endophytes producteurs de métabolites secondaires dans les plantes hôtes (Jia et *al.*, 2016 ; Ikram et *al.*, 2019)

Champignon endophyte	Métabolite secondaire	Plante hôte	Bio-activité
<i>Fusarium solani</i>	Camptothecine	<i>Apodytes dimidiata</i>	Anti-tumoral
<i>Neurospora sp.</i>	Camptothecine	<i>Nothapodytes foetida</i>	Anti-tumoral
<i>Fusarium solani</i>	Camptothecine	<i>Camptotheca acuminata</i>	Anti-tumoral
<i>Penicillium sp</i>	Quinine	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Antipyrétique et anti-malaria
<i>Alternaria sp.</i>	Berberine	<i>Phellodendron amurense</i>	Antibiotique
<i>Trichoderma atroviride D16</i>	Tanshinone IIA et Tanshinone I	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Antibactérien et anti-inflammatoire
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Piperine	<i>Piper nigrum</i>	Antimicrobien, anti-inflammatoire et anti-cancer
<i>Alternaria sp.</i>	Vinblastine	<i>Catharan thusroseus</i>	Anti-tumoral
<i>Blastomyces sp.</i>	Huperzine A	<i>Phlegmariurus cryptomerianus</i>	Anti-cholinestérase
<i>P. chrysogenum</i>	Huperzine A	<i>Lycopodium serratum</i>	Anti-cholinestérase
<i>Acremonium sp.</i>	Huperzine A	<i>Huper ziaserrata</i>	Anti-cholinestérase
<i>Phomopsis sp.</i>	Phomoxanthone A et B	<i>Garcinia sp.</i>	Antibiotique
<i>Cochliobolus sp.</i>	Cochlioquinone A,	<i>Piptadenia adiantoides</i>	Antiparasitaire (anti-Leishmania)
<i>Muscodor albus E-6</i>	Caryophyllene	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Antibiotique
<i>Fusarium subglutians</i>	Subglutinol A et B	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Immunosuppressive
<i>Chaetomium chiversii</i>	C5-36-62 Radicol	<i>Ephedra fasciculata</i>	Activité cytotoxique
<i>Acremonium sp.</i>	Leucinostatines	<i>Taxus baccata</i>	Antifongique et Anti-cancer
<i>Penicillium janthinellum</i>	Citrinine (Polyketide)	<i>Melia azedarach</i>	Antibactérien

Synthèse bibliographique

<i>Fusarium oxysporum, Neonectria macrodidym, F. solani, F. proliferatum</i>	Acide Cajaninstilbène	<i>Cajanus cajan</i>	Antioxydant, hypotriglycémique et hypoglycémique
<i>Cochliobolus nisikadoi</i>	Bornéol	<i>Cinnamomum camphora</i> chvar. Bornéol	Anti-inflammatoire et antioxydant
<i>Cephalosporium sp.</i>	Graphislactone A	<i>Trachelospermum Jasminoides</i>	Antioxydants
<i>Aspergillus niger</i> PN2	Monacoline K/lovastatine	<i>Taxus baccata</i>	Hypocholestérolémique
<i>Aspergillus parasiticus</i>	sequoiatones C–F	<i>Sequoia sempervirens</i>	Antiviral
<i>Penicillium janczewskii</i>	Mulleine	<i>Prumnopitys andina</i>	Antiviral
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	Cryptocine	<i>Tvipterigeum wilfordii</i>	Antifongique



Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé avec la collaboration de plusieurs laboratoires de recherches, à savoir :

- ✓ ¹Le laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie ;
- ✓ ²Le laboratoire PEIRENE EA 75000, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Limoges, France ;
- ✓ ³Le laboratoire des Ressources Naturelles, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie ;
- ✓ ⁴Le laboratoire d'analyse HPLC, police scientifique, Alger.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel

2-1-1. Appareillage

Un certain nombre d'équipements scientifiques a été utilisés lors de la réalisation des différentes expérimentations de ce travail :

- Spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU) (2);
- Spectrophotomètre UV-Visible, double faisceaux (SHIMADZU) (2);
- Centrifugeuse réfrigérée (max 28 000xg ; SIGMA3-16 PK) (2);
- Lyophilisateur à plateaux (Telstar LyoQuest) (1);
- Etuve (MEMMERT) (1);
- Rotavapor (Stuart) (1);
- Microscope optique (hund WETZLAR) (1);
- Autre matériel d'usage courants (balance de précision à 0,01 mg (Denver Instrument) ; balances analytiques à affichage digital (0,01 g ; Denver Instrument) ; pH mètre (Hanna instruments) ; Autoclave (Pb international) ; Congélateur (DIRECT Freeze) ; Vortex (BIOBLOCK SCIENTIFIC) ; Plaque chauffante (SANO clav) ; bain-Marie (Memmert) ; agitateurs variés...etc).
- Equipement utilisé pour la LC/MS :
 - ✓ Un chromatographe en phase liquide de marque AGILENT série 1100 (4);
 - ✓ Un détecteur à barrette de diodes (DAD) (4);

Matériel et méthodes

- ✓ Une pompe quaternaire (4);
- ✓ Un dégazeur on-line (4);
- ✓ Un injecteur automatique (4);
- ✓ Une colonne Hypersil BDS-C18, (5 μ m, 250 X 4,6) (4).

2-1-2. Réactifs et produits chimiques

Les produits chimiques ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne), Biochem Chemopharma (Montréal, Québec), Bio-Red (Marnes la Coquette, France), Liofilchem (Roeseto, Italie) ou Biokar (Beauvais, France).

- **Milieux de culture** : Suivant les méthodes employées, et selon les souches utilisées, nous avons eu recours aux milieux de culture suivants :
 - Mueller Hinton Agar (MHA) ;
 - Mueller Hinton Bouillon (MHB) ;
 - Brain Heart Infusion (BHI) ;
 - Brain Heart Infusion Bouillon (BHIB) ;
 - Potato Dextrose Agar (PDA) ;
 - Potato Dextrose Bouillon (PDB).
- **Solvants organiques**
 - Acétate d'éthyle ;
 - Méthanol ;
 - Ethanol.
- **Autres produits**
 - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH•)
 - Acétonitrile ;
 - Acid diethylenetriaminepentaacetic (DETAPAC) ;
 - Acide acétique ;
 - Acide ascorbique ;
 - Acide chlorhydrique ;
 - Acide dithiobis 2-nitro benzoïque (DTNB) ;
 - Acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) ;
 - Acide formique ;
 - Acide gallique (GA) ;
 - Acide trichloroacétique (TCA) ;

Matériel et méthodes

- Azote liquide ;
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3) ;
- Chloramphénicol ;
- Chlorure de fer (FeCl_3) ;
- Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) ;
- Diméthyle sulfoxyde (DMSO) ;
- Eau distillée ;
- Eau oxygénée (H_2O_2) ;
- Eau physiologique.
- Ferrocyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$;
- Folin-Ciocalteu ;
- Glutathion réduit ;
- Glycérol ;
- Hydroxyde de sodium (NaOH) ;
- Nitrobleu tetrazolium (NBT) ;
- Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) ;
- Phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4) ;
- Polyvinylpyrrolidone.

2-1-3. Matériel biologique

➤ Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles d'*Urtica dioïca* L. récoltées, en janvier 2015, dans la région de Larbaâ Nath Irathen ($36^\circ 38' 12''$ Nord, $4^\circ 12' 24''$ Est), située à 30 km à l'Est de Tizi-Ouzou (centre de l'Algérie), à 937m d'altitude (Figure 9). La plante a été identifiée au laboratoire des Ressources Naturelles par Mme Noria Smail Sadoun, professeur en botanique, à la Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Une fois récoltées, une certaine quantité des feuilles fraîches sont immédiatement lavées à l'eau courante et séchées. Afin d'éviter la perte des substances actives et la contamination causée par la poussière, les insectes ravageurs ou les rongeurs, le séchage est effectué dans une étuve à 40°C . Les feuilles sont étalées en couches minces pour optimiser le séchage afin d'éviter les moisissures, et cela pendant deux ou trois jours (jusqu'à obtention d'un poids

Matériel et méthodes

stable). Après séchage, les feuilles sont broyées, la poudre obtenue est stockée au frais (+4°C), à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.



Figure 9 : Localisation géographique de Larbaâ Nath Irathen, lieu de la récolte d'*U. dioica* (I.N.C., 1997).

➤ Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des extraits étudiés a été évaluée avec l'utilisation de souches bactériennes de référence et isolées. Les souches de référence ont été obtenues du Laboratoire de Sécurité Alimentaire (ANSES.F-94700 Maisons-Alfort, France). Nous avons utilisé cinq souches bactériennes à Gram positif, dont *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) : *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* LGA 251, *S. aureus* MU 50. Ainsi que trois souches bactériennes à Gram négatif dont *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 4352 et *Citobacter freundii* ATCC 8090. Les autres souches ont été isolées du lait cru ou acidifié et identifiées comme étant toutes des SARM, par M. Yacine Titouche, docteur à la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Le tableau VIII représente la caractérisation phénotypique et génotypique des souches isolées.

Tableau VIII : Caractérisation phénotypique et génotypique des souches *S. aureus* isolées.

Souche bactérienne	Echantillon	Origine	Type-Spa	ST	Profil des gènes de toxines	Phénotype de résistance	Gènes de résistance aux antimicrobiens
S84	raw milk	local market 4	t024	8	<i>seb, sep</i>	OFX-FOX-TE-NOR-P	<i>tet (K), blaZ, mecA</i>
S95	acidified milk	local market 4	t024	8	<i>seb, sep</i>	OFX-FOX-TE-OX-NOR-P	<i>tet (K), blaZ, mecA</i>
S96	acidified milk	local market 4	t024	8	<i>seb, sep</i>	OFX-FOX-TE-OX-NOR-P	<i>tet (K), blaZ, mecA</i>
S100	raw milk	local market 4	t024	8	<i>seb, sep</i>	OFX-FOX-TE-OX-NOR-P	<i>tet (K), blaZ, mecA</i>
S101	raw milk	local market 4	t024	8	<i>seb, sep</i>	OFX-FOX-TE-OX-NOR-P	<i>tet (K), blaZ, mecA</i>

OFX: ofloxacin; Fox: céfoxitine; TE: tétracycline; OX: oxacilline; NOR: norfloxacine; P: pénicilline; **ST**: type de séquence ; **Type-Spa**: staphylococcal protéine de type A ; **tet (k)** : gène codant pour la résistance vis-à-vis la tétracycline ; **blaZ** : gène codant pour la résistance vis-à-vis la pénicilline ; **mecA** : gène codant pour la résistance vis-à-vis la méthicilline.

➤ Souches fongiques

Le pouvoir antifongique des champignons endophytes a été évalué contre des souches fongiques de références obtenues auprès du professeur Riba (Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université M'hamed Bougara de Boumerdès). Nous avons utilisé *Fusarium culmorum* (Fc), *Fusarium proliferatum* (Fp), *Fusarium graminearum* (Fg), *Botrytis cinerea* (Bc), *Penicillium glabrum* (Pg) et *Penicillium sp* (Pe) toutes fournies par le département de botanique, école d'agriculture d'Alger ainsi qu'une souche d'*Aspergillus flavus* (Af), NRRL 3375, fournie par l'INRA de Toulouse, France.

➤ Enzymes et protéines

- ✓ Xantine oxydase (XO)
- ✓ Albumine sérique bovine (BSA)

2-2. Méthodes

Lors de cette étude, une partie des expérimentations a été réalisée sur les extraits aqueux et à l'acétate d'éthyle des feuilles d'ortie et des champignons endophytes qui la colonisent ; à savoir l'évaluation de l'activité antibactérienne et aussi pour la détermination de l'activité antiradicalaire et du pouvoir réducteur. Pour les dosages des activités enzymatiques (Superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT)) ainsi que le dosage des composés phénolique et des thiols totaux, les échantillons de feuilles d'ortie et de champignons endophytes ont été congelés et broyés en une fine poudre dans de l'azote liquide et extrait dans des solvants appropriés pour chaque dosage.

2-2-1. Coloration des feuilles d'*U. dioica* pour la mise en évidence des champignons endophytes foliaires

La coloration des feuilles d'*U. dioica* L. a été réalisée selon le protocole de Phillips et Hayman (1970), initialement prévu pour la coloration des racines. Les étapes sont :

- Rinçage des feuilles fraîches à l'eau courante ;
- mettre les feuilles dans du KOH (10%), puis à l'étuve pendant 30 min à 90°C, remplacer la solution de KOH aussitôt qu'elle devient foncée ;
- rinçage à l'eau courante à plusieurs reprises ;
- mettre les feuilles dans du H₂O₂ (10 %), à l'étuve pendant 5 min à 90°C ;
- rinçage à l'eau courante ;
- neutraliser les feuilles dans un bain d'acide lactique (10%) pendant 3 à 4 min ;
- rinçage à l'eau courante ;
- mettre les feuilles dans du Bleu Trypan, à l'étuve (90°C) pendant 2 heures ;
- rinçage à l'eau courante ;
- mettre les feuilles colorées dans du glycérol pour la conservation.

Après coloration, les feuilles sont mises entre lames et lamelles dans de la gélatine glycinée, pour une observation sous microscope optique à différents grossissements.

2-2-2. Isolement et purification des champignons endophytes foliaires

2-2-2.1. Stérilisation superficielle des feuilles et mise en culture

Les feuilles saines sans symptômes visibles de maladie sont soigneusement sélectionnées pour l'isolement des champignons endophytes. Le but de la stérilisation superficielle est l'élimination des microorganismes épiphytes qui se retrouvent au niveau du phylloplan. Les feuilles sont soigneusement lavées à l'eau courante pour éliminer la poussière et les débris adhérents. Dans des conditions aseptiques, la surface des feuilles est stérilisée dans un bain d'éthanol à 96% pendant 1 min, suivie d'un trempage dans de l'hypochlorite de sodium à 10% pendant 4 min, puis un rinçage à l'éthanol à 96% pendant 30s. A la fin, les feuilles sont lavées à l'eau distillée stérile et séchées avec du papier absorbant stérile (Schulz et *al.*, 1993).

Au total, 200 feuilles sont utilisées à raison de 20 plantes d'ortie et 10 feuilles par plante. Chaque feuille est coupée en quatre segments, puis placée de manière aseptique sur des boîtes de pétri contenant du milieu PDA, additionné de chloramphénicol (100µg/mL), pour empêcher la croissance bactérienne. Les boîtes de Pétri sont incubées à température ambiante pendant 2 mois et contrôlées quotidiennement jusqu'à l'apparition de mycélium ou de colonies. Tous les endophytes fongiques qui forment des colonies sont ensuite isolés et placés dans de nouvelles boîtes de pétri contenant du PDA, jusqu'à obtention de colonies pures. Chaque champignon isolé et purifié sera conservé sur du PDA à 4°C. Le pourcentage de colonisation (PC) est calculé en utilisant la formule suivante (Pimentel et *al.*, 2006) :

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

2-2-2.2. Validation du protocole de stérilisation superficielle des feuilles

Deux méthodes expérimentales ont été utilisées pour vérifier l'efficacité de la stérilisation superficielle et pour confirmer que les isolats provenaient des tissus internes et que les champignons épiphytes ont été éliminés. La première méthode consistait à immerger des colonies d'endophytes fongique cultivées sur gélose PDA, dans de l'éthanol à 96% pendant 1 min, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10% pendant 4 min et enfin dans de l'éthanol à 96% pendant 30s. Les cultures fongiques submergées ont été inoculées sur le même milieu de culture et incubées à 28°C, la viabilité des champignons a été suivie. La deuxième méthode consistait à tremper les échantillons de feuilles stérilisés en surface dans 5ml d'eau distillée stérile et à agiter pendant 1 min, puis centrifuger à 5000 g pendant 10 min.

Un aliquote de 0,3ml de cette suspension a ensuite été inoculé sur de la gélose PDA et incubé à 28°C, la croissance microbienne a été vérifiée (Goudjal et *al.*, 2013).

2-2-3. Identification macroscopiques et microscopiques des champignons endophytes foliaires

Après une incubation de 7 jours sur du PDA, on procède à l'identification macroscopique des genres fongiques, en se basant sur leurs caractères culturaux et la morphologie des fructifications. A cet effet, les cultures sont examinées périodiquement et regroupées en morphotypes en fonction des caractéristiques suivantes :

- Aspect et texture de la surface du thalle (velouté, laineux, poudreux, etc.) ;
- pigmentation de la colonie, des contours ainsi que la couleur du revers de la culture et celle du milieu de culture ;
- diamètre des colonies mesuré sur le fond de la boîte ;
- vitesse de croissance ;
- présence ou absence d'exsudat (gouttelettes d'eau émises par le mycélium).

Les champignons ont été aussi examinés au microscope optique afin de déterminer le mécanisme de production des spores ainsi que les caractéristiques des spores en se basant sur la morphologie des hyphes, la présence ou l'absence de septations, la couleur et la forme des spores et le regroupement des conidies (solitaires, chaîne, bouquet...). La préparation des frottis s'est faite de telle sorte à ce que les échantillons soient prélevés aussi bien des bordures des colonies, où les structures fertiles sont jeunes et les spores sont peu nombreuses, que du centre des colonies pour prélever les structures renfermant des spores matures.

2-2-4. Identification moléculaire de quelques isolats fongiques

➤ Extraction de l'ADN fongique

La caractérisation moléculaire a été réalisée sur trois isolats fongiques, considérés comme étant les plus abondants et ayant donnés des résultats prometteurs lors des tests d'activités antimicrobiennes. L'identification moléculaire s'est déroulée au sein du laboratoire BIOfidal, Lyon, France. L'extraction de l'ADN génomique s'est faite à partir des cultures pures et a été effectué en utilisant le kit d'extraction d'ADN fongique Universal Pathogen (Oméga Biotek Mag-Bind). Ensuite, l'ADN a été quantifié par dosage fluorimétrique sur l'appareil Quantus (Kit Quantifluor DNA Proméga). Les échantillons ont été stockés à 4°C pour une utilisation immédiate et à -20°C pour un stockage à long terme.

➤ **Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Les amorces ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') et ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (White et *al.*, 1990 ; Gardes et Bruns, 1993) ont été utilisées pour l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des régions transcrites internes (ITS1 et ITS2). Ces deux régions encadrent un fragment d'une taille de 600 pb. Les amorces NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') et NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Hopple et Vilgalys, 1994) ont été utilisées pour l'amplification des segments D1/D2 en 5' du gène codant pour l'ARN 28S. Le programme d'amplification consiste en une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 12 minutes (activation du Mix HotStart HOTBIOAmp), puis 30 cycles de 20 secondes de dénaturation à 96°C, 20 secondes d'hybridation à 56°C et une 1mn30s d'extension à 72°C et une extension finale de 5 minutes à 72°C.

Les séquences nucléotidiques amplifiées par PCR ont été purifiées en utilisant le kit commercial ExoSap-It, selon les instructions du fabricant. Les produits amplifiés ont été séquencés avec le kit BigDyeV3.1 Dye Terminator Kit (Thermo Fisher Scientific), en utilisant les mêmes amorces. Les séquences ont ensuite été purifiées avec le kit Big Dye Xterminator (Thermo Fisher Scientific) avant d'être analysées sur un séquenceur 96 capillaires ABI3730XL.

➤ **Analyse des séquences**

Les séquences, après vérification, ont été alignées avec le logiciel CHROMAS Pro pour créer le Contig Complet du locus séquencé. Les champignons ont été identifiés par une analyse de similarité, à cet effet, les séquences résultantes ont été soumises à des recherches BLAST dans la base de données NCBI GenBank pour comparer les données des séquences ITS trouvées à celles déposées dans la base de données des séquences génétiques. Les séquences ont été déposées dans la base de données NCBI et les numéros d'accès suivant ont été obtenus : MK880626, MK880625 et MK880627.

2-2-5. Analyse de l'activité des champignons endophytes en présence d'un stress biotique

Tous les champignons endophytes isolés ont été testés pour voir leur activité face au stress biotique. Pour cela deux méthodes ont été utilisées, la première est la double culture de diffusion sur gélose et la deuxième est la technique de la double culture ou co-culture. Chaque

isolat est confronté individuellement à des souches pathogènes. L'utilisation de ces tests peut être intéressante pour un criblage préliminaire rapide et pour le choix des isolats antagonistes putatifs, selon leur inhibition de la croissance des colonies et la production de métabolites inhibiteurs.

2-2-5.1. Antagonisme *in vitro* des champignons endophytes à l'égard des bactéries pathogènes

Nous avons utilisé la méthode de double culture de diffusion sur gélose. De jeunes cultures de champignons endophytes âgées de 6 jours ont été testées contre les bactéries suscitées. Cette technique a été décrite par Devaraju et Satish en 2011. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien (métabolites secondaires des champignons) en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure du diamètre d'une zone d'inhibition.

Initialement, les souches bactériennes ont été inoculées sur des tubes contenant du milieu BHI stérile et incubées à 37°C pendant 18 h. L'inoculation par écouvillonnage d'une gélose Muller-Hinton par cette suspension bactérienne dont la turbidité a été ajustée à 0,5 McFarland. Par la suite, des disques de 5 mm de diamètre des champignons endophytes ont été déposés sur la géloseensemencée, à l'aide d'une pince stérile. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 18h. Les tests ont été répétés trois fois. L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque.

2-2-5.2. Antagonisme *in vitro* des champignons endophytes à l'égard des champignons phytopathogènes

Le pouvoir antifongique a été estimé en utilisant la technique de la double culture décrite par Orole et Adejumo (2009). Elle consiste à mettre un disque de 5 mm de diamètre du champignon endophyte provenant d'une culture de 6 jours sur une boîte de pétri contenant du PDA, ensuite un autre disque de même diamètre du champignon phytopathogène (jeunes cultures de 6 jours) est mis à l'autre extrémité de la boîte avec une distance de 50 mm entre les deux disques. Les boîtes inoculées avec l'endophytes ainsi que les boîtes témoins, qui ne contiennent pas l'endophyte, sont incubées à 28°C. Après 8 jours d'incubation le rayon de chaque champignon pathogène est mesuré dans le sens du champignon endophyte, ainsi que dans les boîtes contrôles.

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (PI)} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

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

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

2-2-6. Préparation des extractions végétales

L'extraction par macération dans l'eau ou dans l'acétate d'éthyle a été réalisée. 20 g de poudre séchée ont été mélangés à 200 ml d'eau ou d'acétate d'éthyle, le mélange est agité vigoureusement à l'aide d'un agitateur magnétique, à température ambiante pendant 24h. Les mélanges ont été filtrés sur du papier Whatman N°1. Le filtrat d'eau a été congelé et lyophilisé dans un lyophilisateur à une pression de 5 mHg à -50°C. Le filtrat d'acétate d'éthyle a été concentré en utilisant un évaporateur rotatif sous vide à pression réduite à 40°C. Les extraits de feuilles d'ortie ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2-2-7. Préparation des extraits fongiques

Trois isolats fongiques considérés comme étant les plus abondants avec des résultats pro-bons lors des tests d'activités antimicrobiennes, ont été choisis pour la suite du travail. Les champignons endophytes sélectionnés ont été cultivés sur du PDA à 28°C pendant 6 jours. Par la suite, chaque champignon a été cultivé sur un bouillon de dextrose de pomme de terre (PDB) en plaçant quatre pièces (5 mm de diamètre) de chaque champignon, provenant de culture pure en croissance active, dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu PDB, ceci a été répété cinq fois (Nath et *al.*, 2012). Chaque flacon a été incubé à 28°C pendant quatre semaines, avec une agitation périodique et une vérification d'éventuelle contamination.

Après la période d'incubation, le bouillon fermenté a été filtré à l'aide de trois couches de tissu de mousseline, pour éliminer le mycélium, et centrifugé à 5000 g pendant 10 min, à 4°C (Mohanta et *al.*, 2008 ; Barik et *al.*, 2010 ; Madki et *al.*, 2010). Le surnageant de culture a été soit congelé et lyophilisé dans un lyophilisateur à une pression de 5 mHg à -50°C, ou extrait avec un solvant organique, l'acétate d'éthyle. À chaque filtrat on rajoute un volume égal de solvant et on le met sous agitation pendant deux heures, la solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décompter, pour séparer les deux phases. La phase organique a été recueillie et le solvant a ensuite été éliminé par évaporation sous pression réduite à 40°C, en

utilisant un évaporateur rotatif sous vide (Mohanta et *al.*, 2008). Les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2-2-8. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par l'utilisation de deux méthodes, celle de la diffusion sur gélose, qui consiste à déterminer la sensibilité des souches bactérienne utilisées vis-à-vis des différents extraits étudiés et la méthode de macro-dilution en série, dans le bouillon Mueller-Hinton, pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB).

Les différentes souches bactériennes, précédemment citées, sont d'abord repiquées par la méthode des stries sur milieu BHI, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées. Une ou plusieurs colonies de chaque culture pure sont prélevées et transférées dans l'eau physiologique stérile (0,9 % P/V). La densité optique des suspensions a été ajustée de 0.08 à 0.1, lue à 620 nm, ce qui correspond à une densité cellulaire voisine à celle de 0,5 McFarland. On obtient alors un inoculum estimé entre 10^7 - 10^8 UFC/ml.

2-2-8.1. Méthode de diffusion sur gélose

Les extraits lyophilisés des feuilles d'ortie et des champignons endophytes ont été dilués dans de l'eau distillée à raison de 5 mg/mL et les extraits d'acétate d'éthyle ont été dilués dans du diméthylsulfoxyde à raison de 5 mg/mL (DMSO, dilué au 1/10). Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, un prélèvement à partir de ce dernier sert à ensemercer de nouvelles boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton par la technique d'écouvillonnage.

Pour chaque extrait, un disque de papier Wattman stérilisé, de 5 mm de diamètre, a été saturé avec 20 µL d'extrait brut et placé sur les géloses Muller-Hinton précédemmentensemencées. Un disque saturé uniquement de DMSO ou d'eau distillée a été utilisé comme témoin négatif. De plus, un disque standard contenant l'antibiotique de référence, le chloramphénicol (30 µg/disque), a été utilisé comme témoin positif. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. Toutes les boîtes de pétri ont été incubées à +4°C pendant 2 puis à 37°C pendant 18 à 24 h.

L'effet des extraits se traduit par l'apparition autour des disques d'un halo translucide correspondant à l'absence de la croissance bactérienne. L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant les diamètres (mm) des zones d'inhibition par rapport aux standards et les résultats sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (Valgas et *al.*, 2007).

2-2-8.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI / CMB) des extraits

Les CMI des extraits ont été déterminées en utilisant la méthode de macro-dilution en série dans le bouillon Mueller-Hinton (Saha et Rahman, 2008). On procède à une dilution successive par progression géométrique à raison de 2 des extraits bruts concentrés. Chaque extrait brut a été dilué en série de 25 à 0,19mg/mL. Les inocula ont été préparés dans le bouillon Mueller-Hinton et standardisé à 0,5 McFarland.

Ensuite, 1 mL de chaque dilution a été ajouté à 1 mL d'inoculum. Des milieux de culture sans échantillons et d'autres milieux sans micro-organismes ont été utilisés comme témoins dans les tests. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 18 à 24 h. La croissance bactérienne a été détectée par la recherche de turbidité et la mesure de la densité optique (DO) à 620 nm. La valeur CMI a été définie comme la concentration la plus faible de la préparation d'extraits dans laquelle aucune croissance bactérienne ne s'est produite et qui est exprimée en mg/mL. Tous les tests ont été répétés trois fois.

L'examen de la CMB consiste à transférer 100 μ L de culture bactérienne de chaque puits où aucune croissance n'a été observée dans des géloses Müller-Hinton. Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. La croissance des colonies sur les boîtes de pétri a été vérifiée après cette période. La CMB a été définie comme étant la plus faible concentration d'extrait qui a entraîné une inhibition complète de la croissance bactérienne, et elle est exprimée en mg/mL. L'effet antibactérien a été jugé bactéricide ou bactériostatique en fonction du rapport : CMB/CMI. En effet, si le rapport CMB/CMI est inférieur à 4, l'effet est bactéricide et si ce rapport est supérieur à 4, l'effet est bactériostatique (Berche et *al.*, 1991).

2-2-9. Systèmes anti-oxydatifs enzymatiques

2-2-9.1. Extraction et dosage des protéines

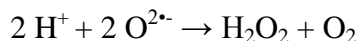
Les échantillons de feuilles et de champignons endophytes congelées ont été broyées en une fine poudre dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. La poudre obtenue a été solubilisée dans 1 mL de tampon d'extraction contenant du tampon phosphate 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, 1%(p/v) de polyvinylpyrrolidone et 10% (v/v) de glycérol. Le mélange a été centrifugé à 16000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant résultant a été récupéré et utilisé pour la quantification des protéines et la détermination des activités enzymatiques.

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Bradford (1976). Cette technique utilise du bleu de Coomassie G250 qui a la propriété de s'adsorber sur les protéines. Ce colorant contenu dans le réactif réagit avec l'arginine et dans une moindre mesure avec l'histidine, la lysine et les acides aminés aromatiques des protéines pour donner une couleur bleue dont l'intensité est mesurée à 595 nm.

On ajoute 10 µL d'extrait protéique à 200 µL de réactif de Bradford et 790 µL d'H₂O. Puis on effectue la lecture à 595 nm. Le blanc est fait sur un échantillon auquel on n'ajoute pas d'extrait protéique. La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée dans les mêmes conditions avec des échantillons d'albumine sérique bovine (BSA) de concentrations connus (0-15 µg/mL). Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

2-2-9.2. Dosage de l'activité de la Superoxide dismutase (SOD)

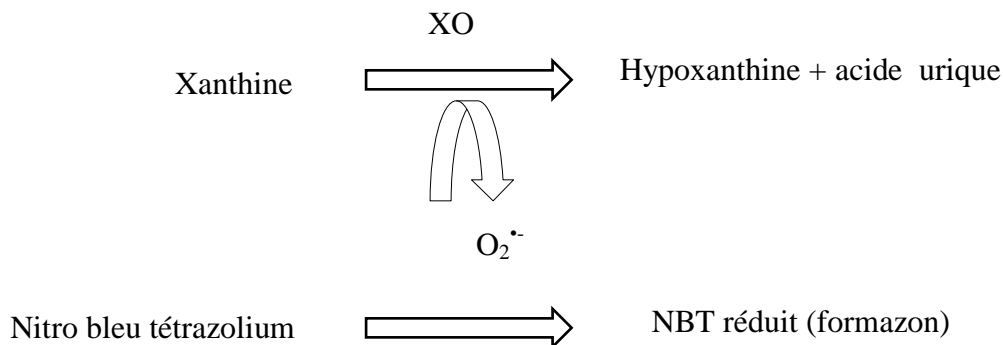
La Superoxide dismutase (SOD - CE 1.15.1.1) est une métalloenzyme. Il s'agit d'une des premières lignes de défense contre les ROS. C'est l'enzyme antioxydante (anti O₂^{•-}) la plus importante dans toutes les cellules car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), en se basant sur la réaction suivante :



La méthode utilisée est celle d'Issawi et *al.*, (2018). Cette méthode repose sur les usages compétitifs du radical superoxyde O₂^{•-} de plusieurs réactions. L'anion superoxyde est produit par l'activité de la xanthine oxydase (XO) qui transforme la xanthine en acide urique. La réduction du nitro bleu tétrazolium (NBT) utilise le radical superoxyde O₂^{•-} et cette réaction peut être quantifiée par la mesure de l'absorbance à 560nm. L'activité de la SOD inhibe cette

Matériel et méthodes

réaction par l'utilisation du radical superoxide $O_2^{\bullet-}$ pour produire du H_2O_2 . L'activité de la SOD est donc quantifiée en fonction du degré d'inhibition de la réduction du NBT.



La mesure de l'activité enzymatique se fait à 560 nm par un spectrophotomètre double faisceaux (SHIMADZU), la cinétique a été réalisée sur 5 min (une mesure chaque 20 sec). 30 μ g de protéines solubles totales de chaque échantillon ont été dilués dans un tampon phosphate 50 mM (pH 7,8), contenant 10 μ L de xanthine (10 Mm), 10 μ L de diethylenetriaminepenta acetic acid (DETAPAC) (0,1 M), 56 μ L de nitro bleu tétrazolium (NBT) (1 mM). Le volume de la xanthine oxydase à ajouter est de 2 μ L (1 unité). L'activité spécifique de la SOD est exprimée en $U.mg^{-1}$ de protéines. Une unité d'activité SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber 50% de la réaction du NBT.

$$\% \text{ Inhibition} = [(\Delta \text{ DO contrôle} - \Delta \text{ DO échantillon}) / \Delta \text{ DO contrôle}] \times 100.$$

2-2-9.3. Dosage de l'activité de la Catalase (CAT)

La catalase (CAT- EC 1.11.1.6) est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produit par la SOD), selon la réaction suivante : $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode décrite par Issawi et *al.*, (2018). Cette méthode est basée sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène, du fait de l'activité de la catalase, à 240 nm pendant 3 min (une mesure chaque 20 sec). 40 μ g des protéines solubles totales de chaque échantillon ont été diluées dans un tampon phosphate potassium 50 mM (pH 6,5). La réaction a été initiée par l'addition de H_2O_2 à une concentration finale de 20 mM. La quantité de H_2O_2 est calculée sur la base du coefficient d'extinction molaire de $43,6 M^{-1}.cm^{-1}$. L'activité enzymatique est calculée sur la pente de la partie linéaire de la courbe résultante et elle est exprimée en $mmol.mn^{-1}.mg^{-1}$ de protéine.

2-2-10. Systèmes anti-oxydatifs non enzymatique

2-2-10.1. Dosage des thiols totaux

Le dosage des thiols totaux a été réalisé selon Issawi et *al.*, (2018). Des échantillons congelés de feuilles d'ortie et de champignons endophytes ont été broyés dans de l'azote liquide, puis extraits dans 1 ml de HCl 0,2N. Après centrifugation à 16000 g pendant 4 min, 500 μ L de solution extraite ont été neutralisés avec 400 μ L de NaOH (0,2 M) et 50 μ L de NaH_2PO_4 (0,2 M). 0,7 mL de NaH_2PO_4 (0,12M - pH 7,5), 6 μ L d'EDTA (1M), 0,1 mL de l'acide Dithiobis 2-nitro benzoïque (DTNB, 6mM) ont été ajoutés à 0,2 mL d'extrait. Pour les standards, l'extrait a été remplacé par 0, 10, 20, 50 et 100 nmol de glutathion réduit (volume total 1 mL). L'absorbance a été lue à 412 nm, 5 min après l'addition de l'étalon ou de l'extrait.

2-2-10.2. Dosage des composés phénoliques totaux

Le contenu phénolique total (CP) a été déterminé en utilisant la méthode au Folin-Ciocalteu avec quelques modifications (Singleton et Rossi 1965), qui repose sur la grande oxydabilité de ces composés. Le réactif utilisé est réduit lors de l'oxydation des phénols, en milieu alcalin, en un chromogène de couleur bleu qui absorbe à 760 nm. La coloration produite est proportionnelle à la quantité en CP totaux.

Des échantillons de feuilles d'ortie et de champignons endophytes congelés ont été broyés en une fine poudre dans de l'azote liquide, puis extraits dans de l'éthanol (2 mL, 96%). Après centrifugation à 12 000 g pendant 15 min, 1,25 mL de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10) et 1 mL de carbonate de sodium (75 g.L^{-1}) ont été ajoutés simultanément au mélange puis vortexés. Au bout de 5 minutes, 10 ml d'une solution de Na_2CO_3 à 7% ont été ajoutés au mélange. Le mélange réactionnel a été incubé à 50°C pendant 5 minutes et l'absorbance a été mesurée à 760 nm. L'acide gallique (GA) est utilisé comme standard pour établir la courbe d'étalonnage dans une gamme allant de 0-100 $\mu\text{g/mL}$.

2-2-11. Détermination de l'activité antioxydante des extraits

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être évaluée quantitativement, d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de différentes expérimentations complémentaires pour avoir une indication sur le potentiel antioxydant des échantillons étudiés (Sanchez-Moreno, 2002). Lors de cette étude

nous avons choisi d'évaluer cette activité antioxydante par deux tests : le test de piégeage du radical 1,1 diphenyl 2-picrylhydrazyl (DPPH) et le pouvoir réducteur.

2-2-11.1. Test de piégeage du radical DPPH

Le 1,1diphényl 2-picrylhydrazyl (DPPH•) est un radical libre relativement stable en raison de la délocalisation de l'électron, de couleur violette et qui présente une bande d'absorption dans une solution d'éthanol centrée à environ 517 nm. Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée à celle d'un substrat (AH) qui peut donner un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite (DPPH-H), selon l'équation de la figure 10, avec la perte de cette couleur violette et un changement de couleur qui vire au jaune. La réduction du DPPH• est suivie par la mesure de la diminution de son absorbance à 517 nm, selon le protocole décrit par Brand-Williams et *al.*, (1995).

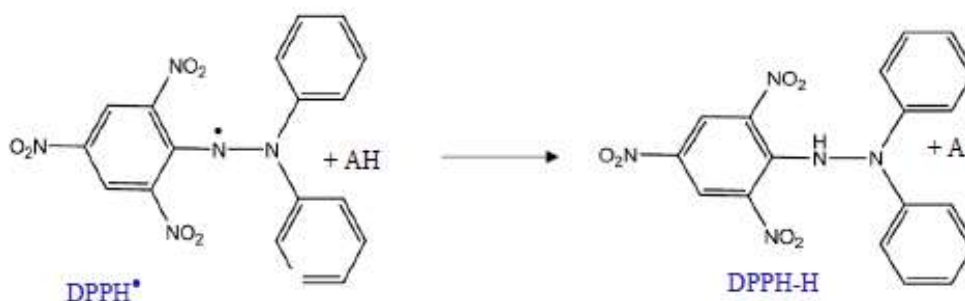


Figure 10 : Structure du DPPH• et sa réduction par l'antioxydant AH (Paixao et *al.*, 2007).

Les extraits de feuilles et de champignons endophytes ont été dilués en série entre 50 et 450 µg/mL. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif. Pour le contrôle négatif et le blanc, une solution de DPPH dans du méthanol et du méthanol ont été utilisés. Des solutions de DPPH dans du méthanol (0,1 mM, 1,95 ml) ont été mélangées avec 50µl d'extraits. Le mélange réactionnel a été vortexé puis incubé à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre à 517 nm. La diminution de l'absorbance du mélange réactionnel a indiqué une activité de piégeage des radicaux libres plus élevée, qui a été calculée à l'aide de l'équation suivante:

(%) d'inhibition du DPPH = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$; où, A_0 est l'absorbance du témoin et A_1 est l'absorbance de l'extrait. Pour toutes les concentrations, les résultats sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type.

L'activité anti radicalaire des extraits est aussi exprimée en termes de concentration inhibitrice à 50 % (IC50). La valeur d'IC50 est déterminée graphiquement par la régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés. L'IC50 exprime la concentration de l'extrait testé requise pour le piégeage de 50% des moles de la solution de DPPH•. Notons que l'activité antioxydante est inversement proportionnelle à la valeur de l'IC50. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (Pokorny *et al.*, 2001).

2-2-11.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu (1986), basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} (figure 11). La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}). Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle d'un composé. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700nm.

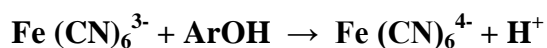


Figure 11 : Réactions mises en jeu dans le test au ferrocyanure de potassium (Apak *et al.*, 2007).

Un volume égal à 1mL de l'échantillon à différentes concentrations (de 100 à 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$) est mélangé avec 2,5mL d'une solution tampon phosphate 0,2M (pH = 6.6) et 2,5mL d'une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Une quantité de 2,5mL d'acide trichloroacétique (10%) a été également ajoutée au mélange pour stopper la réaction, les tubes ont été centrifugés à 3000g pendant 10 minutes. La couche supérieure de la solution (2,5mL) a été mélangée avec de l'eau distillée (2,5mL) et du FeCl_3 (0,5mL, 0,1%) puis l'absorbance a été prise à 700 nm contre un blanc au moyen d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif aux mêmes concentrations choisies pour les extraits et dans les mêmes conditions expérimentales.

Pour exprimer les résultats obtenus, les graphes des absorbances obtenues sont tracés en fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Pour chaque concentration, les résultats sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type.

2-2-12. Caractérisation des extraits végétaux et fongiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

L'analyse chimique des différents extraits a été réalisée par la technique de chromatographie en phase liquide. L'analyse est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase liquide de marque AGILENT série 1100, équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) avec plusieurs longueurs d'ondes choisies en fonction des absorbances maximales des molécules recherchées, d'une pompe quaternaire, dégazeur on-line et injecteur automatique. Le chromatographe est muni d'une colonne Hypersil BDS-C18, 5 μ m, 250X4,6 à température de 30°C.

L'élution a été réalisée par une phase mobile composée d'un gradient de solvant allant de 95% d'eau acidifiée à 0,2% par l'acide acétique (pH3,1) jusqu'à 100% d'acétonitrile pendant 30 minutes. Le volume injecté est de 5 μ l pour chaque extrait. Le débit d'écoulement est de 1,5 ml/min.

La concentration de chaque composé phénolique de l'extrait est exprimée en pourcentage à partir des aires des pics obtenus. Leur identification est réalisée par comparaison des temps de rétentions des différents standards analysés selon le même mode opératoire.

2-2-13. Analyse statistique

Toutes les expériences biologiques ont été réalisées au moins trois fois. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm ET. Les données ont été analysées par le test t de Student et l'ANOVA l'aide du logiciel PAST.

En parallèle, des histogrammes concernant les différences des fréquences de colonisation pour chaque sujet ont été tracés. Une analyse statistique de type ANOVA (logiciel Stat Box 6.40) a été réalisée afin de mettre en évidence les différences entre les fréquences de colonisations. Un test complémentaire de comparaisons multiples des moyennes (NEWMAN-KEULS) a été réalisé pour classer ces sujets en groupes homogènes.



Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3-1. Localisation des champignons endophytes dans le tissu foliaire d'*Urtica dioica*

Le développement des champignons endophytes dans le tissu foliaire d'*Urtica dioica* a été observé en utilisant la microscopie optique inversée. Il a été possible d'observer une colonisation étendue et disséminée le long de toutes les parties des feuilles. Les endophytes variaient en type, en taille et en emplacement dans le tissu foliaire. Les hyphes étaient les principales structures fongiques observées, généralement trouvées dans les cellules épidermiques, les cellules du parenchyme et également dans le tissu vasculaire. L'entrée d'hyphes à partir d'une cellule épidermique à une autre (les hyphes se déplaçaient entre les cellules du parenchyme) et le regroupement des hyphes a également été observé (masse mycélienne). Des champignons endophytes ont également été observés au niveau des stomates et des poils urticants. Les spores des champignons endophytes ont été également visualisées (Figure 12).

La présente étude trouve des preuves de la colonisation fongique des tissus foliaires d'*Urtica dioica* en utilisant la méthode de coloration différentielle grâce à la visualisation des hyphes. Il est bien connu que les observations histologiques des hyphes fournissent des preuves de la présence de champignons endophytes (Spurr et Welty, 1975) et indiquent également l'emplacement exact de la communauté fongique. La croissance de champignons endophytes à l'intérieur de différentes cellules du tissu est évidente à partir des hyphes en forme de filet pénétrant à travers la paroi cellulaire et s'étendant à partir du faisceau fibrillaire et des cellules du parenchyme. Les méthodes microscopiques peuvent révéler les emplacements précis des champignons endophytes (Kuldau et Yates, 2000), et l'étendue de la colonisation (Muniz et al., 2011) comme le montre également la présente étude. Plusieurs auteurs ont précédemment signalé les techniques de colorations différentielle et de microscopie optique pour détecter clairement la présence de structures fongiques chez différentes plantes hôtes (Petrini et Fischer 1990 ; Kowalski et Kehr, 1992 ; Baum et al., 2003 ; Gomez-Vidal et al., 2006 ; Oses et al., 2008 ; Bernardi-Wenzel et al., 2010 ; Garcia et al., 2012).

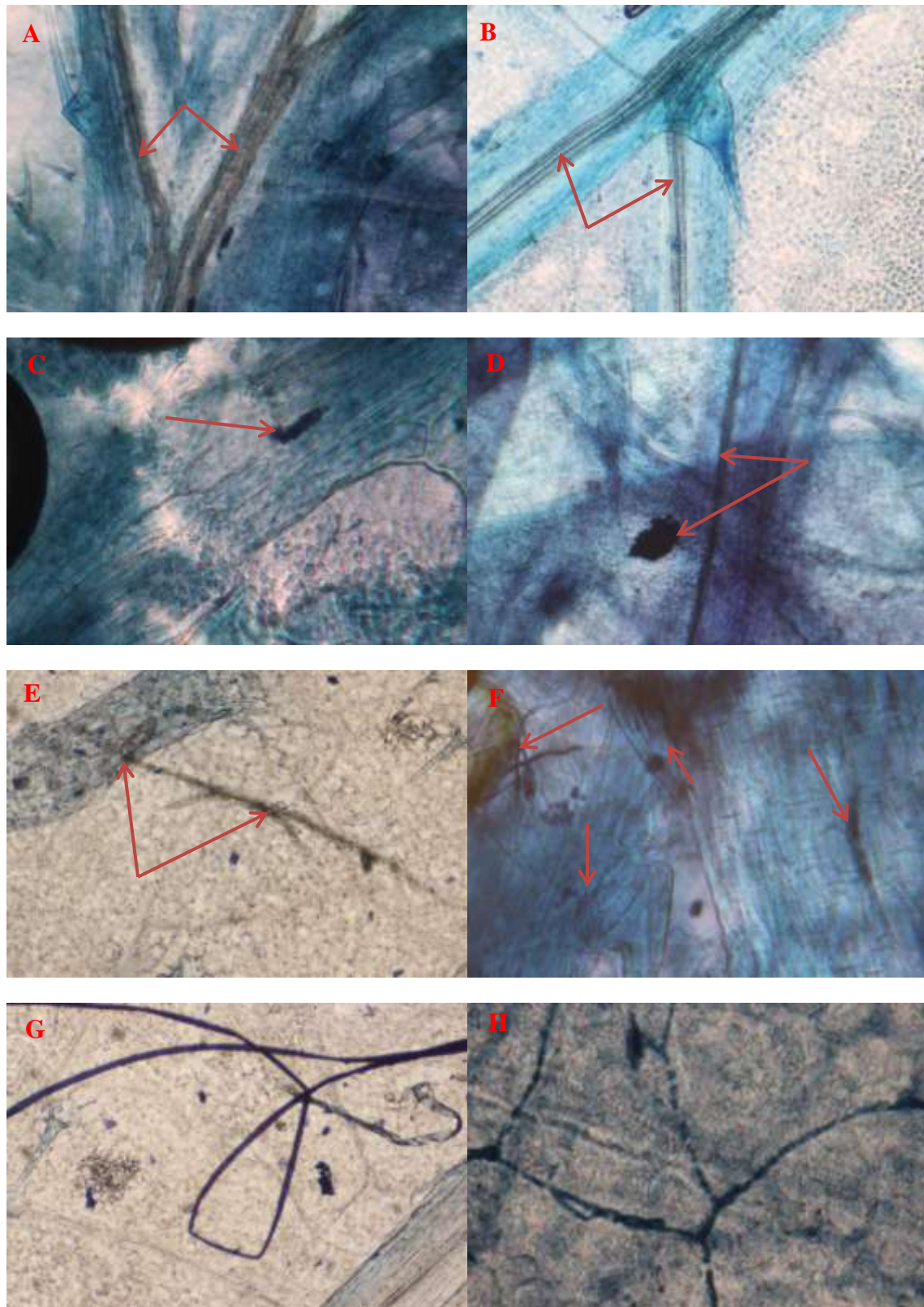


Figure 12 : Observations microscopiques (X 400) d'une colonisation inter et intracellulaire du tissu foliaire d'*Urtica dioica* par les champignons endophytes (A et B) : au niveau des tissus vasculaires, (C et D) : masses mycéliennes, (E) : au niveau du parenchyme, (F, G et H) : structures hyphales.

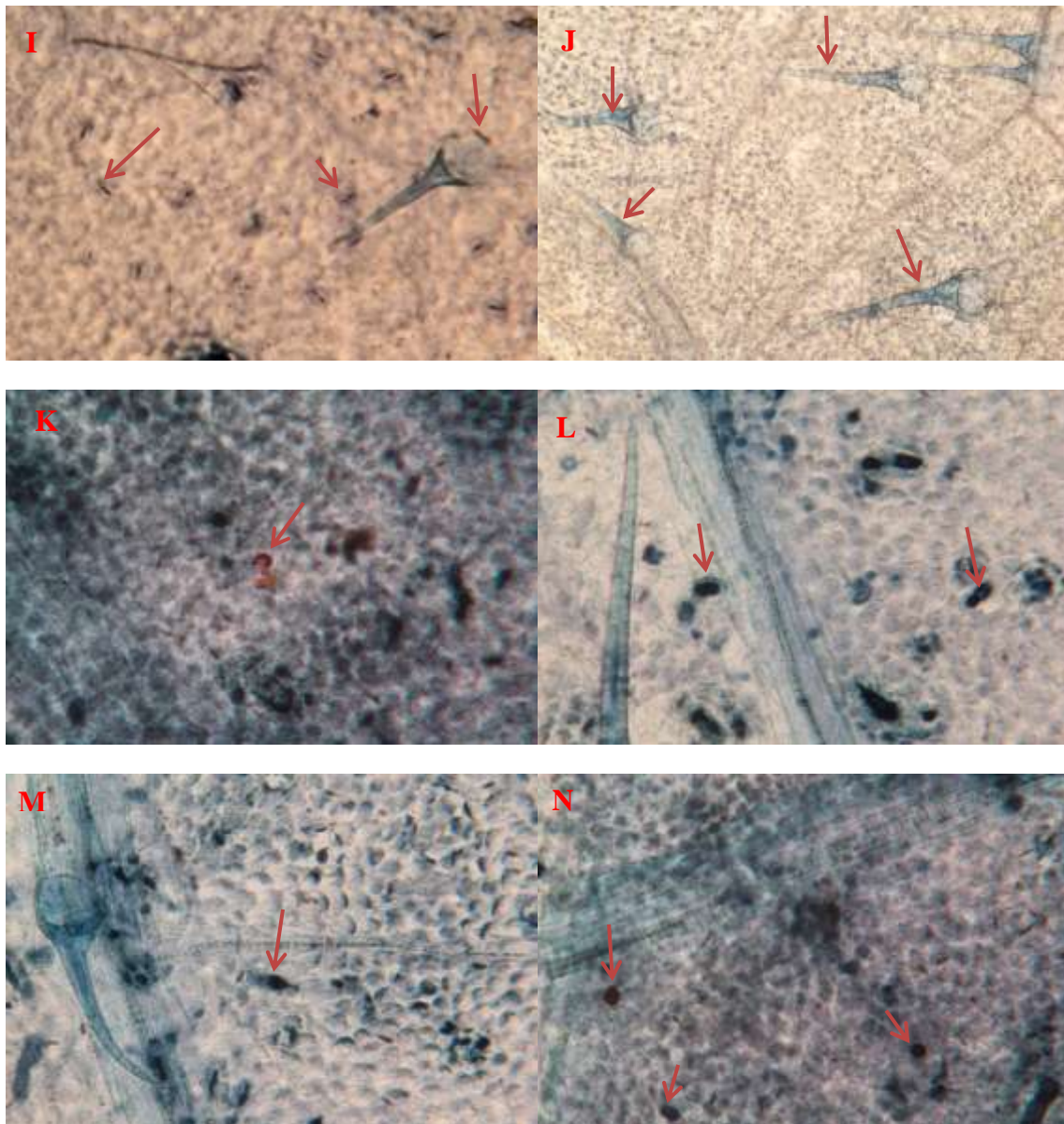


Figure 12 (suite) : Observations microscopiques (X 400) d'une colonisation inter et intracellulaire du tissu foliaire d'*Urtica dioica* par les champignons endophytes (I) : au niveau des stomates, (J) : au niveau des poils urticants, (K, L, M et N) : spores de champignons endophytes.

L'importance de la détection de la colonisation inter ou intracellulaire par les champignons endophytes permet de mieux comprendre l'interaction endophyte/hôte. À cet égard, Garcia et *al.*, (2012) pensent que la colonisation intracellulaire des feuilles par des champignons endophytes indique une forte interaction entre eux, positivement sélectionnés dans un événement co-évolonnaire. Kneip et *al.*, (2007), en étudiant de nouveaux modèles de symbiose, ont comparé les caractéristiques morphologiques, physiologiques et moléculaires des associations symbiotiques de fixation d'azote de bactéries et de leurs divers hôtes. Des particularités de l'interaction, comme la transmission verticale des symbiotes, le degré de dépendance des partenaires et les modifications physiologiques ont été considérées en termes de degré de coévolution et d'adaptation. Selon eux, certaines interactions révèlent un statut plus obligatoire de coévolution. Les divers degrés de symbioses, allant d'associations lâches à des interactions intracellulaires hautement spécifiques, pourraient refléter les destins évolutifs potentiels pour les partenariats symbiotiques.

Selon Kuldau et Bacon, (2008), les espaces intracellulaires contiennent de nombreux nutriments organiques et inorganiques, capables de supporter la concentration de champignons endophytes observée chez les graminées.

Les champignons endophytes colonisent donc les espaces intracellulaires car ce sont des niches protégées où il y a peu de concurrence avec les autres organismes et en raison de l'abondance nutritionnelle qu'ils y trouvent.

Bernardi-Wenzel et *al.*, (2010), en utilisant la microscopie optique, ont visualisé des champignons endophytes qui habitent les espaces inter et intracellulaires des feuilles de *Luhea divaricata*. Il a été possible d'observer une colonisation dans le parenchyme palissade, le sclérenchyme, l'épiderme adaxial et les vaisseaux conducteurs, indiquant une interaction étroite entre les endophytes dans de multiples sous-niches structurales et trophiques chez l'hôte. Ces résultats confirment les données présentées dans l'étude microscopique de la colonisation des feuilles d'*Urtica dioica* par les champignons endophytes.

C'est de la même manière que Gómez-Vidal et *al.*, (2006), ont étudié la colonisation endophytique des feuilles de palmier *Phoenix dactylifera* L. par des champignons, ils ont observé une forte densité d'hyphes colonisateurs dans les espaces inter- et intracellulaires du parenchyme. Durán et *al.*, (2005) ont également visualisé des hyphes fongiques collés à des cellules du parenchyme palissade dans les feuilles de *Citrus limon*.

Selon Deshmukh et *al.*, (2006), la colonisation fongique se produit par invasion intra et intercellulaire des tissus environnants et augmente progressivement avec la maturation des tissus. La colonisation commence à partir des chlamydospores qui, lors de la germination, forment finalement un réseau hyphal à l'intérieur du tissu. L'hyphe entre dans la couche sous-épidermique à travers les espaces intercellulaires où ils se ramifient et continuent de croître.

D'après Muniz et *al.*, (2011), les hyphes pénètrent l'espace entre la cellule et la membrane plasmique des cellules corticales. La pénétration des hyphes fongiques dans les parois cellulaires et la distribution des champignons entre les cellules voisines mettant en évidence les sites de pénétration et d'invasion. Cela indique que la paroi cellulaire, les glucides complexes sont facilement brisés par l'appareil enzymatique des champignons. Cela peut signifier que la pénétration du champignon dans les cellules est liée à la croissance et à l'expansion du mycélium. Une observation similaire a été faite par Sathe et Raghukumar (1991).

3-2. Fréquence de colonisation du tissu foliaire d'*Urtica dioica* par les champignons endophytes

Afin de vérifier l'efficacité du protocole de stérilisation superficielle et de pouvoir confirmer que les isolats obtenus provenaient bien des tissus internes des feuilles d'*Urtica dioica*, les colonies fongiques obtenues ont été traitées avec le protocole de stérilisation de surface, mais elles n'ont montré aucune croissance microbienne sur milieu PDA. De plus, l'eau de lavage de toutes les feuilles stérilisées en surface n'a également montré aucune croissance sur le même milieu. Cela prouve que les champignons épiphytes ont bien été éliminés et ne pouvaient pas se développer après le protocole de stérilisation de surface. De ce fait, les isolats fongiques obtenus étaient bien des endophytes.

Un total de 144 champignons endophytes ont été isolés des 800 fragments de feuilles analysées, donnant une fréquence de colonisation en pourcentage de 18%. Les fréquences de colonisation des différents sujets indiquent une divergence de colonisation par les champignons endophytes (Figure 13). L'analyse ANOVA a révélé une différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre les fréquences de colonisations des 20 sujets analysés. La fréquence de colonisation la plus élevée est observée chez le sujet 3 (40 %), suivi de celle du sujet 2 (37,5 %), et la fréquence de colonisation la plus faible est observée chez le sujet 11 (2,5 %).

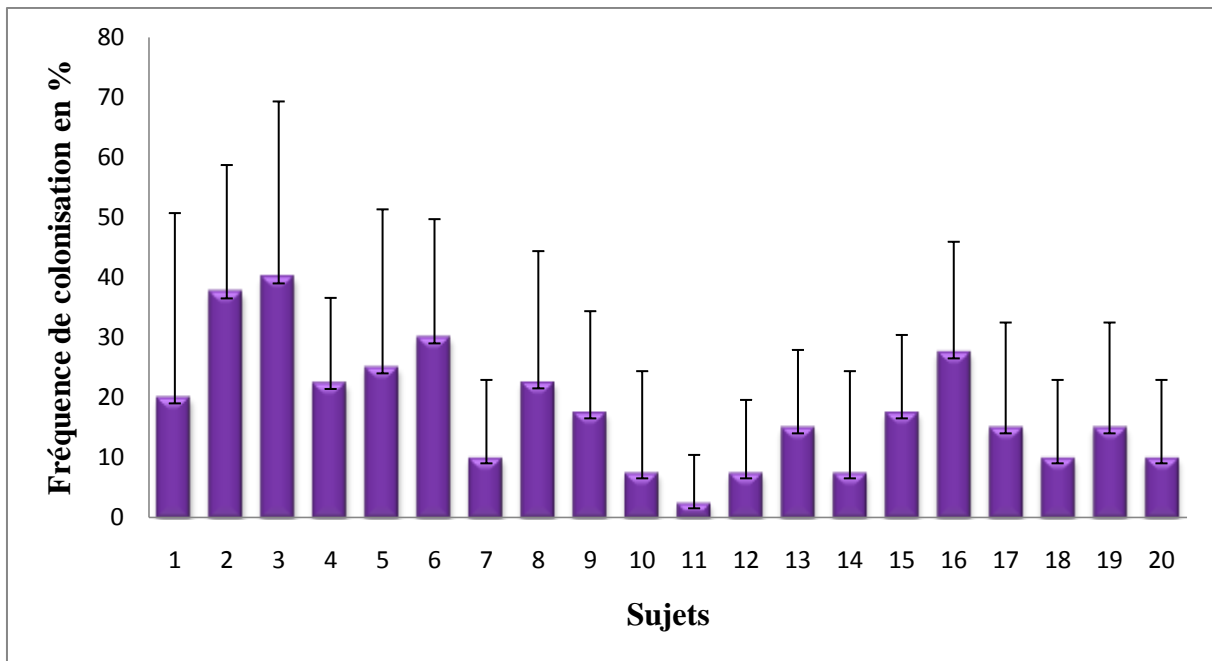


Figure 13: Fréquence de colonisation (%) par les champignons endophytes foliaires d'*Urtica dioica* chez les sujets analysés.

Le test complémentaire de comparaisons multiples des moyennes (NEWMAN KEULS) a permis de classer les sujets analysés en groupes homogènes suivant les moyennes des fréquences de colonisations par les champignons endophytes foliaires. Il y a eu formation de 5 groupes homogènes (A, AB, ABC, BC et C) (Tableau IX).

La fréquence de colonisation des champignons endophytes observée dans cette étude rentre bien dans la gamme de fréquence de colonisation de nombreuses plantes hôtes étudiées jusqu'à présent. Nous avons également constaté une différence de la fréquence d'infection des 20 sujets étudiés. Cette variation de l'incidence des champignons endophytes dans les plantes hôtes peut être due à plusieurs facteurs, notamment, l'espèce de l'hôte, le stade de développement au cours duquel la plante a été échantillonnée (Miller et Roy, 1982), les conditions environnementales (Elamo et *al.*, 1999), l'emplacement de la plante telles que l'élévation, l'exposition et la végétation, ainsi que le type et l'âge des tissus (Arnold et Herre, 2003).

Tableau IX : Comparaison des moyennes des fréquences de colonisations par les champignons endophytes foliaires d'*Urtica dioica* des différents sujets analysés.

Sujet	Groupe	Moyenne (%)
Sujet 11	A	2,50
Sujet 12	AB	7,50
Sujet 14	AB	7,50
Sujet 10	AB	7,50
Sujet 18	ABC	10,00
Sujet 20	ABC	10,00
Sujet 07	ABC	10,00
Sujet 17	ABC	15,00
Sujet 19	ABC	15,00
Sujet 13	ABC	15,00
Sujet 15	ABC	15,00
Sujet 09	ABC	17,50
Sujet 01	ABC	20,00
Sujet 08	ABC	22,50
Sujet 04	ABC	22,50
Sujet 05	ABC	25,00
Sujet 16	ABC	27,50
Sujet 06	ABC	30,00
Sujet 02	BC	37,50
Sujet 03	C	40,00

Une tendance constante confirmée à plusieurs reprises pour la fréquence globale des infections par les champignons endophytes qui augmente avec l'âge des organes ou des tissus de l'hôte. Ceci est mieux observé à partir de plantes à feuilles persistantes ou de plantes à feuillage de longue durée, mais est également apparent à un moindre degré dans les arbres à feuilles caduques et les plantes annuelles. A cet effet, Pimentel et *al.*, (2006) ont constaté que le nombre d'isolats obtenus à partir des plantes cultivées au champ diminuent avec l'âge des plantes, cela pourrait être dû à un manque de nutriments essentiels, comme cela a été observé par McInroy et Kloeper, (1995) pour les bactéries endophytes. Ils ont montré que certains des nutriments nécessaires à ces bactéries n'étaient pas disponibles pendant la maturation et la sénescence des plantes. Une augmentation du mycobiote endophyte des plantes hôtes de jeune à mature ont également été mises en évidence pour plusieurs populations endophytes (Pereira et *al.*, 1993; Rodrigues, 1994 ; Toofanee et Dulymamode, 2002 ; Suryanarayanan et Thennarasan, 2004).

Fisher et *al.*, (1992) en étudiant l'effet du site d'isolement sur le nombre d'isolats fongiques, ont observé que les parties de tiges de maïs les plus proches du sol présentaient une

incidence plus faible d'infection fongique que celles qui étaient plus en hauteur et ont expliqué cela comme étant probablement dû au fait que ces parties de la tige avaient une fréquence accrue de bactéries, ce qui a inhibé la colonisation fongique. De plus, les emplacements géographiques des sites d'échantillonnage peuvent également affecter la population des champignons endophytes des plantes médicinales, une étude d'Arnold et Lutzoni, (2007) a démontré que le pourcentage de colonisation des tissus diminue avec une latitude croissante, en parallèle, certaines études ont également montré une réponse mixte où la fréquence de colonisation n'était pas affectée, augmentée ou diminuée avec l'altitude (Hashizume et al., 2008 ; Kazenel, 2016)

Certaines études suggèrent également que la colonisation par les endophytes est corrélée aux facteurs climatiques (Wilson et Carroll, 1994). Ces facteurs peuvent déterminer la propagation et la germination des spores des endophytes fongiques (Schulthess et Faeth, 1998).

Cependant, il est important de ne pas perdre de vue que ces champignons endophytes ont été isolés par la méthodologie traditionnelle, il est donc concevable de n'obtenir que les champignons cultivables à croissance plus rapide et qu'il est très probable que certains ou même de nombreux endophytes ne soient jamais isolés. Et c'est dans la même optique que Hyde et Soyong, (2008), ont souligné que le défaut le plus important, mais rarement mentionné dans les études sur les endophytes, est le fait que des fragments végétaux sont placés sur de la gélose et que les endophytes isolés dans toute étude sont ceux qui poussent, et qu'il y a de nombreux champignons incapables de se développer en culture. L'utilisation d'approches moléculaires directement sur les tissus végétaux pourrait donner une indication plus large des endophytes présents. Duong et al., (2006) ont obtenu 14 unités taxonomiques de champignons, qui ne sont pas normalement isolés par la méthodologie conventionnelle, à partir des feuilles vivantes de *Magnolia*, en utilisant la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : électrophorèse en gradient dénaturant sur gel) (Hyde et Soyong, 2007).

3-3. Diversité des champignons endophytes dans le tissu foliaire d'*Urtica dioica*

Les champignons endophytes étaient abondants et diversifiés dans les feuilles d'*Urtica dioica*. Sur les 144 isolats récupérés, 10 isolats (6.94 %) sont restés comme des mycéliums stériles en culture. Les autres isolats ont sporulé en culture et ont été identifiés en 11 genres. Le genre le plus abondant était *Alternaria* avec 39 colonies (environ 27% du total des

Résultats et discussion

colonies). Le genre *Epicocum* (27 colonies, environ 18 % du total des colonies) était le deuxième genre le plus abondant, suivi d'*Ulocladium* (16 colonies, environ 11% du total des colonies). Tant dis que le genre *Aspergillus* était le plus rare avec uniquement une colonie, soit 0.69% du total des colonies (figure 14, tableau X).

Les champignons endophytes recensés appartenait tous aux ascomycètes (tableau X). Des études ont montré que les champignons endophytes appartiennent aux ascomycètes, basidiomycètes, zygomycètes ou les oomycètes, cependant les ascomycètes (principalement Diaporthales et Helotiales chez les angiospermes et gymnospermes, respectivement) sont prédominants par rapport aux autres groupes (Sinclair et Cerkauskas, 1996 ; Sieber, 2007).

Notre étude a révélé la présence de près de 7 % de champignons endophytes qui sont restés comme mycélium stérile après culture sur gélose (tableau X). Ces mycéliums stériles ont été isolé sous forme d'endophytes à partir d'une large gamme de plantes hôtes (Arnold et al., 2000; Frohlich et al., 2000). Dans une étude sur la plante médicinale chinoise *Tripterygium wilfordii*, les mycéliums stériles ont été isolés comme le deuxième taxon le plus abondant avec (23,6 %) (Kumar et Hyde, 2004). Étant donné que ces mycéliums stériles, non sporulant, ne peuvent pas être fourni avec des noms taxonomiques sans reproduction structurelle dans la classification conventionnelle, ils sont maintenant généralement classés dans la catégorie des morphotypes sur la base de critères caractéristiques similaires en culture (Guo et al., 2003 ; Promputtha et al., 2005).

Tableau X : Abondance en pourcentage (%) des champignons endophytes dans le tissu foliaire d'*Urtica dioica*

Genre du champignon endophyte	Phylum	Abondance (%)
<i>Alternaria</i>	Ascomycota	27,08
<i>Aspergillus</i>	Ascomycota	0,69
<i>Chaetomium</i>	Ascomycota	2,08
<i>Cladosporium</i>	Ascomycota	9,02
<i>Curvularia</i>	Ascomycota	1,38
<i>Epicocum</i>	Ascomycota	18,75
<i>Fusarium</i>	Ascomycota	4,16
<i>Hansfordia</i>	Ascomycota	3,47
<i>Mycélium stérile (MS)</i>	Ascomycota	6,94
<i>Penicillium</i>	Ascomycota	4,86
<i>Trichoderma</i>	Ascomycota	10,42
<i>Ulocladium</i>	Ascomycota	11,11

Comme mentionné précédemment pour la fréquence de colonisation, plusieurs considérations doivent aussi être prises en compte lors de l'étude de la diversité des champignons endophytes telles que le type et l'âge des tissus, le site de collecte et la saison de la récolte.

Plusieurs études ont montré que les vieilles feuilles supportent plus d'endophytes que les feuilles relativement plus jeunes (Toofanee et Dulymamode, 2002 ; Suryanarayanan et Thennarasan, 2004). Toofanee et Dulymamode, (2002) ont suggéré que l'environnement intrinsèque des feuilles subit des changements constants à mesure qu'elles matures et donc les feuilles supportent différents endophytes tout au long de leur vie. Ainsi, les feuilles matures sont plus favorables à la colonisation fongique. Les changements dans la biochimie des feuilles influencent la colonisation par les endophytes (Fernandes et *al.*, 2011).

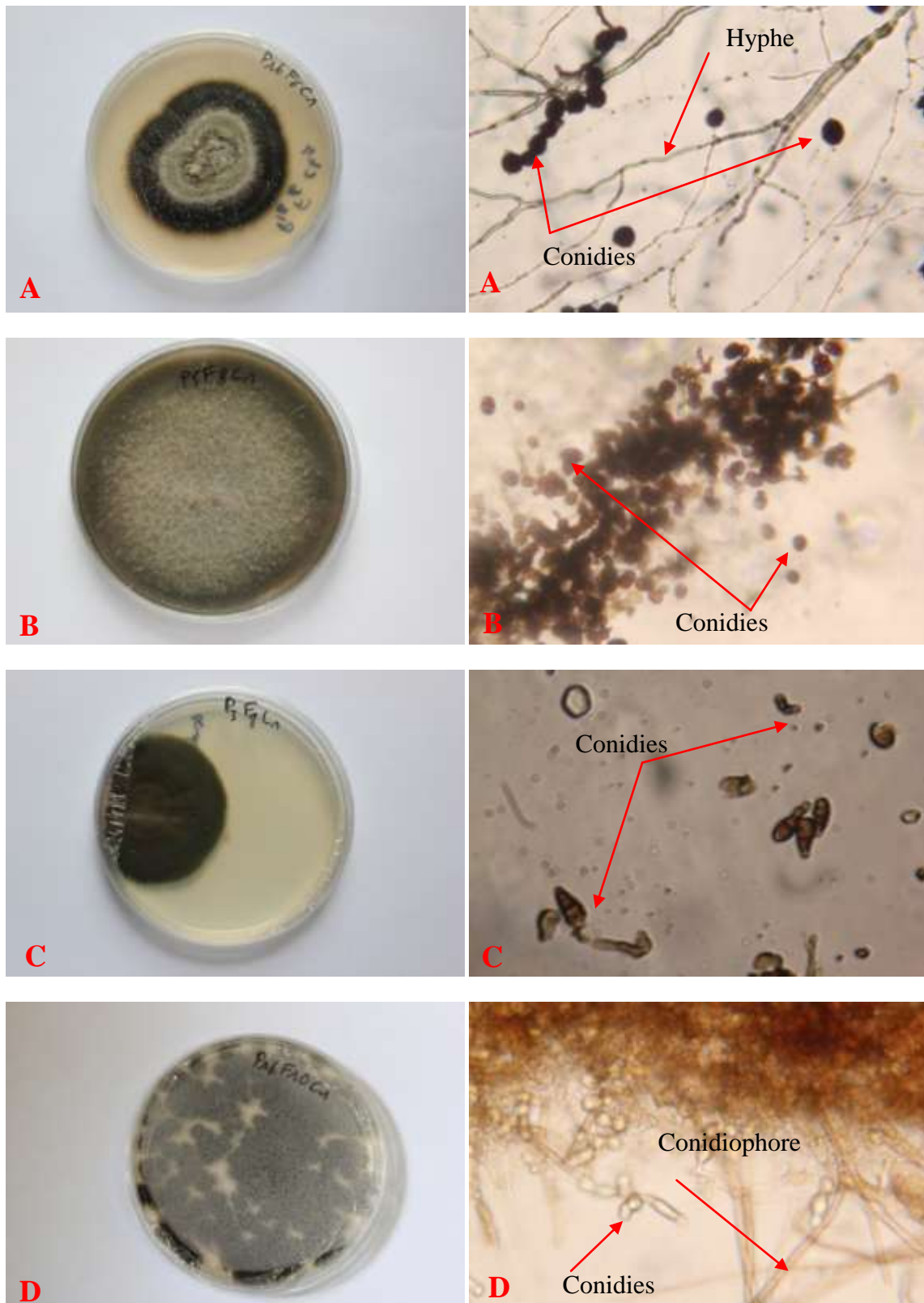


Figure 14 : Champignons endophytes colonisant le tissu foliaire d'*Urtica dioica* : sous microscope optique (X400) et en culture sur milieu PDA : A : *Epicocum* sp, B : *Ulocladium* sp, C : *Curvularia* sp, D : *Cladosporium* sp.

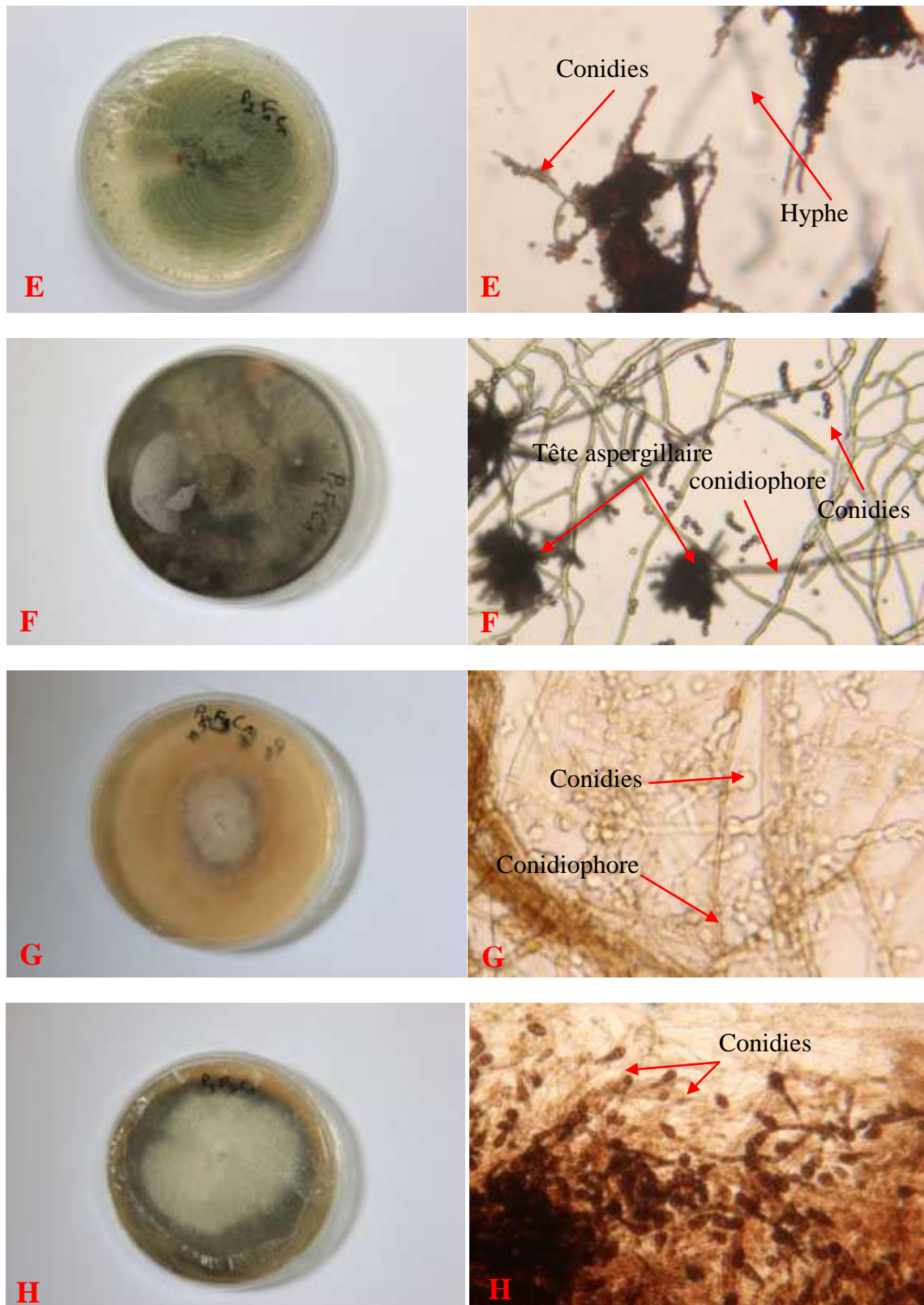


Figure 14 (suite) : Champignons endophytes colonisant le tissu foliaire d'*Urtica dioica* : sous microscope optique (X400) et en culture sur milieu PDA : E : *Trichoderma sp.*, F : *Aspergillus sp.*, G : *cladosporium sp.*, H : *Alternaria sp.*

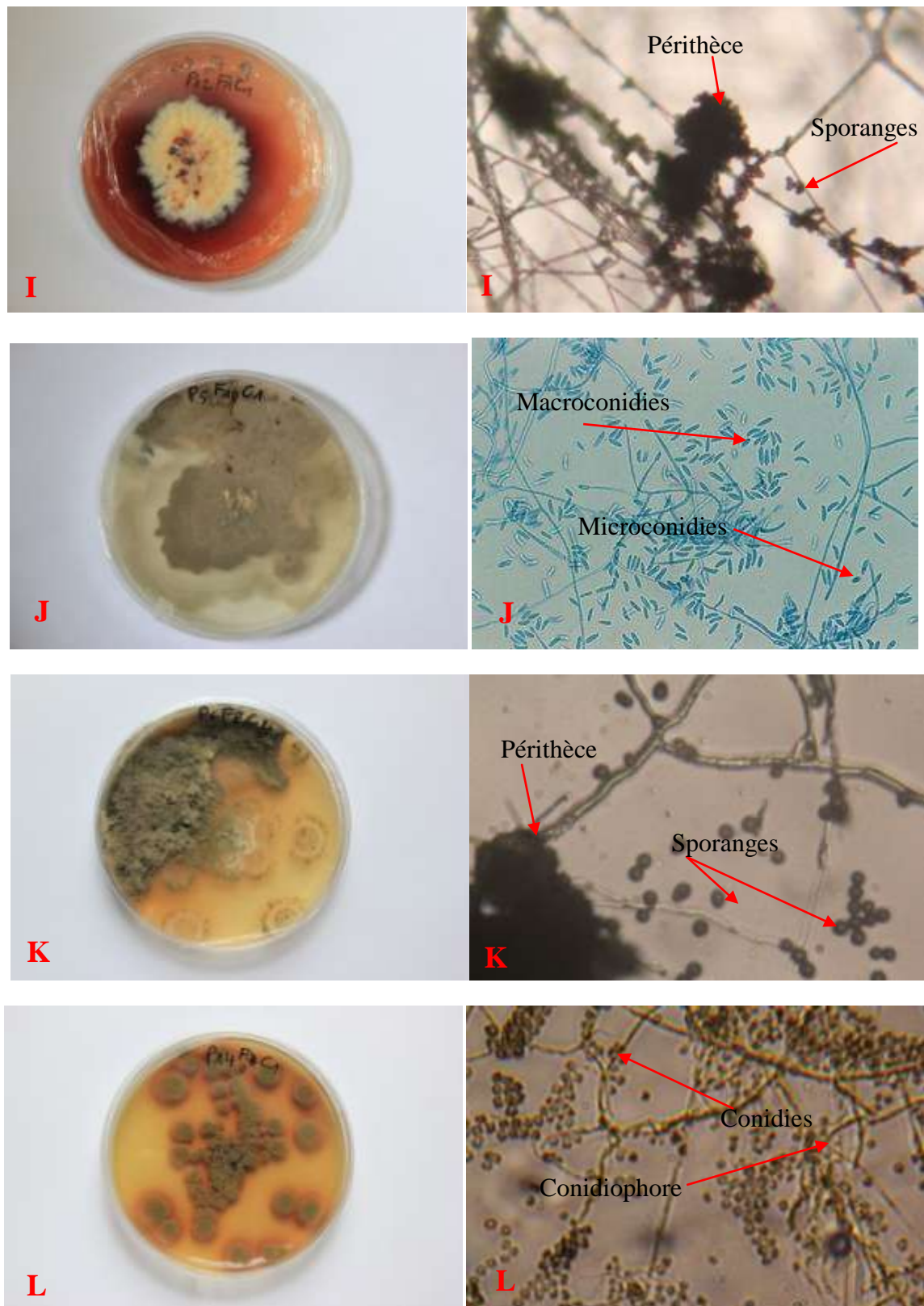


Figure 14 (suite) : Champignons endophytes colonisant le tissu foliaire d'*Urtica dioica* : sous microscope optique (X400) et en culture sur milieu PDA : I : *Hansfordia* sp, J : *Fusarium* sp, K : *Chaetomium* sp, L : *Penicillium* sp.

De plus, les jeunes feuilles sont chimiquement plus protégées, elles pourraient contenir des concentrations plus élevées en substances antifongiques et anti-herbivores par rapport aux feuilles matures, ce qui pourrait être la raison du faible taux de colonisation (Coley et Barone, 1996 ; Jeffrey et *al.*, 2012 ; Coley ; 1988). Enfin, les feuilles matures peuvent supporter une plus grande abondance en endophytes probablement en raison de leur plus grande biomasse fournissant plus de sites et de ressources pour la colonisation par rapport aux jeunes feuilles (Toofanee et Dulymamode, 2002).

Des études ont montré que certains champignons endophytes sont spécifiques à un organe (feuille, pétiole, tige ou racine). Cela pourrait être dû à l'adaptation aux facteurs microécologiques et physiologiques, conditions présentes dans un organe (Carroll et *al.*, 1977). Un grand nombre d'espèces endophytes fongiques se trouvent généralement pendant le processus d'isolement; cependant, seules quelques souches spécifiques à l'hôte sont dominantes.

La spécificité de l'hôte est parfois affectée par le site ou l'habitat de la plante hôte (Petrini et *al.*, 1992). Les emplacements géographiques affectent le plan de distribution des populations endophytes dans les plantes médicinales. Plusieurs études antérieures ont exploré l'importance de l'emplacement géographique sur la structure et la diversité de la communauté endophyte. On a constaté que les conditions écologiques ou environnementales, telles que les niveaux de nutrition du sol, l'éclairage et la végétation étaient des facteurs importants pour déterminer les types et la quantité de métabolites secondaires des plantes hôtes, qui pourraient directement affecter la structure de la population des champignons endophytes (Suryanarayanan et *al.*, 2005 ; Song et *al.*, 2007). De plus, il a été démontré que cela se produisait à la fois à grande échelle, comme à travers le continent du Nord de l'Amérique (U'Ren et *al.*, 2012), et à petite échelle, de l'ordre de quelques centaines de mètres (Arnold et *al.*, 2000)

La diversité en champignons endophytes dans les plantes peut aussi varier selon un modèle saisonnier de colonisation. La diversité fongique maximale est généralement observée pendant la saison des pluies comme une humidité et une température élevées favorise la croissance fongique endophyte (Mishra et *al.*, 2012 ; Nalini et *al.*, 2014) et aide également dans la dispersion des spores. Par exemple, une plus grande diversité en champignons endophytes a été observée dans les rameaux et l'écorce de *Terminalia liajarjuna* (Tejesvi et *al.*, 2005) et les feuilles de *Centella asiatica* (Gupta et Chaturvedi, 2017) pendant les saisons des

pluies. Certains champignons tels que *Colletotrichum*, *Phomopsis* et *Pestalotiopsis* produisent des gloeiospores qui ne sont pas libérées de force mais dispersé par l'eau, ce qui peut expliquer une isolation accrue pendant la saison des pluies. L'incidence la plus élevée des genres *Cladosporium* et *Penicillium* isolés au cours de l'été peut être dû à la capacité de leurs spores à survivre et grandir à faible potentiel hydrique.

Ces changements saisonniers dans la composition des espèces seraient dus à des pressions de sélection différentes à différentes saisons, à l'intérieur des tissus végétaux (Guo et al., 2008 ; Kamalraj et al., 2013), ceci pourrait être dû au fait que les niveaux de métabolites secondaires varient tout au long de l'année (Fang et al., 2013).

Ainsi, la diversité recensée dans cette étude pour les feuilles d'*Urtica dioica* pourrait varier en variant les sites et conditions d'échantillonnage ainsi que la période ou saison de la récolte. Comme il est également possible qu'il y ait des variations causées par l'âge des tissus, à cet effet, il est important de souligner que lors de notre étude il aurait été judicieux de discerner si les segments de feuilles étaient jeunes, matures ou vieux.

Dans notre étude nous avons recensé la présence de champignons endophytes cloisonnés sombres notamment *Curvularia* et *Alternaria*. Les champignons endophytes cloisonnés foncés habitent principalement les tissus racinaires (Reininger et al., 2012). Cependant, le fait qu'ils ont été fréquemment isolés dans les feuilles, prouve qu'ils ne se limitent pas aux tissus mycorhiziens. Les champignons septés foncés aident la plante à survivre contre le stress abiotique généré par les radicaux libres d'oxygène (Yuan et al., 2010). Ils agissent comme des antioxydants naturels des plantes.

Il est important de signaler que ce travail serait le premier dans son genre à s'être intéressé aux champignons endophytes foliaire d'*Urtica dioica*. La domination d'*Alternaria* peut être liée à son potentiel plus élevé à coloniser les feuilles d'*U. dioica*, ce qui favorise son établissement et sa croissance (Duong et al., 2006) ou a des effets négatifs sur d'autres champignons (Herre et al., 2007). De nombreux travaux rapportent la prédominance d'*Alternaria* dans différentes plante hôtes (Khan et al., 2010 ; Kumar et al., 2011). Il est vrai que des espèces d'*Alternaria* ont été décrites comme étant des champignons pathogènes des végétaux, qualifiés de saprophytes ou de parasites des plantes (Barnett et Hunter, 1972). Cependant, *Alternaria sp.*, a été répertorié comme étant des champignons endophytes colonisant plusieurs plantes hôtes y compris des plantes médicinales (Shankar et al., 2008 ; Aly et al., 2008 ; Woudenberg et al., 2013 ; Govindappa et al., 2014).

3-4. Activité des champignons endophytes foliaire d'*Urtica dioica* en présence d'un stress biotique

3-4-1. Activité des champignons endophytes foliaire d'*Urtica dioica* à l'égard des champignons phytopathogènes

L'objectif de cette étude est d'examiner quelques endophytes obtenus pour l'étude de leurs activités antagonistes effectuées en boîtes de Pétri en double culture contre quelques champignons pathogènes à savoir, *Fusarium culmorum* (Fc), *Fusarium proliferatum* (Fp), *Fusarium graminearum* (Fg) : *Botrytis cinerea* (Bc), *Penicillium glabrum* (Pg), *Penicillium sp* (Pe) et *Aspergillus flavus* (Af). L'utilisation des essais en boîtes de Pétri peut être intéressante pour un criblage préliminaire rapide et pour le choix des isolats antagonistes putatifs, selon leurs inhibitions de la croissance des colonies et la production de métabolites inhibiteurs de croissance des hyphes des pathogènes fongiques. La croissance mycélienne a été mesurée à l'aide d'une règle graduée. Le taux d'inhibition de la croissance radiale du pathogène a été enregistré. Après la lecture des résultats, nous avons caractérisé et classé les différents types d'antagonismes en trois catégories d'effet : un effet de compétition, un effet d'antibiose et un effet de parasitisme.

Après quelques jours d'incubation, nous avons constaté que la croissance mycélienne des souches pathogènes témoins est plus importante par rapport à celle observée lors des différentes confrontations (pathogène - antagoniste) ce qui peut témoigner d'un effet de compétition entre les deux champignons (Figure 15). Les isolats endophytes exercent des effets d'antagonisme vis-à-vis des agents pathogènes à des degrés divers pouvant atteindre 81,25% du taux d'inhibition. Cette variation dépend non seulement des espèces antagonistes utilisées, mais aussi, des agents pathogènes étudiés. Le taux d'inhibition maximum a été enregistré par l'isolat 1 en présence d' Af (81,25%), tandis que le taux le plus faible est enregistré en présence de l'isolat 2 vis-à-vis de Pe (Figure 15, Tableau XI).

Selon les résultats obtenus, nous avons remarqué que les endophytes peuvent dans certains cas exercer un effet d'antibiose, ainsi certaines souches endophytes inhibitrices de la croissance mycélienne ont enregistré l'apparition d'une zone d'inhibition claire en présence des champignons pathogènes ceci en fonction des espèces antagonistes utilisées ainsi que des agents fongiques étudiés.

Tableau XI : Taux d'inhibition (%) de la croissance mycélienne des agents pathogènes étudiés à l'égard des souches endophytes testées.

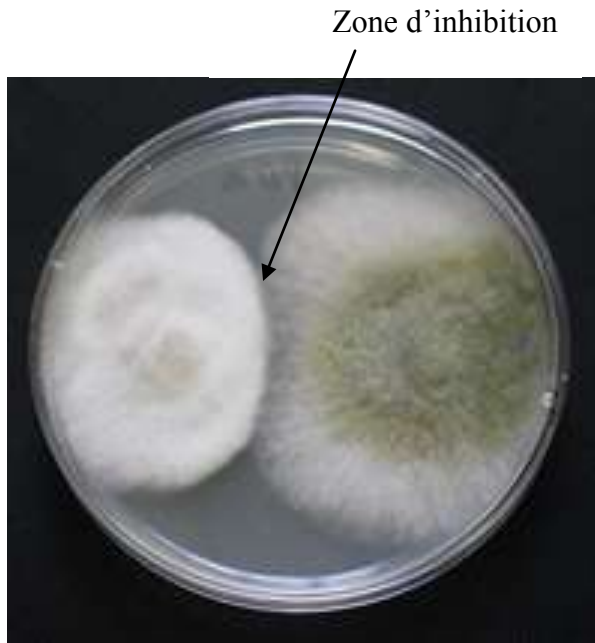
Endophyte	Champignon phytopathogène							
	Pe	Af	Bc	Fp	Fs	Fc	Fg	Pg
Isolat 1	50	81.25	53.70	78	50.66	52.38	53.70	69.41
Isolat 2	0	3.75	20.37	20	6.66	34.52	22.22	58.82
Isolat 3	6.25	31.25	28	16	44	40.47	25.92	64.70
Isolat 4	31.25	25	20.37	10	33.33	40.47	1.85	23.52
Isolat 5	75	73	50	66.66	20	65	50.90	65
Isolat 6	45	60	41.66	41.66	20	50	49.50	62
Isolat 7	10	70	21.66	41.66	30	50	21.81	32.72
Isolat 8	5	10	28.33	33.33	30	50	32.72	60

Fc : *Fusarium culmorum*, Fp : *Fusarium proliferatum*, Fg : *Fusarium graminearum*, Bc : *Botrytis cinerea*, Pg : *Penicillium glabrum*, Pe : *Penicillium sp.*, Af : *Aspergillus flavus*.

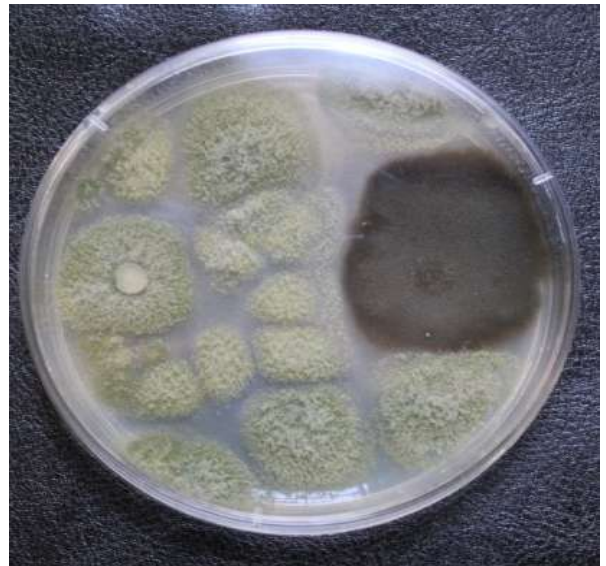
Lors du suivi continu des interactions d'antagonisme en boîtes de Pétri, nous avons observé que certains endophytes pouvaient avoir un effet de mycoparasitisme ainsi, ces endophytes présentaient une croissance vigoureuse, quelques jours après l'incubation. Par la suite, ces endophytes ont envahi les colonies des pathogènes et ont même sporulé sur celles-ci, révélant ainsi leur pouvoir hautement mycoparasitaire (Figure 15).

Il est clair, que les phytopathogènes menacent toujours la sécurité alimentaire mondiale et dans de nombreux cas, les outils disponibles n'ont pas suffi à les gérer correctement et à réduire les pertes. Les résultats du test d'antagonisme ont révélé la capacité des endophytes utilisés à inhiber la croissance mycélienne des pathogènes testés. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent fortement que l'assemblage diversifié d'espèces d'endophytes isolés des feuilles d'ortie pourrait jouer un rôle essentiel dans la résistance de leur hôte aux dommages causés par les agents pathogènes, et que ces endophytes peuvent potentiellement être utilisés comme des agents de bio-contrôle efficaces. D'où l'utilité de s'intéresser à la lutte biologique médiée par les champignons endophytes afin d'affronter les phytopathogènes. Il est évident que les résultats *in vitro* ne traduisent pas nécessairement ce qui se passe dans la plante, néanmoins, ces résultats sont particulièrement utiles pour identifier les candidats potentiels à la lutte biologique.

Résultats et discussion



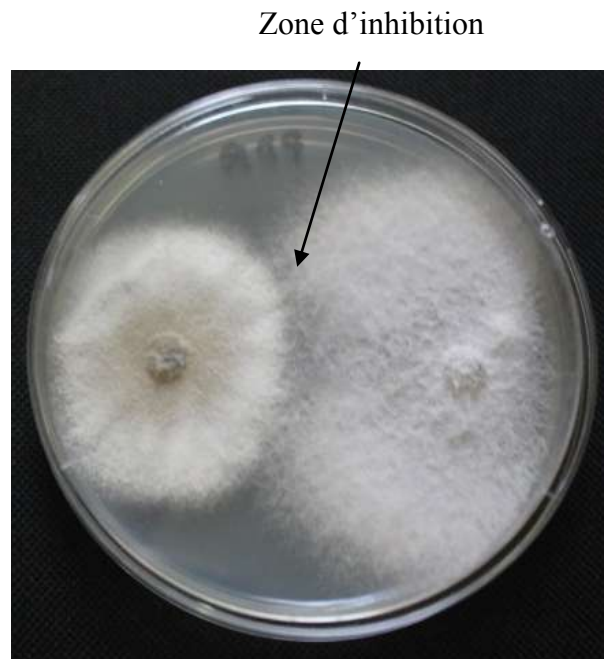
Isolat 6- Af



Isolat 3- Af



Isolat 7-Af



Isolat 1-Fc

Figure 15: Effet de quelques endophytes fongiques sur la croissance des champignons phytopathogènes (Fc : *Fusarium culmorum*, Fp : *Fusarium proliferatum*, Fg : *Fusarium graminearum*, Bc : *Botrytis cinerea*, Af : *Aspergillus flavus*).



Isolat 1-Fc



Isolat 1-Fc



Isolat 1-Fc



Isolat 5-Bc

Figure 15 (suite) : Effet de quelques endophytes fongiques sur la croissance des champignons phytopathogènes (Fc : *Fusarium culmorum*, Fp : *Fusarium proliferatum*, Fg : *Fusarium graminearum*, Bc : *Botrytis cinerea*, Af : *Aspergillus flavus*).

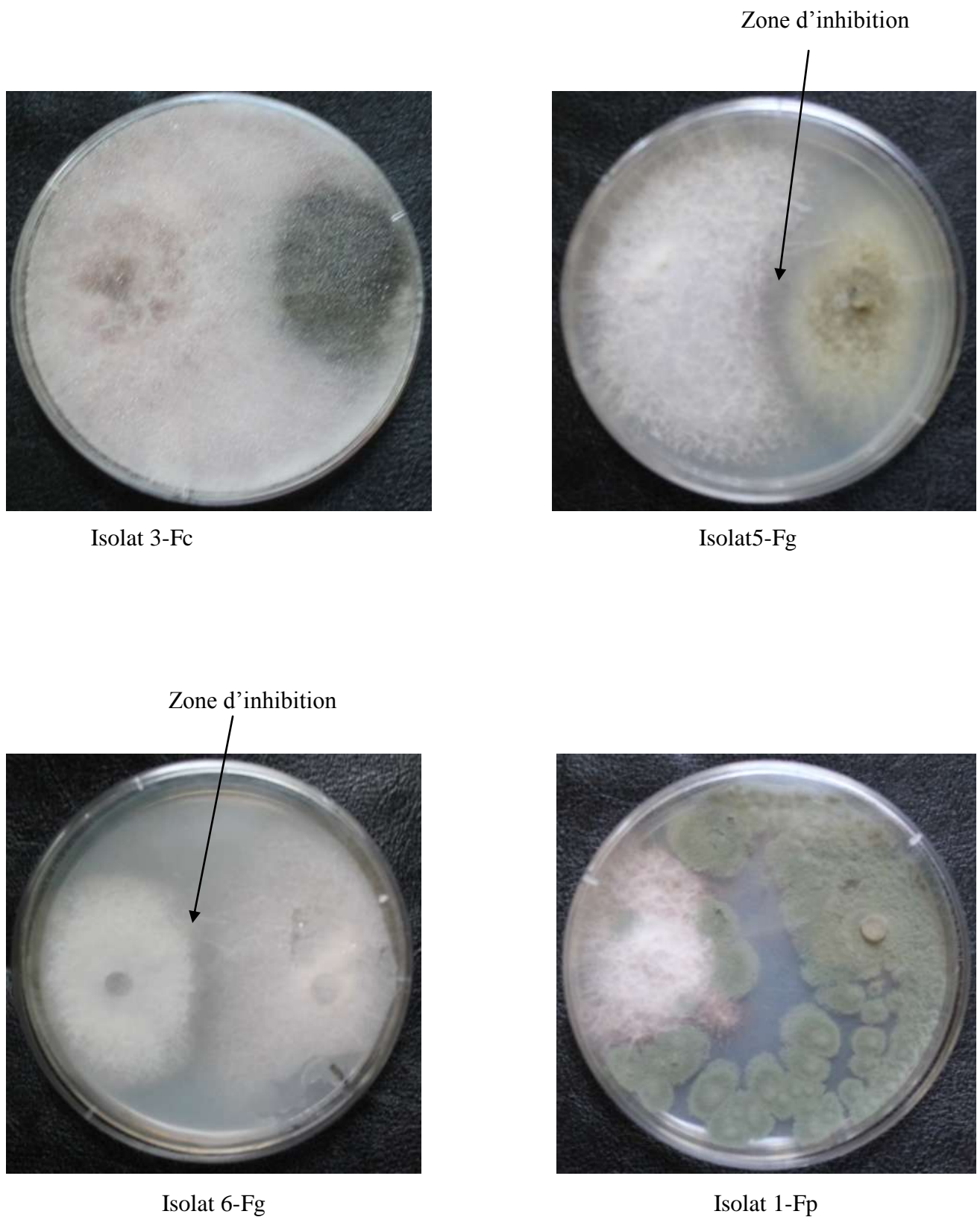


Figure 15 (suite) : Effet de quelques endophytes fongiques sur la croissance des champignons phytopathogènes (Fc : *Fusarium culmorum*, Fp : *Fusarium proliferatum*, Fg : *Fusarium graminearum*, Bc : *Botrytis cinerea*, Af : *Aspergillus flavus*).

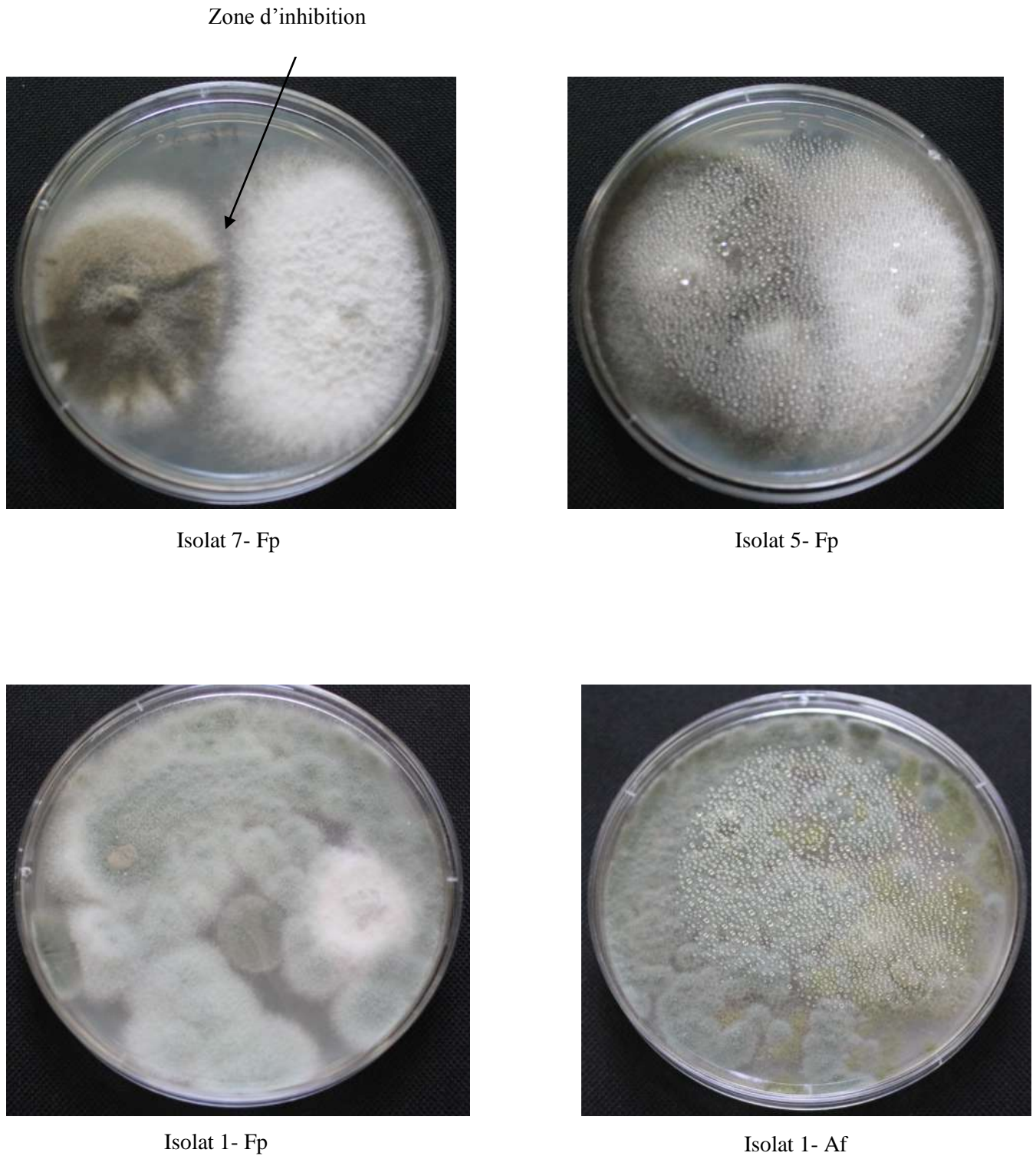


Figure 15 (suite) : Effet de quelques endophytes fongiques sur la croissance des champignons phytopathogènes (Fc : *Fusarium culmorum*, Fp : *Fusarium proliferatum*, Fg : *Fusarium graminearum*, Bc : *Botrytis cinerea*, Af : *Aspergillus flavus*).

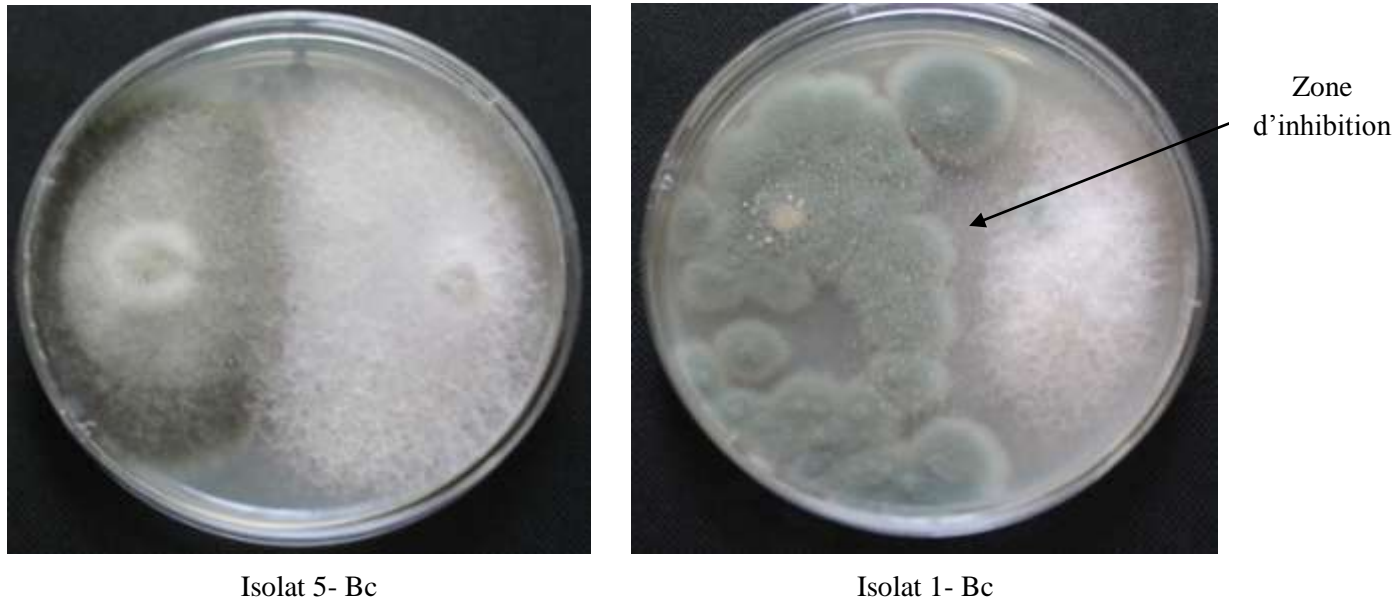


Figure 15 (suite) : Effet de quelques endophytes fongiques sur la croissance des champignons phytopathogènes (Fc : *Fusarium culmorum*, Fp : *Fusarium proliferatum*, Fg : *Fusarium graminearum*, Bc : *Botrytis cinerea*, Af : *Aspergillus flavus*).

Ainsi, certaines études ont révélé que plusieurs espèces de *Trichoderma* sont considérées comme des agents de contrôle biologique. Les espèces de *Trichoderma* sont capables de coloniser un large éventail de cultures telles que le soja, le blé, le maïs et le coton. Ce champignon a montré différents mécanismes impliqués dans le contrôle des maladies et est largement connu pour ses capacités à induire une résistance chez les plantes (Pascholati et al., 2019), il a montré une capacité remarquable à parasiter des phytopathogènes très différents. Par exemple, *Trichoderma sp.*, peut parasiter les hyphes de *Sclerotinia sclerotiorum* et de *Rhizoctonia solani* (Harman et al., 2004). De plus, plusieurs souche sont été signalées pénétrant et parasitant les œufs de *Meloidogyne javanica* et les kystes de *Heterodera avenae*, une structure très résistante (Sharon et al., 2007 ; Zhang et al., 2014). Cependant, selon Jeffries, (1995), il serait difficile si non improbable de vérifier que le mycoparasitisme se produit *in planta*, car la confirmation du transfert de nutriments est difficile et, par conséquent, de nombreuses allégations de mycoparasitisme sont basées sur des preuves circonstanciées.

Les études de vérification du comportement mycoparasitaire sont généralement menées *in vitro* car il est plus facile d'observer des signes de parasitisme dans une boîte de Pétri que

sur une plante. En utilisant diverses techniques, il est possible de voir des interactions directes entre les partenaires. Le mycoparasite peut entrer en contact direct, pénétrer dans les hyphes de la proie, s'enrouler autour des hyphes et finalement provoquer une perturbation/épuisement des hyphes de la proie. Des exemples de mycoparasitisme par des champignons endophytes sont démontrés dans les travaux de Donayre et Dalisay, (2016), qui ont étudié le parasitisme de *Geotrichum sp.* (Isolat EF-ds104-16) sur *Thanatephorus cucumeris*. Le mycoparasite a été isolé en tant qu'endophyte de l'herbe *Echinochloa glabrescens*, mais les tests ont été effectués *in vitro*. De même, Cao et al., (2009) ont testé trois isolats fongiques, isolés sous forme d'endophytes de *Phragmites australis* contre huit agents pathogènes du sol, ils ont pu observer au microscope une pénétration suivie d'un enroulement d'hyphes autour d'hyphes pathogènes et d'une dégradation du cytoplasme. De plus, la production des chitinases extracellulaires et des β -1,3-glucanases a été démontrée. Les champignons mycoparasites ont été initialement isolés en tant qu'endophytes, ils ont été testés *in vitro*, uniquement en présence d'un phytopathogène, ce qui signifie que la plante n'était pas là pour interférer avec l'interaction. D'après Card et al., (2016), il est probable que le mycoparasitisme comme principe de contrôle ne soit pas très important pour les endophytes. Car, selon eux, pour que le parasitisme se produise, il faudrait que le parasite se rapproche suffisamment de sa proie à l'intérieur de la plante pour que le parasitisme puisse être initié.

D'autres endophytes peuvent entrer en compétition avec l'agent pathogène pour les nutriments et les niches racinaires. Notre étude a montré que la plupart des champignons phytopathogènes ont vu leur croissance radiaire diminuer en présence de l'endophyte comparativement à la boîte témoin (figure 15, tableau XI). Pour la plupart des microorganismes, le fer est un élément essentiel pour la viabilité. Sous une carence en fer, ces microorganismes excrètent des chélateurs spécifiques de fer-ferrique nommés siderophores, pour mobiliser le fer environnemental, qui inhibe la croissance des microorganismes pathogènes ou leurs activités métaboliques (Machuca et Milagres, 2003). L'exclusion compétitive est un mécanisme par lequel les endophytes pourraient empêcher la colonisation de l'hôte par des agents pathogènes (Zabalgoeazcoa, 2008 ; Martinuz et al., 2012). Les endophytes fongiques peuvent coloniser différents tissus végétaux localement ou systématiquement, de manière inter- ou intracellulaire (Boyle et al., 2001). Grâce à une colonisation rapide et au piégeage des nutriments disponibles, ils occupent ainsi la niche qui pourrait autrement être utilisée par un organisme pathogène (Rodriguez et al., 2009). Ceci est illustré par le fait que l'élimination d'endophytes spécifiques dans les feuilles de manguier par

un traitement fongicide a permis à d'autres champignons de coloniser cette niche (Mohandoss et Suryanarayanan, 2009), laissant ainsi de la place à des microorganismes potentiellement pathogènes. De même, la colonisation des racines de colza par l'endophyte à cloisons sombres *Heteroconium chaetospira*, mesurée par PCR, était négativement corrélée aux symptômes de la hernie (Lahlali et al., 2014). Cependant, l'augmentation de l'inoculum d'agents pathogènes a réduit l'effet de contrôle, indiquant les limites de la compétition en tant que mécanisme sous une forte pression de la maladie. Dans le contrôle biologique, le mécanisme d'exclusion compétitive est le plus susceptible de se produire en combinaison avec d'autres mécanismes.

En plus du parasitisme direct et de l'effet compétitif, nous avons aussi observé l'apparition d'une zone claire d'inhibition exercée par certains mycoendophytes (figure 15). Il est connu que plusieurs agents de contrôle biologiques produisent et libèrent de nombreux effecteurs à savoir des antibiotiques, des toxines et des métabolites fongitoxiques contre les agents pathogènes des plantes, ils peuvent également inhiber les agents pathogènes par la production de cellulase, glucanase, chitinase et lactones (composés volatils) (Stefanova et al., 1999). Par exemple, *Purpureocillium lilacinum* est un agent classique de lutte biologique contre les nématodes et les insectes parasites des plantes, qui a démontré sa capacité à supprimer différents agents pathogènes des plantes en déployant des effecteurs. Wang et al., (2016) ont montré l'implication des leucinostatines (antibiotiques) sur la suppression de *Phytophthora infestans* et *Phytophthora capsici*.

3-4-2. Activité des champignons endophytes foliaire d'*Urtica dioica* à l'égard des bactéries pathogènes

De nombreux champignons endophytes produisent des composés antibiotiques ayant une activité contre les bactéries pathogènes humaines et végétales. Les produits naturels obtenus à partir de ces champignons possèdent une activité à large spectre et une toxicité inférieure par rapport aux molécules de synthèse. Dreyfuss et Chapela, (1994) ont signalé que les champignons endophytes xylophages (vivant en association avec des organes de plantes ligneuses) sont de meilleurs producteurs de composés antimicrobiens.

C'est dans cette même optique qu'on a mis dans des boîtes de pétri, en double culture, des champignons endophytes et bactéries pathogènes. Les résultats obtenus montrent que les isolats testés présentent une activité antibactérienne à l'égard des souches pathogènes utilisées, traduite par une zone d'inhibition claire tout autour du disque fongique (figure 16). Cette activité varie en fonction de l'isolat fongique et de la bactérie pathogène. L'isolat 4

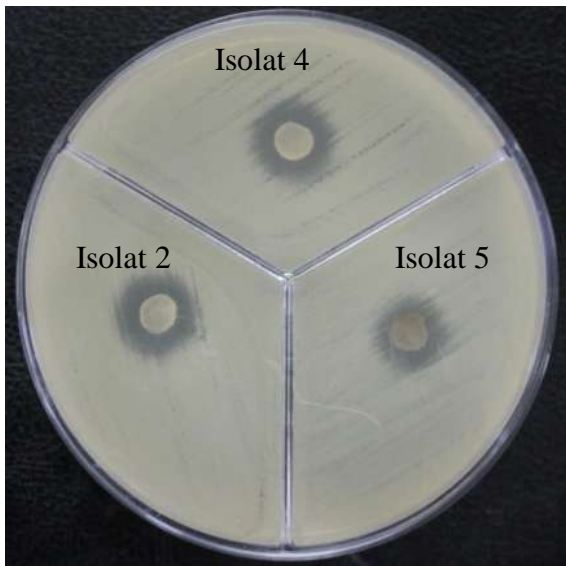
Résultats et discussion

possède une activité puissante contre *S. aureus* 25923 ainsi qu'un certain nombre d'autres bactéries (Tableau XII ; figure 16). L'isolat 2 présente un pouvoir antibactérien à large spectre d'activité démontré contre les bactéries Gram positives telles que *B. cereus* 10876 ainsi que certaines autres bactéries résistantes aux médicaments. Cependant, l'activité biologique la plus impressionnante est attribuée à l'isolat 6 contre *S. aureus* MU50 (tableau XII).

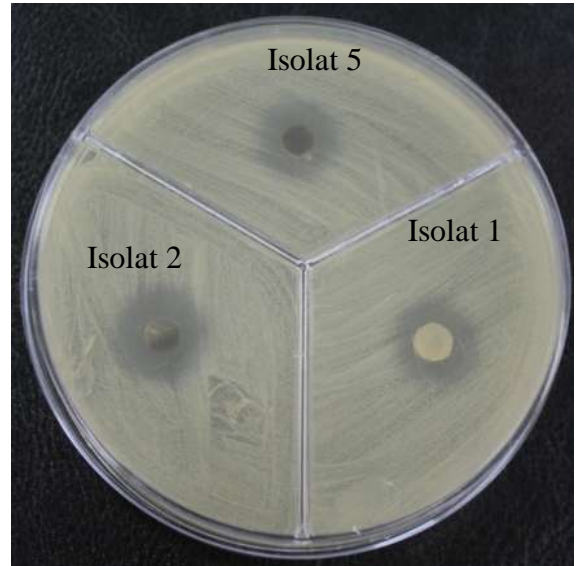
Tableau XII : Activité antibactérienne de quelques champignons endophytes évaluée par test direct à l'égard de bactéries pathogènes

Souches bactériennes	Inhibition zone (mm)					
	Isolate 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolate 5	Isolat 6
<i>S. aureus</i> 25923	15±0.5	19±0.6	15.5±0.8	19.5±0.7	17±0.6	17±0.2
<i>S. aureus</i> 43300	17.5±0.5	18±0.25	14±0.5	16±0.7	17±0.8	18±0.9
<i>S. aureus</i> MU50	17.5±0.5	16.5±1	10±0.6	12±0.2	12±0.3	18±0.5
<i>S. aureus</i> LGA251	14.5±0.4	15±0.5	13±0.5	14±0.7	17±0.5	15±0.5
<i>S. aureus</i> S84	10±0.8	16.5±0.2	8±0.8	18±0.5	10±0.9	16±0.7
<i>S. aureus</i> S95	16.5±0.5	15.5±0.5	14±0.7	14±1.4	9±0.5	8±0.5
<i>S. aureus</i> S96	13±0.3	15.5±0.5	16±0.2	15±0.8	11±0.9	15±0.9
<i>S. aureus</i> S100	10±0.5	12±0.5	18±0.5	17±0.4	16±0.5	13.5±0.6
<i>S. aureus</i> S101	15±0.5	14.5±0.2	14±0.7	11±0.5	12±0.5	11.5±1.2
<i>E. coli</i> 25922	16±0.9	14±0.2	16±0.5	15±0.6	16±0.5	15.5±0.5
<i>K. pneumonia</i> 4352	12±0.9	13.5±0.5	13±0.5	12±0.7	13±0.4	17±0.5
<i>B. cereus</i> 10876	17±0.8	14.5±0.3	11±0.6	14±0.6	10±0.3	14±0.8
<i>C. freundii</i> 8090	13.5±0.7	14±0.5	9.5±1.2	9±0.2	8±0.85	12.5±0.7

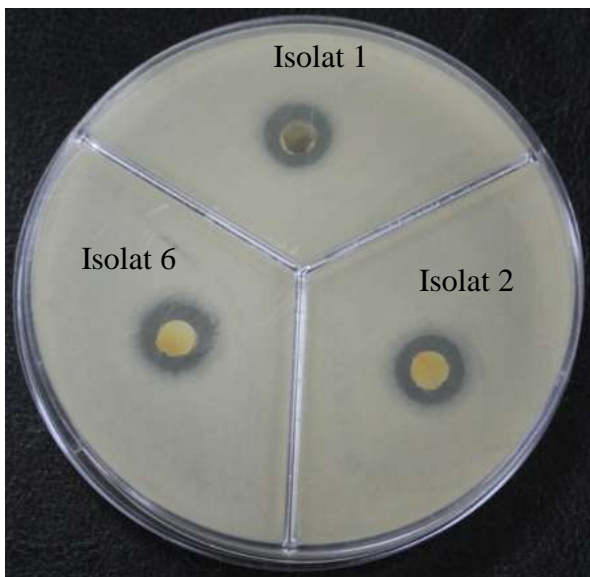
(S : *Staphylococcus*, E : *Escherichia*, K : *Klebsiella*, B : *Bacillus*, C : *Citobacter*.).



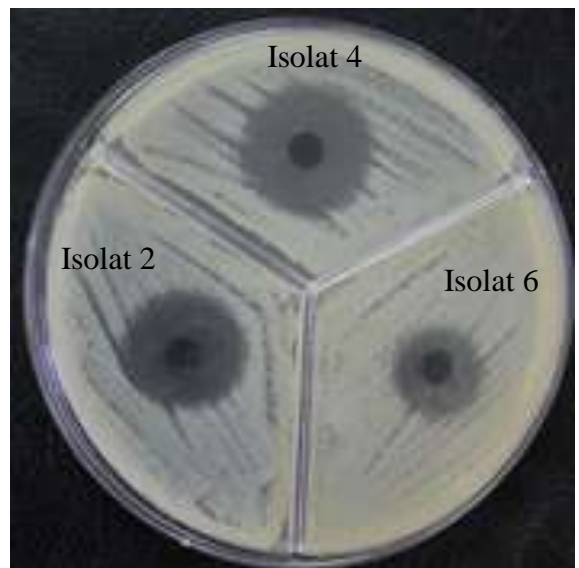
S. aureus 25923



LGA 251

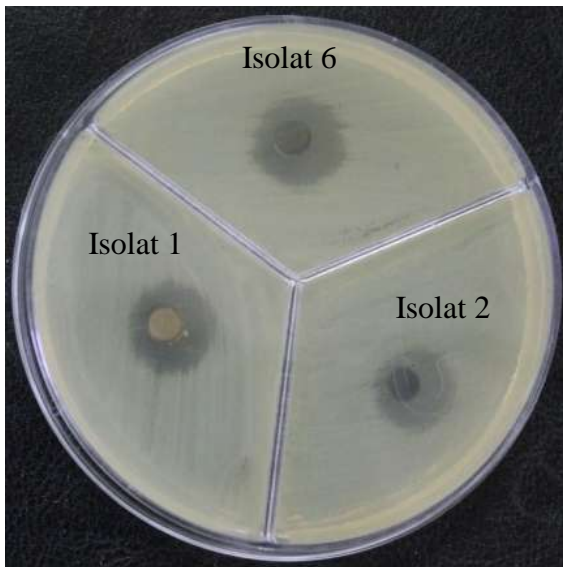


S. aureus MU50

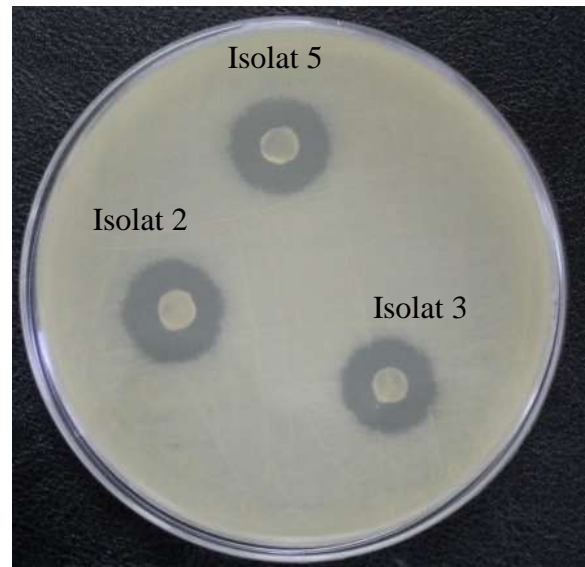


B. cereus 10876

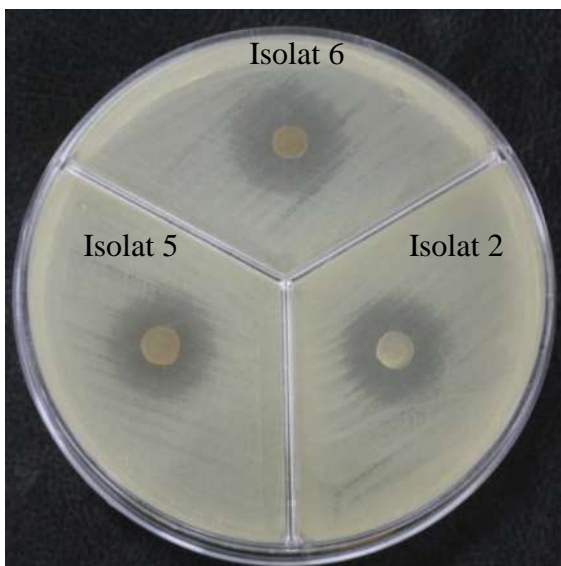
Figure 16 : Activité antibactérienne de quelques champignons endophytes évaluée par le test direct à l'égard de bactéries pathogènes.



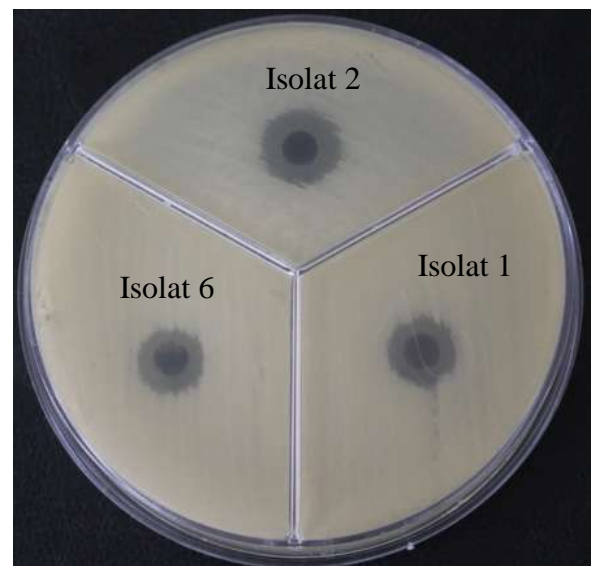
E. coli 25922



K. pneumonia 4352

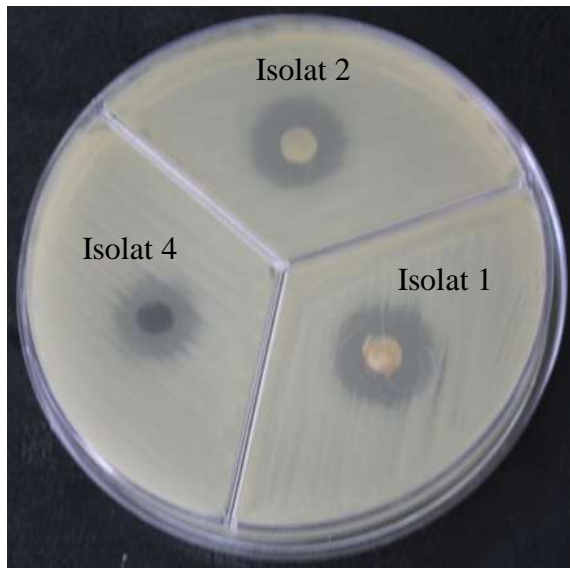


S. aureus 43300

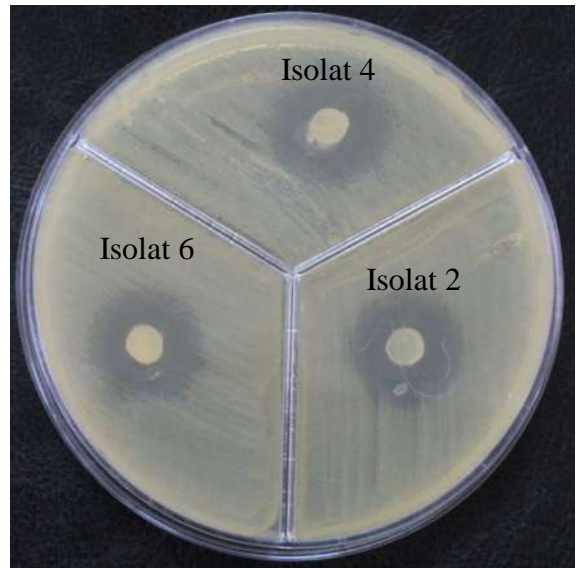


C. freundii 8090

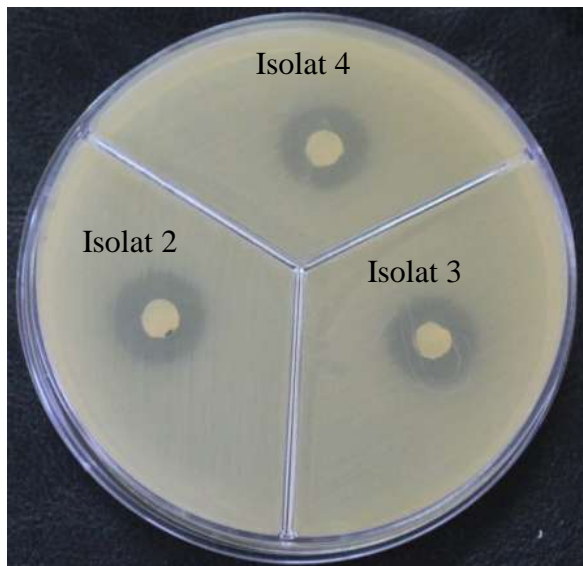
Figure 16 (suite) : Activité antibactérienne de quelques champignons endophytes évaluée par le test direct à l'égard de bactéries pathogènes.



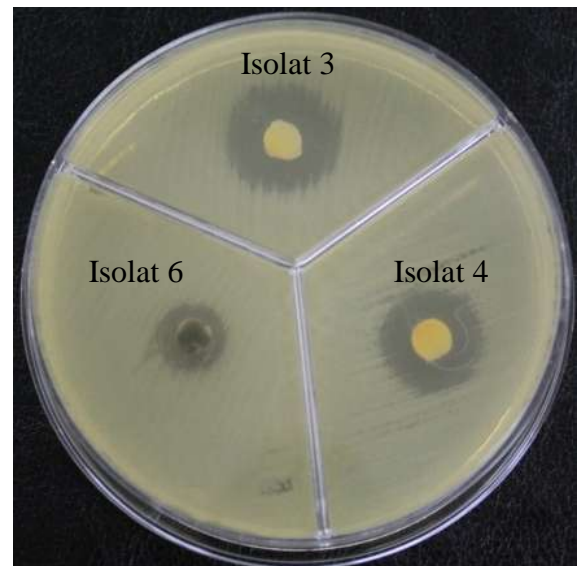
S. aureus S. 95



S. aureus S. 84



S. aureus S. 96



S. aureus S. 100

Figure 16 (suite) : Activité antibactérienne de quelques champignons endophytes évaluée par le test direct à l'égard de bactéries pathogènes.

Il est évident que les champignons endophytes représentent une riche source de métabolites spécialisés et d'autres composés qui peuvent inhiber les microorganismes concurrents (Thines et *al.*, 2004). Un grand nombre de produits naturels possédant des activités antimicrobiennes ont été isolés à partir d'endophytes, notamment des alcaloïdes, des flavonoïdes, des peptides, des phénols, des quinones, des stéroïdes, des terpénoïdes et des composés organiques volatils. Cependant, très souvent, les effets des métabolites sont évalués dans des conditions *in vitro*, ce qui donne une indication du potentiel d'un organisme à produire des substances qui peuvent inhiber le pathogène, mais qui ne donne pas d'indication sur l'inhibition du pathogène dans la plante (Köhl et *al.*, 2011 ; Deketelaere et *al.*, 2017 ; Laur et *al.*, 2018). Souvent, la biosynthèse de certains composés bioactifs par le mycoendophyte nécessite une association avec la plante ou éventuellement une interaction en tripartite avec la plante et l'agent pathogène. Par exemple, le groupe de gènes de l'alcaloïde lolitrem chez l'endophyte *Neotyphodium lolii* est fortement exprimé en association avec les graminées de la saison froide, mais il est uniquement détecté à faibles concentrations dans les conditions *in vitro* (Young et *al.*, 2006). Un autre exemple bien connu est la découverte que plusieurs endophytes fongiques étaient associés à la production du médicament anticancéreux taxol dans l'if du Pacifique *Taxus brevifolia*. Par ailleurs, Heinig et *al.*, (2013) ont bien conclu que de nombreuses souches d'endophytes n'étaient pas réellement des producteurs indépendants.

Cela pourrait être dû à des différences majeures dans les niveaux de nutriments, les conditions environnementales ainsi que les interactions avec d'autres organismes dans la situation *in planta*, avec des interactions complexes entre le mycoendophyte, la plante et l'agent pathogène (Aly et *al.*, 2013 ; Kusari et *al.*, 2013 ; Ludwig-Müller, 2015).

3-5. Caractérisation moléculaire de quelques souches de champignons endophytes du tissu foliaire d'*Urtica dioica*

Sur les 144 isolats obtenus, trois isolats ont été sélectionnés pour la suite des expérimentations car ils sont considérés comme les plus abondants selon la caractérisation morphologique et microscopique des différents isolats et ayant donné de meilleurs résultats lors de la confrontation aux bactéries et champignons pathogènes.

Les isolats choisis ont fait l'objet d'une identification moléculaire sur la base du séquençage des régions ITS (figure 17). Les séquences ITS de ces isolats ont été comparées par blast dans GenBank (la base de données NCBI). L'analyse a révélé que les isolats appartiennent tous au genre *Alternaria* et ont été identifiés comme: *Alternaria*

Résultats et discussion

sorghi, *Alternaria tenuissima* et *Alternaria alternata* avec un pourcentage de similarité supérieur à 99%. Les numéros d'accès suivants ont été fournis par Genbank : MK880626, MK880625 et MK880627 (tableau XIII).

>MK880625 ITS

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAA
TATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCCTTGCT
TTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCT
TGTTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCC
TGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCT
TTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCAC
AAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGA
CCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCATAA
```

>MK880626 ITS

```
TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACA
CAATATGAAAGCGGGCTGGCATCCTTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTC
TCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCATAGGACAAACCATAAACC
TTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAAAAAATTAATAATTACAACCTTTTAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCA
GAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGC
ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTC
CAGTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCA
GCACAAGTCGCGCTCTCTTCCAGCCAAGTTCAGCATCCACAAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAT
```

>MK880627 ITS

```
TCTTGGTTCCATTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGA
GGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGG
ACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAG
TGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTA
TTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGG
CGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGG
TTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCT
TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATAT
```

Figure 17 : Séquences obtenues après séquençages des régions ITS des isolats.

Tableau XIII : Les contigs obtenus et blastés sur les banques de données des séquences champignons de NCBI

Numéro d'accès NCBI	% d'identité	% du locus couvert en séquençage	Genre de la souche	Nom de l'espèce
MK880625	100 %	99 %	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria tenuissima</i>
MK880626	100 %	99 %	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria sorghi</i>
MK880627	100 %	99 %	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i>

3-6. Activité antibactérienne des extraits végétaux et fongiques

Lors de ce travail, on a entrepris l'étude de l'activité antibactérienne des feuilles d'*Urtica dioica* et de ses trois champignons endophytes, et cela pour deux extraits différents, l'extrait aqueux et à l'acétate d'éthyle. Cette étude a été menée contre des bactéries à Gram négative : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 4352 et *Citobacter freundii* ATCC 8090 et des bactéries à Gram positive dont des souches SARM de références ou isolées à partir du lait cru ou acidifié.

L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose et les résultats sont présentés dans les tableaux XIV et XV. Tous les extraits ont montré une activité antibactérienne prometteuse contre les bactéries testées bien que le chloramphénicol ait une activité inhibitrice beaucoup plus forte.

Pour l'extrait aqueux, les feuilles d'*U. dioica* ont présenté des activités similaires à celles des champignons endophytes avec des zones d'inhibition comprises entre 9,5 et 15,5 mm contre les bactéries Gram-positives (figure 18, tableau XIV). Des inhibitions maximales de 15,5 et 14 mm ont été respectivement observées contre la souche SARM *S. aureus* MU50 et la souche *S. aureus* S.95 isolée à partir de lait acidifié. *Alternaria sorghi* a présenté l'activité antimicrobienne la plus forte par rapport aux autres champignons.

E. coli 25922 s'est avéré résistante à l'extrait de feuilles. Cependant, *Alternaria sorghia* présenté la zone d'inhibition la plus élevée contre cette souche avec 12,5 mm (Tableau XV). Il est intéressant de noter qu'à l'exception de l'extrait d'*Alternaria sorghi*, l'activité antibactérienne de tous les extraits contre les bactéries Gram-positives était plus efficace que celle contre les bactéries Gram-négatives.

Pour l'extrait à l'acétate d'éthyle, aucune activité n'a été présentée par l'extrait de feuilles contre *K. pneumonia* 4352 et *B. cereus* 10876, alors que cet extrait a montré une

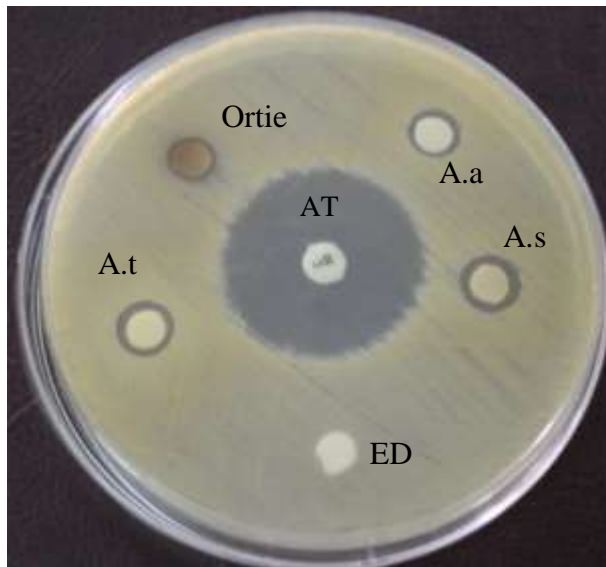
Résultats et discussion

activité plus forte contre la souche SARM *S. aureus* MU50 avec 12, 16 ± 0, 28 mm (figure 19, tableau XV). *Alternaria sorghi* a généralement affiché une activité antimicrobienne plus forte envers les bactéries testées que les autres champignons. De plus, les extraits d'acétate d'éthyle ont également montré une activité inhibitrice relativement faible contre les souches Gram-négatives.

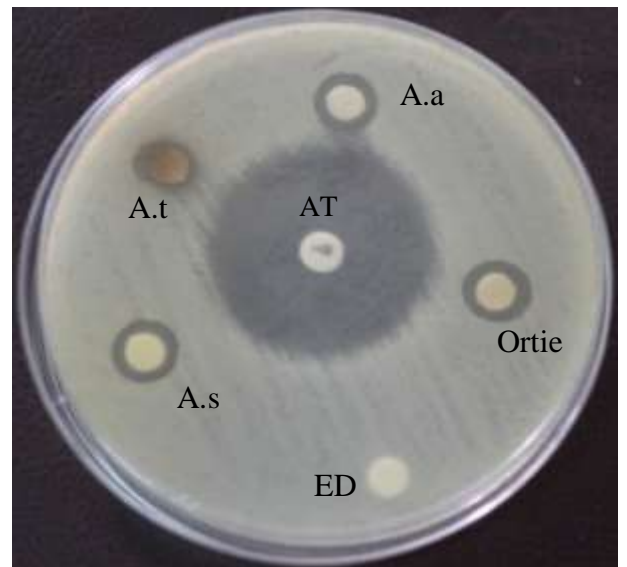
Tableau XIV: Activité antibactérienne des extraits aqueux de champignons endophytes et de feuilles d'ortie, évaluée par la méthode de diffusion sur gélose

Souches bactériennes	Zone inhibition (mm)					
	Ortie	<i>A. alternata</i>	<i>A. tenuissima</i>	<i>A. sorghi</i>	ED	chloramphenicol
<i>S. aureus</i> 25923	9.5±0.5	11.83±1.60	12.5±0.86	11.83±0.76	–	30.83±0.28
<i>S. aureus</i> 43300	10±0.5	8.16±1.25	10.33±0.57	13.16±0.76	–	31.16±0.76
<i>S. aureus</i> MU50	15.5±0.5	9±1	8.66±2.08	11.16±0.28	–	27.66±0.57
<i>S. aureus</i> LGA251	11.16±0.28	9.5±0.5	8.16±1.04	12.33±0.76	–	28±1
<i>S. aureus</i> S84	12.83±0.76	10.16±0.28	8.5±0.86	12.33±0.57	–	31.66±0.57
<i>S. aureus</i> S95	14±0.5	10.5±0.5	8.33±0.57	11.66±1.44	–	31.66±0.57
<i>S. aureus</i> S96	11.33±0.28	10.5±0.5	9.33±1.52	11±0.86	–	29.66±0.57
<i>S. aureus</i> S100	11.5±0.5	9.33±0.57	8.33±1.15	10.33±1.04	–	30±2
<i>S. aureus</i> S101	12.66±0.57	9.83±0.28	10.83±0.76	12±0.5	–	31±1
<i>E. coli</i> 25922	–	9±0.28	7.83±1.75	12.5±0.86	–	29±2.64
<i>K. pneumonia</i> 4352	8±0.5	6.25±0.35	7.25±0.35	11.16±0.76	–	24±0.57
<i>B. cereus</i> 10876	9.5±0.5	8.75±0.35	9.83±1.6	11±0.86	–	27.5±0.86
<i>C. freundii</i> 8090	7.83±0.28	8.66±0.57	9.5±1.32	11.66±0.28	–	26.66±0.57

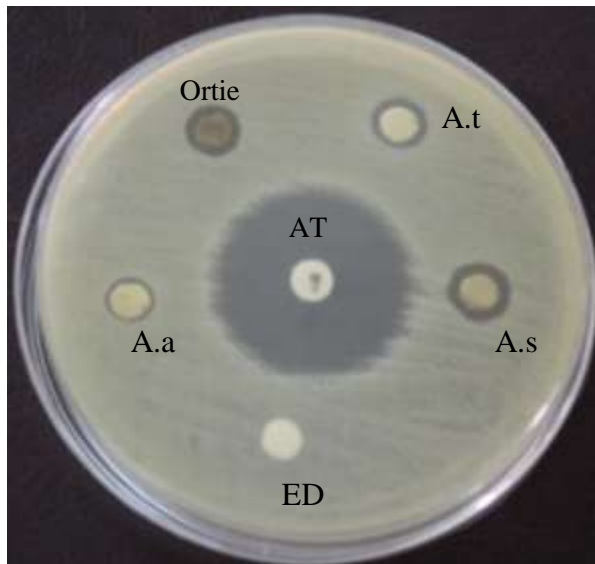
(S : *Staphylococcus*, E : *Escherichia*, K : *Klebsiella*, B : *Bacillus*, C : *Citobacter*, ED : Eau distillée, na : non applicable).



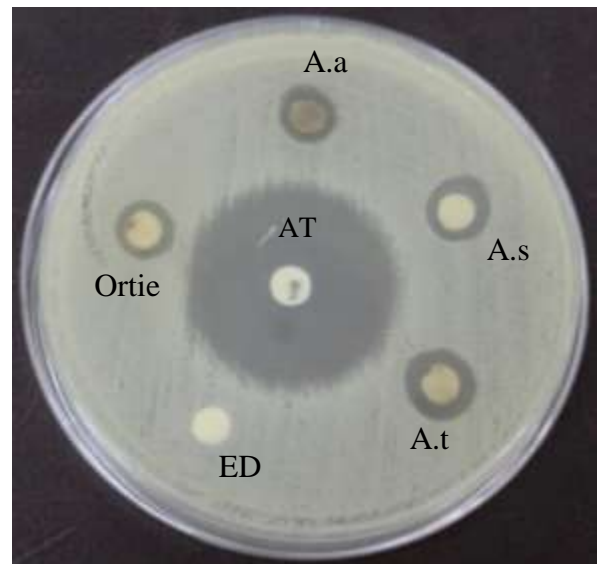
C. freundii 8090



S. aureus S. 96

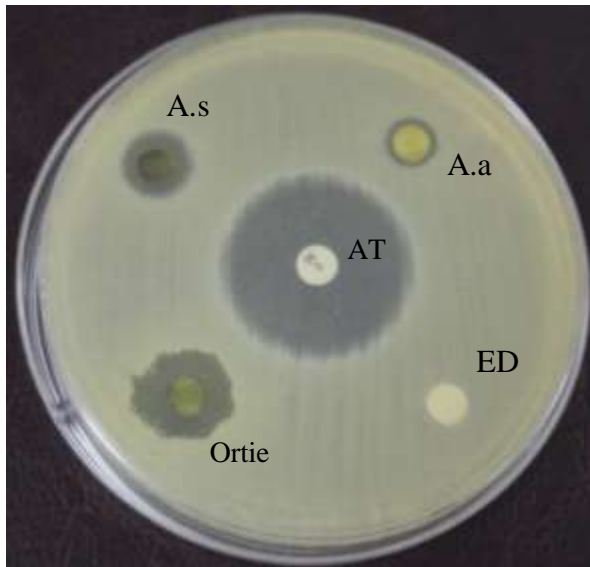


S. aureus LGA 251

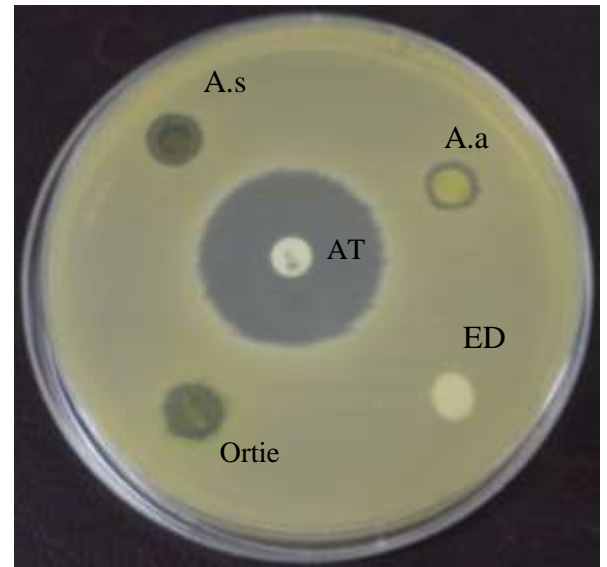


S. aureus 25923

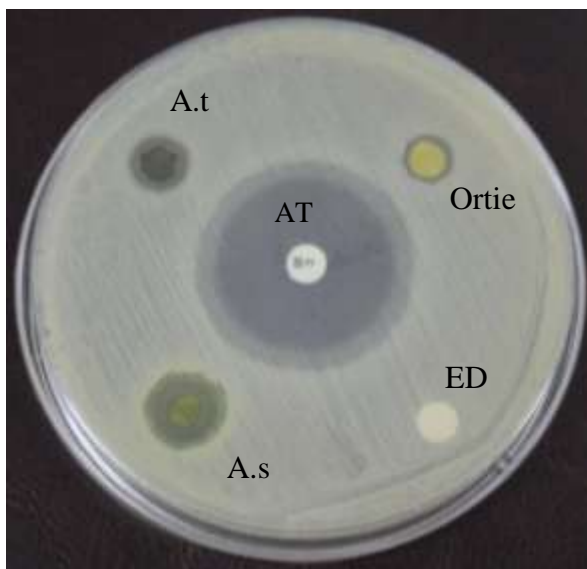
Figure 18 : Activité antibactérienne des extraits aqueux de champignons endophytes et de feuilles d'*Urtica dioica*, obtenues par la méthode de diffusion sur gélose (A.a : *Alternaria alternata*, A.t : *Alternaria tenuissima*, A.s : *Alternaria sorghi*, AT : antibiotique, Chloramphenicol, ED : eau distillée).



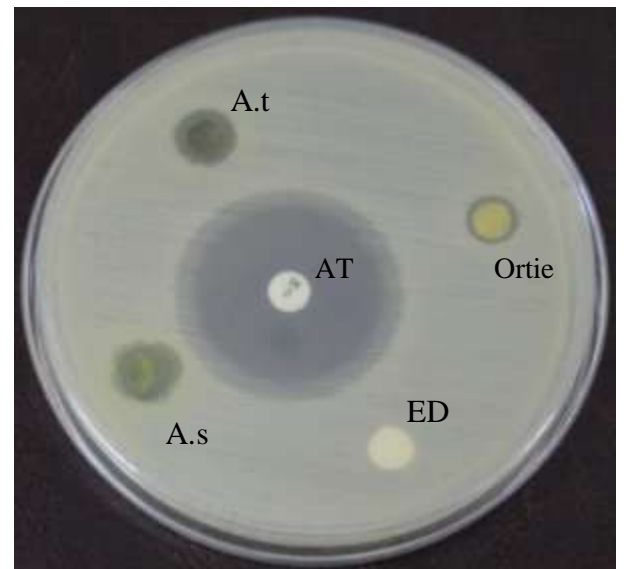
S. aureus MU50



S. aureus S 84

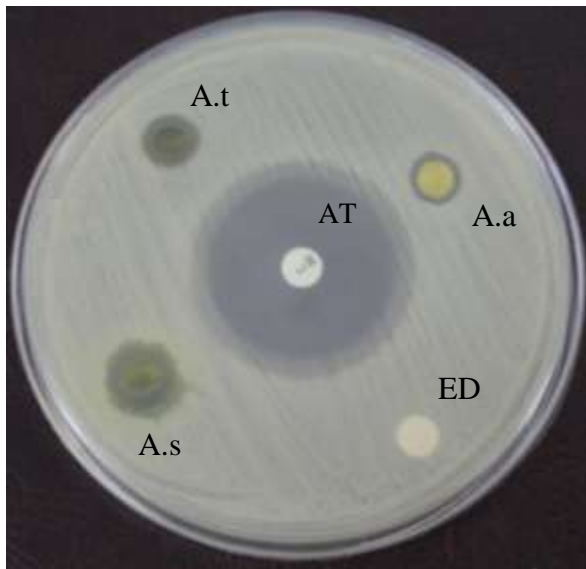


S. aureus 43300

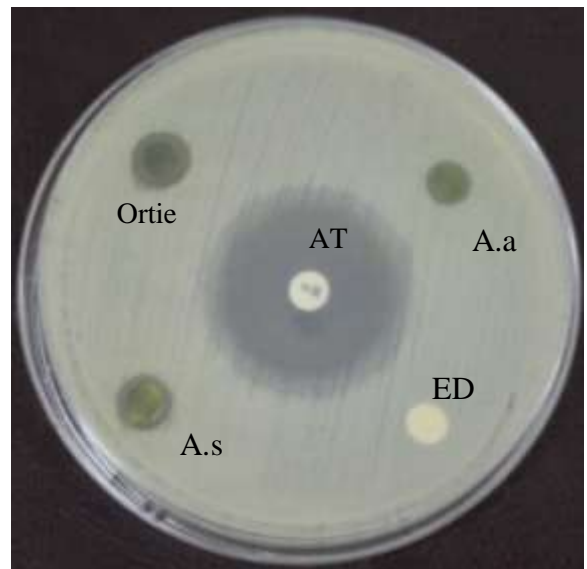


B. cereus 10876

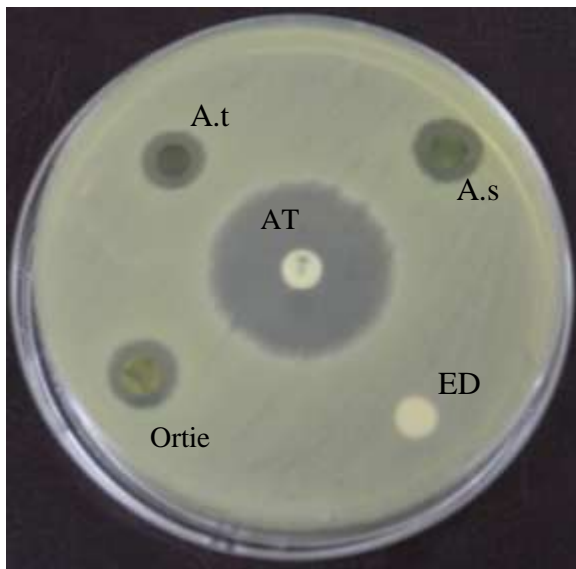
Figure 18 (suite) : Activité antibactérienne des extraits aqueux de champignons endophytes et de feuilles d'*Urtica dioica*, obtenues par la méthode de diffusion sur gélose (A.a : *Alternaria alternata*, A.t : *Alternaria tenuissima*, A.s : *Alternaria sorghi*, AT : antibiotique, Chloramphenicol, ED : eau distillée).



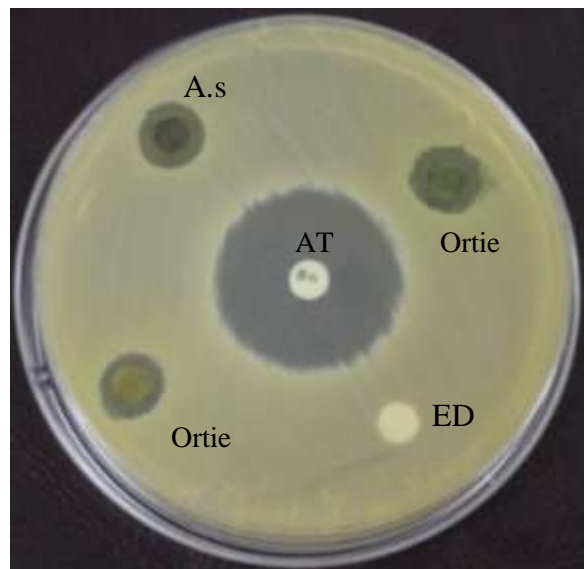
E. coli 25922



S. aureus S. 100



S. aureus S. 101



S. aureus S. 95

Figure 18 (suite) : Activité antibactérienne des extraits aqueux de champignons endophytes et de feuilles d'*Urtica dioica*, obtenues par la méthode de diffusion sur gélose (A.a : *Alternaria alternata*, A.t : *Alternaria tenuissima*, A.s : *Alternaria sorghi*, AT : antibiotique, Chloramphenicol, ED : eau distillée).

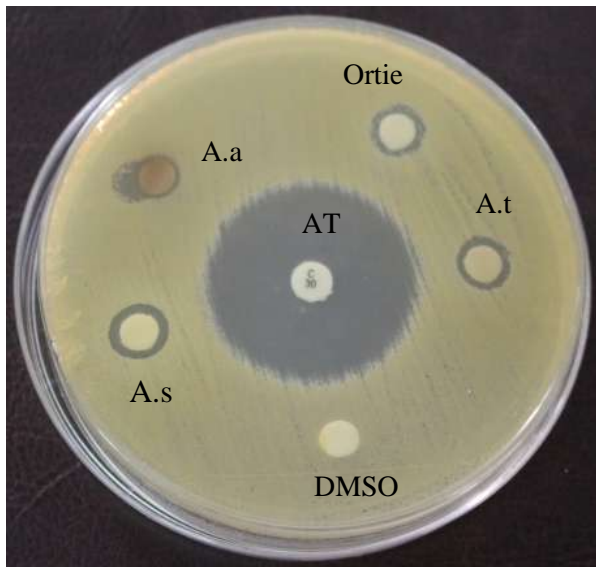
Tableau XV : Activité antibactérienne des extraits d'acétate d'éthyle de champignons endophytes et de feuilles d'ortie, évaluée par la méthode de diffusion sur gélose

Souches bactériennes	Zoned'inhibition (mm)					
	Ortie	<i>A. alternata</i>	<i>A. tenuissima</i>	<i>A. sorghi</i>	DMSO	Chloramphenicol
<i>S. aureus</i> 25923	9.5±0.5	10.83±0.28	12.16±0.76	12.83±0.28	–	29.33±1.15
<i>S. aureus</i> 43300	9.16±0.28	8.16±0.28	10.16±0.28	11±0.5	–	23.33±1.15
<i>S. aureus</i> MU50	12.16±0.28	11.5±0.5	11.5±0.86	10.66±1.04	–	27.33±1.15
<i>S. aureus</i> LGA251	11±0.5	6.5±0.5	10.83±0.28	12±0.5	–	27±0.57
<i>S. aureus</i> S84	10±0.5	10±0.5	9.5±0.5	12.16±0.28	–	31.66±0.57
<i>S. aureus</i> S95	10.83±0.28	8.16±0.28	10.83±0.76	12.5±0.5	–	30.66±0.57
<i>S. aureus</i> S96	9.66±0.57	9±0.5	9.16±1.04	10.16±1.25	–	30.33±0.57
<i>S. aureus</i> S100	10.33±0.76	6.16±0.28	9.5±1.32	10.5±1.32	–	31.66±0.57
<i>S. aureus</i> S101	10.66±0.28	7.83±1	9.16±1.04	8.83±0.76	–	28.33±2.30
<i>E. coli</i> 25922	9.5±0.86	9.83±0.76	10.16±1.25	10.16±0.28	–	31.33±0.57
<i>K. pneumonia</i> 4352	–	8±0.5	8.83±0.76	7.83±1.32	–	24±0.5
<i>B. cereus</i> 10876	–	7.16±1.04	10.83±0.28	11.83±0.28	–	30.33±115
<i>C. freundii</i> 8090	9.83±0.28	7.5±0.5	9.5±0.86	8.83±0.76	–	26±1

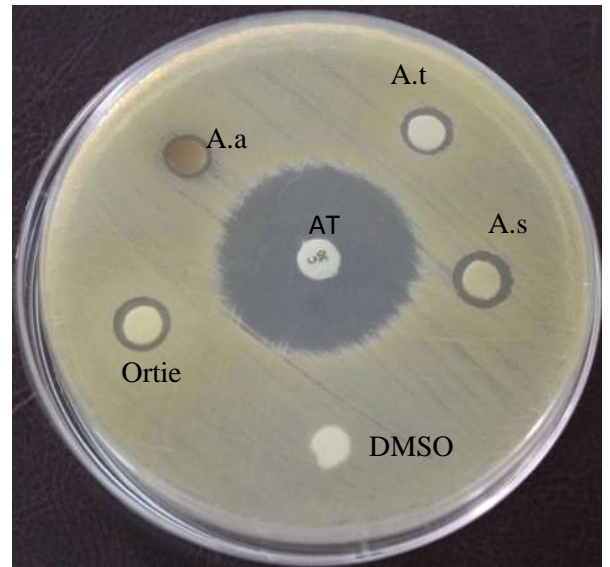
(S : Staphylococcus, E : Escherichia, K : Klebsiella, B : Bacillus, C : Citobacter, DMSO : diméthylsulfoxyde, na : non applicable).

Dans cette étude, les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB) des différents extraits ont également été déterminées, tous les extraits ont pu inhiber la croissance des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, avec des valeurs CMI et CMB allant de 0,19 à 25 mg/mL. Les extraits avaient présenté une activité bactériostatique ou bactéricide contre toutes les bactéries examinées (tableaux XVI et XVII).

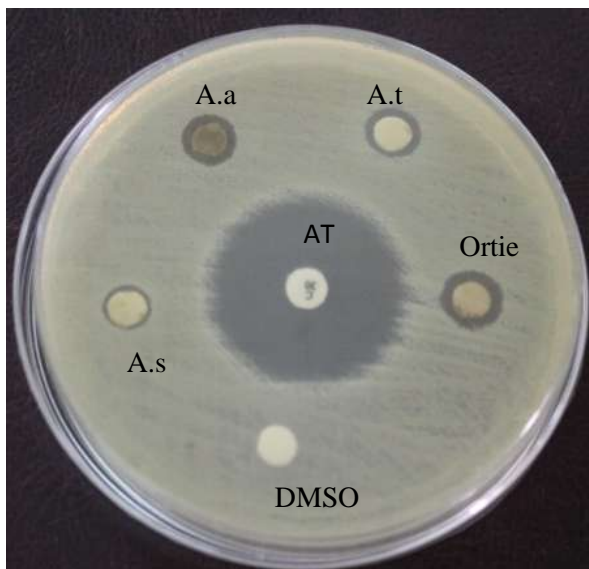
L'étude de l'activité antibactérienne a révélé que pratiquement tous les extraits étudiés présentent des zones d'inhibitions assez considérables contre la majorité des bactéries étudiées, elles restent toutefois moindres que celle obtenue par le témoin positif, le chloramphénicol. L'impureté et la complexité des extraits bruts utilisés pourraient sans doute expliquer cette différence.



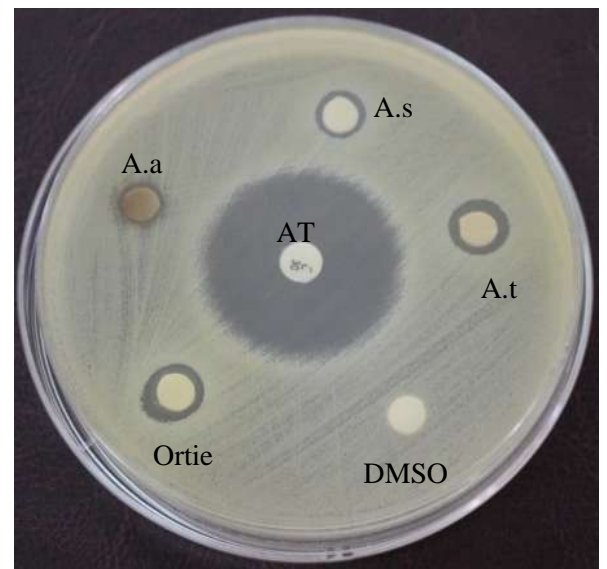
E. coli 25922



S. aureus LGA 251

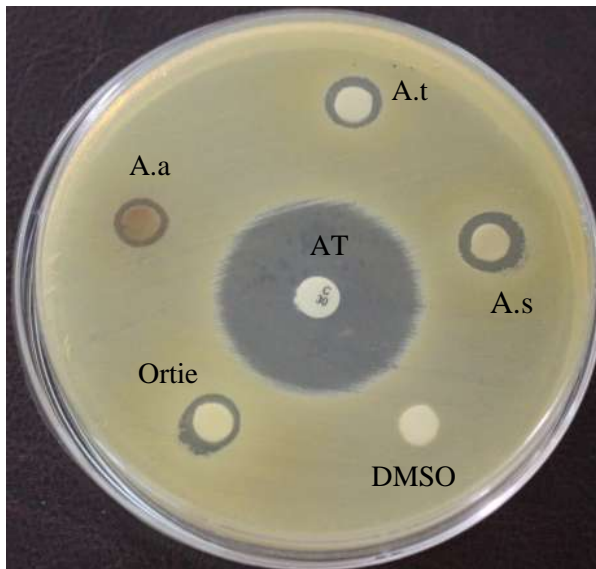


S. aureus 25923

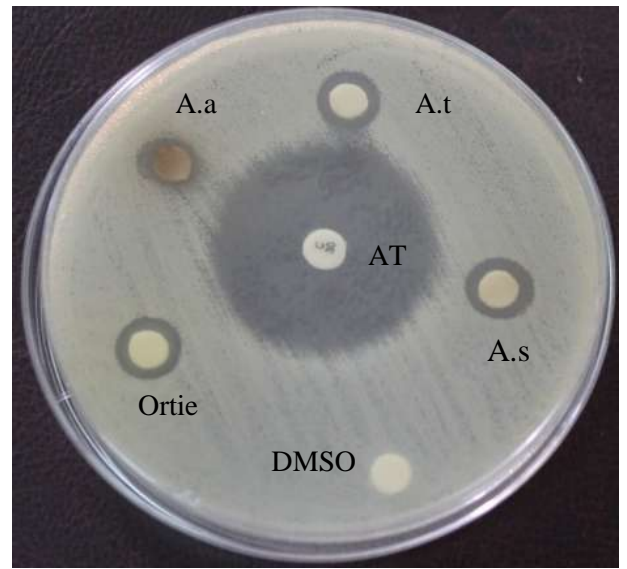


S. aureus S.101

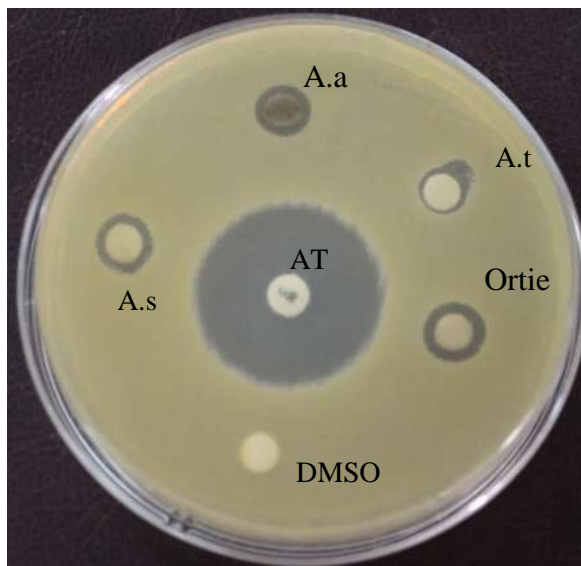
Figure 19 : Activité antibactérienne des extraits à l'acétate d'éthyle de champignons endophytes et de feuilles d'*Urtica dioica*, obtenues par la méthode de diffusion sur gélose (A.a : *Alternaria alternata*, A.t : *Alternaria tenuissima*, A.s : *Alternaria sorghi*, AT : antibiotique, Chloramphenicol, DMSO : diméthylsulfoxyde).



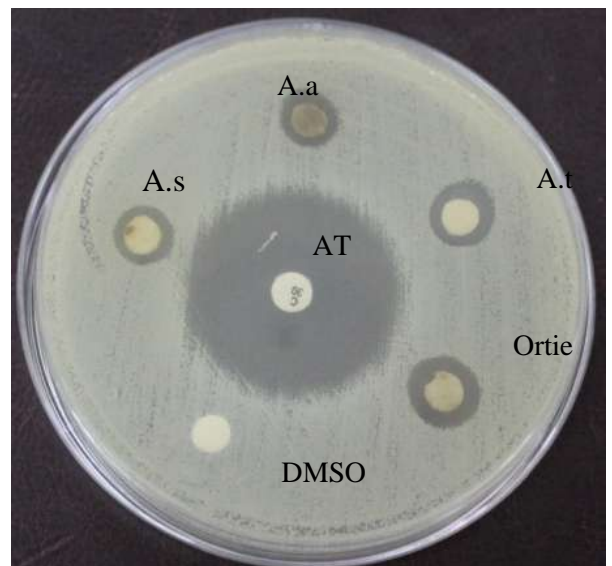
S. aureus S. 100



S. aureus S. 96

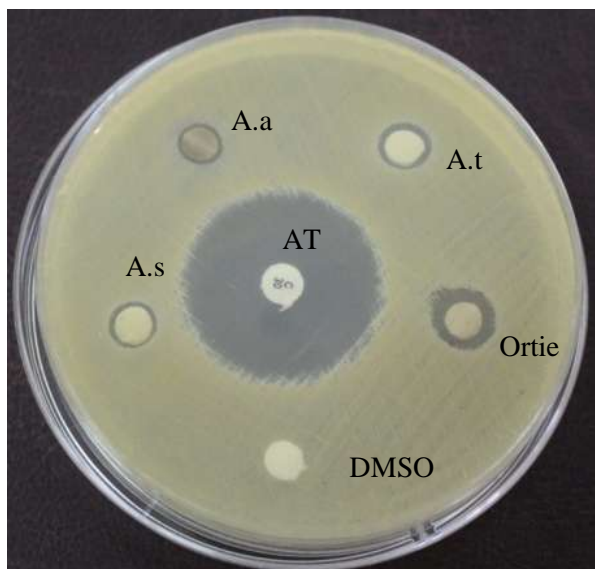


B. cereus 10876

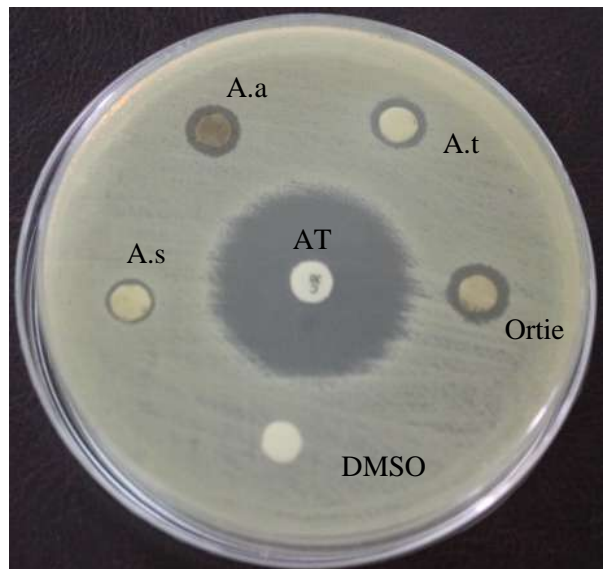


S. aureus MU50

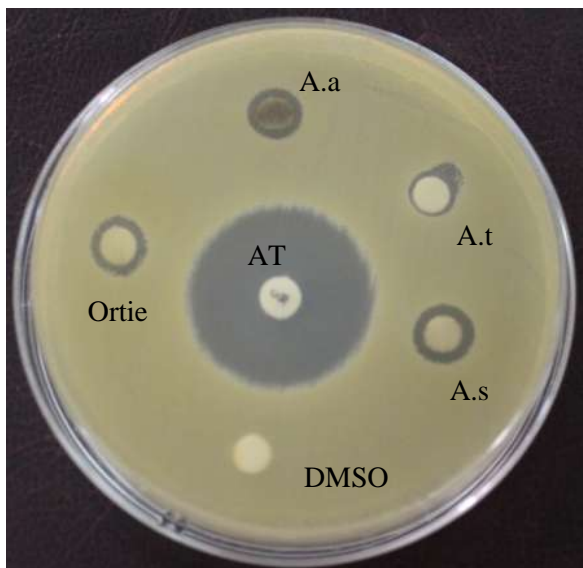
Figure 19 (suite) : Activité antibactérienne des extraits à l'acétate d'éthyle de champignons endophytes et de feuilles d'*Urtica dioica*, obtenues par la méthode de diffusion sur gélose (A.a : *Alternaria alternata*, A.t : *Alternaria tenuissima*, A.s : *Alternaria sorghi*, AT : antibiotique, Chloramphenicol, DMSO : diméthylsulfoxyde).



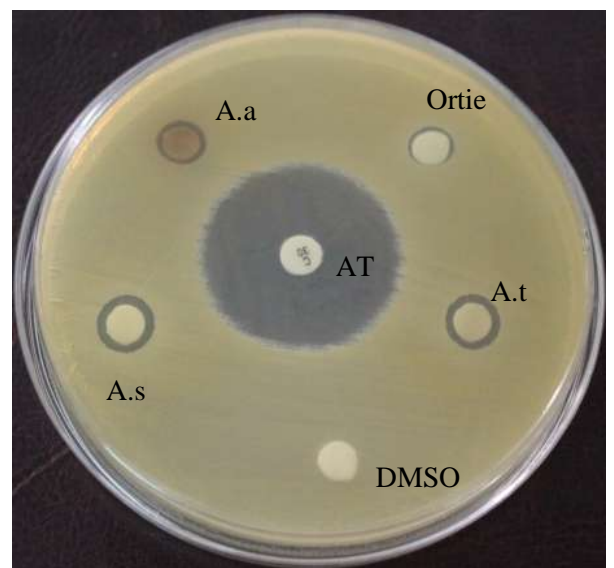
S. aureus S. 96



S. aureus S. 95



S. aureus S. 84



S. aureus 43300

Figure 19 (suite) : Activité antibactérienne des extraits à l'acétate d'éthyle de champignons endophytes et de feuilles d'*Urtica dioica*, obtenues par la méthode de diffusion sur gélose (A.a : *Alternaria alternata*, A.t : *Alternaria tenuissima*, A.s : *Alternaria sorghi*, AT : antibiotique, Chloramphenicol, DMSO : diméthylsulfoxyde).

Tableau XVI : CMI et CMB (mg.mL⁻¹) des extraits aqueux de champignons endophytes et de feuilles d'ortie déterminées par la méthode de macro-dilution

Souches bactériennes	Ortie		<i>A. alternata</i>		<i>A. tenuissima</i>		<i>A. sorghi</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S.aureus</i> 25923	3.12	12.50	0.78	3.12	0.39	0.78	0.78	1.56
<i>S.aureus</i> 43300	3.12	12.50	3.12	25	1.56	3.12	0.39	0.39
<i>S.aureus</i> MU50	0.19	0.39	3.12	12.50	3.12	12.50	0.78	1.56
<i>S.aureus</i> LGA251	1.56	3.12	3.12	12.50	6.25	25	0.78	0.78
<i>S.aureus</i> 84	0.78	1.56	1.56	3.12	3.12	12.50	0.78	1.56
<i>S.aureus</i> 95	0.39	0.39	1.56	6.25	3.12	25	0.78	1.56
<i>S.aureus</i> 96	1.56	6.25	1.56	3.12	3.12	>25	0.78	3.12
<i>S.aureus</i> 100	1.56	3.12	3.12	25	6.25	25	1.56	6.25
<i>S.aureus</i> 101	0.78	1.56	3.12	25	1.56	3.12	0.78	1.56
<i>E.coli</i> 25922	na	na	3.12	12.50	6.25	>25	0.78	1.56
<i>K.pneumonia</i> 4352	6.25	>25	na	na	6.25	>25	1.56	12.50
<i>B.cereus</i> 10876	3.12	25	6.25	>25	3.12	12.5	1.56	6.25
<i>C.freundii</i> 8090	6.25	>25	6.25	>25	3.12	25	0.78	6.25

(S : Staphylococcus, E : Escherichia, K : Klebsiella, B : Bacillus, C : Citobacter, CMI : Concentration minimale inhibitrice, CMB : Concentration minimale bactéricide, na : non applicable).

Tableau XVII : CMI et CMB (mg.mL⁻¹) des extraits d'acétate d'éthyle de champignons endophytes et de feuilles d'ortie déterminées par la méthode de macro-dilution

Souches bactériennes	Ortie		<i>A. alternata</i>		<i>A. tenuissima</i>		<i>A. sorghi</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S.aureus</i> 25923	3.12	12.50	1.56	6.25	0.78	0.78	0.39	0.39
<i>S.aureus</i> 43300	3.12	25	3.12	25	1.56	6.25	0.78	1.56
<i>S.aureus</i> MU50	1.56	1.56	1.56	3.12	1.56	3.12	1.56	3.12
<i>S.aureus</i> LGA251	1.56	3.12	na	na	1.56	6.25	0.78	1.56
<i>S.aureus</i> 84	3.12	12.50	3.12	6.25	3.12	25	0.78	0.78
<i>S.aureus</i> 95	3.12	6.25	6.25	>25	1.56	12.50	0.39	1.56
<i>S.aureus</i> 96	6.25	>25	3.12	25	3.12	25	1.56	6.25
<i>S.aureus</i> 100	3.12	12.50	na	na	3.12	>25	3.12	12.50
<i>S.aureus</i> 101	3.12	6.25	6.25	25	3.12	>25	3.12	25
<i>E.coli</i> 25922	6.25	>25	3.12	6.25	3.12	25	1.56	12.50
<i>K.pneumonia</i> 4352	na	na	6.25	>25	6.25	>25	6.25	>25
<i>B.cereus</i> 10876	na	na	6.25	>25	1.56	3.12	1.56	3.12
<i>C.freundii</i> 8090	6.25	25	6.25	>25	3.12	6.25	3.12	>25

(S : Staphylococcus, E : Escherichia, K : Klebsiella, B : Bacillus, C : Citobacter, CMI : Concentration minimale inhibitrice, CMB : Concentration minimale bactéricide, na : non applicable).

Résultats et discussion

Il s'avère que les bactéries à Gram positives étaient plus sensibles aux extraits que les bactéries à Gram négatives, cette différence pourrait être attribuée à la différence des constituants morphologique de ces microorganismes. Les bactéries à Gram négatives possèdent une membrane externe phospholipidique contenant le lipopolysaccharide comme composant structural, ce qui rend la paroi cellulaire imperméable aux antibactériens. Tandis que les bactéries à Gram positives ne renferment qu'un peptidoglycane dans leur membrane externe, ce qui ne constitue pas une barrière imperméable efficace et les rend ainsi plus susceptibles que les bactéries à Gram négatives (Kaushik et al., 2015).

Nos résultats ont ainsi montré que la souche *E.coli* ATCC 25922 s'est révélée résistante à l'extrait aqueux des feuilles d'*Urtica dioica*, une étude similaire a rapporté que l'extrait éthanolique des feuilles d'ortie n'a pas montré une inhibition de la croissance bactérienne d'*E.coli* ATCC 9837 (Salinas-Sánchez et al., 2009), en parallèle les travaux de Gülcin et al., (2004) ont montré une faible activité bactérienne des extraits aqueux avec une zone d'inhibition de 8 mm.

Comme nous avons aussi relevé que l'extrait à l'acétate d'éthyl des feuilles d'ortie était sans activité contre *K. pneumonia* ATCC 4352, ce résultat concorde avec celui trouvé par Körpe et al., (2013) où les extraits des feuilles d'*U. dioica* et d'*U. pilulifera* n'ont également révélé aucune activité contre *K. pneumonia*. Cependant, l'extrait aqueux d'*Alternaria sorghi* a présenté une activité assez considérable à l'encontre d'*E.coli* ATCC 25922, avec une zone d'inhibition de 12.5 mm et des valeurs CMI et CMB de 0.78 mg/mL et 1.56 mg/mL respectivement.

Des études ultérieures ont démontré que les champignons endophytes peuvent soit présenter les mêmes activités que les plantes hôtes qui les hébergent, puisqu'ils ont la capacité de synthétiser des molécules bioactives identiques ou similaires à celles produites par leur hôte, ou encore avoir de nouvelles activités que celles de leur hôte, en sécrétant de nouveaux composants phytochimiques, absents chez la plante (Yan-Ling et al., 2015). Ainsi, il a été mis en évidence qu'*Alternaria sp* pourrait produire de nouveaux composés bioactifs, ayant comme origine leur plante hôte, comme on a également constaté qu'elles peuvent produire des principes actifs tels que le paclitaxel, la podophylotoxine et la camptothécine, qui ont également été produites par leur plante hôte (Zhao et al., 2011).

Il est vrai que le mécanisme d'action exacte de ces composés contre les agents pathogènes reste pour la plupart inconnu, toutefois, Busi et al., (2012) ont démontré qu'*Aspergillus parasiticus* avait la capacité de biotransformer l'a-santonine en un produit

possédant un grand degré d'activité antibactérienne. Les produits biotransformés pourraient agir contre les microorganismes pathogènes en inhibant leur croissance (Busi et *al.*, 2012).

Au cours de cette analyse, on a également rapporté une activité antibactérienne assez considérable pour les extraits étudiés contre les souches MRSA de références ou isolées à partir du lait cru ou acidifié. Ainsi les résultats révèlent que l'extrait aqueux des feuilles d'ortie a montré l'activité la plus importante contre les souches *S. aureus* MU 50 et *S. aureus* S 95 avec des zones d'inhibition de 15.5 et 14.05 mm respectivement. De même pour l'extrait aqueux d'*A. sorghi* qui a présente une activité bactéricide contre les souches de *S. aureus* ATCC 43300 (CMI 0.39 mg/mL ; CMB 0.39 mg/mL) et *S. aureus* LGA 251 (MIC 0.78 mg/MI ; CMB 0.78 mg/mL). En accord avec les résultats obtenus dans cette présente étude, des études antérieures ont rapporté qu'*Urtica dioica* possède une activité antibactérienne notable contre *S. aureus* (Gülcin et *al.*, 2004 ; Fisgin et *al.*, 2009).

Ces résultats sont d'autant plus intéressants car la plupart des isolats cliniques de *S. aureus* sont résistants à plusieurs antibiotiques (Sibanda et *al.*, 2010), de plus, les *S. aureus* résistantes à la Methicilline restent une préoccupation majeure dans le monde entier, car cela réduit considérablement le choix d'antibiotiques efficaces pour la prévention et le traitement d'une infection très courante dans les hôpitaux et les communautés (Gould, 2005).

En revanche, nous avons constaté qu'*Alternaria sorghi*, d'une manière générale, a présenté une activité antibactérienne plus importante comparativement à *Alternaria tenuissima* et *Alternaria alternata*.

Nous devons garder à l'esprit que ces champignons endophytes interagissent au sein de la plante pour améliorer sa croissance et sa compétitivité afin de la protéger contre les herbivores et phytopathogènes. En fonction de l'arsenal phytochimique de chacun, ils peuvent être responsables d'une ou plusieurs activités biologiques (Tan et Zou, 2001 ; Gunatilaka, 2006).

Les espèces d'*Alternaria* sont connues comme source de nombreuses substances bioactives avec des structures très différentes et des bioactivités diverses (Liebermann et *al.*, 1994 ; Tan et Zou, 2001). Ainsi, l'acide borique D et l'Altenusine d'*Alternaria sp.*, ont montré une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus* avec des CMI de 100µg/mL et 25µg/mL, respectivement (Xu et *al.*, 2012), comme il a été également mis en évidence, que certaines anthraquinones d'*Alternaria solani* et *Alternaria sp.*, ont montré une activité antibactérienne sur *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* et *Vibrio parahemolyticus* (Okamura et *al.*, 1993 ; Yagi et *al.*, 1993 ; Zheng et *al.*, 2012). Les dérivés de pyrone du

champignon endophyte *Alternaria tenuissima* de la plante médicinale chinoise, *Salvia przewalskii* présentent aussi une activité antibactérienne contre les souches testées (Xiao et al., 2014). Sonaimuthu et al., (2010) ont démontré que l'acide tenuazonic s'est révélé être un composé actif d'*Alternaria alternata* contre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (CMI 250 µg / mL), ce qui en ferai un principe antituberculeux prometteur.

Il est clair que les champignons endophytes d'espèce *Alternaria* sont une nouvelle source abondante de composés à activité antibactérienne importante, ils ont la capacité particulière de produire des composés bioactifs identiques ou similaires à ceux produit par leurs plantes hôtes ainsi que d'autres constituants bioactifs, mais ils sont également capables de transformer des produits naturels en modifiant leurs structures et leurs bioactivités.

Il est donc extrêmement intéressant d'exploiter ces nouvelles molécules bioactives produites par les champignons endophytes, d'autant plus que la production de ces composés bioactifs pourrait être facilitée par les processus de fermentation fongique et permettra d'augmenter la concentration de molécules faiblement synthétisées par les plantes hôtes.

Cependant, il important de ne pas perdre de vue que les métabolites secondaires peuvent être atténués dans des conditions axéniques. L'absence de stimulus de l'hôte dans le milieu de culture et le silence des gènes dans les cultures axéniques pourraient être responsables de l'atténuation de ces métabolites (Hertweck, 2009). Brakhage et al., (2008) et Sachin et al., (2013) ont déduit que les groupes de gènes de la biosynthèse des métabolites secondaires restent silencieux jusqu'à ce que les déclencheurs de leur induction soient enclenchés.

3-7. Evaluation des systèmes antioxydatifs

Afin de comprendre le rôle potentiel des champignons endophytes dans la régulation des stress abiotiques et biotiques sur la plante, l'étude suivante s'est concentrée sur la quantification des composés phénoliques et thiols totaux, les considérant comme des molécules antioxydantes, et sur l'étude des activités enzymatiques de détoxification des ROS telles que les catalases et les superoxydes dismutases. Pour cela, nous avons mesuré ces composés et enzymes dans les feuilles d'ortie et les différents mycéliums âgés de 6 jours.

3-7-1. Evaluation des systèmes anti-oxydatifs enzymatiques

3-7-1.1. Activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT)

Dans cette étude, la catalase a démontré l'activité la plus faible chez *A. tenuissima* et *A. alternata* avec 30 mmol de protéine $\text{mn}^{-1}\text{mg}^{-1}$. L'activité maximale des champignons endophytes a été observée chez *A. sorghi*. Nous avons constaté que l'activité CAT était plus élevée dans les feuilles d'ortie (50 mmol de protéine $\text{mn}^{-1}\text{mg}^{-1}$) par rapport aux champignons endophytes (figure 20). En revanche, *A. alternata* et les feuilles d'ortie ont présenté l'activité SOD la plus élevée avec respectivement 53,32 et 54,66 U/mg de protéine.

Le rôle des enzymes antioxydantes contre le stress oxydatif chez les plantes a été largement rapporté par de nombreux chercheurs (Garratt et *al.*, 2002 ; Radhakrishnan et *al.*, 2013). CAT et SOD sont des antioxydants importants qui éliminent les espèces réactives de l'oxygène. La SOD catalyse la transformation de l'anion superoxyde (O_2^-) en O_2 et H_2O_2 . Le peroxyde d'oxygène ainsi produit sera ensuite converti en eau et en oxygène par la catalase et/ou les peroxydases, ainsi, la SOD et la CAT peuvent être considérées comme des mécanismes de défense antioxydante de première ligne (Racchi, 2013). Dans cette présente étude, on a recensé que l'activité de ces enzymes été plus élevée chez la plante hôte. Plusieurs études ont montré que l'interaction symbiotique entre les plantes hôtes et certains de leurs microorganismes endophytes peuvent conférer aux plantes hôtes une tolérance ou une résistance au stress (Waller et *al.*, 2005 ; Kumar et *al.*, 2009).

Ainsi, Zhang et *al.*, (2018) ont démontré qu'en fonction de l'écotypes, le champignon endophyte *Epichloë* a réussi à augmenter l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT), la capacité photosynthétique, la concentration des glucides ainsi que la croissance de son hôte, *Elymus dahuricus*. Pour Bonnet et *al.*, (2000), il est clair que la présence de l'endophyte *Epichloë lolii* a modifié le métabolisme de son hôte (*Lolium perenne* cv. Apollo), en favorisant la catalyse de H_2O_2 par la catalase et en améliorant la capacité de défense de l'hôte. D'autant plus, qu'une augmentation de l'activité des enzymes de détoxification des ROS a été mise en évidence chez des individus de *Elymus dahuricus* exposés à la sécheresse (Zhang et *al.*, 2018). On ignore jusqu'à présent les mécanismes mis en jeu par les champignons endophytes afin d'améliorer les systèmes de défense de la plante, à cet effet, le gène SOD a été isolé chez *Epichloë lolii*, ce qui a fourni une nouvelle approche pour l'étude du rôle de l'expression des gènes dans la capacité de détoxification des ROS et le mécanisme d'interaction entre endophyte et plante.

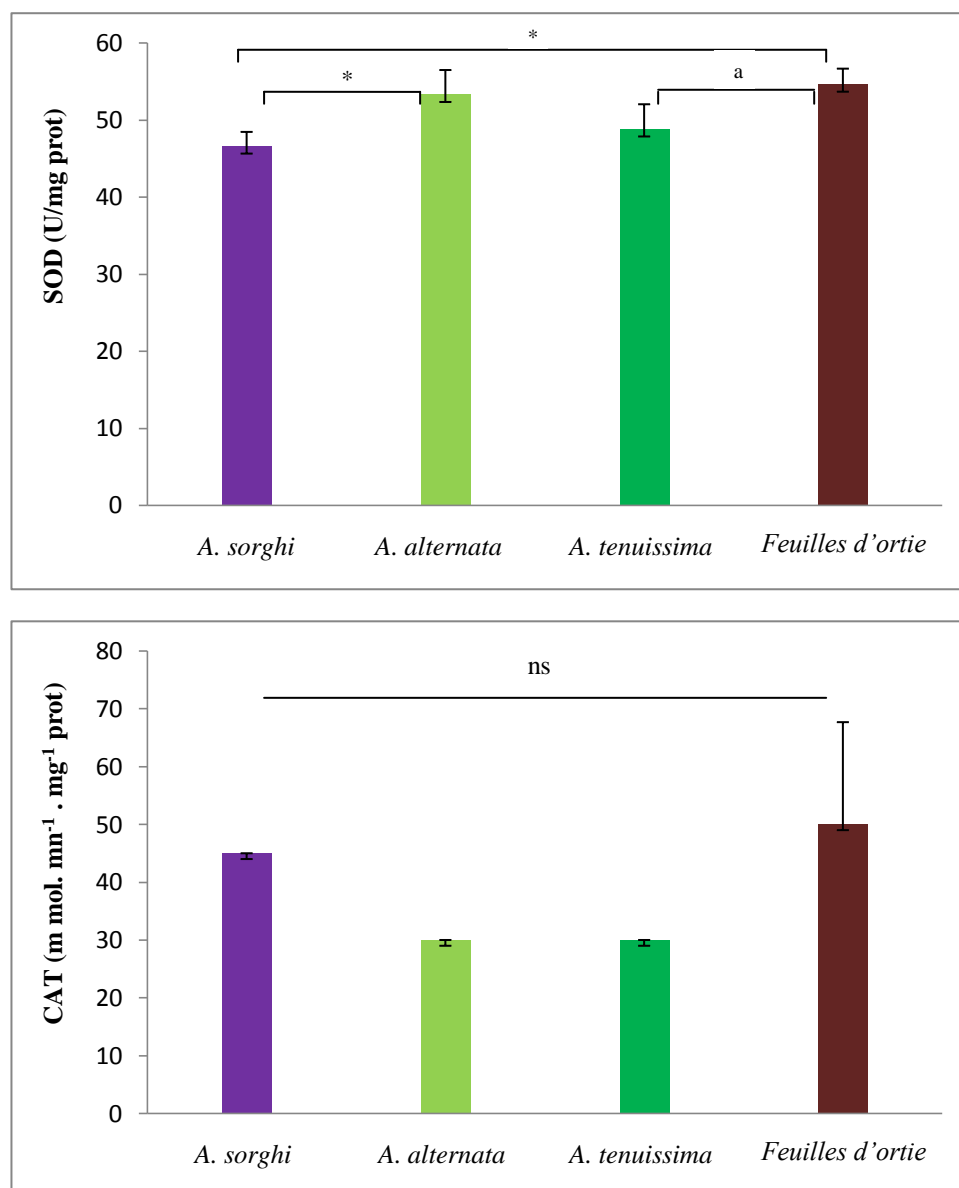


Figure 20 : Activités spécifiques des enzymes de détoxification des ROS dans les feuilles d'*Urtica dioica* et ses champignons endophytes, CAT : catalase, SOD : superoxyde dismutase (les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes \pm ET, *P <0,05, a : P<0,1, ns : non significatif).

Alizadeh et al., (2016), ont étudié les effets de *Piriformospora indica* sur la résistance au froid du haricot vert et ont constaté que l'activité CAT des plantes inoculées avec *Piriformospora indica* était 2,16 fois plus élevée que celle des plantes non inoculées après 3 jours sous stress froid. De même, l'activité CAT dans *Piriformospora indica* a sensiblement augmenté de 211,4 % après 24 h de stress au froid. En outre, la teneur en H₂O₂ a montré une corrélation négative avec l'activité CAT. Cela indique que *Piriformospora indica* augmente l'activité CAT, participe à l'élimination des radicaux libres en excès, accélère l'efficacité de piégeage de H₂O₂ et atténue les dommages de la structure de la membrane cellulaire causés par le stress dû au froid.

Li et al., (2021), ont montré que l'activité SOD et l'expression de SOD dans *Piriformospora indica* avant et après le stress dû au froid étaient toutes deux significativement plus élevées que chez les plantes non colonisées. Il est suggéré que *Piriformospora indica* pourrait induire l'expression du gène SOD pour réguler la résistance au froid du bananier. A cet effet Zhang, (2010) a cloné le gène ChiI 1 de la protéine antigel de la chitinase, apparenté à la glycosidase et à l'hydrolase, à partir de bananier sauvage Sanming tolérant au froid et a découvert que le stress dû au froid induit l'expression de ChiI 1 après 8 h de traitement à basse température (Zhang, 2010). Li et al., (2021) ont constaté que ce même gène (ChiI 1) était régulé positivement par le stress dû au froid et par la colonisation de *Piriformospora indica* chez le cultivar *Tianbaojiao* sensible au froid, indiquant que ce gène est à la fois sensible aux basses températures et à *Piriformospora indica*.

Une autre étude a aussi montré que les champignons mycorhiziens ont la capacité d'augmenter les antioxydants dans les plantes soumises à un stress abiotique. Par exemple, *Glomus mosseae* est un champignon mycorhizien arbusculaire dont on a découvert qu'il protégeait les semis d'agrumes des effets du stress de salinité via la stimulation des systèmes de défense antioxydants (Wu et al., 2010). Radhakrishnan et al., (2003) ont trouvé des activités CAT, POD et SOD significativement plus élevées dans les plantes traitées au *Glomus mosseae* dans des conditions de salinité par rapport aux conditions sans stress salin (Radhakrishnan et al., 2013). Ce qui est en corrélation avec les résultats d'Alguacil et al., (2003), qui ont découvert que l'inoculation de mycorhizes augmentait l'activité de la CAT chez *Oleo europaea* cultivée dans des conditions semi-arides.

Zhang et al., (2016) ont également montré que les enzymes antioxydantes (SOD et CAT) des semis de blé sous stress salin, ont été augmenté avec l'application de la souche *Trichoderma longibrachiatum* T6. L'expression relative des gènes SOD et CAT dans les plantules de blé étaient nettement régulées à la hausse. Leurs résultats indiquent que la souche

T6 atténuait considérablement les effets indésirables, protégeant les semis du stress dû au sel pendant leur période de croissance. Les mécanismes possibles par lesquels la souche supprime l'effet négatif du stress dû au NaCl sur la croissance des semis de blé peuvent être dus à l'amélioration du système de défense antioxydant et de l'expression des gènes chez le blé stressé.

La SOD et CAT aident également les plantes à se protéger contre le stress des métaux lourds. L'étude de Wang *et al.*, (2020) a montré que la bactérie endophyte *Sphingomonas* SaMR12 a atténué le stress lié au cadmium (Cd) chez le colza par la régulation des enzymes antioxydantes. Ainsi, l'exposition au Cd a augmenté l'activité SOD dans les pousses et les racines, a augmenté l'activité CAT à de faibles concentrations de Cd et l'a diminuée à des concentrations plus élevées. L'inoculation de SaMR12 a favorisé les activités CAT et SOD.

Une autre étude a rapporté que l'inoculation de bactéries résistantes au Cd (deux *Pseudomonas spp.*, et deux *Rhizobium sllae*) dans *Sulla coronaria* a augmenté les activités SOD dans les pousses et les racines (Chiboub *et al.*, 2018). L'inoculation avec *Glomus intradices* BEG141 a favorisé les activités SOD et CAT du maïs sous une exposition au Cd, ce qui indique que ces endophytes accéléreraient la réponse de la plante non hôte au stress au Cd en augmentant les activités des enzymes du système antioxydant, tels que SOD, CAT (Liu *et al.*, 2018). Ainsi, les endophytes pourraient être des candidats efficaces qui interagiraient avec des plantes à plus grande biomasse, comme le colza ou le blé pour augmenter la tolérance des plantes aux métaux lourds, au froid, à la salinité et la sécheresse et améliorer l'efficacité et le rendement des semences.

3-7-2. Evaluation des systèmes anti-oxydatifs non enzymatiques

3-7-2.1. Taux des thiols totaux et des phénols totaux

Lors de cette étude, la teneur en phénols et en thiols totaux des champignons endophytes et des feuilles d'*Urtica dioica* a été déterminée. De manière inattendue, tous les champignons ont montré presque la même quantité de composés phénoliques que les feuilles d'ortie (figure 21). Cependant, ce n'était pas le cas pour les thiols totaux où les feuilles d'ortie présentaient le niveau le plus élevé soit presque deux fois la teneur des champignons ($P < 0.01$; $P < 0.05$) (figure 21).

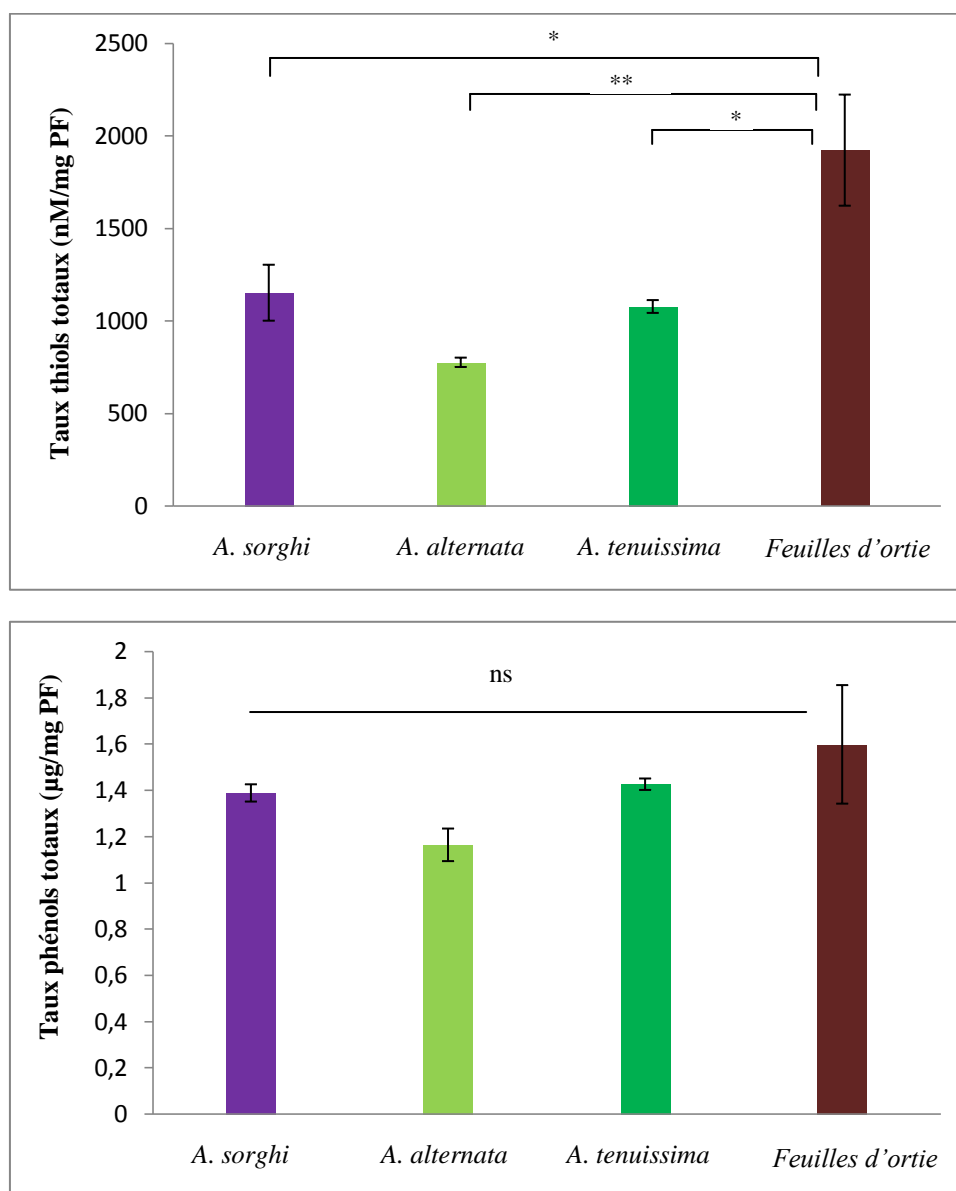


Figure 21 : Teneur en molécules antioxydantes des feuilles d'*Urtica dioica* et de ses champignons endophytes (PF : poids frais, les résultats sont la moyenne de trois expériences \pm ET, ** P < 0,01 ; *P < 0,05, ns : non significatif).

Résultats et discussion

Les phénols sont des phyto-constituants importants en raison de leur capacité de piégeage des radicaux libres due à leurs groupes hydroxyles. Dans diverses études, il a été rapporté qu'une relation très positive entre les phénols totaux et l'activité antioxydante était présente dans plusieurs espèces végétales (Gulçin *et al.*, 2002 ; Oktay *et al.*, 2003). Les composés polyphénoliques seraient associés à une activité antioxydante et joueraient un rôle important dans la stabilisation de la peroxydation des lipides et ont également des effets inhibiteurs sur la mutagenèse et la carcinogenèse chez l'homme (Duh *et al.*, 1999).

Cette étude a révélé que les feuilles d'ortie et les champignons endophytes la colonisant sont une source importante de composés phénoliques. Orcic *et al.*, (2014) ont admis que les parties supérieures de la grande ortie représentent une assez grande richesse en composés phénolique et qui est trois fois supérieure à celle des racines.

Les thiols sont présents sous forme de phytochélatines de faible poids moléculaire dans les plantes (Clemens *et al.*, 2002 ; Seregin et Ivanov, 2001) et certains champignons (Gadd, 2001 ; Clemens et Simm, 2003). Les composés de haut poids moléculaire sont des protéines riches en cystéine - les métallothionéines. Ils ont été trouvés chez de nombreux animaux (Nordberg 1998), quelques champignons (Gadd et Sayer, 2000; Clemens et Simm, 2003) et des plantes (Cobbett et Goldsbrough, 2002). La biosynthèse des phytochélatines est étroitement liée au métabolisme du glutathion (Penninckx, 2002).

Les ROS peuvent causer des dommages oxydatifs aux lipides membranaires, aux protéines, aux pigments chloroplastiques, aux enzymes, aux acides nucléiques et à d'autres biomolécules (Mittler, 2002). Pour surmonter les dommages oxydatifs causés par la toxicité des radicaux libres, les champignons ont développé des systèmes de défense antioxydants. Le système de défense antioxydant implique des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) (abordées précédemment), et des antioxydants tels que le glutathion (GSH) et le thiol non protéique (NP-SH) (Zhang *et al.*, 2015).

De plus, les champignons endophytes, comme tous les organismes vivants, ont développé un ensemble de mécanismes qui contrôlent et réagissent à l'absorption et à l'accumulation de métaux lourds. Les interactions possibles entre les métaux toxiques et les champignons comprennent entre autres la synthèse de composés contenant des thiols, tels que le glutathion non protéique et les phytochélatines et les protéines métallothionéines, qui peuvent séquestrer les ions métalliques (Binz et Kagi, 1999 ; Gadd, 2001 ; Miersch *et al.*, 2001 ; Cobbett et Goldsbrough, 2002). Nous avons constaté que les taux des thiols totaux

étaient plus élevés dans les feuilles que dans les champignons, ceci pourrait être dû au fait que le dosage des thiols totaux s'est fait en dehors de stimulus.

3-8. Activité antioxydantes des extraits

L'étude de l'activité antioxydante des extraits aqueux et à l'acétate d'éthyles des endophytes d'*Alternaria* et de leur hôte, les feuilles d'*Urtica dioica*, a été entrepris en se basant d'abord, sur le test de l'activité antiradicalaire, qui consiste à déterminer la capacité de piégeage des radicaux libres et des électrons impairs du DPPH, ensuite, en se basant sur leur capacité de chélation des ions ferreux.

3-8-1. Piégeage du radical DPPH

Les profils de piégeage des radicaux libres de DPPH sont représentés dans les figures 22 et 23. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle possède la plus forte activité antioxydante par rapport à l'extrait aqueux. Pour les extraits aqueux, on a constaté que l'extrait de feuilles d'*U. dioica* présentait le plus faible pourcentage d'inhibition du radical DPPH. L'activité antiradicalaire des extraits de champignons endophytes s'est révélée plus important avec (72,10 ±0.60%) pour *Alternaria alternata*, (76,77 ±0.84%) pour *Alternaria tenuissima* et (83,53 ±0.70%) *Alternaria sorghi*. Cependant, tous les extraits ont montré une différence significative ($p < 0,001$) par rapport à l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique (97,30 ±1.05%).

Pour les extraits à l'acétate d'éthyle, les plus efficaces d'entre eux ont présenté une activité très proche de celle de l'antioxydant de référence. Ainsi, les feuilles d'ortie et *Alternaria sorghi* ont présenté la plus grande activité antioxydante avec des valeurs de piégeage des radicaux libres DPPH de 94,87 ± 1.48 % et 96,88±1.15 %, respectivement, tandis que l'*Alternaria tenuissima* et l'*Alternaria alternata* ont donné 87,98 ± 0.64 % et 70,95 ±1.23 %, respectivement. La valeur IC50, qui est la concentration de l'échantillon nécessaire pour piéger 50 % des radicaux libres, a été calculée par l'analyse de régression linéaire. La faible valeur de IC50 indique une activité antioxydante élevée, ainsi l'activité antioxydante la plus élevée a été recensé pour *Alternaria sorghi* avec (139,27 ±1.56µg/mL) et les feuilles d'ortie avec (104,63 ±3.33µg/mL).

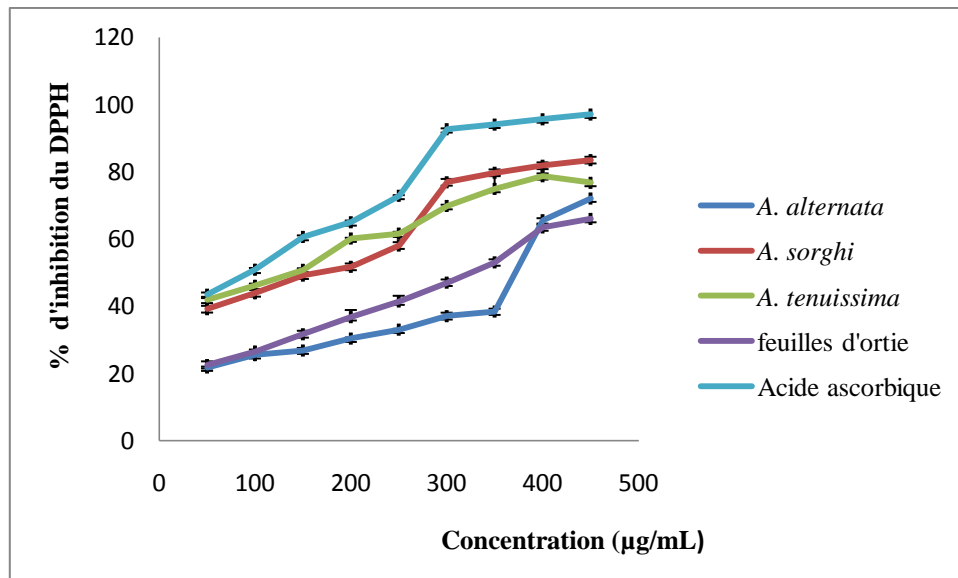


Figure 22 : Activité de piégeage des radicaux DPPH des extraits aqueux des champignons endophytes et des feuilles d'*U. dioica* comparativement à l'acide ascorbique (les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes \pm ET, pour tous $P < 0,001$).

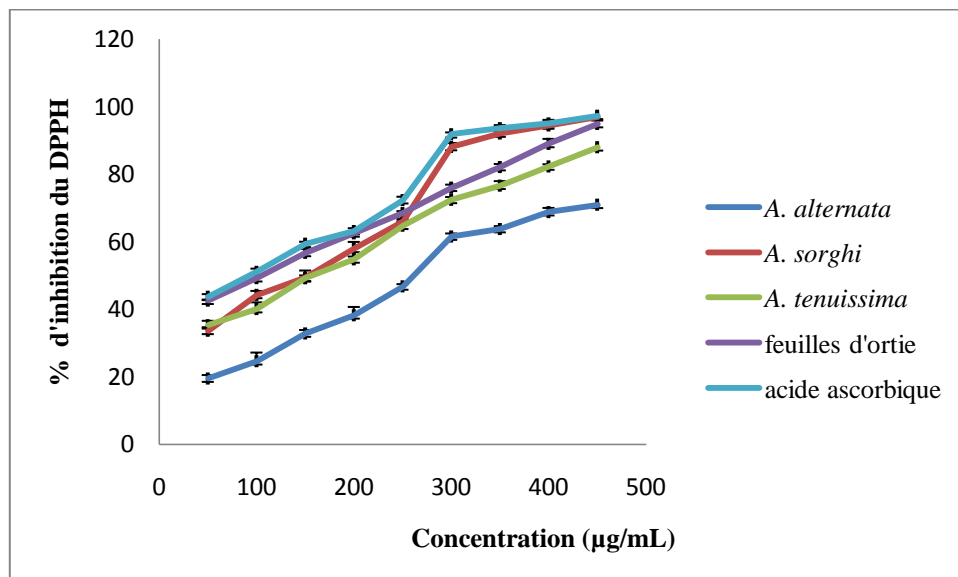


Figure 23 : Activité de piégeage des radicaux DPPH des extraits à l'acétate d'éthyl des champignons endophytes et des feuilles d'*U. dioica* comparativement à l'acide ascorbique (les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes \pm ET, pour tout $P < 0,001$).

3-8-2. Pouvoir réducteur

Dans le dosage du pouvoir réducteur, la présence de l'antioxydant entraîne la réduction de la forme oxydée du fer (Fe^{3+}) dans le chlorure ferrique en ferreux (Fe^{2+}). En effet, l'efficacité de certains antioxydants est liée à leur pouvoir réducteur. La quantité de Fe^{2+} a ensuite été détectée en mesurant l'absorbance à 700 nm. Comme le montrent les figures 24 et 25, une valeur d'absorbance plus élevée indique un pouvoir réducteur plus fort. Le pouvoir réducteur de tous les extraits dépendait de la dose, les extraits aqueux ayant montré un pouvoir réducteur significativement plus fort ($p < 0,001$) par rapport aux extraits à l'acétate d'éthyle.

Pour les extraits aqueux, les feuilles d'*U. dioica* ont montré le potentiel réducteur le plus élevé ($3,12 \pm 0.023$) qui était comparable au pouvoir réducteur des champignons endophytes. Les champignons endophytes possèdent un pouvoir réducteur de ($2,57 \pm 0.025$), ($2,17 \pm 0.037$) et ($1,95 \pm 0.030$) pour *Alternaria sorghi*, *Alternaria tenuissima* et *Alternaria alternata*, respectivement. Pour les extraits à l'acétate d'éthyle, les feuilles d'ortie ont montré le potentiel réducteur le plus faible ($1,24 \pm 0.010$) comparable au pouvoir réducteur des champignons endophytes. En revanche, *Alternaria alternata* a présenté le pouvoir réducteur le plus élevé avec $2,27 \pm 0.006$.

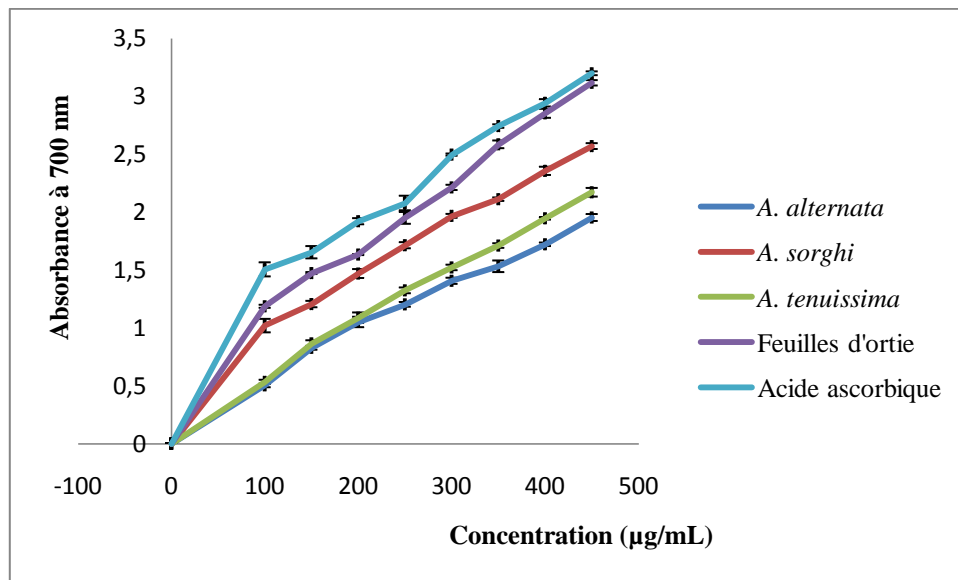


Figure 24 : Dosage du pouvoir réducteur des extraits aqueux des champignons endophytes et des feuilles d'*U. dioica* comparativement à l'acide ascorbique (les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes \pm ET, pour tous $P < 0,001$).

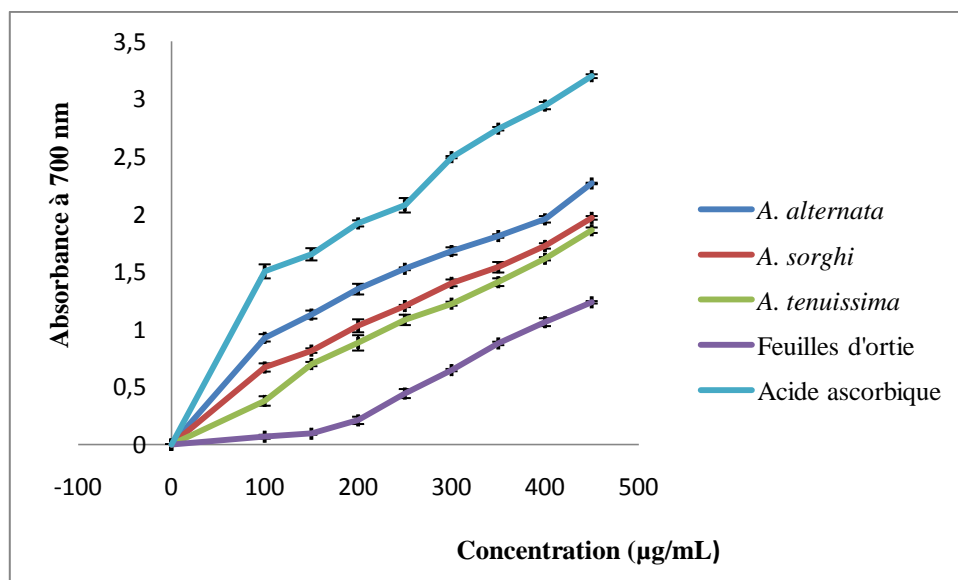


Figure 25 : Dosage du pouvoir réducteur des extraits à l'acétate d'éthyle de champignons endophytes et des feuilles d'*U. dioica* comparativement à l'acide ascorbique (les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes \pm ET, pour tous $P < 0,001$).

Nos résultats ont révélé que d'une manière générale tous les extraits étudiés possèdent une forte activité antioxydante. A cet effet, il a été admis que l'activité antioxydante d'un extrait est fortement influencée par la composition phénolique de ce dernier (Cheung et *al.*, 2003). On a constaté qu'il y a une corrélation et une relation linéaire entre la teneur de certains extraits en polyphénols totaux et l'activité antioxydante. Ainsi, les extraits à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*U. dioica* et d'*A. sorghi* ont exhibé la plus grande activité antiradicalaire avec un taux de piégeage du DPPH de 94.86 % et 96.87 %, respectivement. Comme nous avons constaté que ces deux entités ont également présenté les plus grandes teneurs en composés phénoliques (figure 21).

Le choix des techniques d'extraction a le plus souvent un grand impact sur la composition et la concentration des composés bioactifs obtenus à partir d'un large éventail de matières végétales (herbes, légumes, baies et fruits) (Smith, 2003). Il a été montré que différentes méthodes d'extraction conduisent à des rendements d'extraction différents sur le même matériel végétal (Gupta et *al.*, 2012). Par exemple, Lisitsyn et *al.*, (2006) ont étudié les extraits de plantes (romarin, poivre noir, thym et sauge) obtenus par l'utilisation de l'extraction au CO₂ supercritique. Grâce à cette méthode d'extraction, ils ont produit des extraits avec une composition significativement différente par rapport à ceux obtenus de manière traditionnelle. C'est dans le même contexte que Lombardo et *al.*, (2010) ont démontré que les composés bioactifs présents dans un matériel biologique et notamment les polyphénols, peuvent varier lors des étapes du traitement et en fonction des procédures technologiques utilisées pour leur extraction.

Il convient également de rappeler que la capacité antioxydante change non seulement avec les techniques d'extraction mais varie selon la période de croissance des tissus végétaux choisis et les méthodes de séchage et aussi entre les parties de la plante. L'influence de ces facteurs a été confirmée par une analyse multivariée réalisée par Buitrago et *al.*, en 2019.

3-9. Caractérisation phytochimiques des extraits de feuilles d'ortie et des champignons endophytes la colonisant

L'analyse LC/MS nous a permis d'identifier un total de 36 composés dans les différents extraits étudiés. Les composés identifiés ont été globalement divisés en quatre classes à savoir les phenylpropanoïdes, les acides phénoliques, les phénols et les flavonoïdes. Ainsi, les phénylpropanoïdes étaient soit de l'acide cinnamique et ses dérivés (acide cinnamique, acide di-hydroxy cinnamique, acide n-hydroxy cinamique, acide trans-cinnamique, acide-2,3

dimethyl hydroxy cinnamique, acide caféique, acide cinnapique, acide rosmarinique) soit des coumarines. Les acides phénoliques retrouvés étaient principalement l'acide vanillique, l'acide tannique, l'acide syringique, l'acide para-hydroxy benzoïque, l'acide resorcylique, l'acide gallique, l'acide isovanillique, l'acide m-anisique et l'acide 3,4,5 triméthoxy benzoïque. Nous avons constaté que seuls les extraits aqueux contenaient les acides dihydroxy cinnamique et gallique. La vanilline et le catechol (1.2-dihydroxy-Benzene) étaient les seuls phénols répertoriés dans tous les extraits.

Le profil polyphénolique établi a montré la présence de flavonoïdes sous les formes glycoside et aglycone. Les flavonoïdes aglycones étaient principalement la quercétine, la catechine, l'apigénine, la myricétine et l'orientine. L'naringinine-7-Glucoside et l'apigénine-7-Glucoside étaient les flavonoïdes retrouvés sous la forme glycoside. Le kampherol et la vitixine ont été uniquement détectés dans les extraits aqueux. L'analyse a aussi révélé la présence d'autres composés organiques comme la vitamine C (acide ascorbique), la caféine, l'hydroxy quinone et le resorcinol (tableaux XVIII et XIX, annexe 2).

Lors de l'étude des profils chromatographiques, nous avons constaté que les extraits de feuilles d'ortie étaient moins diversifiés en composés phénoliques que les extraits fongiques, d'autant plus que lors du dosage des polyphénols totaux, tous les champignons ont montré presque la même quantité de composés phénoliques que les feuilles d'ortie (figure 21). Ceci pourrait être expliqué par la faible diversité des étalons utilisés lors de cette étude, à cet effet, plusieurs pics bien résolus n'ont pas pu être identifiés (annexe 2). Comme on pourrait également envisager que certains composés étaient tout simplement présents à des niveaux inférieurs à la limite de détection de la technique utilisée lors de cette étude.

Au cours de cette analyse, on a relevé une certaine similitude dans la composition phénolique des feuilles d'*Urtica dioica* avec les résultats obtenus dans de précédentes investigations, toutefois avec quelques différences constatées. Ainsi, la présence de l'acide para hydroxy benzoïque, caféique, cinnamique, gallique ainsi que la catéchine a été déjà rapporté par Orcic et *al.*, en 2014.

Tableau XVIII : Composés phénoliques identifiés par LC/MS dans les extraits à l'acétate d'éthyles des champignons endophytes et des feuilles d'ortie.

Composés phénoliques	Ortie		<i>Altenaria alternata</i>		<i>Alernaria sorghi</i>		<i>Alternaria tenuissima</i>	
	Tr (mn)	% aires	Tr (mn)	% aires	Tr (mn)	% aires	Tr (mn)	% aires
1.2-dihydroxy-Benzene	-	-	6.317	1.5928	6.455	1.4918	6.308	3.2255
Acide 3,4,5 trimrthoxy Benzoïque	-	-	-	-	11.183	1.3256	-	-
Acide Ascorbique	2.077	8.5140	2.083	3.9662	1.985	6.9294	2.080	8.1473
Acide Caféique	-	-	7.468	3.0447	-	-	7.460	42.1064
Acide Cinnamique	13.713	6.4766	13.767	2.8121	-	-	-	-
Acide Cinnapique	-	-	8.533	5.8705	-	-	-	-
Acide di-hydroxyCinnamique	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide Gallique	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide Isovanillique	-	-	7.467	6.4727	7.540	3.2596	7.466	30.4290
Acide m-Anisique	-	-	11.264	13.6557	11.608	13.6210	-	-
Acide n-HydroxyCinamique	-	-	8.651	7.9316	-	-	8.410	19.0400
Acide para-Hydroxy Benzoïque	6.339	3.3756	-	-	6.170	1.3421	6.316	2.1727
Acide Resorcylique	-	-	-	-	6.453	0.7996	6.007	2.1072
Acide Rosmarinique	-	-	13.764	3.8468	-	-	-	-
Acide Syringique	-	-	7.468	2.3477	7.250	4.0841	7.460	18.9605
Acide Tannique	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide- trans Cinnamique	-	-	14.295	37.9122	-	-	15.277	4.4329
Acide Vanillique	-	-	-	-	7.247	5.9613	-	-
Acide-2,3 dimethylHydroxyCinnamique	-	-	14.295	42.1045	-	-	-	-
Apigénine	-	-	14.295	88.2472	14.301	42.0680	-	-
Apigénine-7-Glucoside	-	-	10.367	1.4259	-	-	-	-
Cafeine	-	-	-	-	-	-	6.695	4.9639
Catechine	6.080	0.2810	5.595	0.8590	6.053	0.7028	6.167	0.1231

Résultats et discussion

Coumarine	-	-	11.270	2.4327	11.876	2.3945	-	-
Hesperidine	-	-	-	-	-	-	15.279	2.5484
Hydroxy Quinone	-	-	4.213	1.4182	4.213	2.5122	-	-
Kampherol	-	-	-	-	-	-	-	-
Myricetine	-	-	11.258	4.8489	-	-	-	-
Naringinine-7-Glucoside	-	-	-	-	11.182	1.2942	-	-
Orientine	-	-	-	-	-	-	-	-
para Hydroxy Benzaldehyde	-	-	-	-	7.484	2.9183	-	-
Quercetine	-	-	13.374	2.3049	-	-	-	-
Resorcinol	-	-	-	-	5.002	3.0863	6.005	6.5097
Vanilline	-	-	-	-	8.289	2.1768	8.410	5.7753
Vitexine	-	-	-	-	-	-	-	-
Vitexine-2-O-Rhamnoside	-	-	8.650	0.9605	-	-	-	-

Tableau XIX : Composés phénoliques identifiés par LC/MS dans les extraits aqueux des champignons endophytes et des feuilles d'ortie.

Composés phénoliques	Ortie		<i>Altenaria alternata</i>		<i>Alernaria sorghi</i>		<i>Alternaria tenuissima</i>	
	Tr (mn)	% aires	Tr (mn)	% aires	Tr (mn)	% aires	Tr (mn)	% aires
1.2-dihydroxy-Benzene	6.321	0.6624	-	-	6.450	0.6128	6.321	3.2255
Acide 3,4,5 trimrthoxy Benzoïque	-	-	-	-	11.598	6.5980	-	-
Acide Ascorbique	-	-	-	-	-	-	1.988	8.1473
Acide Caféique	7.140	1.6364	-	-	7.459	49.9897	7.466	42.1064
Acide Cinnamique	13.715	2.1591	-	-	-	-	-	-
Acide Cinnapique	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide di-hydroxyCinnamique	7.142	0.6532	-	-	-	-	-	-
Acide Gallique	3.017	1.4535	3.032	2.8473	3.029	2.2676	2.999	1.9558
Acide Iovanillique	-	-	7.467	2.1296	7.459	26.5512	7.466	30.4290

Résultats et discussion

Acide m-Anisique	-	-	-	-	11.598	3.1507	-	-
Acide n-HydroxyCinamique	8.709	1.1182	-	-	-	-	8.422	19.0400
Acide para-Hydroxy Benzoique	6.321	1.6229	-	-	-	-	6341	2.1727
Acide Resorcylique	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide Rosmarinique	13.714	1.5350	-	-	-	-	-	-
Acide Syringique	-	-	7.301	2.9120	7.249	2.4893	7.466	18.9605
Acide Tannique	4.144	2.5561	-	-	4.092	0.9430	-	-
Acide- trans Cinnamique	-	-	14.301	16.3405	-	-	-	-
Acide Vanillique	-	-	7.298	4.8005	7.241	3.0307	-	-
Acide-2,3 dimethylHydroxyCinnamique	-	-	14.301	8.2631	-	-	-	-
Apigénine	-	-	14.301	74.2297	14.293	38.3116	-	-
Apigénine-7-Glucoside	-	-	-	-	-	-	-	-
Cafeine	-	-	-	-	6.754	1.9057	6.167	4.9639
Catechine	-	-	-	-	6.158	0.4917	6.167	0.1231
Coumarine	-	-	-	-	-	-	-	-
Hesperidine	-	-	-	-	-	-	15.286	2.5484
Hydroxy Quinone	3.775	1.0301	4.215	6.8207	3.997	1.3123	4.214	4.4087
Kampherol	-	-	14.149	7.8884	-	-	-	-
Myricétine	-	-	-	-	-	-	-	-
Naringinine-7-Glucoside	-	-	-	-	-	-	-	-
Orientine	8.109	4.2399	-	-	-	-	-	-
para Hydroxy Benzaldehyde	-	-	-	-	7.459	24.3354	7.689	2.7914
Quercétine	-	-	-	-	-	-	-	-
Resorcinol	-	-	-	-	5.070	1.3832	-	-
Vanilline	-	-	-	-	8.651	1.5649	8.422	5.7753
Vitixine	-	-	-	-	6.760	0.4917	-	-
Vitexine-2-O-Rhamnoside	-	-	-	-	-	-	-	-

Cependant, il convient de noter que les études précédentes (Pinelli et *al.*, 2008 ; Farag et *al.*, 2013 ; Orcic' et *al.*, 2014 ; Carvalho et *al.*, 2017 ; Grauso et *al.*, 2020) n'ont pas fait mention de la présence de l'orientine ainsi que des acide tannique et rosmarique identifiés au cours de cette analyse. De plus, les résultats obtenus par Pinelli et *al.*, (2008) ont détecté la présence de l'acide 5-O-caféoylquinique et de la rutine. Kavtaradze et *al.*, (2001) ont identifié l'acide caféoïque, la rutine, la quercétine et l'isoquercitrine. Otles et Yalcin, (2012) ont également signalé la rutine, l'acide caféique et l'acide chlorogénique comme composants majeurs, mais aussi l'isorhamnétine, la naringine, l'acide syringique et vanillique. Grevsen et *al.*, (2008) ont également identifié plusieurs acides phénoliques et dérivés (acides 3-O- et 5-O-caféoylquiniques, acide 5-O-féruoylquinique et acide 2-O-caféoylmalique) et plusieurs flavonoïdes (glucoside, diglucoside et rutinoside de la quercétine, ainsi comme les rutinosides du kaempférol et de l'isorhamnétine). Cependant, aucun de ces composés n'a pu être détecté lors de cette étude.

Il est très courant de retrouver des profils polyphénoliques différents pour la même plante. Généralement, la composition phénolique des plantes est affectée par différents facteurs, notamment la variété, le génotype, le climat, le sol, le stade végétatif de la plante, le moment de la récolte, le stockage, la transformation et le traitement (Angela et Meireles, 2009 ; Marrelli et *al.*, 2012). Par exemple, l'influence des techniques d'extraction a été mise en évidence par Đurovic et *al.*, (2017) qui ont montré qu'après extraction au Soxhlet, les acides syringique, cinnamique et protocatéchuique ont été détectés dans les produits, ce qui n'était pas le cas avec l'extrait aux ultrasons. En revanche, les acides férulique, caféique, chlorogénique et sinapique n'ont été détectés qu'après extraction assistée par ultrasons (Đurovic et *al.*, 2017).

Lors de l'étude des profils polyphénoliques des champignons endophytes, nous avons constaté que certaines molécules (acide ascorbique, acide caféique, acide cinnamique, acide gallique, acide rosmarinic, acide tannique, catéchine et l'hydroxy quinone) étaient à la fois synthétisées par la plante et aussi par un ou plusieurs de ses champignons endophytes.

La similitude des composés produits par les endophytes fongiques et leur hôte a déjà été rapportée. Par exemple, le taxol, célèbre composé anticancéreux isolé de l'écorce de l'if du Pacifique, a également été obtenu *in-vitro* à partir de son endophyte fongique *Taxomyces andreanae* (Stierle et *al.*, 1993). L'acide chlorogénique (acide 5-O-caféoylquinique, 1) est le principal composé phénolique de plusieurs plantes médicinales, qui a montré des propriétés antioxydantes. Il a été trouvé à la fois dans la culture AiL1, un champignon endophyte, et également dans l'extrait de la plante hôte *Artemisia indica* (Huang et *al.*, 2007). L'insecticide

azadirachtine est produit à la fois par le spermatophyte *Azadirachta indica* et par ses endophytes associés (Kusari et *al.*, 2012).

Plusieurs études ont montré que les champignons endophytes présentent généralement une relation mutualiste avec leurs plantes hôtes pour des besoins nutritionnels. Cette symbiose entre les endophytes et les plantes est un facteur déclencheur dans la production de métabolites secondaires par les endophytes (Bacon et white, 2000). La production par les champignons endophytes de composés spécifiques à la plante et qui lui sont bénéfiques témoigne de l'extrême adaptation chimique de ces champignons avec leur plante hôte.

Certaines études ont établi que la recombinaison génétique du champignon endophyte avec l'hôte serait la raison explicative que certains endophytes produisent les mêmes composés bioactifs que leurs plantes hôtes (Stierle et *al.*, 1993 ; Tan et Zou, 2001). Des études de biologie moléculaire sur *Pestalotiopsis microspora*, un champignon endophyte du *taxus wallichiana*, ont montré que certains des gènes de la plante hôte ont pu être acquis, exprimés et répliqués par les endophytes (Long et *al.*, 1998). Ce partage biosynthétique ainsi que l'échange de matériel génétique entre la plante et les champignons semblent être acquis au cours de la coévolution à long terme (Stierle et *al.*, 1993 ; Newman et Cragg, 2012).

Lors de cette analyse, nous avons également observé que plusieurs molécules (acide cinnapic, acide isovanillic, acide m-anisic, acid resorcylic, acide syringic, acide vanillique, apigénine, apigénine-7-glucoside, caféine, coumarin, hesperidine, kampherol, myricétine, naringinine-7-glucoside, quercétine, resorcinol, vanilline, vitixine, vitexine-2-O-rhamnoside) étaient uniquement retrouvées chez les champignons endophytes et n'étaient pas répertoriées chez la plante hôte.

Il est clair que les plantes hôtes ont une réelle influence sur le métabolisme secondaire des champignons endophytes qui les colonisent (Aly et *al.*, 2013), cependant, plusieurs études ont révélé la capacité des champignons endophytes à synthétiser de nouvelles molécules, différentes de celles produites par leur hôte (Griffin et Chu, 1983 ; Aly et *al.*, 2008 ; Quinet *al.*, 2019). Ainsi, les champignons endophytes d'espèce *Alternaria* ont produit de nouveaux métabolites secondaires qui n'ont pas été signalés chez leur plante hôte. Le métabolite le plus répandu est l'alternariol qui a été isolé de quelques champignons du genre *Alternaria* (Griffin et Chu, 1983 ; Aly et *al.*, 2008 ; Quinet *al.*, 2019). D'autres nouveaux métabolites ont également été retrouvés chez le champignon endophyte *Alternaria sp.*, isolé de la plante de mangrove *Sonneratia alba*, notamment, l'acide xanalterique I et II, altenuene ainsi que l'altenusin qui a présenté une activité antimicrobienne contre plusieurs souches de bactéries multi résistantes et des champignons (Kjer et *al.*, 2009).

Certaines études ont également abordé la capacité des champignons endophyte à décomposer certains métabolites, ils peuvent ainsi affecter la composition en métabolites secondaires des plantes médicinales, par biotransformation. Par exemple, les champignons endophytes *Flavobacterium sp.* GE 32 et *Arthrite sp.* GE 17-18 isolés de *Panax ginseng* peuvent transformer le ginsenoside Rb1 qui a une faible biodisponibilité en ginsenoside Rg3 et C-K qui ont une biodisponibilité plus élevée, ces produits ont été impliqués dans plusieurs avantages pour la santé humaine (Fu et al., 2016 ; Fu, 2019).

De plus, des études ont montré que certains endophytes présentent une préférence d'hôte (Petrini et al., 1992) et une spécificité tissulaire (Luginbuhl et Müller, 1980). Comme il a été démontré que la composition de la communauté d'endophytes diffère significativement entre les différentes zones géographiques (Vaz et al., 2018), et qu'il existe une hétérogénéité spatiale (Carroll, 1995) ainsi que des variations saisonnières (Rodrigues, 1994). Ce qui joue un rôle de sélection des souches endophytes les mieux adaptées aux conditions environnementales. Ces variations écologiques ou saisonnières régulent et affectent la biosynthèse des métabolites secondaires des champignons endophytes (Panaccione et al., 2014).

Lors de cette étude, les résultats des activités antioxydantes et antibactériennes ont révélé un potentiel biologique important des différents extraits étudiés, qui pourrait en partie être attribué à leur richesse en composés phénoliques. Il est désormais clair que les composés phénoliques sont une classe de composés biologiquement significative. Ils possèdent un large éventail d'activités biologiques, puisqu'ils sont considérés comme antioxydants, antimicrobiens, chélateurs des métaux et piègeurs des radicaux, comme ils peuvent également protéger les molécules biologiques contre l'oxydation (Sato et al., 1996 ; Villano et al., 2005).

Au cours de cette étude, l'activité antiradicalaire la plus importante a été obtenue par les extraits à l'acétate d'éthyle. Les feuilles d'ortie, *Alternaria sorghi* et *Alternaria tenuissima* ont présenté la plus grande activité antioxydante avec des valeurs de piégeage des radicaux libres de DPPH de $94,87 \pm 1.48$ % et $96,88 \pm 1.15$ % et $87,98 \pm 0.64$ % respectivement (figure 23). Tandis que les extraits aqueux ont montré le potentiel réducteur le plus élevé avec $3,12 \pm 0.023$ pour les feuilles d'*U. dioica* ainsi que $2,57 \pm 0.025$ et $2,17 \pm 0.037$ pour *Alternaria sorghi* et *Alternaria tenuissima* (figure 24). Les profils phénoliques obtenus (tableaux XVII et XVIII) montrent une certaine divergence dans la composition de ces extraits. Cependant, il est extrêmement difficile d'établir un lien entre les profils obtenus et l'activité antioxydante de ces extraits. De plus, ce n'est pas évident de fournir un ordre de classement de la capacité antioxydante des composés phénoliques obtenus, en se basant uniquement sur les résultats

présentés, d'autres investigations sont nécessaires afin de parvenir à mettre une relation entre l'activité antioxydante de chaque extrait et son profil phénolique.

Il est évident que l'activité antioxydante est en fonction de la structure moléculaire de chaque composé phénolique ainsi que sa concentration dans ces extraits. L'activité antioxydante des composés phénoliques est attribuée à la capacité de piéger les radicaux libres, de donner des atomes d'hydrogène, des électrons ou des cations métalliques chélatés. Les structures moléculaires, en particulier le nombre et les positions des groupes hydroxyles et la nature des substitutions sur les cycles aromatiques, confèrent aux composés phénoliques la capacité d'inactiver les radicaux libres (Afanas'ev et *al.*, 1989). Par exemple, Rice-Evans et *al.*, (1996) ont rapporté que la double liaison du groupe fonctionnel oxo ($-C=O$) de certains flavonoïdes, confèrent à ces composés leur forte activité antioxydante. Ainsi, la quercétine et la catéchine sont deux composés qui partagent un nombre similaire de groupes hydroxyle, aux mêmes positions, cependant, la quercétine contient également une double liaison 2,3 dans le cycle C et la fonction 4-oxo. L'avantage de cette structure est une amélioration de la capacité antioxydante de plus de 50%, par rapport à la structure hétérocyclique saturée de la catéchine.

D'une manière générale, tous les extraits ont montré une activité antibactérienne intéressante contre les bactéries testées à savoir : des bactéries à Gram négative : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 4352 et *Citobacter freundii* ATCC 8090 et des bactéries à Gram positive dont des souches SARM de références ou isolées à partir du lait cru ou acidifié (tableaux XIV et XV, figures 18 et 19).

En plus de leur activité antioxydante établie, de nombreux composés phénoliques peuvent présenter une activité antibactérienne significative. Des auteurs ont expliqué cette activité par la modification de la perméabilité des membranes cellulaires, les modifications de diverses fonctions intracellulaires induites par la liaison hydrogène des composés phénoliques aux enzymes ou par la modification de la rigidité de la paroi cellulaire avec des pertes d'intégrité dues aux différentes interactions avec la membrane cellulaire. (Stapleton et *al.*, 2004 ; Taguri et *al.*, 2006 ; Cushnie et Lamb, 2011). L'augmentation du caractère lipophile des composés phénoliques renforcent aussi leur activité antimicrobienne en favorisant leur interaction avec la membrane cellulaire (Sikkema et *al.*, 1995). Par exemple, les phénylpropanoïdes peuvent induire des dommages au niveau de la membrane cellulaire et même inactiver le métabolisme en se liant aux enzymes (Ya et *al.*, 1988 ; Chung et *al.*, 1998) tandis qu'il a été démontré que les acides phénoliques perturbent l'intégrité de la membrane, car ils provoquent une fuite conséquente d'éléments intracellulaires essentiels (Borges et *al.*,

2013). Les flavonoïdes peuvent agir en inhibant à la fois le métabolisme énergétique et la synthèse de l'ADN affectant les synthèses de protéines et d'ARN (Haraguchi et *al.*, 1998).

Il est clair que de la même manière que pour l'activité antioxydante, la structure des composés phénolique influence énormément le mode d'action de ces composés et par la même occasion leur activité antibactérienne (Griffin et *al.*, 2005 ; Oyedemi et *al.*, 2009). Ce qui pourrait expliquer que certains extraits ont montré de meilleures activités contre certaines souches bactériennes que d'autres. Nous avons ainsi recensé la plus forte activité antibactérienne avec l'extrait aqueux des feuilles d'*U. dioica* qui a présenté des zones d'inhibition maximales de 15,5 mm contre la souche SARM *S. aureus* MU50 et de 14 mm contre la souche *S. aureus* S.95 isolée à partir de lait acidifié. Comme nous avons constaté que l'extrait d'*Alternaria sorghi* a présenté l'activité antimicrobienne la plus forte par rapport aux autres champignons endophyte (tableaux XIV et XV, figures 18 et 19).

Nos résultats ont montré que les bactéries à Gram positives étaient plus sensibles aux extraits que les bactéries à Gram négatives. La différence de sensibilité aux polyphénols entre les bactéries à Gram-positives et à Gram-négatives a déjà été rapportée par Inouye et *al.*, (2001). Ces auteurs ont conclu que l'effet antibactérien des polyphénols était généralement plus efficace contre les bactéries Gram-positives que contre les Gram-négatives. Ils ont indiqué que les bactéries Gram-négatives sont plus résistantes aux métabolites secondaires des plantes, y compris les composés phénoliques, en raison de la paroi cellulaire qu'elles possèdent liée à une membrane externe complexe, qui ralentit le passage des produits chimiques (Inouye et *al.*, 2001).

Nos résultats ont également montré que la souche *E.coli* ATCC 25922 s'est révélée résistante à l'extrait aqueux des feuilles d'*Urtica dioica* et que l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'ortie était sans activité contre *K. pneumonia* ATCC 4352 (tableaux XIV et XV, figures 18 et 19). La résistance de ces souches aux extraits étudiés ne serait pas due uniquement à l'imperméabilité de la membrane externe de ces espèces à Gram négatif, mais également à une synergie de cette perméabilité limitée aux polyphénols avec des pompes à efflux multidrogues codées chromosomiquement (Poole, 2001). De plus, la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est connue pour être dose-dépendante mais également souche-dépendante (Rawat et *al.*, 2016 ; Dantas Silva et *al.*, 2017 ; Ouerghemmi et *al.*, 2017).

Au cours de cette analyse, on a également relaté une activité antibactérienne assez considérable pour les extraits étudiés contre les souches MRSA de références ou isolées à partir du lait cru ou acidifié. Alves et *al.*, (2012) ont montré que les composés phénoliques

Résultats et discussion

inhibent plus les SARM que les *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline. Ils ont montré que le SARM a été inhibé par les acides 2,4 dihydroxybenzoïque, vanillique et syringique, alors que ces composés aux mêmes concentrations n'avaient aucun effet inhibiteur contre les *Staphylococcus aureus* sensibles à méthicilline. Les acides vanillique et syringique ont été répertoriés chez plusieurs des extraits étudiés dans cette présente analyse (tableaux XVII et XVIII).

Comme d'autres auteurs l'ont signalé avant nous, nos résultats reflètent la complexité des phénomènes impliqués dans les activités antioxydante et antimicrobienne. Il est important de garder à l'esprit qu'en plus des composés phénoliques, d'autres composés pourraient également avoir contribué à ces activités (Ćetković et *al.*, 2007). De plus, d'autres recherches seraient appropriées pour expliquer la relation entre les profils polyphénoliques de ces extraits et leurs activités biologiques.



Conclusion

Conclusion

Conclusion

La présente étude s'est intéressée à l'isolement et à l'identification des différents champignons endophytes associés à la Grande ortie (*Urtica dioica*) et l'évaluation de certaines activités biologiques des extraits aqueux et à l'acétate d'éthyle des feuilles d'ortie et de ses champignons endophytes ainsi que l'élaboration d'une éventuelle corrélation entre la présence des champignons endophytes et la synthèse de métabolites secondaires par leur hôte.

Durant cette étude, une évaluation de la diversité des champignons endophytes des feuilles d'*Urtica dioica* a été réalisée. Un total de 144 isolats a été obtenu, ce qui a représenté un pourcentage de colonisation de 18%. Les champignons endophytes étaient abondants et diversifiés dans les feuilles d'*Urtica dioica*. Nous avons choisi de travailler uniquement avec trois champignons endophytes, sélectionnés en se basant sur leur abondance. Les isolats choisis ont fait l'objet d'une identification moléculaire sur la base du séquençage des régions ITS. Les séquences ITS de ces isolats ont été comparées par blast dans GenBank. L'analyse a révélé que les isolats appartiennent tous au genre *Alternaria* et ont été identifiés comme étant : *Alternaria sorghi*, *Alternaria tenuissima* et *Alternaria alternata* avec un pourcentage de similitude supérieur à 99%. Les séquences ont été soumises à la GenBank sous les codes d'accès suivants MK880626, MK880625 et MK880627.

Lors de ce travail, on a entrepris l'étude de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et à l'acétate d'éthyle des feuilles d'*Urtica dioica* et de ses trois champignons endophytes. L'étude a révélé que pratiquement tous les extraits présentaient des zones d'inhibitions assez remarquables contre la majorité des bactéries étudiées, elles restent toutefois moindres par rapport à celles obtenues par le contrôle positif à savoir le chloramphénicol. L'impureté et la complexité des extraits bruts utilisés pourraient sans doute expliquer cette différence.

Au cours de cette analyse, on a également révélé une activité antibactérienne pour les extraits étudiés contre les souches MRSA de références ou isolées à partir du lait cru ou acidifié. Les résultats révèlent que l'extrait aqueux des feuilles d'ortie a une activité plus importante contre les souches *S. aureus* MU 50 et *S. aureus* S 95. De même que pour l'extrait aqueux d'*A. sorghi* avec une activité bactéricide contre les souches de *S. aureus* ATCC 43300. Ces résultats sont d'autant plus intéressants car les isolats cliniques de *S. aureus* surtout ceux résistant à la Methicilline demeurent un problème de santé publique à l'échelle mondiale.

La teneur en composés phénoliques et en thiols totaux des champignons endophytes et des feuilles d'*Urtica dioica* a été déterminée. Il est bien connu que les composés phénoliques

Conclusion

contribuent directement aux activités biologiques des végétaux en raison de leurs propriétés antioxydantes et le fait qu'ils peuvent potentiellement interagir avec les systèmes biologiques.

Nos résultats ont révélé que les feuilles d'ortie et les champignons endophytes sont une source importante de composés phénoliques et de thiols totaux. Nous avons ainsi estimé les taux les plus élevés dans les feuilles suivies par *A. sorghi*, *A. tenuissima* et *A. alternata*.

Nous nous sommes également intéressés aux enzymes de détoxification des ROS, notamment la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD). Nos résultats ont montré que pour les deux activités enzymatiques, les feuilles d'*Urtica dioica* sont celles qui ont exhibées la plus grande activité comparativement aux champignons endophytes. On ignore jusqu'à présent les mécanismes mis en relief par les champignons endophytes afin d'améliorer les systèmes de défense de la plante.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits aqueux et à l'acétate d'éthyles des endophytes d'*Alternaria* et de leur hôte a été entreprise. Nos résultats ont révélé que d'une manière générale tous les extraits étudiés possèdent une forte activité antioxydante. Le potentiel réducteur le plus élevé a été observé avec les extraits aqueux, alors que la plus grande activité de piégeage des radicaux libres du DPPH l'a été avec les extraits à l'acétate d'éthyle et particulièrement *A. sorghi* et les feuilles d'ortie.

L'analyse LC/MS a permis de révéler que les champignons endophytes ont la capacité de produire des composés phénoliques similaires à ceux produits par leur hôte. Fait intéressant, vu que la culture fongique est plus simple avec des processus de fermentations qui visent à améliorer efficacement la production du composé bioactif, capables d'être réalisés dans des conditions optimisées. Les champignons endophytes ont également la possibilité de synthétiser de nouveaux produits, non recensés dans les extraits de feuilles d'ortie analysés, ce qui les rend potentiellement intéressants pour la production de nouvelles substances bioactives.

Au cours de cette étude, *Alternaria sorghi* a montré les meilleures activités comparativement aux autres champignons isolés. En effet, il est fréquent, qu'une plante soit colonisée par des champignons appartenant au même genre ou à la même espèce et seulement un ou plusieurs biotypes d'un champignon donné produiront un composé biologiquement actif en culture. De plus, la production de certains composés bioactifs par l'endophyte peut faciliter la domination de sa niche biologique au sein de la plante ou même fournir une protection à la plante contre des agents pathogènes envahissants et nocifs. Cependant, il nous est difficile, avec les résultats annoncés, d'établir une corrélation entre les profils phénoliques obtenus et les activités biologiques des extraits étudiés.

Conclusion

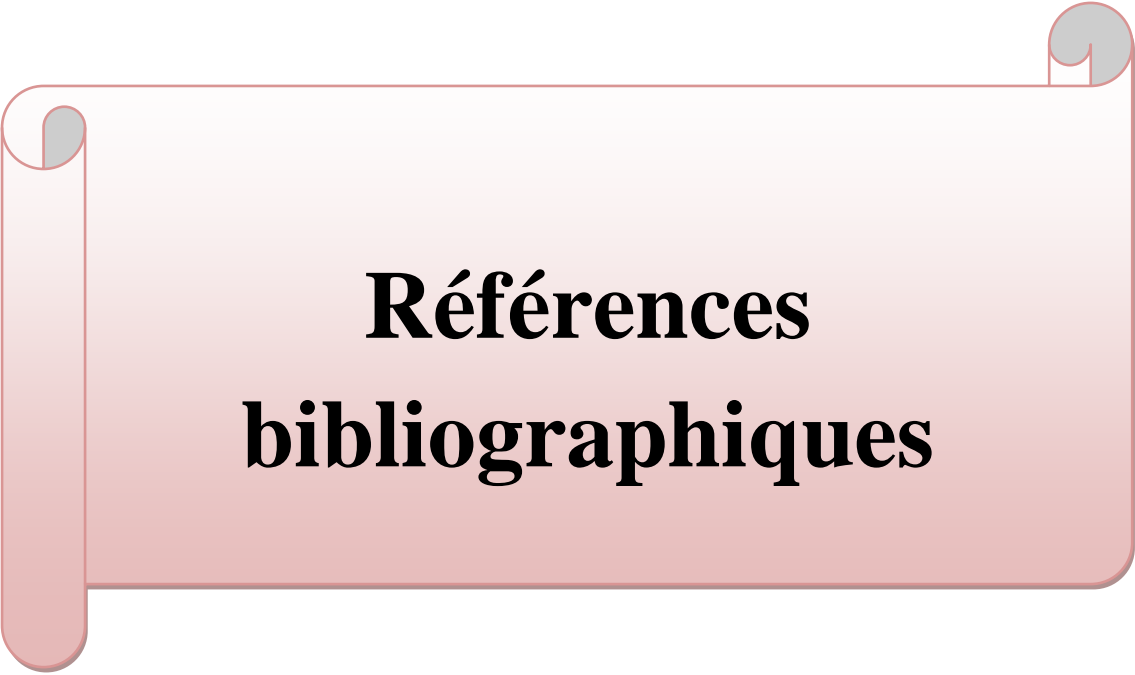
A la lumière de cette étude, on conclut qu'il existe plusieurs points d'ombres et une grande part d'incertitude dans cette quête de compréhension de la relation qui régit les champignons endophytes et leur plante hôte. Notre analyse comparative des métabolites produits par la plante hôte et ses champignons endophytes isolés a conduit à la découverte de certains composés phénoliques produits uniquement par les champignons endophytes. Il serait donc probable que certaines vertues médicinales de la plante (la grande ortie) proviennent en fait de leurs champignons endophytes. Idéalement, une plante de la même espèce, sans endophyte, devrait être utilisée comme témoin, mais une telle plante est difficile à avoir.

De plus, il semblerait que de nombreux facteurs changeant dans l'hôte, en fonction de la saison et d'autres facteurs comme l'âge, l'environnement et la localisation peuvent influencer la biologie de l'endophyte. Ainsi, les résultats annoncés dans cette étude ne sont valables que dans les dimensions et conditions de récolte utilisées.

On conclut également que la plante qui a exhibé les plus fortes activités doit être considérée comme un assemblage d'espèce entre le végétal et les microorganismes qui la colonisent.

En perspectives, il serait intéressant de poursuivre les recherches afin :

- ✓ d'effectuer des recherches plus poussées au niveau moléculaire afin d'élucider le mystère des interactions champignons endophytes – plante ;
- ✓ d'essayer de comprendre les synergies et les interactions qui peuvent exister entre les champignons endophytes et leur capacité à cohabiter ensemble dans la même plante ;
- ✓ d'étudier les interactions existantes entre les deux partenaires et découvrir le potentiel d'activités biologiques de ces champignons ;
- ✓ d'exploiter à l'échelle industrielle des composés à activités biologiques issus des champignons endophytes.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Afanas'ev I.B., Dcrozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A. et Potapovitch A.I. (1989). Chelating and freeradical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 38:1763–1769
- Ahangarpour A., Mohammadian M. et Dianat M. (2012). Antidiabetic effect of hydroalcoholic *Urtica dioica* leaf extract in male rats with fructose-induced insulin resistance. *Iran. J. Med. Sci.*, 37:181-6.
- Ait Haj Said A., Sbai El Otmani I., Derfoufi S. et Ben Moussa A. (2015). Highlights On Nutritional And Therapeutic Value Of Stinging Nettle (*Urtica Dioica*), *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 7 : 8-14.
- Akbay P., Basaran A.A., Undeger U. et Basaran N. (2003). *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica*. *Phytother. Res.*, 17: 34-7.
- Alguacil M.M., Hernandez J.A., Caravaca F., Portillo B., et Roldan A. (2003). Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi- arid soil. *Physiol. Plant*, 118: 562–570.
- Alizadeh F.M., Pirdashti H., Yaghoubian Y., Babaeizad V. (2016). Effect of paclobutrazol and *Piriformospora indica* inoculation on antioxidant enzymes activity and morphological characteristics of green beans (*Phaseoluse vulgaris* L.) in chilling stress (In Persian). *J. Plant. Process. Funct.*, 5: 133–146.
- Alloush G.A. (2004). Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium spp.* endophytes. *Plant Soil*, 267:1-12.
- Alves M.J., Ferreira I.C.F.R., Martins A. et Pintado M. (2012). Antimicrobial activity of wild mushrooms extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *J. Apl. Microbiol.*, 113: 466-475.
- Alvin K.I., Miller B.A. et Neilan B.A. (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol. Res.*, 169: 483–495.
- Al-Wasfi R.M., Jabaar Al-Kaabee H.J., Dergham M. et Hameed A.F. (2012). Studying the hypoglycemic and the antibacterial activity of various plant extract of *Urtica dioica*. *Al-kufa J. Biol.*, 4: 232-42.

Références bibliographiques

- Aly A.H., Debbab A. et Proksch P. (2013). Fungal endophytes – secret producers of bioactive plant metabolites. *Pharmazie*, 68:499-505.
- Aly A.H., Edrada-Ebel R., Indriani I.D., Wray V., Muller W.E.G., Totzke F., Zirrgiebel U., Schachtele C., Kubbutat M.H.G. et Lin W.H. (2008). Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria sp.* and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J. Nat. Prod.*, 71: 972–980.
- Angela M. et Meireles A. (2009). Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Anton R., Bernard M. et Wichtl M. (2003). Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Paris : Éd. Tech & Doc ; Cachan : Ed. Médicales internationales, p : 692.
- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I. et Özyurt D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12: 1496-1547.
- APG III, (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Biol. J. Linn. Soc.*, 161: 105–121.
- Arnold A.E. et Herre E. A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*, 95: 388-398.
- Arnold A.E. et Lutzoni F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecol.*, 88: 541-549.
- Arnold A.E., Maynard Z., Gilbert G.S., Coley P.D. et Kursar T.A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol. Lett.*, 3: 267-274.
- Asgher M., Khan M.I.R., Anjum N.A. et Khan N.A. (2015). Minimising toxicity of cadmium in plants-role of plant growth regulators. *Protoplasma*, 252: 399-413.
- Azevedo J.L. (1998). Microorganismos as endofíticos. In: Melo I.S., Azevedo J.L. (Eds.), *Ecologia Microbiana*. Editora Embrapa, Jaguariuna, Sao Paulo, p: 117–137.
- Azevedo J.L., Júnior W.M., Pereira J.O. et Araújo W.L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Eletron. J. Biotech.*, 3: 40- 65.
- Bacon C.W. et White J.F. (2000) *Microbial endophytes*. Ed. Marcel Dekker, New York, USA. p. 149.

Références bibliographiques

- Bagchi K. et Puri S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *EMHJ*, 4: 350–360.
- Ballio A., Bossa F., DiGioglio P., Ferranti P., Paci M., Pucci P., Scaloni A., Segre A. et Strobel G.A. (1994). Structure of the pseudomycins, new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas syringae* MSU 16H. *FEBS Lett.*, 355: 96-100.
- Balzarini J., Neyts J., Schols D., Hosoya M., Van Damme E. et Pneumans W. (1992). The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine) n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Res.*, 18:191-207.
- Balzarini J., Van Laethem K., Hatse S., Froeyen M., Peumans W. et Van Damme E. (2005). Carbohydrate-binding agents cause deletions of highly conserved glycosylation sites in HIV GP120: A new therapeutic concept to hit the achilles heel of HIV. *J. Biol. Chem.*, 280:41005-14.
- Bano A., Ullah F. et Nosheen A. (2012). Role of abscisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in wheat. *Plant Soil Environ.*, 58: 181–185.
- Barik B. P., Tayung K., Jagadev P. N. et Dutta S. K. (2010). Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *EJBS*, 2 : 8-16.
- Barlow R.B. et Dixon R.O.D. (1973). Choline acetyltransferase in the nettle *Urtica dioica* L. *Biochem. J.*, 132 :15–8.
- Barnett H.L. et Hunter B.B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi, 3ème Ed. Burgess Publishing, Minnesota.
- Baum S., Sieber T.N., Schwarze F.W.M.R. et Fink S. (2003). Latent infections of *Fomes fomentarius* in the xylem of European beech (*Fagus sylvatica*). *Mycol. Prog.*, 2: 141–148.
- Belanger F.C. (1996). A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. *Crop Sci.*, 36: 460–462.
- Berche P., Gaillard JL et Simonet M. (1991). Les bactéries des infections humaines. Ed. Flammarion, Médecine et Sciences. P. 660.
- Bernardi-Wenzel J., Garcia A., Rubin-Filho C.J., Prioli A.J. et Pamphile J. (2010). Evaluation of foliar fungal endophytes diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biol. Res.*, 43: 375–384

Références bibliographiques

- Bertrand B. (2002). Les secrets de l'ortie.- 7ème édition .Editions de Terran, Sengouagnet, p.128.
- Bertrand B. (2010). Les secrets de l'ortie. Ed. Terran. Sengouagnet, p.214.
- Bhuwan C.J, Minky M. et Ajudhia N.K. (2014). Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *Int. J. Green Pharm.*, 8:201-9.
- Bills G.F., Dombrowski A., Pelaez F., Polishook J. et AN Z. (2002). In: Watling R., Frankland J.C., Ainsworth A.M., Isaac S. et Robinson C.H. Ed. CABI publishing, New York, 2, p.165.
- Binz P.A. et Kagi J.H.R., (1999). Metallothionein: molecular evolution and classification. In: Klaassen C. (2000). Ed. Metallothionein IV. Birkhäuser Verlag, Basel, p. 7–13.
- Birkenbihl R.P., Liu S., et Somssich I.E. (2017). Transcriptional events defining plant immune responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 38: 1-9.
- Bischoff J.F et White J.F (2005) Evolutionary development of the Clavicipitaceae. *Mycol. Series*, 23 : 505.
- Bischoff H., Puls W., Karause H.P., Schutt H. et Thomas G. (1985). Pharmacological properties of the novel glucosidase inhibitors BAY m 1099 (miglitol) and BAY o 1248. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 1: 53–62.
- Błaszczuk L., Siwulski M., Sobieralski K., Lisiecka J., Jedryczka M. (2014). *Trichoderma spp*, application and prospects for use in organic farming and industry. *J. Plant Protec. Res.*, 54: 309-317.
- Bnouham M., Merhfour F.Z., Ziyat A., Mekhfi H., Aziz M. et Legssyer A. (2003). Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia*, 74:677-81.
- Bombardelli E., Morazzoni P., (1997). *Urtica dioica* L. *Fitoterapia*, 68:387–402.
- Bonito G., Reynolds H., Robeson M.S., Nelson J., Hodkinson B.P., Tuskan G., Schadt C.W. et Vilgalys R. (2014). Plant host and soil origin influence fungal and bacterial assemblages in the roots of woody plants. *Mol. Ecol.*, 23:3356–3370.
- Bonnet M., Camares O. et Veisseire P. (2000). Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *J. Exp. Bot.*, 51: 945-953.

Références bibliographiques

- Borges A., Ferreira C. et Saavedra M.J. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb. Drug Resist.*, 19: 256–265.
- Botineau M. (2010). Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. TEC and DOC. Lavoisier, Paris ; in : DRAGHI F. (2010). L'Ortie dioïque (*Urtica dioïca* L.) : Etude Bibliographique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université Henri Poincaré, Nancy, France.
- Boyle C., Gotz M., Dammann-Tugend U., et Schulz B. (2001). Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. *Symbiosis*, 31: 259–281.
- Brabant-Hamonic J. (2004). Tisanes et vieux remèdes. Édition Ouest-France. Page 24-56.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brakhage A. A., Schuemann J., Bergmann S., Scherlach K., Schroeckh V. et Hertweck C. (2008). Activation of fungal silent gene clusters: a new avenue to drug discovery. *Prog. Drug. Res.*, 66: 1–12.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. et Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28: 25-30.
- Brantner A. et Grein E. (1994). Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 44: 35-40.
- Bredeman, G. et Garber K. (1959). Die grosse Brennessel *Urtica dioica* L: Forschungen über ihren Anbau zur Fasergewinnung. Akademie Verlag, Berlin. p. 188-191.
- Brenner G. (2001). Pharmacology, 1^{ère} ed. Harcourt Health Science, San Diego. p. 98-105.
- Buitrago D., Buitrago-Villanueva I., Barbosa-Cornelio R. et Coy-Barrera E. (2019). Comparative examination of antioxidant capacity and fingerprinting of unfractionated extracts from different plant parts of Quinoa (*Chenopodium quinoa*) grown under greenhouse conditions. *Antioxidants*, 8: 238.
- Busi S., Ramakrishna G. et Mandava V.B.R. (2012). Biotransformation of (-)-a-santonin by *Aspergillus parasiticus* and antimicrobial efficacy of the transformed products. *Curr. Biotechnol.*, 1:194–198.
- Cameron D.D., Neal A.L., van Wees S.C. et Ton J. (2013). Mycorrhiza-induced resistance: More than the sum of its parts? *Trends Plant Sci.*, 18: 539–545.

Références bibliographiques

- Campos-Soriano L., García-Martínez J. et San Segundo B. (2012). The Arbuscular Mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Mol. Plant Pathol.*, 13: 579-592.
- Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Dai Y. et Wang X. (2009). Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Curr. Microbiol.*, 59: 584–592.
- Card S., Johnson L., Teasdale S. et Caradus J. (2016). Deciphering endophyte behaviour: The link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 92: 1–19.
- Carroll G. (1986). The biology of endophytism in plants with particular reference to woody plants. In: Fokkema N.J., van den Heuvel J., (1989). *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge (UK): Cambridge University Press. p. 205-222.
- Carroll G. (1995). Forest endophytes: Pattern and process. *Can. J. Bota.*, 73:S1316–S1324.
- Carroll G. et Petrini O. (1983). Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia*, 75: 53–63.
- Carroll F.E., Muller E. et Sutton B.C. (1977). Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. *Sydowia*, 29: 87–103.
- Carvalho A.R., Costa G., Figueirinha A., Liberal J., Prior J.A.V, Lopes M.C., Cruz M.T. et Batista M.T. (2017). *Urtica* spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Res. Int.*, 99:485-494.
- Castillo U., Harper J.K., Strobel G.A., Sears J., Alesi K., Ford E., Lin J., Hunter M., Maranta M., Ge H., Yaver D., Jensen J.B., Porter H., Robison R., Millar D., Hess W.M., Castillo U.F., Strobel G.A., Ford E.J., Hess W.M., Porter H., Jensen J.B., Albert H., Robison R., Condrón M.A., Teplow D.B., Stevens D. et Yaver D. (2002). Munumbicins, widespectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiol.*, 148: 2675-2685.
- Cecchini T. et Tecli T.B. (2008). *Plantes médicinales. Sur les presses de pollina. L48125A*. Ed 10223. Luçon. France. p. 228-234.
- Četković G.S., Čanadanović-Brunet J.M., Djilas S.M., Tumbas V.T., Markov S.L. et Cvetković D.D. (2007). Antioxidant potential, lipid peroxidation Inhibition and an-

Références bibliographiques

- timicrobial activities of *Satureja montana* L. subsp. *kitaibelii* extracts. *Int. J. Mol. Sci.*, 8: 1013–1027.
- Chaurasia N. et Wichtl M. (1986). Phenylpropanes and lignans from the roots of *Urtica dioica* L. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 126:1559–1563.
 - Chen M., Arato M., Borghi L., Nouri E. et Reinhardt D. (2018). Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi—From ecology to application. *Front. Plant Sci.*, 9: 1270-1277.
 - Chen S.L., Yu H., Luo H.M., Wu Q., Li C.F. et Steinmetz A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chin. Med.* 11: 37-48.
 - Chet I. et Inbar J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 48: 37-43.
 - Cheung L.M., Cheung P.C.K. et Ooi V.E.C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem.*, 81:249–255.
 - Chiboub M., Jebara S.H., Saadani O., Fatnassi I.C., Abdelkerim S. et Jebara M. (2018). Physiological responses and antioxidant enzyme changes in *Sulla coronaria* inoculated by cadmium resistant bacteria. *J. Plant Res.*, 131: 99–110.
 - Chrubasik J.E., Basil D.R., Wagner H. et Chrubasik S. (2007). A Comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* ., 14: 568-79.
 - Chung K.T., Lu Z. et Chou M.W. (1998). Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.* 36: 1053–1060.
 - Clemens S. et Simm C. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism. *New Phytologist*, 159: 323-330.
 - Clemens S., Palmgren M.G. et Krämer U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci*, 7: 309-315.
 - Clement S.L., Elberson L.R., Bosque-Pérez N.A. et Schotzko D.J. (2005). Detrimental and neutral effects of wild barley-*Neotyphodium* fungal endophyte associations on insect survival. *Entomol. Exp. Appl.*, 114: 119–125.
 - Cobbett C. et Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant.*, 53: 159-182.

Références bibliographiques

- Coley P.D. (1988). Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia*, 74: 531-536.
- Coley P.D. et Barone J.A. (1996). Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annu. Rev. Ecol.Syst.*, 27: 305–335.
- Collier H.O.J et Chesher G.B. (1956). Identification of 5-hydroxytryptamine in the sting of the nettle (*Urtica dioica*). *Brit. J. Pharmacol.*, 11:186–9.
- Cookson M.R. et Shaw P.J. (1999). Oxidative stress and motor neurone disease. *Brain Pathol.*, 9: 165–186.
- Costa J.M. et Loper J.E. (1994). Characterization of siderophore production by the biological-control agent *Enterobacter cloacae*. *Mol. Plant Microbe Interact. J.*, 7: 440–448.
- Cragg G.M. et Snader K.M. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.*, 100: 72–79.
- Cushnie T.T. et Lamb A.J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 38:99–107.
- Czarnetzki B.M., Thiele T. et Rosenbach T. (1990). Immunoreactive leukotrienes in nettle plants (*Urtica urens*). *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 91: 43–6.
- D’Amico M., Frisullo S. et Cirulli M. (2008). Endophytic fungi occurring in fennel, lettuce, chicory, and celery-commercial crops in southern Italy. *Mycol. Res.*, 112: 100–107.
- Daher C.F., Baroody K.G. et Baroody G.M. (2006). Effect of *Urtica dioica* extract intake upon blood lipid profile in the rats, *Fitoterapia*, 77: 183-8.
- Dai C.C., Yu B.Y., Xu Z.L. et Yuan S. (2003). Effect of environmental factors on growth and fatty acid composition of five endophytic fungi from *Sapium sebiferum*. *J. Appl. Ecol.*, 14: 1525–1528.
- Daisy B.H., Strobel G.A., Castillo U., Ezra D., Sears J., Weaver D. et Runyon J.B. (2002). *Naphthalene*, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiol.*, 148: 3737-3741.
- Dantas Silva R.P., Machado B.A., Barreto, G.A., Costa S.S., Andrade L.N. et Amaral R.G. (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS ONE*, 12: e0172585.

Références bibliographiques

- Dar S.A., Yousuf A.R., Ganai F.A., Sharma P., Kumar N. et Singh R. (2012). Bioessay guided isolation and identification of anti-inflammatory and antimicrobial compounds from *Urtica dioica* L. (Urticaceae) leaves. *Afr. J. Biotechnol.*, 11: 12910-12920.
- Davì G., Falco A. et Patrono C. (2005). Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid. Redox Signal*, 7: 256–268.
- Davis E.C., Franklin J.B., Shaw A.J. et Vilgalys R. (2003). Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *Ame. J. Bot.* 90: 1661-1667.
- De Leo P., Miceli A., Antonaci C. et Vigna G. (1993). Characterisation and enzymatic hydrolysis of nettle (*Urtica dioica* L) deproteinated biomass. *J. Sci. Food Agric.* 63: 391–395.
- De Meyer G., Bigirimana J., Elad Y. et Hofte M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 279-86.
- Deketelaere S., Tyvaert L., França S.C. et Hofte M. (2017). Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Front. Microbiol.* 8: 1-18.
- Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J.P., Tognolini M., Borges G. et Crozier A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal*, 18: 1818–1892.
- Demain A.L. (1981). *Ind. Microbiol.Sci.*, 214: 987-994.
- Deshmukh S., Huckelhoven R., Schafer P., Imani J., Sharma M., Weiss M., Waller F. et Kogel K.H. (2006). The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103:18450–18457.
- Devaraju R. et Satish S. (2011). Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian J. Exp. Sci.*, 2: 75-79.
- Di Maro A., Pacifico S., Fiorentino A., Galasso S., Gallicchio M., Guida V., Severino V., Monaco P. et Parente A. (2013). Raviscanina wild asparagus (*Asparagus acutifolius* L.): A nutritionally valuable crop with antioxidant and antiproliferative properties. *Food Res. Int.*, 53: 180–188.
- Dizaye K., Alberzingi B. et Sulaiman S. (2013). Renal and vascular studies of aqueous extract of *Urtica dioica* in rats and rabbits. *Iraq J. Vet. Sci.*, 27: 25-31.

Références bibliographiques

- Donayre D.K.M et Dalisay T.U. (2016). Identities, characteristics, and assemblages of dematiaceous-endophytic fungi isolated from tissues of barnyard grass weed. *Philipp. J. Sci.*, 145: 153–164.
- Dreyer J. et Müssing J. (2000). New horizons in natural fiber production: retting hemp and nettle with enzymes. In: Proceeding of 3rd International Symposium Biore-source Hemp and Other Fibre Plants, Wolfsburg, Germany. p. 13–16.
- Dreyfuss M. et Chapela I.H. (1994). Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: Gullo, V.P., (Ed.). The discovery of natural products with therapeutic potential. Butterworth-Heinemann, London, UK. p. 49–80.
- Duh P.D., Tu Y.Y. et Yen G.C. (1999). Antioxydant activity of water extract of harnng jjur (*Chrysantemu mirifolium* Ramat). *Lebensm. Wiss. Technol.*, 32: 269-277.
- Duong L.M., Jeewon R., Lumyong S. et Hyde K.D. (2006). DGGE coupled with ribosomal DNA phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes on living leaves of *Magnolia liliifera*. *Fungal Diversity*, 23: 121–138.
- Durak I., Biri H., Devrim E., Sozen S. et Avci A. (2004). Aqueous extract of *Urtica dioica* makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 3:855–7.
- Durán E.L., Ploper L.D., Ramallo J.C., Grandi R.A.P., Giancoli A.C.H. et Azevedo J.L. (2005). The foliar fungal endophytes of *Citrus limonin* Argentina. *Can. J. Bot.*, 83: 350-355.
- Đurovic S., Pavlić B., Šorgić S., Popov S., Savić S., Pertoničević M., Radojkovic M., Cvetanović A. et Zeković Z. (2017). Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *J. Funct. Food.*, 32: 18–26.
- Egamberdieva D., Wirth S., Alqarawi A., Abd Allah E.F. et Hashem A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front Microbiol.*, 8: 2104.
- Elamo P., Helander M.L., Saloniein I. et Neuvonen S. (1999). Birch family and environmental conditions affect endophytic fungi in leaves. *Oecologia*, 118: 151-156
- Emmelin N. et Feldberg W. (1947). The mechanism of the sting of the common nettle (*Urtica urens*). *J. Physiol.*, 106: 440–55.
- Fang W., Yang L., Zhu X., Zeng L. et Li X. (2013). Seasonal and habitat dependent variations in culturable endophytes of *Camellia sinensis*. *J. Plant Pathol. Microbiol.*, 4: 169.

Références bibliographiques

- Farahpour M.R. et Khoshgozaran L. (2015). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of hydroethanolic extract of *Urtica dioica*. *Int. J. Biol. Pharm. Allied. Sci.*, 1: 160-70.
- Farzami B., Ahmadvand D., Vardasbi S., Majin F.J. et Khaghani S.H. (2003). Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 89: 47-53.
- Fässler E., Evangelou M.W., Robinson B.H. et Schulin R. (2010). Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diamine disuccinic acid (EDDS). *Chemosphere*, 80: 901–907.
- Fatimah Z.I., Zaiton Z., Jamaludin M., Gapor M.T., Nafeeza M.I. et Khairul O. (1998). Effect of estrogen and palm vitamin E on malondialdehyde levels toward the development of arteriosclerosis in the New Zealand white rabbit. In: Packer L. et Ong S.H. *Biological Oxidants and Antioxidants: Molecular Mechanism and Health Effects*. Ed. AOCS Press, Champaign, IL, USA, p. 22.
- Fennane M., Tattou M., Mathez J., Ouyahya A. et El Oualidij. (1999). Flore pratique du Maroc. Manuel de détermination des plantes vasculaires. *Trav. Inst. Sci. sér, Bot.*, 1: 558.
- Fernandes G.W., Oki Y., Sanchez-Azofeifa A., Faccion G. et Amaro Arruda H.C. (2011). Hail impact on leaves and endophytes of the endemic threatened *Coccoloba cereifera* (Polygonaceae). *Plant Ecology*, 125: 1-14.
- Fisgin T., Yeliz T.C. et Ahmet Y.C. (2009). Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia.*, 80: 48-50.
- Fisher P. J., Petrini O. et Lappin-Scott M. (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*, 122: 299-305.
- Fleurentin J. et Hayon J.C. (2008). *Plantes médicinales: traditions et thérapeutique*. Rennes: Éd. Ouest-France. p. 104-105.
- Fox R.T., Manners J.G. et Myers A. (1971). Ultrastructure of entry and spread of *Erwinia carotovora* var *atroseptica* into potato tubers. *Potato Res.* 14: 61–73.
- Frank B., Bohn I. et Uehleke B. (1998). *Urtica*. Volume 3. In: Blaschek W, Hänsel R, Keller K, Reichling J, Rimpler H, Schneider (Hrsg.) G, editors. *Hagers Handbuch*. Berlin: Springer. P. 710-36.
- Frattarelli D.A., Reed M.D., Giacoia G.P. et Aranda J.V. (2004). Antifungals in systemic neonatal candidiasis. *Drugs*, 64: 949-968.

Références bibliographiques

- Frohlich J., HYDE K.D. et PETRINI O. (2000). Endophytic fungi associated with palms. *Mycol. Res.* 104: 1202–1212
- Fu Y. (2019). Biotransformation of ginsenoside Rb1 to Gyp-XVII and minor ginsenoside Rg3 by endophytic bacterium *Flavobacterium* sp. GE 32 isolated from *Panax ginseng*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 68: 134–141
- Fu Y., Yin Z.H., Wu L.P. et Yin C.R. (2016). Biotransformation of ginsenoside Rb1 to ginsenoside C-K by endophytic fungus *Arthrinium* sp GE 17–18 isolated from *Panax ginseng*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 63:196–201.
- Gadd G.M. (2001). Metal transformations. In Gadd G.M. (2001). *Fungi in Bioremediation*, Ed. Cambridge University Press. p. 359-382.
- Gadd G.M. (2010). Metals: minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156: 609–643.
- Gadd G.M. et Sayer G.M. (2000). Fungal transformations of metals and metalloids. In : Lovley D.R. (2001). *Environmental Microbe-Metal Interactions*. Ed. ASM, Washington. p. 237-256
- Gagic M., Faville M.J., Zhang W., Forester N.T., Rolston M.P., Johnson R.D., Ganesh S., Koolaard J.P., Easton H.S., Hudson D., Johnson L.J., Moon C.D. et Voisey C.R. (2018). Seed transmission of *Epichloë* endophytes in *Lolium perenne* heavily influenced by host genetics. *Front. Plant Sci.*9: 1580.
- Ganber D. et Spiteller G. (1995). Aromatase inhibitors from *Urtica dioica* roots. *Planta med.*, 21 : 138-140.
- Garcia A., Rhoden S.A., Rubin Filho C.J., Nakamura C.V. et Pamphile J.A. (2012). Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. *Biol. Res.*, 45:139–148.
- Gardes M. et Bruns T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118
- Garratt L.C., Janagoudar B.S., et Lowe K.C. (2002). Salinity tolerance and antioxidant status in cotton culture. *Free Radic. Biol. Med.*, 33 : 502–511.
- Ghedira K., Goetz P. et Le Jeune R. (2009). *Urtica dioica* L., *Urtica urens* et/ou hybrides (Urticaceae). *Phytothérapie*, 7: 279-285.

Références bibliographiques

- Glynou K., Ali T., Buch A.K., Haghi Kia S., Ploch S., Xia X., Celik A., Thines M. et Macia-Vicente J.G. (2016). The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. *Environ. Microbiol.* 18: 2418–2434.
- Gomez-Vidal S., Lopez-Llorca L.V., Jansson H.B., Salinas J. (2006). Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron.* 37: 624– 632.
- Goudjal Y., Toumatia O., Sabaou N., Barakate M., Mathieu F. et Zitouni A. (2013). Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World J Microbiol Biotechnol.*, 29: 1821-1829.
- Gould I.M. (2005). The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* 61: 277-282.
- Goveas S.W., Madtha R., Nivas S.K. et D'Souza L. (2011). Isolation of endophytic fungi from *Coscinium fenestratum* -a red listed endangered medicinal plant. *Eurasia. J. Biosci.* 5: 48–53.
- Govindappa M., Channabasava R., Sadananda T.S., Chandrappa C.P. et Umashankar T. (2014). Identification of bioactive metabolites by gc-ms from an endophytic fungus, *Alternaria alternata* from *Tabebuia argentea* and their in vitro cytotoxic activity. *Int. J. biol. pharm. Res.*, 5: 527-534.
- Grauso L., Falco B., Lanzotti V. et Motti R. (2020). Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem Rev.*, 19: 1341-1377.
- Green T. (1824). Universal herbal. 2nd ed. London: Caxton Press. p. 729.
- Grevsen K., Frette X.C. et Christensen L.P., (2008). Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial plants of stinging nettles (*Urtica dioica*) are affected by nitrogen fertilization and by harvest time. *Europ. J. Hort. Sci.*, 73 (1): 20-27.
- Grieve M. (1931). A modern herbal. 3rd ed. London: Tiger Books International. p. 912.
- Griffin G.F. et Chu F.S. (1983). Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, Alternariol methyl ether, Altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 1420–1422.
- Griffin S.G., Wyllie S.G. et Markham J.L. (2005). Antimicrobially active terpenes cause K⁺ leakage in *E. coli* cells. *J. Essent. Oil. Res.*, 17: 686–690.

Références bibliographiques

- Guil-Guerrero J.L., Reboloso-Fuentes M.M. et Torija Isasa M.E. (2003). Fatty acids and carotenoids from stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *J Food Comp. Anal.*, 16:111–9.
- Gulçin I., Oktay M., Kufrevioglu O.I. et Aslan A. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen *Cetrariais landica*(L) Ach. *J. Ethnopharm.*, 79: 325-329.
- Gulcin I., Kufrevioglu O.I., Oktay M. et Buyukokuroglu M.E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol.*,90: 205-15.
- Guler E.R. (2013). Investigation of chemo-prevent properties of *Urtica dioica* L., in MCF7 and MDA 231 breast cancer cell lines. *New J. Med.*, 30: 50-3.
- Gunatilaka A.A.L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.*69: 509-526.
- Gundale M.J., Almeida J.P., Wallander H., Wardle D.A., Kardol P., Nilsson M.C., Fajardo A., Pauchard A., Peltzer D.A., Ruotsalainen S., Mason B., Rosenstock N. et Austin A. (2016). Differences in endophyte communities of introduced trees depend on the phylogenetic relatedness of the receiving forest. *J. Ecol.*, 104:1219–1232.
- Guo B., Wang Y., Sun X. et Tang K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 44:136–142.
- Guo L.D., Huang G.R., Wang Y., He W.H., Zheng W.H. et Hyde K.D. (2003). Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Myco. Res.*, 107: 680–688.
- Gupta S. et Chaturvedi P. (2017). Foliar endophytic diversity of *Centella asiatica* (L.) Urban in relation to different seasons and leaf age. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*6: 468–477.
- Gupta A., Naraniwal M. et Kothari V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *Int. J. Appl. Nat. Sci.*, 1: 8–26.
- Hadizadeh I., Peivastegan B. et Kolahi M. (2009). Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pak. J. Biol Sci*, 12: 58-63.
- Hajhashemi V. et Klooshani V. (2013). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Urtica dioica* leaf extract in animal models. *Avicenna J. Phytomed.*, 3: 193-200.

Références bibliographiques

- Hajhashemi V., Vaseghi G., Pourfarzam M. et Abdollahi A. (2010). Are antioxidants helpful for disease prevention? *Res. Pharm. Sci.*, 5: 1–8.
- Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K. et Kinoshita T. (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochem.*, 48: 125–129.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I. et Lorito M. (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 43-56.
- Harper J.K., Ford E.J., Strobel G.A., Arif A., Grant D.M., Porco J., Tomer D.P. et Oneill K. (2003). Pestacin: a 1, 3-dihydroisobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*, 59 : 2471–2476.
- Harrison R.K. (1966). *Healing Herbs of the Bible*. Leiden: EJ Brill Publishers. p. 58.
- Harrison L., Teplow D., Rinaldi M. et Strobel G.A. (1991). Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae*, possessing broad spectrum antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.*, 137: 2857-2865.
- Hashizume Y, Sahashi N, Fukuda K. (2008). The influence of altitude on endophytic mycobiota in *Quercus acuta* leaves collected in two area 1000 km apart. *For.Path.*,38: 21–226.
- Heinig U., Scholz S. et Jennewein S. (2013). Getting to the bottom of taxol biosynthesis by fungi. *Fungal Divers.*, 60 : 161–170.
- Hermosa R., Cardoza M.B., Rubio M.E., Gutiérrez S. et Monte E. (2014). Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In. Gupta V.K., Schmoll M.,
- Herrera-Estrella A., Upadhyay R.S., Druzhinina I. et Tuohy M. (2014), *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Ed. Elsevier, The Netherlands. p. 125-137.
- Hermosa R., Viterbo A., Chet I. et Monte E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiol.*, 158 : 17-25.
- Hermosa R., Rubio M.E., Cardoza M.B., Nicolás E., Monte E. et Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *InterMicrobiol.*, 16 : 69-80.
- Herre E.A., Mejia L.C., Kyllö D.A., Rojas E., Maynard Z., Butler A. et Van Bael S.A. (2007). Ecological implication of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, 88: 550-558.
- Hertweck C. (2008). Activation of fungal silent gene clusters: a new avenue to drug discovery. *Prog. Drug Res.*, 66 : 1–12.

Références bibliographiques

- Hirano T., Homma M. et Oka K. (1994). Effects of stinging nettle root extracts and their steroidal components on the Na⁺, k⁽⁺⁾-ATPase of the benign prostatic hyperplasia. *Planta Med.*, 60: 30-3.
- Hitchon C.A. et El-Gabalawy H.S. (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 6: 265–278.
- Hodgson S., de Cates C., Hodgson J., Morley N.J., Sutton B.C. et Gange A.C. (2014). Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecol. Evol.* 4: 1199–1208.
- Hoffman F. (1997). Antioxidant vitamins newsletter. *Nutr. Rev.*, 14: 234–236.
- Hoitink H.A.J., Maden L.V. et Dorrance A.E. (2006). Systemic resistance induced by *Trichoderma spp.*: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathol.*, 96: 196-189.
- Hopple J.S. et Vilgalys R. (1994). Phylogenetic relationship among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA. *Mycologia*, 86: 96-107.
- Horino O. (1984). Ultrastructure of water pores in *Leersia japonica* Makino and *Oryzae sativa* L.: its correlation with the resistance to hydatode invasion of *Xanthomonas campestris* sp. *oryzae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 50: 72–76.
- Horn W.S., Simmonds M.S.J., Schwartz R.E. et Blaney W.M. (1995). Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis sp.* *Tetrahedron*, 14: 3969-3978.
- Hossain M.M., Sultana F., Kubota M. et Hyakumachi M. (2008). Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in *Arabidopsis thaliana* by plant-growthpromoting- fungus *Penicillium sp.* GP16-2 and its cell free filtrate. *Plant Soil*, 304: 227-39.
- Howell C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87: 4-10.
- Hryb D.J., Khan M.S., Romas N.A. et Rosner W. (1995). The effect of extracts of the roots of the stinging nettle (*Urtica dioica*) on the interaction of SHBG with its receptor on human prostatic membranes. *Planta Med.*, 61: 31-2.
- Huang W.Y., Cai Y.Z., Xing J., Corke H. et Sun M. (2007). A potential antioxidant resource: Endophytic fungi from medicinal plants. *Econ. Bot.*, 61: 14–30.

Références bibliographiques

- Hyde K. et Soytong K., (2007). Understanding microfungal diversity – a critique. *Cryptogamie Mycologie*,28: 1–9.
- Hyde K.D et Soytong K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33: 163-173.
- I.N.C. (1997). Carte d'Algérie 1/50.000 type 1922. Fort National. Ed. Institut national cartographie, Larbâa-Nath-Irathen.
- IARC Global Cancer Observatory. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Press Release N 263, 12 September 2018.
- Ikram M., Ali N., Jan G., Jan F. et Khan N. (2019). Endophytic Fungal Diversity and their Interaction with Plants for Agriculture Sustainability Under Stressful Condition. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, 10:1-9.
- Ikram M., Ali N., Jan G., Jan F.G., Rahman I.U., Iqbal A. et Hamayun M. (2018). IAA producing fungal endophyte *Penicillium roqueforti* Thom., enhances stress tolerance and nutrients uptake in wheat plants grown on heavy metal contaminated soils. *PloS one* 13:e0208150
- Indriarningsih A.W. et Tachibana S. (2017). α -Glucosidase inhibitor produced by an endophytic fungus, *Xylariaceae* sp. QGS 01 from *Quercus gilva* Blume. *Food Sci. Human Wellness.*, 6: 88–95.
- Inouye S., Yamaguchi H. et Takizawa T. (2001). Screening of the antibacterial effects of variety of essential oils on respiratory tract pathogens using a modified dilution assay method. *J. Infect. Chemother.*,7: 251–254.
- Issawi M., Guillaumot D., Sol V. et Riou C. (2018). Responses of an adventitious fast-growing plant to photodynamic stress: comparative study of anionic and cationic porphyrin effect on *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant*, 162: 379-390.
- Jasinski J.P. et Payette S. (2007). Holocene occurrence of *Lophodermium piceae*, a black spruce needle endophyte and possible paleoindicator of boreal forest health. *Quat. Res.*,67: 50-56.
- Jeffrey K.S., Polishook J.D. et White J.F. (2012). Endophytic fungi. In Encyclopedia of Science and Technology. Publisher: McGraw-Hill Education.
- Jeffries P. (1995). Biology and ecology of mycoparasitism. *Can. JO Bot.*,73: 1284–1290.

Références bibliographiques

- Jelen H., Błaszczuk L., Chełkowski J., Rogowicz K. et Strakowska J. (2013). Formation of 6-npentyl- 2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycol. Progress*, 13: 589-600.
- Jha P. et Kumar A. (2009). Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microb. Ecol.*, 58: 179–188.
- Jia M., Chen L., Xin H.L., Zheng C.J., Rahman K., Han T. et Qin L.P. (2016). A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Front. Microbiol.*, 7 : 1-14
- Jiang S., Duan J.A., Tao J.H., Yan H. et Zheng J.B. (2010). Ecological distribution and elicitor activities of endophytic fungi in *Changium smyrnioides*. *Chin. Tradit. Herb. Drugs* 1: 121–125.
- Juniper B.E. (1991). The leaf from the inside and the outside: a microbe's perspective. In: Andrews J.H. et Hirano S.S. (1992). *Microbial ecology of leaves*. Ed. Springer-Verlag, New York. p. 21–42.
- Kamalraj S. et Muthumary J. (2013). Prevalence and seasonal periodicity of endophytic coelomycetous fungi in Tamil Nadu, India. *Int J. Biodivers. Conserv.*, 5: 469–77.
- Kataki M.S., Murugamani V., Rajkumari A., Mehra P.S., Awasthi D. et Yadav R.S. (2012). Antioxidant, hepatoprotective, and anthelmintic activities of methanol extract of *Urtica dioica* L. Leaves. *Pharm. Crops.*, 3: 38-46.
- Kaushik A., Aron A., Mihreteab S., Mohamedkassm N. et Michael Kidane E. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activity of medicinal plants used by eritrean traditional healers. *World J. Pharm. Res.*, 4: 501-509.
- Kavalali G. (2003). The chemical and pharmacological aspects of *Urtica*. In: Kavalali G.M. (2004). *Therapeutic and Nutritional Aspects of Stinging Nettles*. Ed. Taylor and Francis. London, New York. p. 47-55.
- Kavtaradze N., Alaniya M., et Aneli J. (2001). Chemical components of *Urtica dioica* growing in Georgia. *Chem. Nat. Compd.*, 37: 287.
- Kawanishi S., Oikawa S. et Murata M. (2005). Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents. *Antioxid. Redox Signal.*, 7: 1728-39.
- Kazenel M.R. (2016). Alitudinal gradient do not predict plant symbiont response to experimental warming .Thesis dissertation. University of New Mexico.
- Keles O., Bakirel T. et Alpmar A. (2001). The antibacterial activity of some plants used for medicinal purposes against pathogens of veterinary importance. *Folia. Vet.*, 1: 22-5.

Références bibliographiques

- Khan M.A., Gul B. et Weber D. J. (2004). Action of plant growth regulators and salinity on seed germination of *Ceratoides lanata*. *Can. J. Bot.*, 82: 37–42.
- Khan N., Bano A. et Babar M.A. (2017). The root growth of wheat plants, the water conservation and fertility status of sandy soils influenced by plant growth promoting rhizobacteria. *Symbiosis*, 72: 195-205.
- Khan A.L., Hussain J., Al-Harrasi A., Al-Rawahi A. et Lee I.J. (2013). Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 35: 62–74.
- Khan N., Zandi P., Ali S., Mehmood A. et Shahid M.A. (2018). Impact of Salicylic acid and PGPR on the Drought Tolerance and Phytoremediation potential of *Helianthus annuus*. *Front. Microbiol.* 9: 1-14.
- Khan N., Bano A., Rahman M.A., Guo J., Kang Z. et Babar M.A. (2019). Comparative Physiological and Metabolic Analysis Reveals a Complex Mechanism Involved in Drought Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum L.*) Induced by PGPR and PGRs. *Scientific reports*, 9: 2097.
- Khan R., Shahaz S., Choudhary M.I., Khan S.A. and Ahmad A. (2010). Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pak. J. Bot.*, 42: 1281-1287.
- Khan S.A., Hamayun M., Yoon H., Kim H.Y., Suh S.J., Hwang S.K. et Kong W.S. (2008). Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC microbiology*, 8: 231.
- Khare V., Kushwaha P., Verma S., Gupta A., Srivastava S. et Rawat A.K.S. (2012). Pharmacognostic evaluation and antioxidant activity of *Urtica dioica L.* *Chin. Med.*, 3: 128-35.
- Kharwar R.N., Mishra A., Gond S.K., Stierle A. et Stierle D. (2011). Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat. Prod. Rep.* 28: 1208-1228.
- Kjer J., Wray V., Edrada-Ebel R., Ebel R., Pretsch A., Lin W. et Proksch P. (2009). Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria sp.* isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. *J. Nat. Prod.*, 72: 2053-2057.
- Klingelhofer S., Obertreis B., Quast S. et Behnke B.J. (1999). Antirheumatic effect of IDS 23, a stinging nettle leaf extract, on in vitro expression of T helper cytokines. *J.Rheumatol.* 26: 2517–2522.

Références bibliographiques

- Kneip C., Lockhart P., Voss C., Maier U.G. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes-new models for symbiosis. *BMC Evol. Biol.*, 7:55-66.
- Koch E., Jaggy H.E.W., Chatterjee S.S. et Arch N.S. (1995). *Pharmacol.* 351, R57 abstract 225.
- Köhl J., Postma J., Nicot P., Ruocco M., et Blum B. (2011). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biol. Control.*, 57: 1–12.
- Konrad A., Mahler M., Arni S., Flogerzi B., Klingelhöfer S. et Seibold F. (2005). Ameliorative effect of IDS 30, a stinging nettle leaf extract, on chronic colitis. *Int. J. Colorectal Dis.*, 20: 9-17.
- Körpe D.A., İßerİ Ö.D., Sahin F.I., Cabi E. et Haberal M. (2013). High-antibacterial activity of *Urtica spp.* Seed extracts on food and plantpathogenic bacteria International. *J. Food Sci. Nutr.*, 64: 355-362.
- Kowalski T. et Kehr R.D. (1992). Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. *Sydowia*, 44:137–168.
- Krauss R. et Spitteler G. (1990). Phenolic compounds from roots of *Urtica dioica*. *Phytochemistry*, 29: 1653–1659.
- Krings M., Taylor T.N., Hass H., Kerp H. et Dotzler N. (2007). Fungal endophytes in a 400- million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytol.*, 174: 648-657.
- Kukric Z.Z., Topalic-Trivunovic L.N., Kukavica B.M., Matos S.B., Pavicic S.S., Boroja M.M. (2012). Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica L.*). *Acta periodica technologica (APTEFF)*, 43: 259-72.
- Kuldau G., et Bacon C. (2008). *Clavicipitaceous* endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biol. Control.*, 46: 57-51.
- Kuldau G. et Yates I.E. (2000). Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In: Bacon C.W et White J.R.J.F. (2001). *Microbial endophytes*. Ed. Dekker. New York (NY). p. 85–117.
- Kumar S. (2013). *Trichoderma*: a biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. *Int. J. Agric. Sci. Vet. Med.*, 1: 1-16.
- Kumar D.S.S. et Hyde K.D. (2004). Biodiversity and tissue recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*, 17: 69–90.

Références bibliographiques

- Kumar S., Thakur M. et Rani A. (2014). *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *Afr. J. Agric. Res.*, 9 : 3838-3852.
- Kumar M., Yadav V., Tuteja N. et Johri A.K. (2009). Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology*, 155: 780–790.
- Kumar S., Kaushik N., Edrada-Ebel R., Ebel R. et Proksch P. (2011). Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 571-577
- Kusari S., Pandey S.P., et Spiteller M. (2013). Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. *Phytochem.*, 91: 81–87.
- Kusari S., Verma V.C., Lamshoef M. et Spiteller M. (2012). An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. That produces azadirachtin. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 1287–1294.
- Lahlali R., McGregor L., Song T., Gossen B.D., Narisawa K. et Peng G. (2014). *Heteroconium chaetospora* induces resistance to clubroot via upregulation of host genes involved in jasmonic acid, ethylene, and auxin biosynthesis. *PLoS One*, 9: 1–9.
- Lamb T.G., Tonkyn D.W. et Kluepfel D.A. (1996). Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Can. J. Microbiol.*, 42: 1112–1120.
- Laur J., Ramakrishnan G.B., Labbé C., Lefebvre F., Spanu P.D. et Bélanger R.R. (2018). Effectors involved in fungal–fungal interaction lead to a rare phenomenon of hyperbiotrophy in the tritrophic system biocontrol agent–powdery mildew–plant. *New Phytol.*, 217: 713–725.
- Le Van A., Quaiser A., Duhamel M., Michon-Coudouel S., Dufresne A. et Vandenkoornhuyse P. (2017). Ecophylogeny of the endospheric root fungal microbiome of co-occurring *Agrostis stolonifera*. *PeerJ*, 5: e3454.
- Lebovitz H.E. (1997). Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 26: 539–551.
- Lee G., Ha J.Y., Min K.R., Nakagawa H., Tsurufuji S., Chang I.M. et Kim Y. (1995). Inhibitory effects of oriental herbal medicines on IL-8 induction in lipopolysaccharide-activated rat macrophages. *Planta Med.*, 61: 26—30.

Références bibliographiques

- Lezhneva L.P., Murav'ev I.A. et Cherevatyi V.S. (1986). Rastitel' nye Resursy, 22 : 255–257
- Li J.Y., Strobel G.A., Harper J.K., Lobkovsky E. et Clardy J. (2000). Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Org. Lett.*, 2: 767-770.
- Li Q., Kuo Y.W., Lin K.H., Huang W., Deng C., Yeh K.W. et Chen S.P. (2021). *Piriformospora indica* colonization increases the growth, development, and herbivory resistance of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell Reports*, 40: 339-350.
- Liebermann B., Elling R. et Ihn W. (1994). ACTG-toxins produced by a strain of *Altemaria altemata*. That does not originate from Citrus species. *Phytopathology*, 140: 385–8.
- Lisitsyn A.B., Semenova A.A. et Gundyreva M.I. (2006). A study of the antioxidant properties of supercritical CO₂ extracts. *Meat Ind.*, 3: 30–35.
- Liu L., Li J.W., Yue F.X., Yan X.W., Wang F.Y. et Bloszies S. (2018). Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and biochar amendment on maize growth, cadmium uptake and soil cadmium speciation in cd-contaminated soil. *Chemosphere*, 194: 495–503.
- Lombardo S., Pandino G., Mauromicale G., Knöfodler M., Carle R. et Schieber A. (2010). Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chem.*, 119: 1175–1181.
- Long N.E., Smidmanky E.D., Archer A.J., et Strobel G.A. (1998). In vivo addition of telomeric repeats to foreign DNA generates chromosomal DNAs in the taxol-producing fungus *Pestalotiopsis microspora*. *Fungal Genetics and Biology*, 24: 335–344.
- Lopez-Aroche U.D.O., Salinas-Sanchez P., Gives M., López-Arellano M.E., Liébano-Hernández E., Valladares-Cisneros G., Arias-Ataide D.M. et Hernández-Velázquez V.J. (2008). Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): a reservoir of nutrition and bioactive components with great functional potential. *Helminthol.*, 82 : 25–31.
- Ludwig-Müller J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnol. Lett.*, 37 : 1325–1334.
- Luginbuhl M. et Müller E. (1980). Endophytische Pilzen den oberirdischen organen von 4 gemein- sam an gleichen Standorten wachsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*, *Ilex*, *Ruscus*). *Sydowia*, 33:185–209.

Références bibliographiques

- Lugtenberg B. et Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541–556.
- Machuca A. et Milagres A.M.F.(2003). Use of cas-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 177-181.
- Madki M.A., Manzoor A.S., Powar P.V. et Patil K.S. (2010). Isolation and biological activity of endophytic fungi from *Withania somnifera*. *Int. J. Pharm. Sci.*, 2: 848-858.
- Mahmoudi R., Amini K., Fakhri O. et Alem M. (2014). Aroma profile and antimicrobial properties of alcoholic and aqueous extracts from root, leaf and stalk of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, 4: 220–224.
- Malik R.J., Dixon M.H. et Bever J.D. (2016). Mycorrhizal composition can predict foliar pathogen colonization in soybean. *Biol. Control*, 103: 46-53.
- Malinowski D.P. et Belesky D.P. (2006). Ecological importance of *Neotyphodium* sp. Grass endophytes in agroecosystems. *Grass Sci.* 52: 23-28.
- Marrelli M., Menichini F., Statti G.A., Bonesi M., Duez P., Menichini F. et Conforti F. (2012). Changes in the phenolic and lipophilic composition, in the enzyme inhibition and antiproliferative activity of *Ficus carica* L. cultivar Dottato fruits during maturation. *Food Chem. Toxicol.*, 50: 726–733.
- Martinuz A., Schouten A et Sikora R.A. (2012). Systemically induced resistance and microbial competitive exclusion: implications on biological control. *Phytopathology*, 102: 260–266.
- McInroy J.A. et Kloepper J.W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 173: 337-342.
- Menendez-Baceta G., Aceituno-Mata L., Tardio J., Reyes-Garcia V. et Pardo-de Santayana M. (2012). Wild edible plants traditionally gathered in Gorbeialdea (Biscay, Basque Country). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59: 1329–1347.
- Mihaljev E., Eivkov-Baloea M., Cupic E. et Jakaic S. (2014). Levels of some microelements and essential heavy metals. *Acta Pol. Pharm.*, 71: 385-91.
- Miller W.A. et Roy K.W. (1982). Mycoflora of soybean leaves, pods, and seeds in Mississippi. *Can. J. Bot.*, 60: 2716-2723.-
- Miller R.V., Miller C.M., Garton-Kinney D., Redgrave B., Sears J., Condrón M., Teplow D. et Strobel G.A. (1998). Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 937-944.

Références bibliographiques

- Mishra A., Gond S.K., Kumar A., Sharma V.K., Verma S.K. et Kharwar R.N. (2012). Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location. *Microb. Ecol.*, 64: 388–98.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7: 405–410.
- Mittman P. (1990). Randomized, double-blind study of freeze-dried *Urtica dioica* in the treatment of allergy rhinitis. *Planta Med.*, 56: 44-7.
- Mohandoss J. Suryanarayanan T.S. (2009). Effect of fungicide treatment on foliar fungal endophyte diversity in mango. *Sydowia*, 61: 11–24.
- Mohanta J., Tayung K. et Mohapatra U. (2008). Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three ethnomedicinal plants of similipal biosphere reserve, India. *The Internet J. Microbio.*, 5: 20-28.
- Mokhtar H. et Aid D. (2013). Contribution in isolation and identification of some pathogenic Fungi from wheat seeds, and evaluation of antagonistic capability of *Trichoderma harzianum* against those isolated Fungi *in vitro*. *Agric. Biol. J. N. Am.*, 4: 145-154.
- Moricca S. et Ragazzi A. (2008). Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopatho.*, 98: 380–386.
- Moutsie M. (2003). L'ortie, une amie qui vous veut du bien. Encyclopédie d'Urovie. p. 56.
- Muniz C.R., Freire F.C.O, Viana F.M.P, Cardoso J.E., Cooke P., Wood D., Guedes M.I.F. (2011). Colonization of cashew plants by *Lasiodiplodia theobromae*: microscopical features. *Micron.*, 42: 419–428.
- Nalini M.S., Sunayana N. et Prakash H.S. (2014). Endophytic fungal diversity in medicinal plants of Western Ghats, India. *Int. J. Biodivers.*, 494213: 1–9.
- Nascimento T.L., Oki Y., Lima D.M.M., Almeida-Cortez J.S., Wilson-Fernandes G. et Souza- Motta C.M. (2015). Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal Ecol.* 14: 79–86.
- Nassiri-Asl M., Zamansoltani F., Abbasi E., Daneshi M.M. and Zangivand A.A. (2009). Effects of *Urtica dioica* extract on lipid profile in hypercholesterolemic rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 28: 428-33.

Références bibliographiques

- Nath A., Raghunatha P. et Joshi S.R. (2012). Diversity and biological activities of endophytic fungi of *Embllica officinalis*, an ethnomedicinal plant of India. *Mycobiol.*, 40: 8-13.
- Newman D.J. et Cragg G.M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75: 311-335
- Niu D., Wang X., Wang Y., Song X., Wang J., Guo J. et Zhao H. (2016). *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through a NPR1-and SA-dependent signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 469: 120-125.
- Nordberg M. (1998). Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, 46:243-253.
- Nunomura A., Castellani R.J., Zhu X., Moreira P.I., Perry G. et Smith M.A. (2006). Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 65: 631–641.
- Obertreis B., Giller K., Teucher T., Behnke B. et Schmitz H. (1996). Anti-inflammatory effect of *Urtica dioica* folia extract in comparison to caffeic malic acid. *Arzneimittelforschung*, 46: 52-6.
- Ofokansi K.C., Esimone C.O. et Anele C.K. (2005). Evaluation of the in-vitro combined antibacterial effects of the leaf extracts of *Bryophyllum pinnatum* and *Ocimum gratissimum*. *Plant Prod. Res. J.*, 9: 23–27.
- Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K. et Yagi A. (1993). Altersolanol-related antimicrobial compounds from a strain of *Alternaria solani*. *Phytochem.*, 34: 1005–1009.
- Oktay M., Gulcin I. et Kufrevioglu O.I. (2003). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36: 263–271.
- Olszewski N., Sun T.P. et Gubler F. (2012). Gibberellin signaling, biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 14: 561–580.
- Orcic D., Franciškovic M., Bekvalac K., Svircev E., Beara I., Lesjak M. et Mimica-Dukic N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chem.*, 143: 48-53.
- Orole O.O. et Adejumo T.O. (2009). Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 3: 969-973.

Références bibliographiques

- Osés R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E. et Rodríguez J. (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Divers.*, 33: 77–86.
- Otles S. et Yalcin B. (2012). Phenolic compounds analysis of root, stalk, and leaves of nettle. *Sci. World J.* 2012:1-12.
- Ouerghemmi I., Bettaieb Rebey I., Rahali F.Z., Bourgou S., Pistelli L. et Ksouri R. (2017). Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *J. Food. Drug. Anal.* 25: 350–359.
- Oyaizu M. (1986) Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of product of browning reaction prepared from Glucosamine. *Jpn J. Nutr.*, 44: 307-315.
- Oyedemi S.O., Okoh A.I., Mabinya L.V., Pirochenva G. et Afolayan, A.J. (2009). The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, (-terpineol and (-terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Afr J. Biotechnol.*, 8:1280–1290.
- Ozen T. et Korkmaz H. (2003). Modulatory effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. *Phytomedicine*, 10: 405-15.
- Pacifico S. et Piccolella S. (2015) Plant-Derived Polyphenols: A Chemopreventive and Chemoprotectant Worth-Exploring Resource in Toxicology. In: Fishbein J.C. et Heilman J.M. (2015). *Advances in Molecular Toxicology*. Ed. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. p. 161–214.
- Pacifico S., Piccolella S., Nocera P., Tranquillo E., Dal Poggetto F. et Catauro M. (2019). New insights into phenol and polyphenol composition of *Stevia rebaudiana* leaves. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 163: 45–57.
- Paixao N., Perestrelo R., Marques J.C. et Camara J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry*, 105: 204-214.
- Pamphile J.A. et Azevedo J.L. (2002). Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*. L). *Wor. J. Microb. Biotech.*, 18: 391-396.
- Pamphile J.A., Dos Santos Ribeiro M.A. et Polonio J.C. (2017). Secondary Metabolites of Endophyte Fungi: Techniques and Biotechnological Approaches. In: de Azevedo J.,

Références bibliographiques

- Quecine M. (2017). Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. Ed. Springer, Cham. p. 37-48.
- Panaccione D.G., Beaulieu W.T. et Cook D. (2014). Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. *Funct. Ecol.*, 28: 299–314
 - Parfrey L.W., Lahr D.J., Knoll A.H. et Katz L.A. (2011). Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 108: 13624-13629.
 - Pascholati S.F., De Souza V.H.M. et Cardoso Filho J.A. (2019). Indução de resistência por *Trichoderma*. *Usos na Agricultura*, 1: 235–254.
 - Penninckx M.J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2: 295-305.
 - Pereira J.O., Azevedo J.L. et Petrini O. (1993). Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. *Mycol.*, 85: 362-364.
 - Petrini O. et Fisher P.J. (1988). A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stems of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Trans. British Mycol. Soc.*, 91: 233–238.
 - Petrini O. et Fischer P.J. (1990). Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycol. Res.* 94:1077–1080.
 - Petrini O., Sieber T.N., Toti L. et Viret O. (1992). Ecology, metabolite production, and substrat utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins.*, 1: 185–196.
 - Peumans W.J., De Ley M. et Broekeart W.F. (1984). An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes *FEBS Lett.*, 177:99–103.
 - Phillips J.M., et Hayman D.S. (1970). Improved procedures for cleaning root and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid accesment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55: 158-160.
 - Pieterse C.M.J. et Zamioudis C. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 52: 347-375.
 - Pimentel I.C., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Stuart R.M. et Azevedo J.L. (2006). Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 49: 705-711.
 - Pinelli P., Ieri F., Vignolini P., Bacci L., Baronti S. et Romani A. (2008). Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 9127–9132.

Références bibliographiques

- Pirttilä A., Joensuu P., Pospiech H., Jalonen J.A.H. (2004). Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. *Physiol. Plant*, 121: 305–312.
- Pokorny J., Yanishlieva N. et Gordon M. (2001). Antioxidants in food partical application, Ed. CRC Press, New York. p. 179.
- Poole K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3: 255–264.
- Pradhan S., Manivannan S. et Tamang J.P. (2015). Proximate, mineral composition and antioxidant properties of some wild leafy vegetables. *J Sci. Ind. Res.*, 74: 155-9.
- Promptuttha I., Jeewon R., Lumyong S., McKenzie E.H.C et Hyde K.D. (2005). Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). *Fungal Divers*, 20: 167–186.
- Quinet M., Angosto T., Yuste-Lisbona F.J., Blanchard-Gros R., Bigot S., J.-P. et Martinez J.P. (2019). Tomato fruit development and metabolism. *Front. Plant Sci.*, 10: 1554
- Racchi M.L. (2013). Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus spp.* *Antioxidants*, 2: 340-369.
- Radhakrishnan R., Khan A.L., et Lee I.J. (2013). Endophytic Fungal Pre-treatments of Seeds Alleviates Salinity Stress Effects in Soybean Plants. *J. Microbiol.*, 51: 850–857.
- Raekiansyah M., Mori M., Nonaka K., Agoh M., Shiomi K., Matsumoto A. et Morita K. (2017). Identification of novel antiviral of fungus-derived brefeldin A against dengue viruses. *Trop Med. Health*. 45: 32.
- Rafajlovska V., Kavrakovski Z., Simonovska J. et Srbinoska M. (2013). Determination of protein and mineral contents in stinging nettle. *Qual. Life Res.*4: 26–30.
- Rajkumar M., Ae N. et Freitas H. (2009). Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*, 77: 153–160.
- Ratnam D.V., Ankola D.D., Bhardwaj V., Sahana D.K. et Kumar M.N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Control Release*, 113: 189-207.
- Rattan R.K., Datta S.P., Chhonkar P.K., Suribabu K. et Singh A.K. (2005). Long-term impact of irrigation with sewage effluents on heavy metal content in soils, crops and groundwater a case study. *Agriculture, Eco. Env.*, 109: 310-322.

Références bibliographiques

- Rawat S., Jugran A.K., Bahukhandi A., Bahuguna A., Bhatt I.D. et Rawal R.S. (2016). Antioxidant and antimicrobial properties of some ethnotherapeutically important medicinal plants of Indian Himalayan Region. *Biotech.*, 6:154.
- Reaume T. (2010). Stinging nettle *Urtica dioica* urticaceae-nettle family. *Nature Manitoba*, 7 : 1-10.
- Redman R.S, Dunigan D.D et Rodriguez R.J. (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytol.*, 151: 705–716.
- Reininger V., Grunig C. et Sieber T.N. (2012). Host species and strain combination determine growth reduction of spruce and birch seedlings colonized by root associated dark septate endophytes. *Environ. Microbiol.*, 14:1064–76.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J. et Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20: 933–956.
- Riehemann K., Behnke B. et Schulze-Osthoff K. (1999). Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.*, 442: 89-94.
- Rodrigues K.F. (1994). The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, 86: 376–385.
- Rodriguez R.J., White J.F., Arnold A.E., Redman R.S., White J.F. et Redman R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.*, 182: 314–330.
- Roos I.M.M. et Hattingh M.J. (1983). Scanning electron microscopy *Pseudomonas syringa*epv. Morsprunorum on sweet cherry leaves. *Phytopathologische Zeitschrift*, 108: 18–25.
- Roschek B.J., Fink R.C., McMichael M., Alberte R.S., Roschek B.J. et Fink Ryan C. (2009). Nettle extract (*Urtica dioica*) affects key receptors and enzymes associated with allergic rhinitis. *Phytoter Res.*, 23: 920-6.
- Rosier A., Bishnoi U., Lakshmanan V., Sherrier D.J. et Bais H.P. (2016). A perspective on inter-kingdom signaling in plant-beneficial microbe interactions. *Plant Mol. Biol.*, 90: 537–548.
- Rubio M.E., Quijada N.M., Pérez E., Dominguez S., Monte E. et Hermosa R. (2014). Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. *Applied and Environmental Microbiol.*, 80 : 1864-1873.

Références bibliographiques

- Rutto L.K., Xu Y., Ramirez E. et Brandt M. (2013). Mineral properties and dietary value of raw and processed stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *Int. J. Food Sci.* 2013: 1-9.
- Saad B., Zaid H., Shanak S. et kadan S. (2017). Antidiabetic medicinal plants, antidiabetes and anti-obesity medicinal plants and phytochemicals, *Springer International publication*, 104: 147-174
- Sachin N., Manjunatha B.L, Kumara P.M, Ravikanth G., Shweta S., Suryanarayanan T.S., Ganesha-iah K.N. et Shaanker R.U. (2013). Do endophytic fungi possess pathway genes for plant second-ary metabolites? *Current Science*, 104: 178–182
- Saha A. et Rahman M.S. (2008). Antimicrobial activity of crude extract from *Calycopteris floribunsa*. *Bang. J. Microbiol.*, 25: 137-139.
- Saikkonen K., Wäli P., Helander M. et Faeth S.H. (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends Plant. Sci.*, 9: 275–280.
- Salinas-Sánchez D.O., Arteaga-Najera G.L., Leon-Rivera I, Do-rado Ramirez O, Guadalupe V.C.M. et García N.V.M. (2009). Antimicrobial Activity of Medicinal Plants from theHuautila Sierra Biosphere Reserve in Morelos (México). *Polibotánica*, 28: 213-225.
- Sanchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food sci. Techno. Int.*, 8: 121-137.
- Sathe V. et Raghukumar S. (1991). Fungi and biomass in detritus of the seagrass *Thalassia hemprichii* (Ehrenberg) Ascherson. *Bot. Mar.*, 34: 271–277.
- Sato M., Ramarathnam N., Suzuki Y., Ohkubo T., Takeuchi M., et Ochi H. (1996). Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of red wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 37–41.
- Saul F.A., Rovira P., Boulot G., Damme E.J. et Peumans W.J. (2000). Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin, a superantgen presented by MHC molecules of class I and class II. *Structure*, 8:593-603.
- Schmidt K. (1983). The effect of an extract of *Dadix Urticae* and various secondary extracts on the SHBG of blood plasma in benign prostatic hyperplasia. *Fortschritte der Medizin*, 101: 713-716.
- Schöttner M., Gansser D. et Spiteller G. (1997). Lignans from roots of *Urtica dioica* and their metabolites bind to human sex hormone binding globulin (SHBG). *Planta Med.*, 63: 529-32.

Références bibliographiques

- Schulthess F.M., Faeth S.H., (1998). Distribution, abundances and association of the endophytic fungal community of *Arizona fescue* (*Festuca arizonica* Vasey). *Mycol.*, 90: 569–578.
- Schulz B., Wanke S., Draeger S. et Aust H.J. (1993). Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol. Res.* 97: 1447-1450.
- Sekeroglu N., Ozkutlu F., Deveci M., Dede O. et Yilmaz N. (2006). Evaluation of some wild plants aspect of their nutritinal values used as vegetable in eastern black sea region of Turkey. *Asian J. Plant Sci.*, 5: 185-9.
- Seregin I.V. et Ivanov V.B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Rus. J. Plant Physio.*, 48: 523-544.
- Sezik E., Yesilada E., Honda G., Takaishi Y., Takeda Y et Tanaka T. (2001). Traditional Medicine in Turkey X. Folk Medicine in Central Anatolia. *J. Ethnopharmacol.*, 75: 95-115.
- Shankar N.B., Shashikala J. et Krishnamurthy Y.L. (2008). Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, western Ghats, southern India. *Fung. Ecol.* 1: 89–93
- Sharon E., Chet I., Viterbo A., Bar-Eyal M., Nagan H., Samuels G.J. et Spiegel Y. (2007). Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and Role of the Gelatinous Matrix. *Eur. J. Plant Pathol.*, 118: 247–258
- Shiomi H.F., Silva H.S.A., Melo I.S.D., Nunes F.V. et Bettiol W. (2006). Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Sci Agri.*, 63: 32-39.
- Sibanda T., Olaniran A.O. et Okoh A.I. (2010). In Vitro antibacterial activities of crude extracts of *Garcinia kola* seeds against wound sepsis associated *S.aureus* strains. *J. Med. plants Res.*, 4: 710 – 716.
- Sieber T.N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biol. Rev.* 21: 75–89.
- Sikkema J., de Bont J.A. et Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59: 201–222.
- Silva A.C.D., Suassuna J.F., Melo A.S.D., Costa R.R. et Andrade W.L.D. (2017). Salicylic acid as attenuator of drought stress on germination and initial development of sesame. *Rev. Bras. Eng. Agr. Amb.* 21:156–162.

Références bibliographiques

- Sinclair J.B. et Cerkauskas R.F. (1996). Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In: Redlin S.C and Carris L.M (1998). Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution. Ed. St. Paul (MN), APS Press, p. 3-29.
- Singh R., Hussain S., Verma R. et Sharma P. (2012). Anti-mycobacterial screening of five india medicinal plants and partial purification of active extracts of *Cassia sophera* and *Urtica dioica* L., *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 6: 366-371.
- Singleton V.L. et Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16: 144-158.
- Smallman B.N. et Manedkjee A. (1981). The synthesis of acetylcholine by plants. *Biochem J* , 194: 361-4.
- Smith R.M. (2003). Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr.*, 1000: 25-31.
- Sökeland J. (2000). Combined sabal and *Urtica* extract compared with finasteride in men with benign prostatic hyperplasia: Analysis of prostate volume and therapeutic outcome. *BJU Int.*, 86: 439-442.
- Sonaimuthu V., Parihar S., Thakur J.P., Luqman S., Saiki D., Chanotiya C.S., Jhonpaul M. et Negi A.S. (2010). Tenuazonic acid: A promising antitubercular principle from *Alternaria alternata*. *Microbiol. Res.*, 2: 63-65.
- Song S., Otkur M., Zhang Z. et Tang Q. (2007). Isolation and characterization of endophytic microorganisms in *Glaucochyta inflat Bat*. From Xinjiang. *Microbiol.*, 5: 867-870.
- Spina M., Cuccioloni M., Sparapani L., Acciarri S., Eleuteri A.M., Fioretti E. et Angeletti M. (2008). Comparative evaluation of flavonoid content in assessing quality of wild and cultivated vegetables for human consumption. *J. Sci. Food Agric.*, 88: 294-304.
- Spurr H.W. et Welty R.E. (1975). Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotina spp.* *Phytopathol.*, 65:417-422.
- Stapleton P.D., Shah S. et Hamilton-Miller J.M.T. (2004). Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3- O acylcatechins. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 24:374-380.
- Starvic B. (1994). Quercetin in our diet: From potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin. Biochem.*, 27: 245-248.

Références bibliographiques

- Stefanova M., Leiva A., Larrinaga L., Coronado M.F. (1999). Actividad Metabólica de Cepas de *Trichoderma Spp* Para El Control de Hongos Fitopatógenos Del Suelo. *Rev. Fac. Agron.*, 16: 509–516.
- Stein E., Molitor A., Kogel, K.H. et Waller F. (2008). Systemic resistance in Arabidopsis conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiol.*, 49: 1747–1751.
- Stierle A., Strobel G.A. et Stierle D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endo- phytic fungus of Pacific yew. *Sci*, 260: 214–216.
- Stone J.K., Polishook J. et White J.R. (2004). Endophytic fungi: Biodiversity of Fungi. *Inv. Mon. Meth.*, 2: 241-270.
- Strakowska J., Błaszczuk L. et Chełkowski J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this Fungus. *J. Basic. Microb.*, 54: 1-12.
- Strobel G.A. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 22: 315–333.
- Strobel G.A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.*, 5: 535-544.
- Strobel G.A. et Daisy B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 491-502.
- Strobel G.A, Stierle A., Stierle D. et Hess W.M. (1993). *Taxomces andreanaea* proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon*, 47: 71-78.
- Strobel G.A., Daisy B., Castillo U. et Harper J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.*, 67: 257–268
- Strobel G.A., Ford E., Worapong J., Harper J.K., Arif A.M., Fung P.C.W. et Chan K. (2002). Ispoestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochem.*, 60: 179-183.
- Strobel G.A., Li J.Y., Sugawara F., Koshino H., Harper J., Hess W.M et Oocydin A. (1999). A chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiol.*, 145: 3557-3564
- Suryanarayanan T.S. (2013) Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecol.*, 6: 561–568.

Références bibliographiques

- Suryanarayanan T.S. et Thennarasan S. (2004). Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity*, 15: 197-204.
- Suryanarayanan T.S. Wittlinger S.K. et Faeth S.H. (2005). Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycol. Res.*, 109: 635–639.
- Szentmihályi K., Kéry A.M., Then Lakatos B., Sándor Z. et Vinkler P. (1998). Medicinal plant teas recommended as nutritional source for element supplementation. *Phytother. Res.* 12: 163–166.
- Taguri T., Tanaka T., et Kouno I. (2006). Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol. Pharm. Bull.*, 29: 2226–2235.
- Tahri A., Yamani S., Legssyer A., Aziz M., Mekhfi H. et Bnouham M. (2000). Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *J. Ethnopharmacol.*, 73: 95-100.
- Tamimi R.M., Hankinson S.E., Campos H., Spiegelman D., Zhang S., Colditz G.A., Willett W.C. et Hunter D.J. (2005). Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 161: 153–160.
- Tan R.X. et Zou W.X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 448–59.
- Tejesvi M.V., Mahesh B., Nalini M.S., Prakash H.S., Kini K.R., Subbiah V. et Shetty H.S. (2005). Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 1535–1540.
- Tejesvi M.V., Nalini M.S., Mahesh B., Parkash S.H., Kinni R.K. et Shetty H.S. (2007). New hopes from endophytic fungal secondary metabolite. *Bol. Soc. QuimMex.*, 1: 19–26.
- Testai L., Chericoni S. et Calderone V. (2002). Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) root extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *J. Ethnopharmacol.*, 81:105-9.
- Thines E., ANKE H. et WEBER R.W.S. (2004). Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycol. Res.*, 108: 14–25.
- Thounaojam T.C., Panda P., Mazumdar P., Kumar D., Sharma G.D., Sahoo L. et Sanjib L. (2012). Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Phy. Bioch.* 202: 33-39.
- Tissier Y. (2009). Les vertus de l'ortie. Tredaniel. Paris: Le Courrier du Livre. p.160.

Références bibliographiques

- Tita B., Faccendini P., Bello U., Martinoli L. et Bolle P. (1993). *Urtica dioica* L.: pharmacological effect of ethanol extract. *Pharmacol. Res.*, 27:21-2.
- Toghuego R.M.K., Ejiya I.E., Sahal D., Yazdani S.S., Boyom F.F. (2017b). Production of cellulolytic enzymes by endophytic fungi isolated from cameroonian medicinal plants. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 6 :1264–1271.
- Toghuego R.M.K., Zabalgoceazcoa I., Vázquez de Aldana B.R., Boyom F.F. (2017a). Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. *South African J. Bot.*, 109 : 146–153.
- Toju H., Yamamoto S., Sato H. et Tanabe A.S. (2013). Sharing of diverse mycorrhizal and root-endophytic fungi among plant species in an oak-dominated cool-temperate forest. *PLoS One*, 8: e78248.
- Toldy A., Atalay M., Stadler K., Sasvari M., Jakus J. et Jung K.J. (2009). The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. *J. Nutr. Biochem.*, 20: 974-81.
- Toldy A., Stadler M.K., Sasvári J., Jakus K.J., Jung H.Y. et Chung Z. (2005). The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 65: 487–493.
- Toofanee S.B. et Dulymamode R. (2002). Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. *Fungal Divers.*, 11: 169-175.
- Tuão Gava C.A. et Pinto J.M. (2016). Biocontrol of melon wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. melonis using seed treatment with *Trichoderma spp.* and liquid compost. *Biol. Control*, 97: 13-20.
- U'Ren J.M., Lutzoni F. et Miadlikowska J. (2012). Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *Am. J. Bot.*, 99: 898–914.
- Uncini M.R.E., Zaccaro L. et Tomei P.E. (2005). Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *J. Ethnopharmacol.*, 98: 323-7.
- Unterseher M. et Schnittler M. (2010). Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fung. Ecol.*, 3: 366–378.
- Upton R. (2013). Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *J. Herb. Med.*, 3: 9–38.

Références bibliographiques

- Uzma F., Mohan C.D., Hashem A., Konappa N.M., Rangappa S., Kamath P.V., Singh B.P., Mudili V., Gupta V.K., Siddaiah C.N., Chowdappa S., Alqarawi A.A. et Allah E.A. (2018). Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: a review. *Front. Pharmacol.*, 9 : 309.
- Valgas C., Machado de Souza S., Smania E.F.A. et Smania A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz. J. Microbiol.*, 38: 369-380.
- Valnet J. (1983). *Phytothérapie: traitement des maladies par les plantes.*- 5ème édition. Paris: Maloine. p. 942.
- Van Damme E.J.M., Broekaert W.F., Peumans W.J. (1988). The *Urtica dioica* agglutinin is a complex mixture of isolectins. *Plant Physiol.*, 86: 598-601
- Van Wees S.C., De Swart E.A., van Pelt J.A., van Loon L.C. et Pieterse C.M. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*97: 8711-8716.
- Vaz A.B.M., Fonseca P.L.C. et Badotti F. (2018). A multiscale study of fungal endophyte communities of the foliar endosphere of native rubber trees in eastern amazon. *Sci. Rep.*8:16151
- Venugopalan A. et Srivastava S. (2015). Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv*, 33: 873–887.
- Verma S.C., Ladha J.K., Tripathi A.K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.* 91: 127–141.
- Vialli D.M., Barbetta F., Zanotti L. et Mihalyi K. (1973). Estendibilità del concetto di sistema cellulare enterocromaffine ai vegetali. I. Inquadramento della questione e contributo alla conoscenza istochimica dei peli di *Urtica dioica* L. *Acta Histochemica*, 45: 270–80.
- Villano D., Fernández-Pachón M. S., Troncoso A. M. et García-Parrilla M.C. (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta.*, 538: 391–398.
- Vogl C.R. et Hartl A. (2003). Production and processing of organically grown fiber nettle (*Urtica dioica* L.) and its potential use in the natural textile industry: a review. *Am. J. Altern. Agric.*18: 119–128.

Références bibliographiques

- Wagner H., Willer F., Samtleben R. et Boos G. (1994). Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (*Urtica dioica*) roots. *Phytomedicine*, 1: 213-24.
- Wakelin S., Warren R., Harvey P. et Ryder M. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium spp.* closely associated with wheat roots. *Biol. Fertil. Soils*, 40:36–43.
- Wall M.E. et Wani M.C. (1995). Camptothecin and taxol: Discovery to clinic—thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res.*, 55: 753–760.
- Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., von Wettstein D., Franken P. et Kogel K.H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 13386–13391.
- Wang J.L., Li T., Liu G.Y., Smith J.M. et Zhao Z.W. (2016). Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zeamays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. *Sci. Rep.*, 6: 22028.
- Wang A., Yin R., Zhou Z., Gu G., Dai J., Lai D. et Zhou L. (2020). Eremophilane-Type Sesquiterpenoids From the Endophytic Fungus *Rhizopycnis vagum* and Their Antibacterial, Cytotoxic, and Phytotoxic Activities. *Front. Chem.*, 8 : 1-17
- Webber J.F. et Gibbs J.N. (1984). Colonization of elm barks by *Phomopsis oblonga*. *Transactions of the British Mycol. Soc.*, 82: 348-352.
- Wetherilt H. (1992). Evaluation of *Urtica* species as potential sources of important nutrients. *Dev. Food Sci.*, 29: 15-25.
- Wetherilt H. (2003). Nutritional evaluation of *Urtica* species. In: Kavalali G. (2003). *Urtica*. Ed. Taylor & Francis, London and New York, p. 84-92.
- White T.J., Bruns T., Lee S. et Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18: 315-22.
- Wichtl M. et Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Lavoisier Tec & Doc, Paris ; in : Delahaye J. (2005). Utilisation de l'ortie –*Urtica dioica*. *Thèse de doctorat en pharmacie*. Université de Rouen France.
- Wilkinson S. et Davies W.J. (2002). ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ.*, 25: 195–210.
- Wilson D. et Carroll G.C. (1994). Infection studies of *Discula quercina* an endophyte of *Quercus garryana*. *Mycol.*, 86: 635–647.

Références bibliographiques

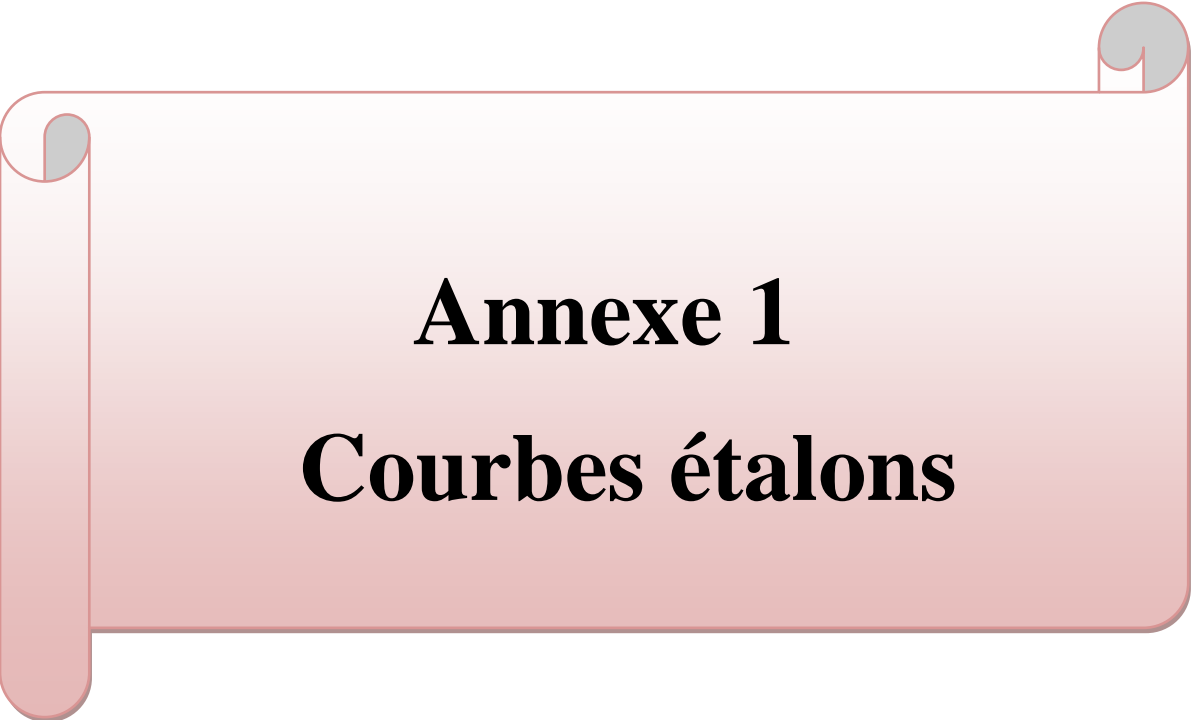
- Wolbang C.M., Chandler P.M., Smith J.J. et Ross J.J. (2004). Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. *Plant Physiol.*, 134: 769–776.
- Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M. et Crous P.W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75: 171–212.
- Wu L., Han T., Li W., Jia M., Xue L. et Rahman K. (2013). Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China. *Curr. Microbiol.*, 66: 40–48.
- Wu Q.S., Zou Y.N., Liu W., Ye X.F., Zai H.F. et Zhao L.J. (2010). Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with mycorrhiza: changes in leaf antioxidant defense systems. *Plant Soil Environ.*, 56: 470–475.
- Xiao Z.W., Xiao H.L., Jie X., Ming M.Z., Yun Y., Ying Z., Phillip C., Cheng S.Y. et Quan X.W. (2014). Pyrone derivatives from the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* SP-07 of Chinese herbal medicine *Salvia przewalskii*. *Fitoterapia*, 99: 184–190.
- Xie Z.C., Chu Y.K., Zhang W.J. et Lang D.Y. (2019). *Bacillus pumilus* alleviates drought stress and increases metabolite accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Environ. Exp. Bot.*, 158:99–106.
- Xu X., Zhao S., Wei J., Fang N., Yin L. et Sun J. (2012). Porric acid D from marine-derived fungus *Alternaria* sp. isolated from Bohai Sea. *Chem. Nat. Compd.*, 47: 893–895.
- Ya C., Gaffney S.H., Lilley T.H. et Haslam E. (1988). Carbohydrate-polyphenol complexation. Hemingway R.W. et Karchesy J.J. (1990). Chemistry and Significance of Condensed Tannins, Ed. NY: Plenum Press New York (NY), p. 553.
- Yagi A., Okamura N., Haraguchi H. Abo T. et Hashimoto K. (1993). Antimicrobial tetrahydroanthraquinones from a strain of *Alternaria solani*. *Phytochem.*, 33: 87–91.
- Yan-de J., Zhen-li H. et Xiao-e Y. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 8 : 192–207.
- Yan-Ling L., Xiao-Ming X., Zheng-Yao C., Ren-Jiu S., Zeng-Min M., Jing D. et Gang-Ping H. (2015). The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge.f. *alba* are a potential source of natural antioxidants. *Botanical Studies*, 56:5.
- Yigit D., Yigit N. et Ozgen U. (2009). An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. *Mycoses*, 52: 135–140.
- Yilmaz B., Basar Ö., Aktas B. et Altinbas A. (2014). Effects of *Urtica dioica* extract on experimental acute pancreatitis model in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 7: 1313-8.

Références bibliographiques

- You J., Zhang J., Wu M., Yang L., Chen W. et Li G. (2016). Multiple Criteria-based Screening of *Trichoderma* isolates for Biological Control of *Botrytis cinerea* on Tomato. *Biol. Control*, 101: 31-38.
- Young C.A., Felitti S., Shields K., Spangenberg G., Johnson R.D., Bryan G.T., Saikia S. et Scott B. (2006). A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genet. Biol.*, 43: 679–693.
- Yuan Z., Zhang C., Lin F., Kubicek C.P. (2010). Identity, diversity and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in rare wild rice roots (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:1642–52
- Yunuskhodzhaeva N.A., Abdullabekova V.N., Ibragimova K.S. et Mezhlumyan L.G. (2014). Amino-acid composition of *Urtica dioica* leaves and *Polygonum hydropiper* and *P. aviculare* herbs. *Chem. Nat. Comp.*, 50: 288-298.
- Zabalgogezcoa I. (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Span. J. Agric. Res.*, 6: 138-146.
- Zaferanloo B., Pepper SA., Coulthard SA., Redfern CPF. et Palombo EA. (2018). Metabolites of endophytic fungi from Australian native plants as potential anticancer agents. *FEMS Microbiol. Lett.*, 365 : e078.
- Zaurov D.E., Bonos S., Murphy J.A., Richardson M. et Belanger F.C. (1984). Endophyte infection can contribute to aluminium tolerance in fine fescues. *Crop Sci.* 41: 1981–1984.
- Zhang D., Tao X. et Chen R. (2015b). Pericoannosin A, a polyketide synthase nonribosomal peptide synthetase hybrid metabolite with new carbon skeleton from the endophytic fungus *Periconia* sp. *Org. Lett.*, 17: 4304–4307.
- Zhang S., Gan Y. et Xu B. (2016). Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Front. Plant. Sci.*, 7: 1-11.
- Zhang S., Gan Y., Xu B. et Xue Y. (2014). The Parasitic and Lethal Effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. *Biol. Control*, 72: 1–8.
- Zhang G., Sun S., Zhu T., Lin Z., Gu J., Li D. et Gu Q. (2011). Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochem.*, 72: 1436–1442.

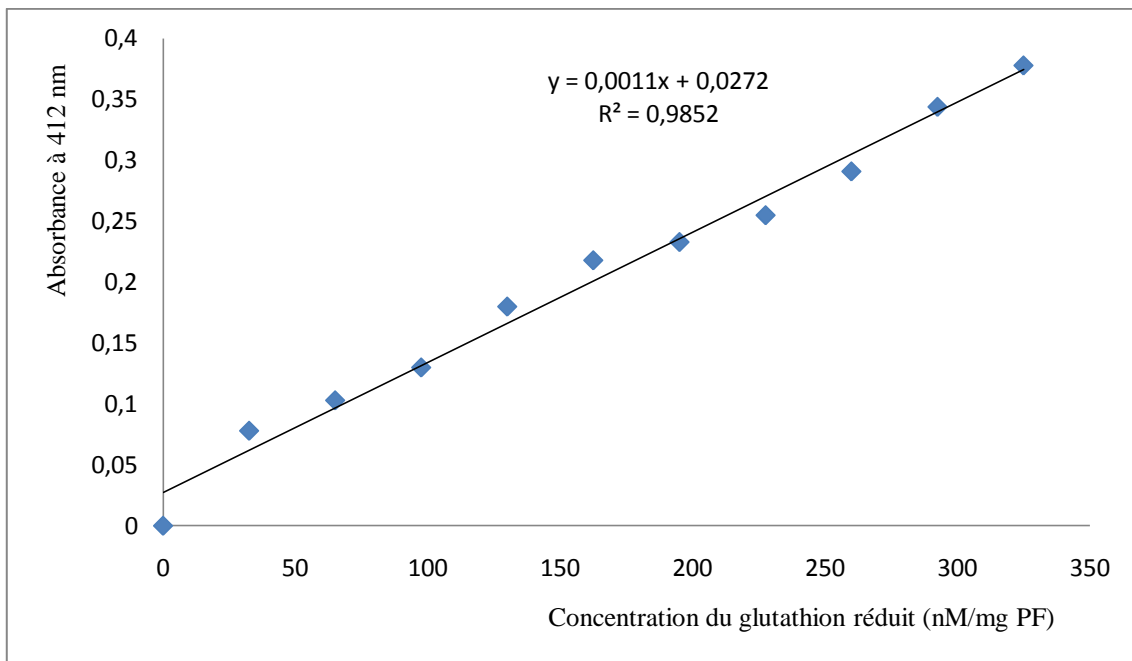
Références bibliographiques

- Zhang J.Y., Tao L.Y., Liang Y.J., Chen L.M., Mi Y.J. et Zheng L.S. (2010). Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. *Mar. Drugs*, 8: 1469–1481
- Zhang B., Salituro G., Szalkowski D., Li Z., Zhang Y., Royo I., Vilella D., Dez M.T., Pelaez F., Ruby C., Kendall R.L., Mao X., Griffin P., Calaycay J., Zierath J.R., Heck J.V., Smith R.G. et Moller D.E. (1999). Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*, 284: 974–981.
- Zhang W.J., Wei W., Shi J., Chen C., Zhao G., Jiao R. et Tan R., (2015a). Natural phenolic metabolites from endophytic *Aspergillus sp.*IFB-YXS with antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25: 2698–2701.
- Zhang X., Li G., Ma,J., Zeng Y., Ma W., et Zhao P. (2010). Endophytic fungus *Trichothecium roseum* LZ93 antagonizing pathogenic fungi in vitro and its secondary metabolites. *J. Microbiol.*, 48: 784–790.
- Zhang Y., Han T., Ming Q., Wu L., Rahman K. et Qin L. (2012). Alkaloids produced by endophytic fungi: a review. *Nat. Prod. Commun.*, 7: 963-968.
- Zhang Y., Zhou Y., Zhang X., Duan T. et Nan Z. (2018). Effects of *Epichloë* endophyte on antioxidant enzymes activities, photosynthesis and growth of three ecotypes of *Elymus dahuricus*. *Front. Agr. Sci. Eng.* 5: 148-158.
- Zhang Y.Z., Sun X., Zechner D., Sachs B., Current W., Gidda J., Rodriguez M. et Chen S.H. (2001). Synthesis and antifungal activities of novel 3-amido bearing pseudomycin analogs. *Bioorg. Med. Chem.*, 11: 903-907.
- Zhao J., Shan T., Mou Y. et Zhou L. (2011) Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini Rev. Med. Chem.*, 11:159–168.
- Zheng C.J., Shao C.L., Guo Z.Y., Chen J.F., Deng D.S., Yang K.L., Chen, Y.Y., Fu X.M., She Z.G. et Lin Y.C. (2012). Bioactive hydroanthraquinones and anthraquinone dimers from a soft coral-derived *Alternaria sp.* fungus. *J. Nat. Prod.*, 75: 189–197.
- Ziyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M., Benjelloun W. (1997). *J. Ethnopharmacol.*, 58: 45–54.

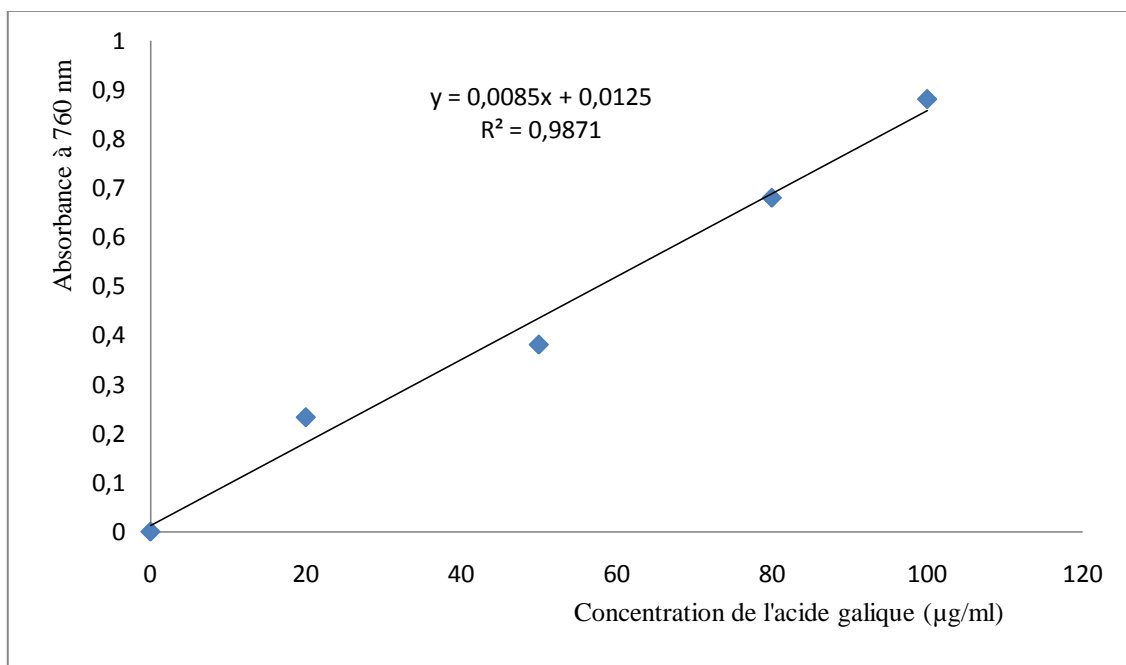


Annexe 1
Courbes étalons

Annexes

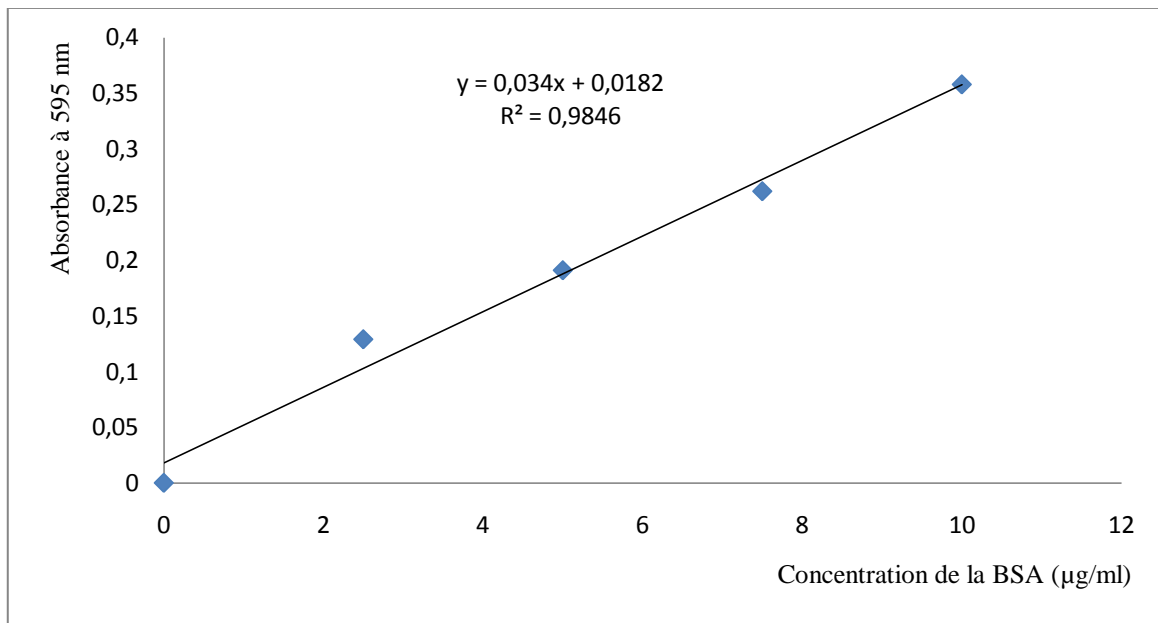


Annexe 1a : Courbe d'étalon pour le dosage des thiols totaux.



Annexe 1b : courbe d'étalon pour le dosage des phénols totaux.

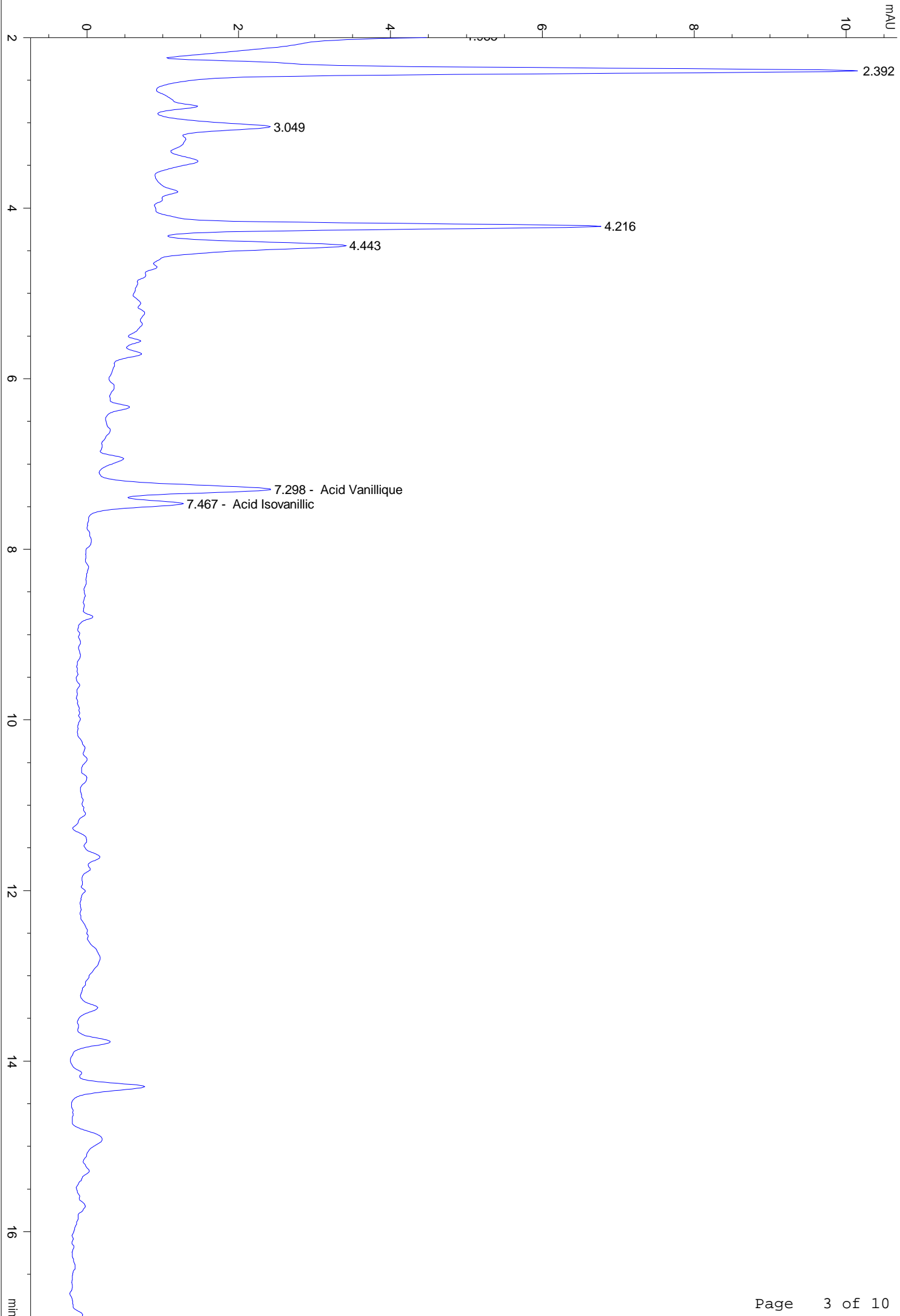
Annexes

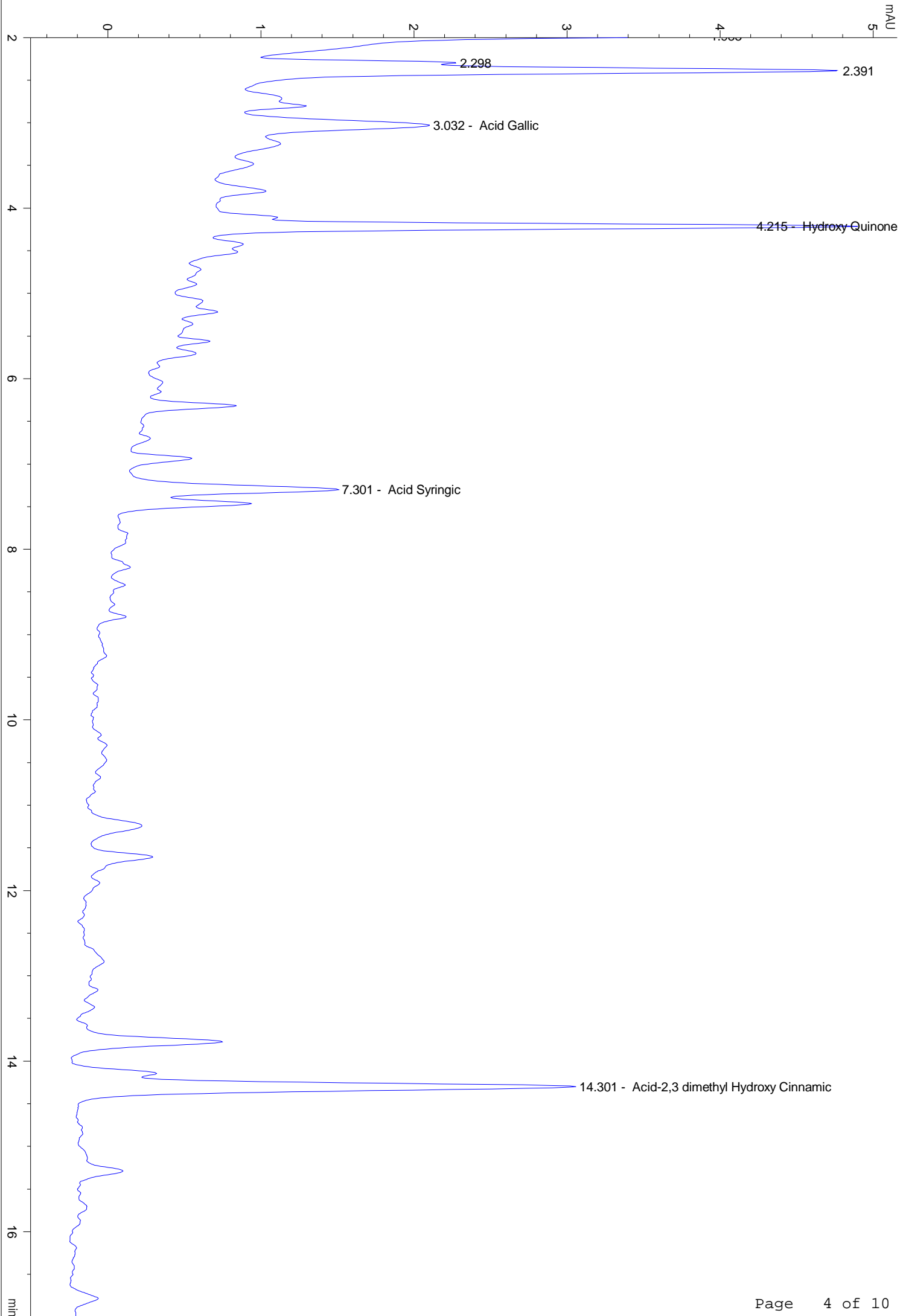


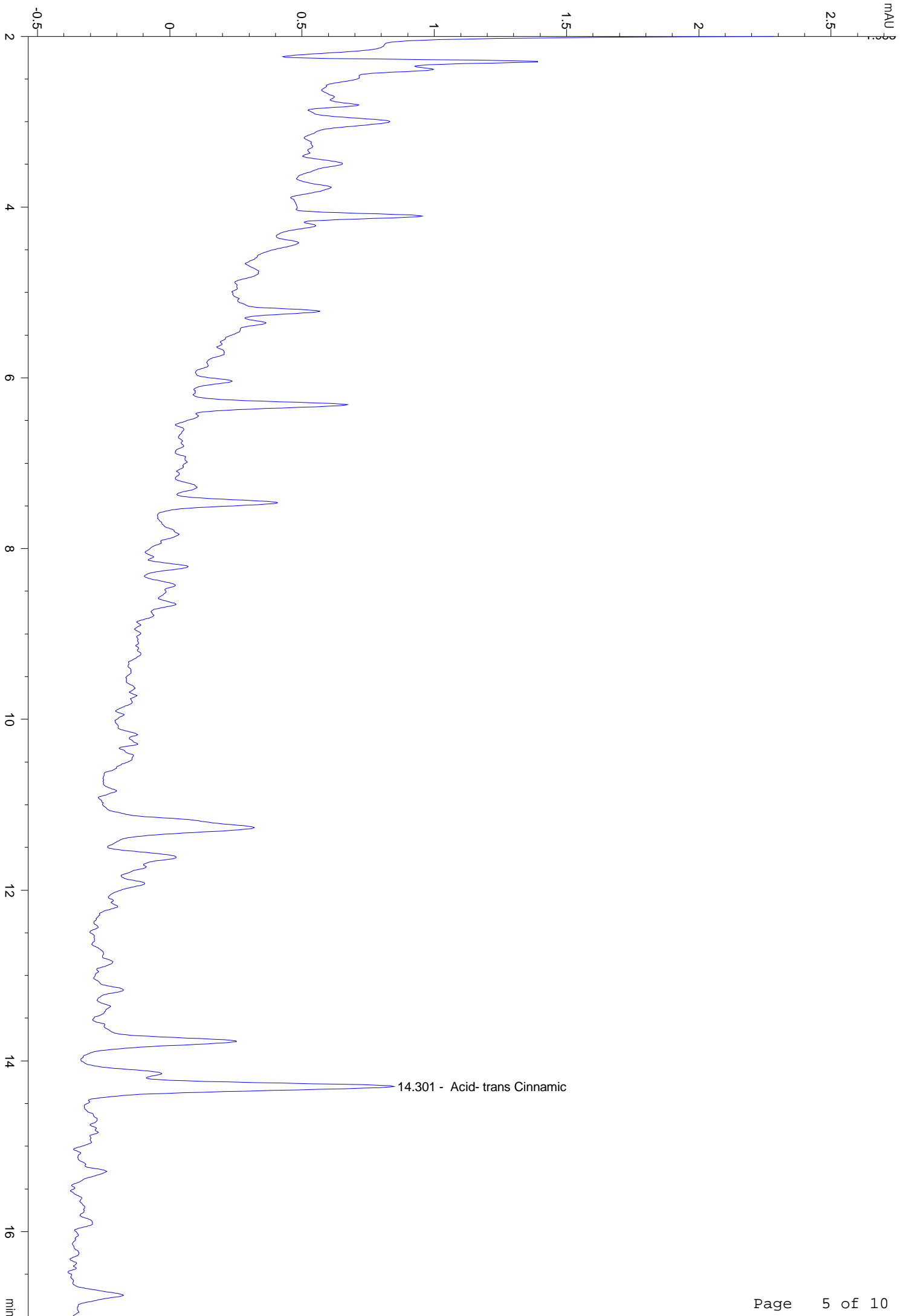
Annexe 1c : Courbe d'étalon pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

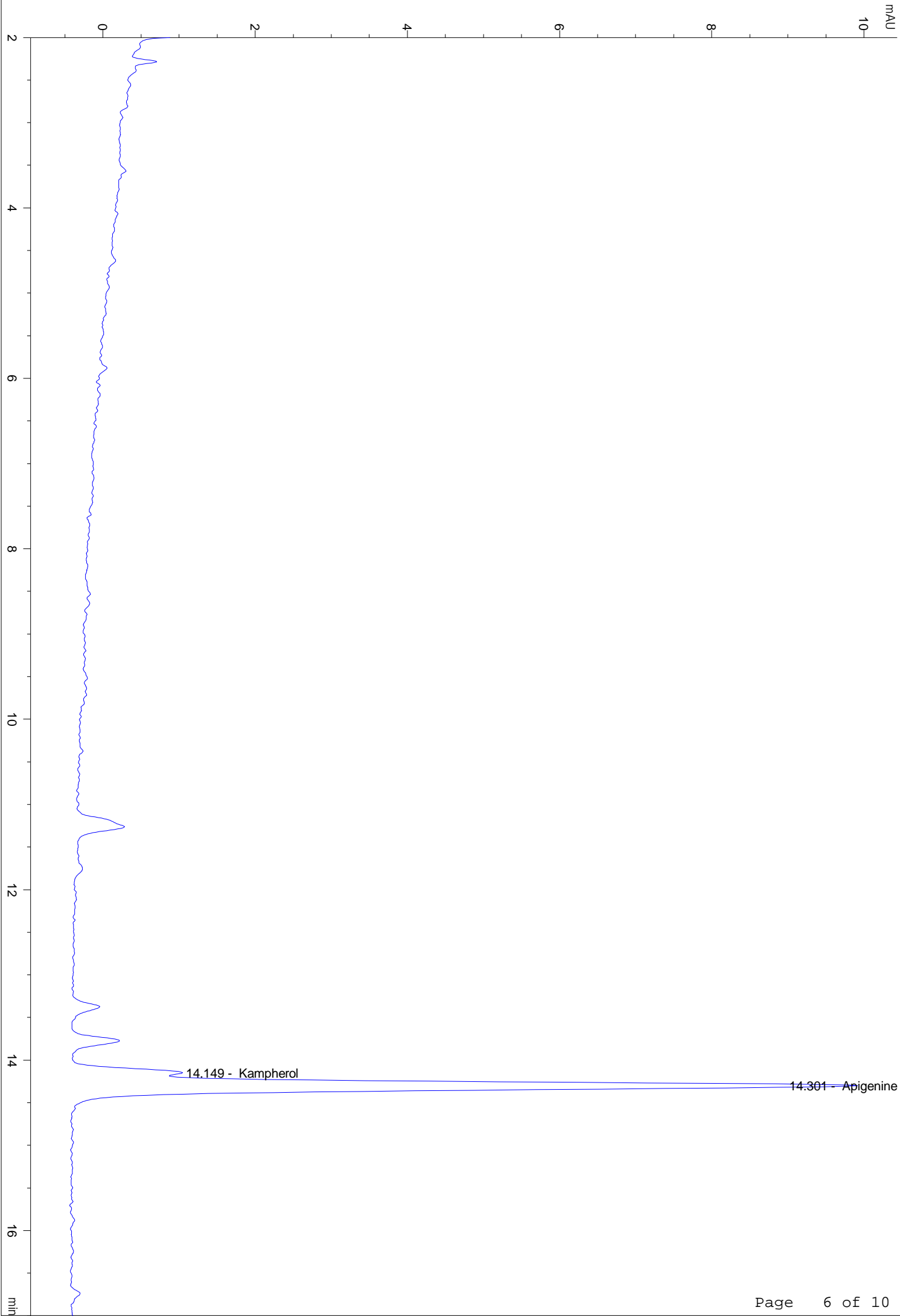


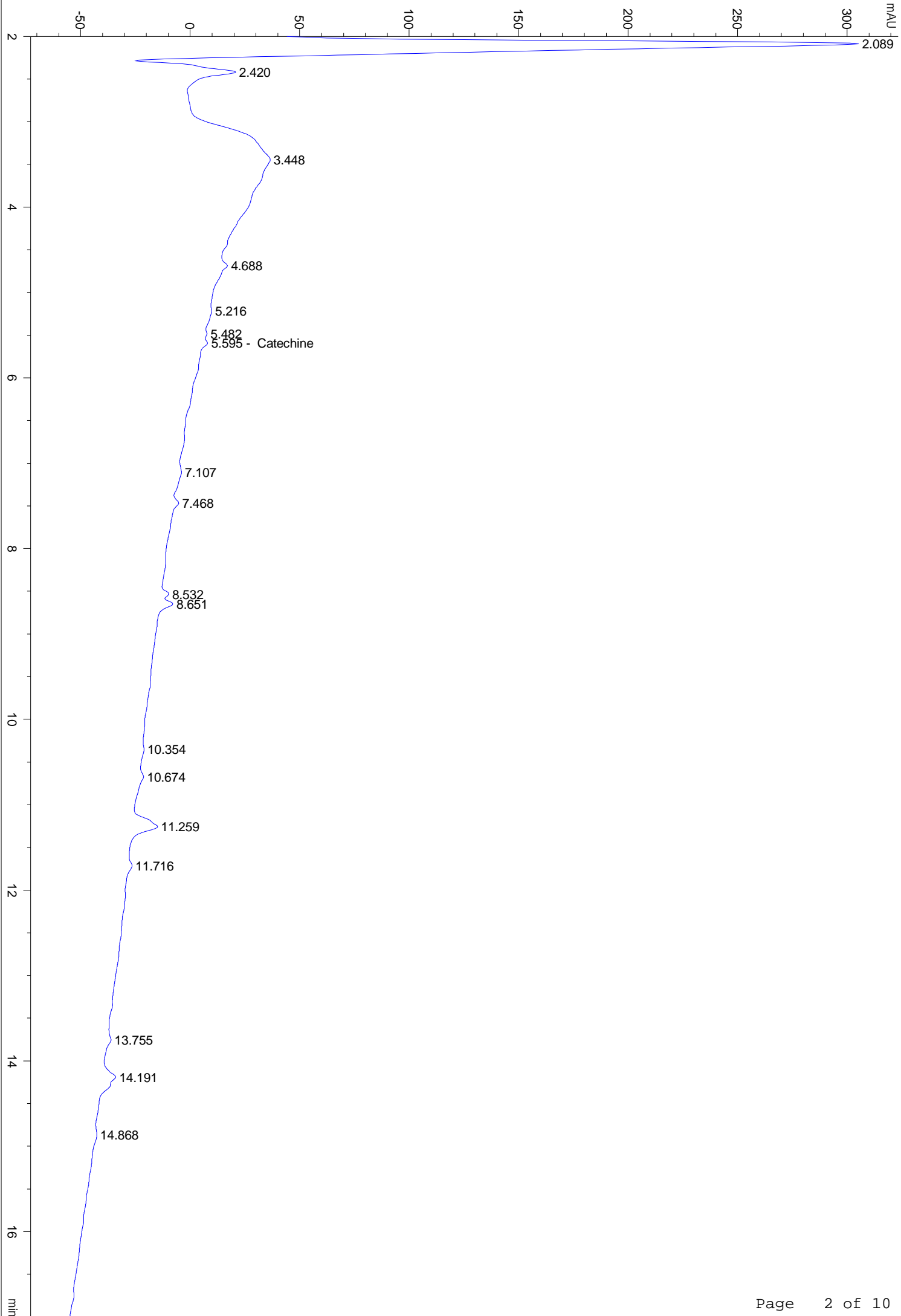
Annexe 2
Profils polyphénoliques

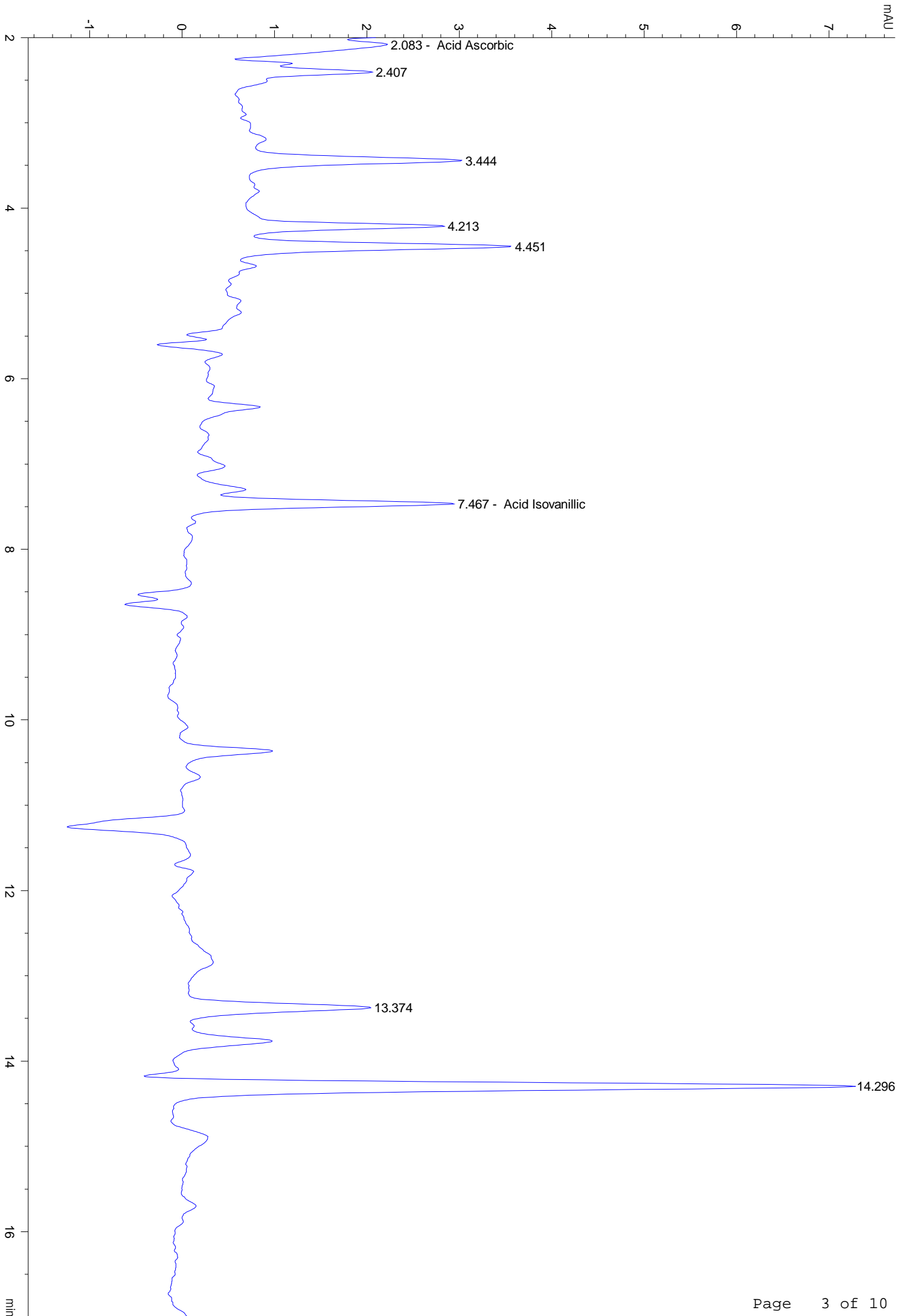


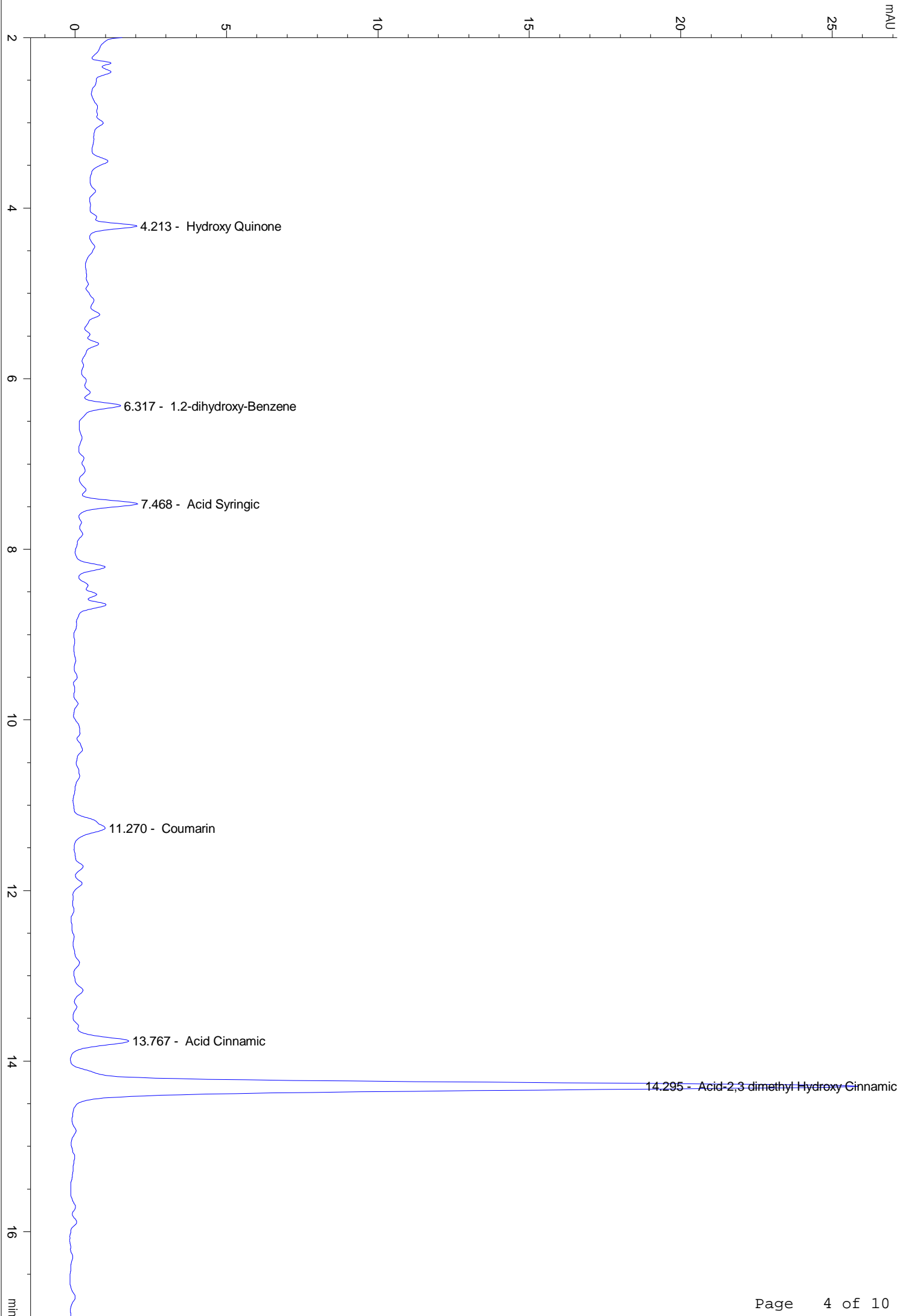


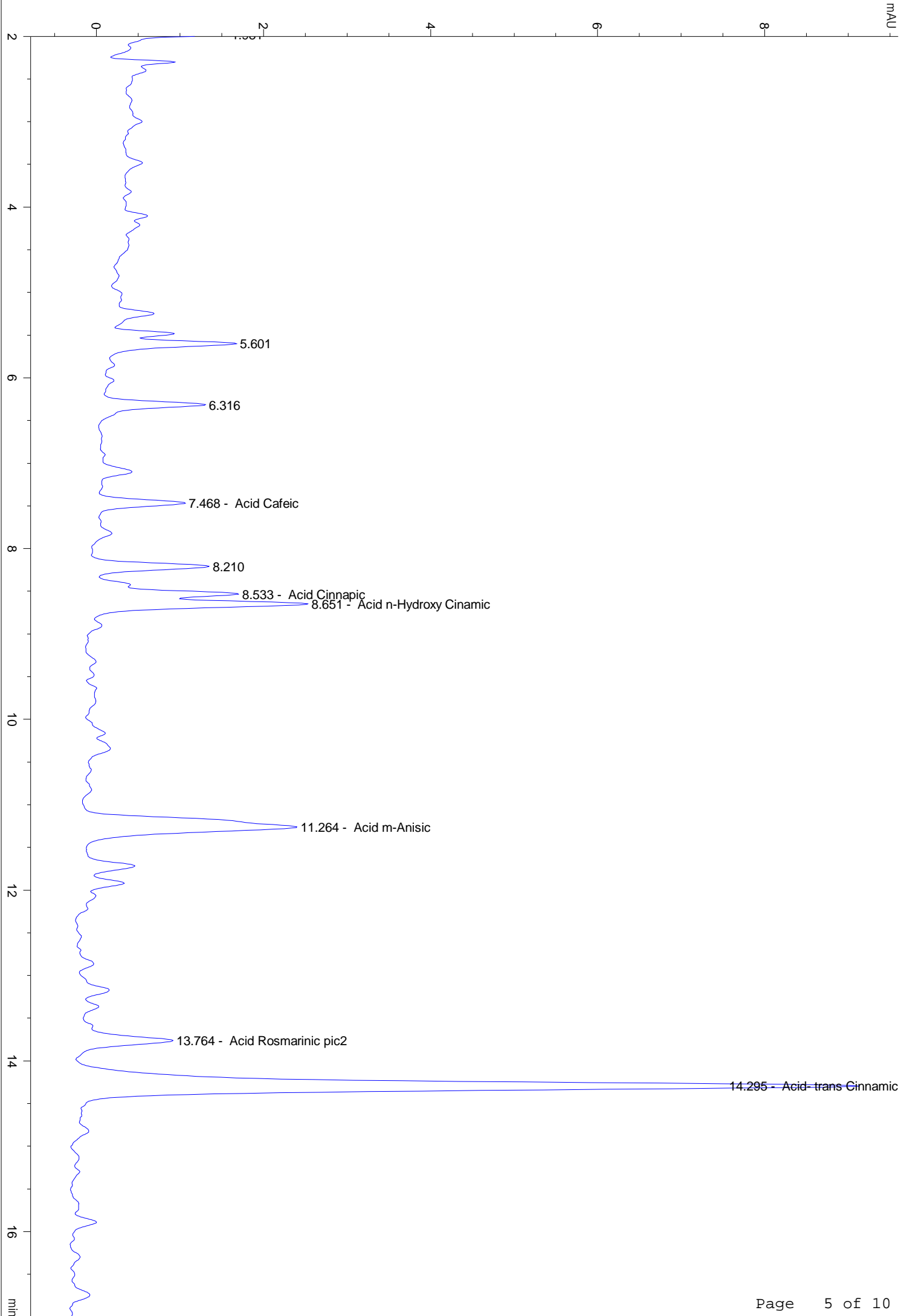


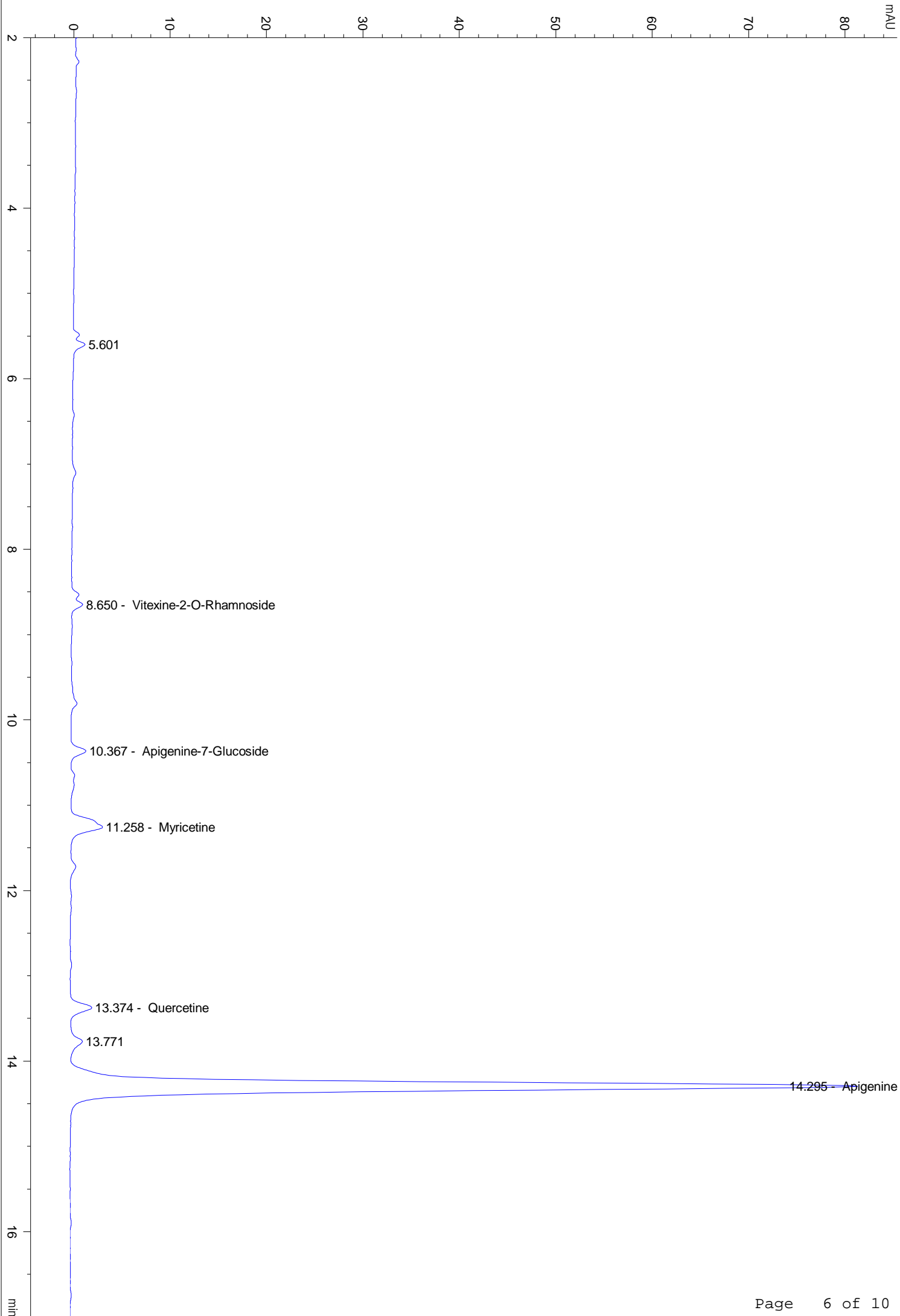


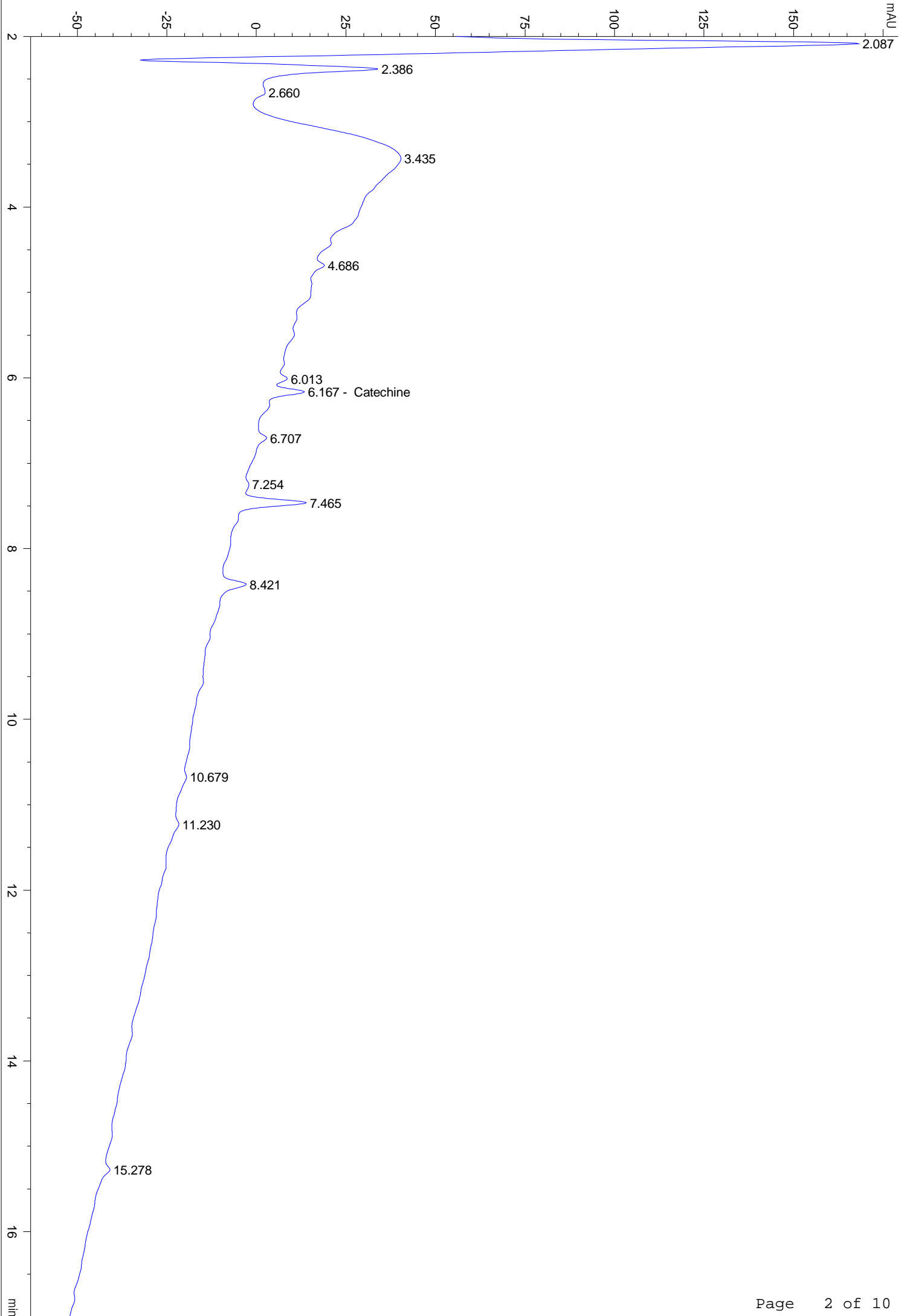


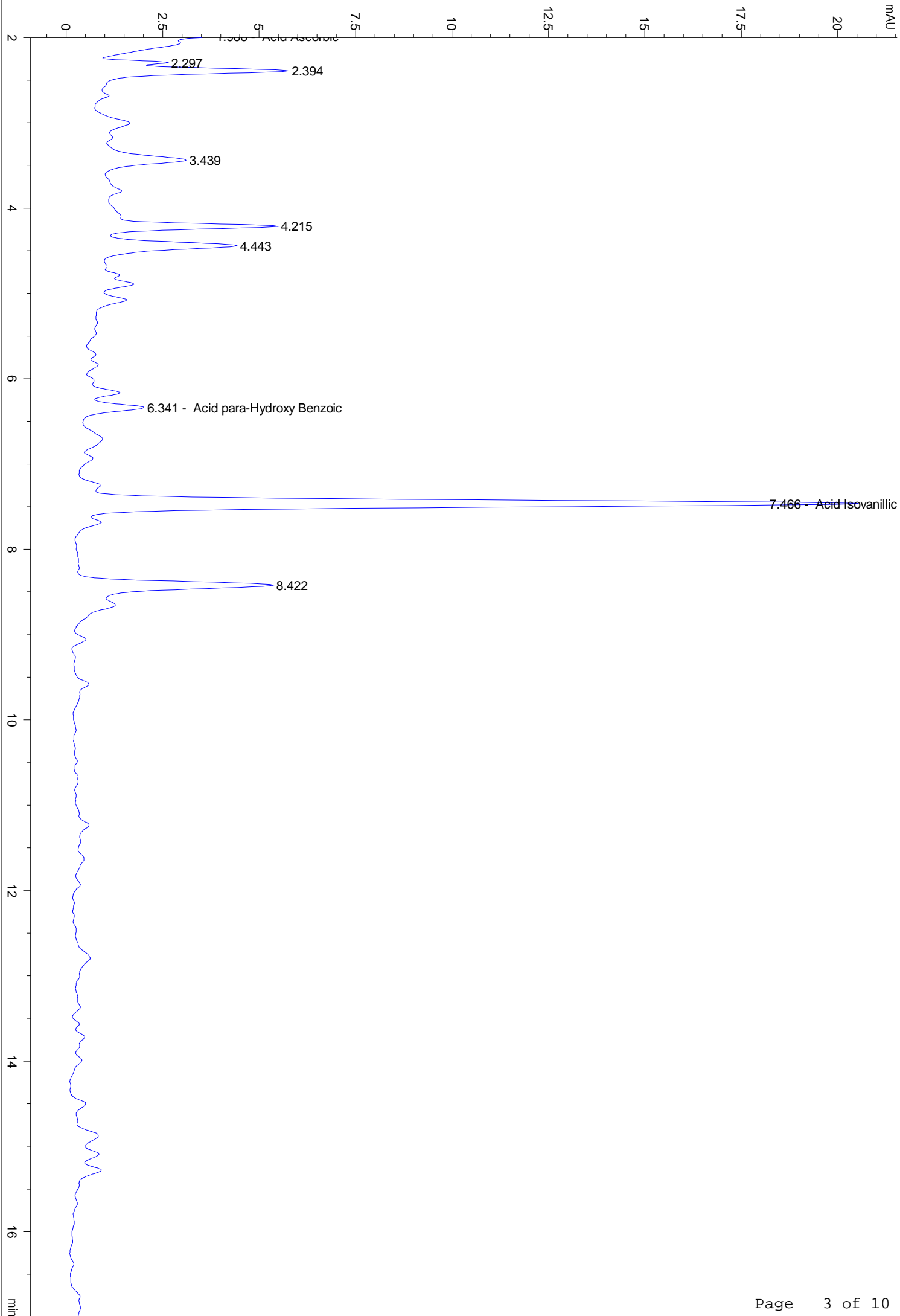


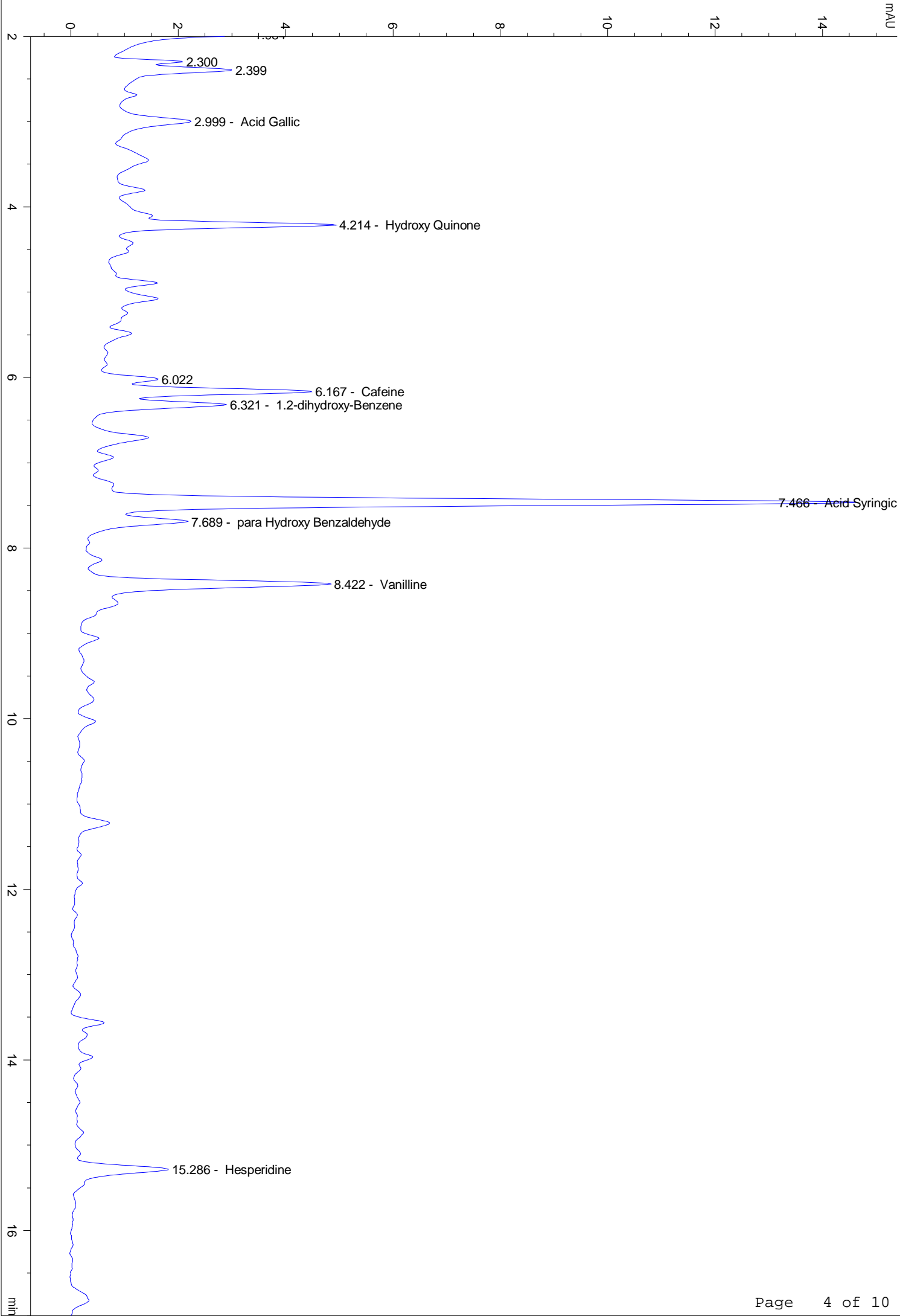


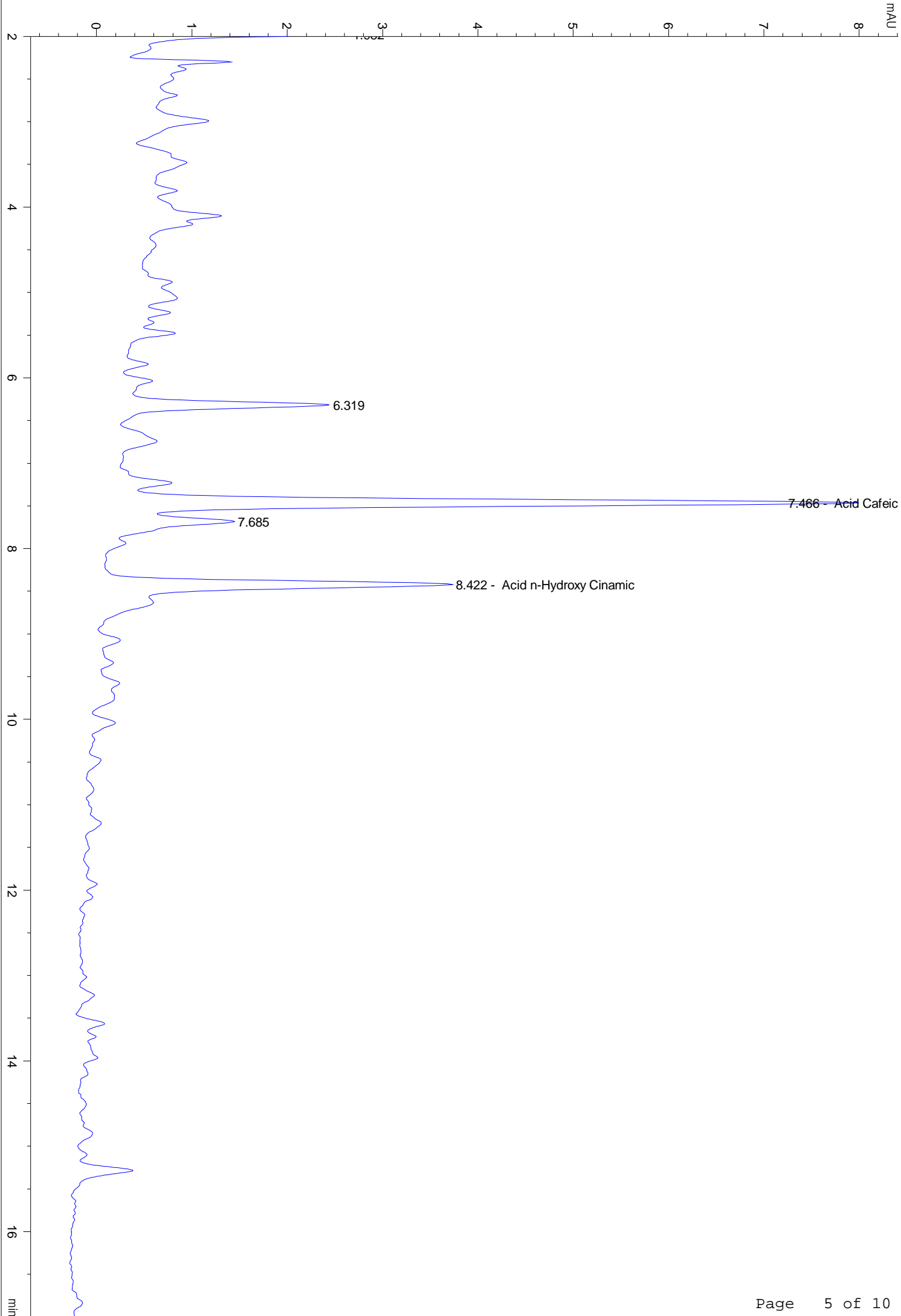


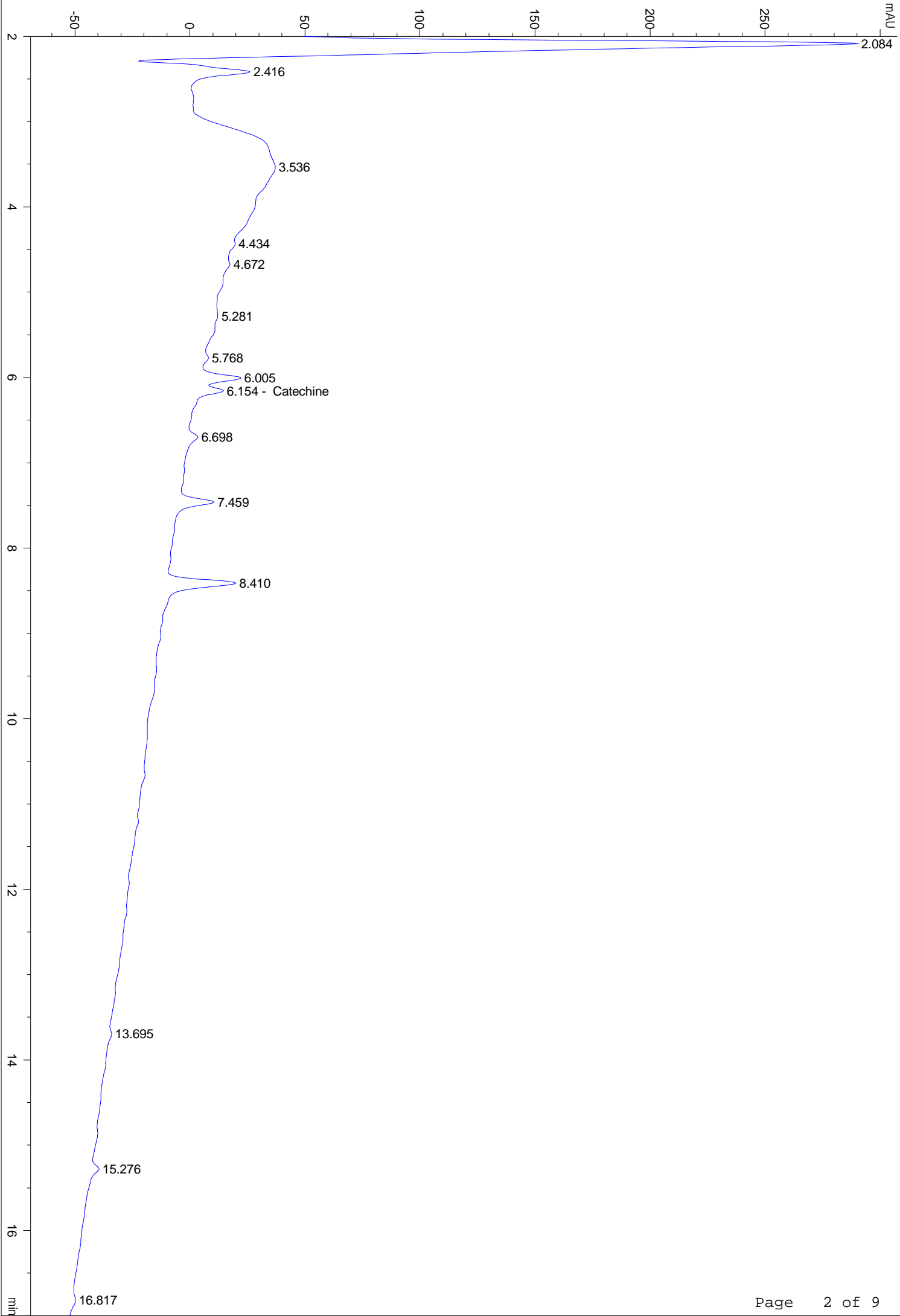


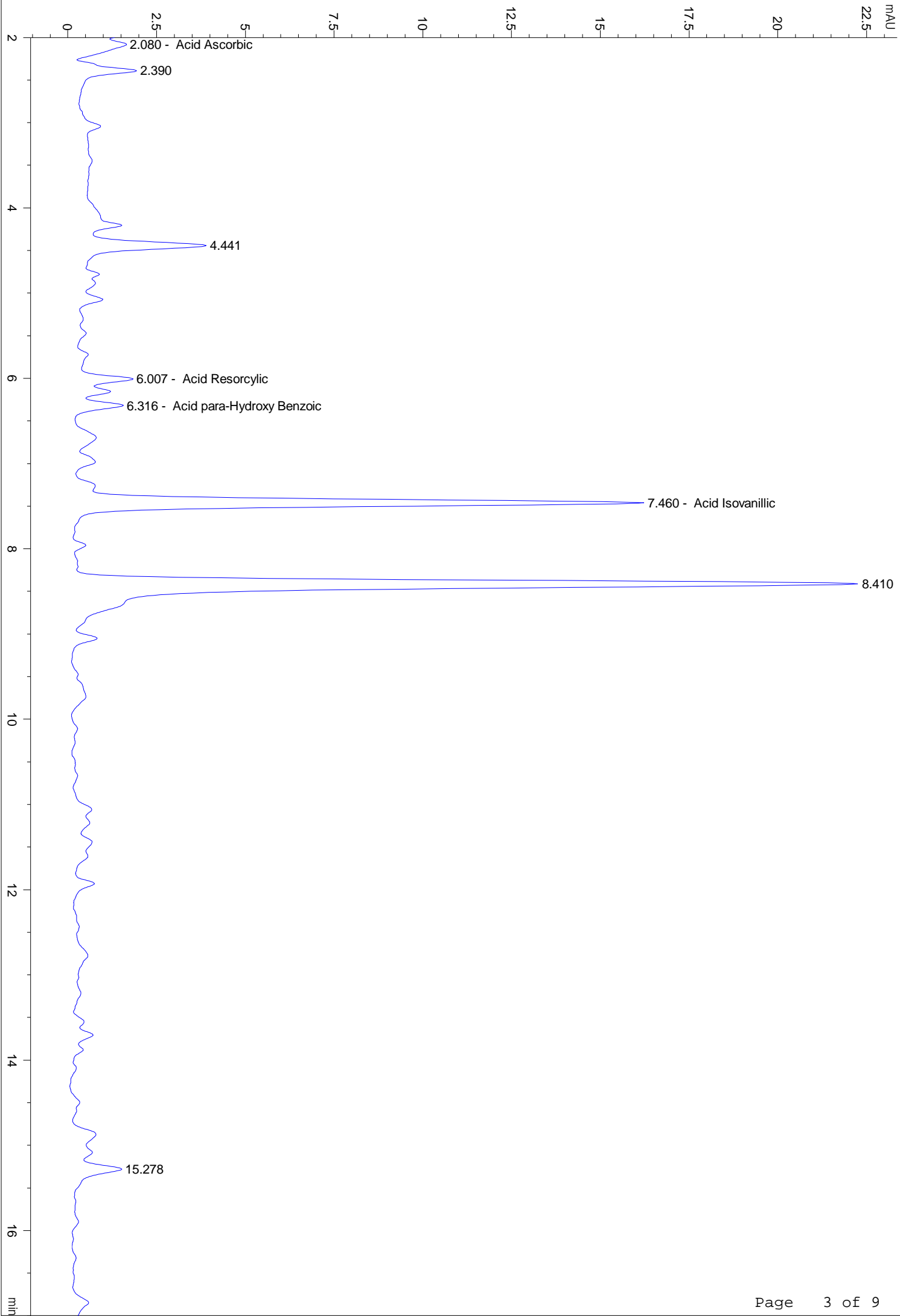


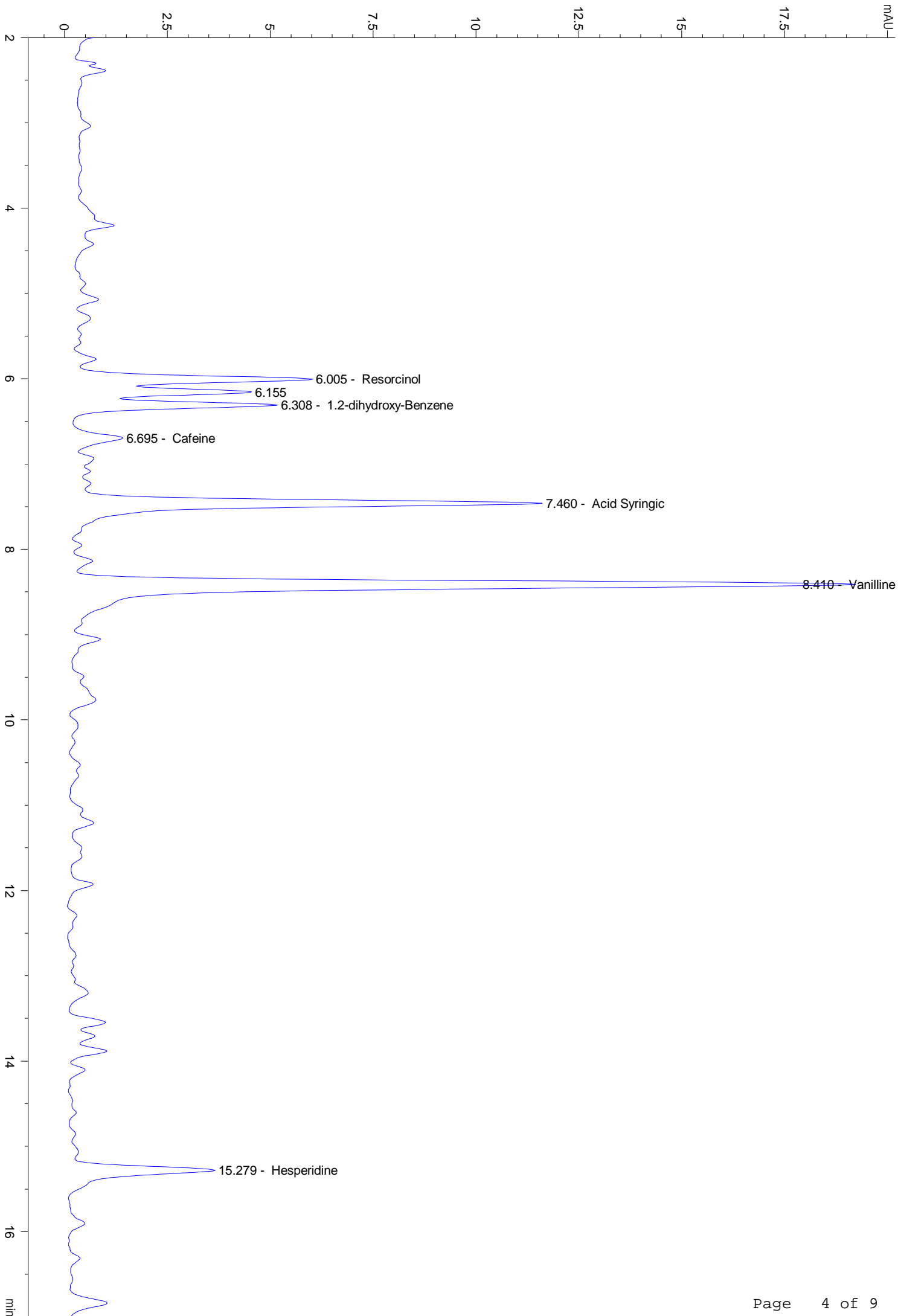


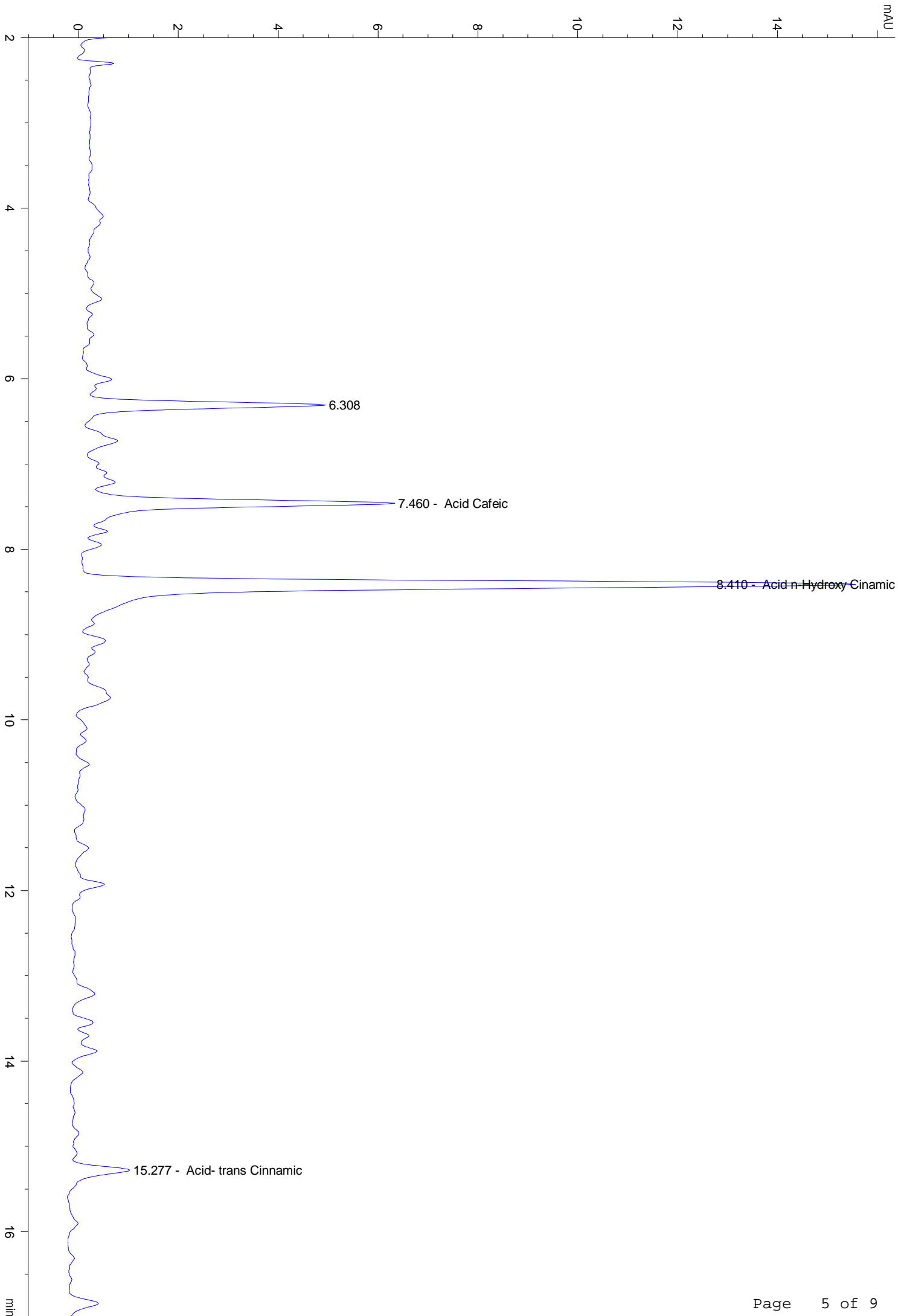


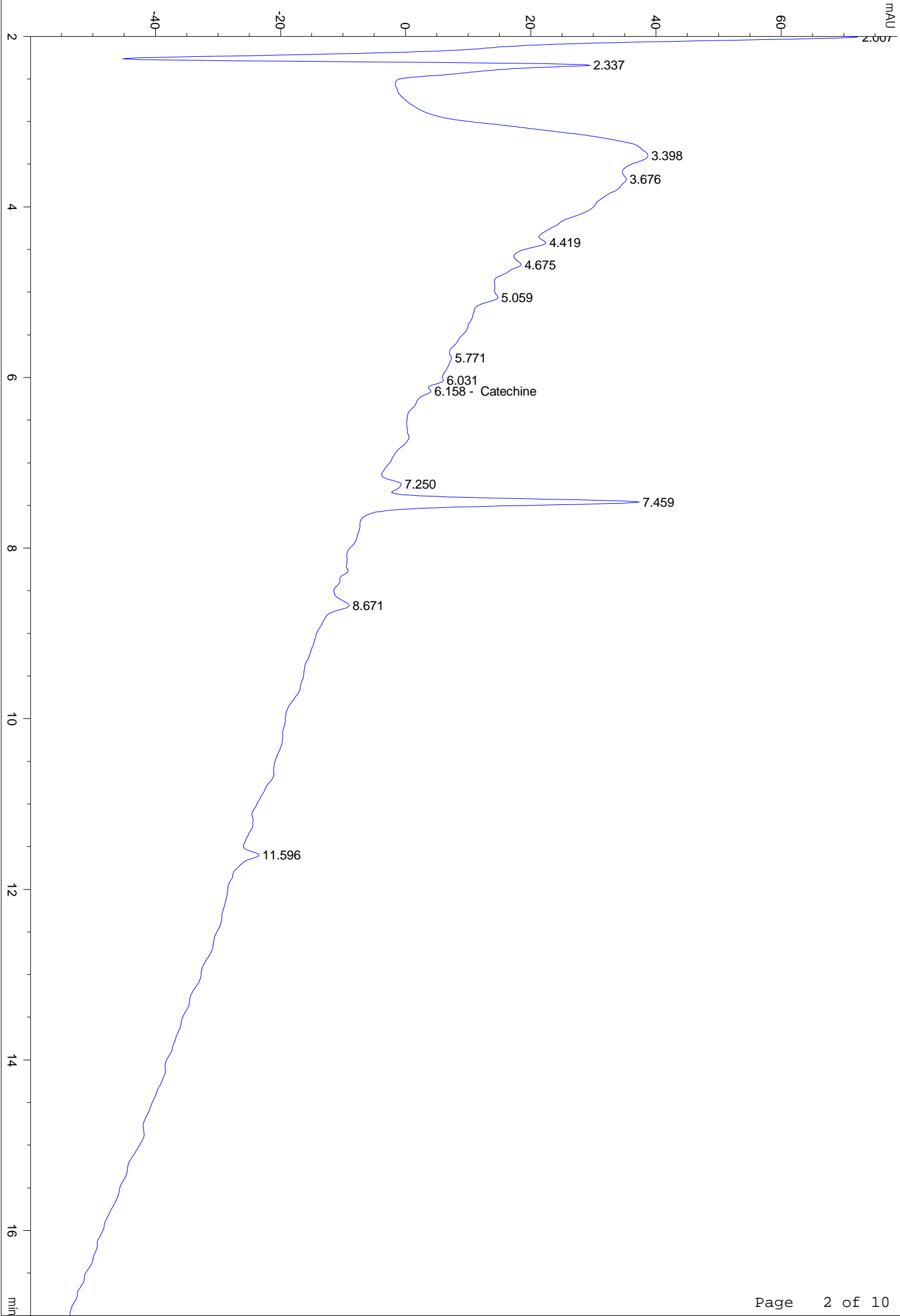


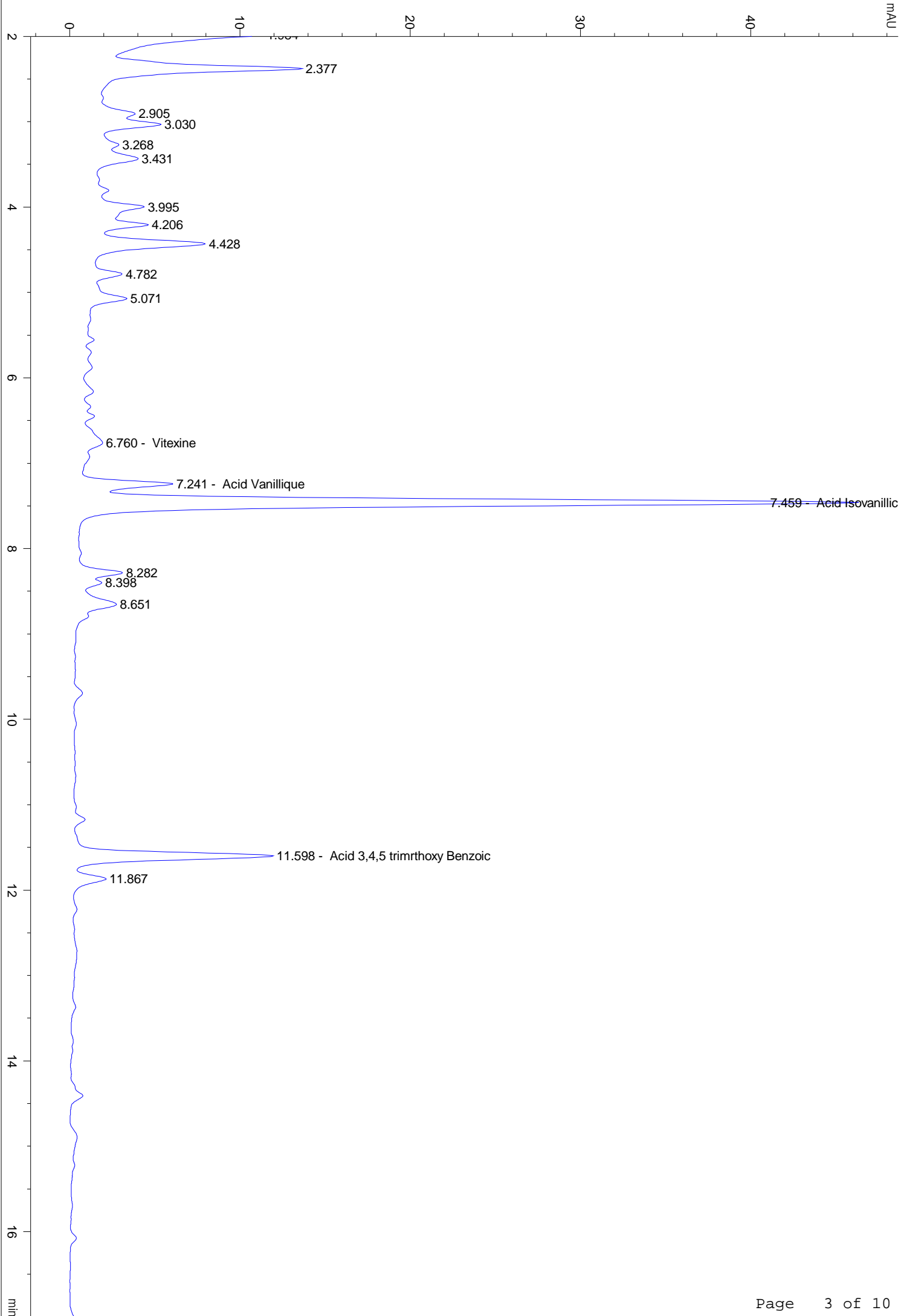


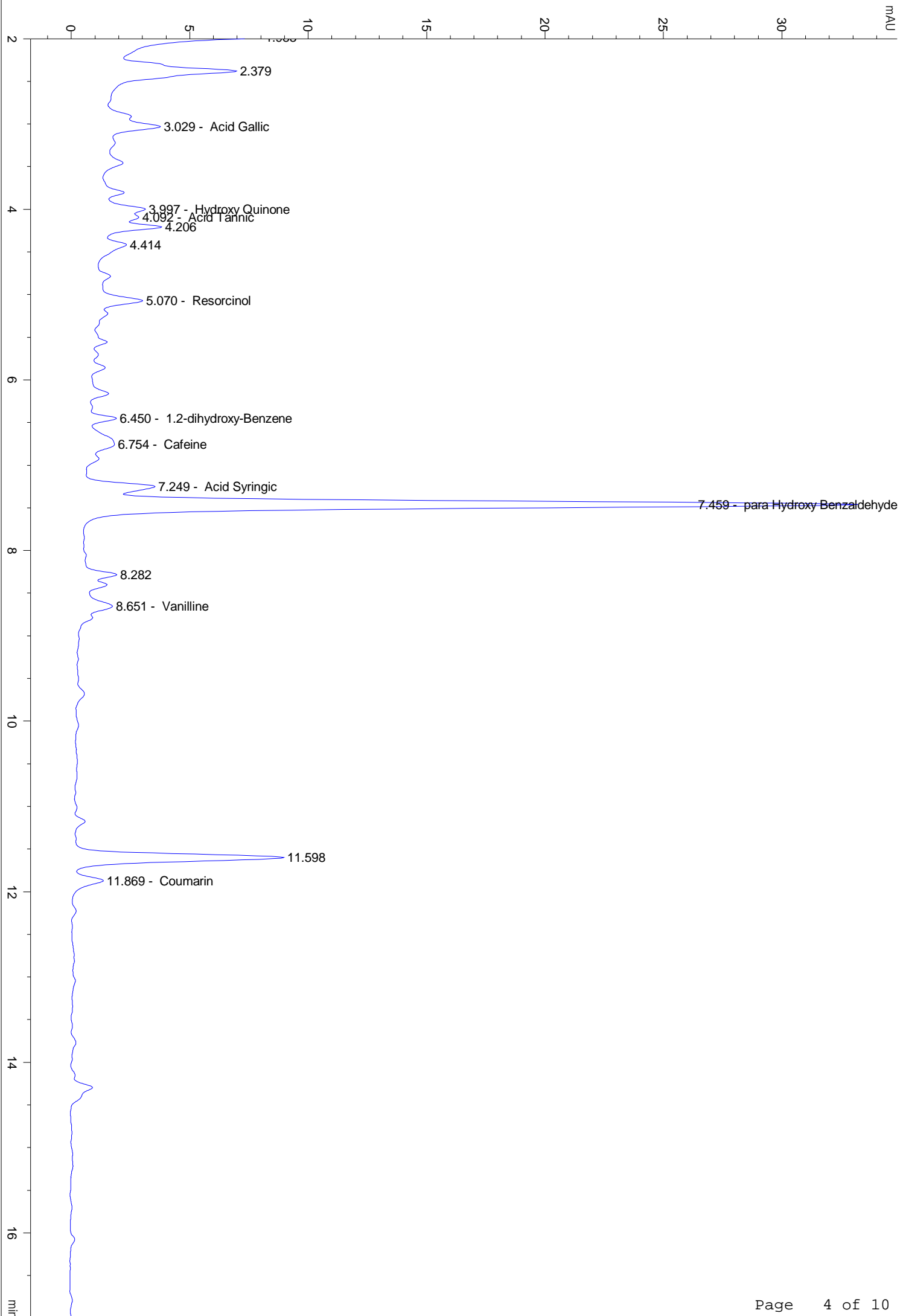


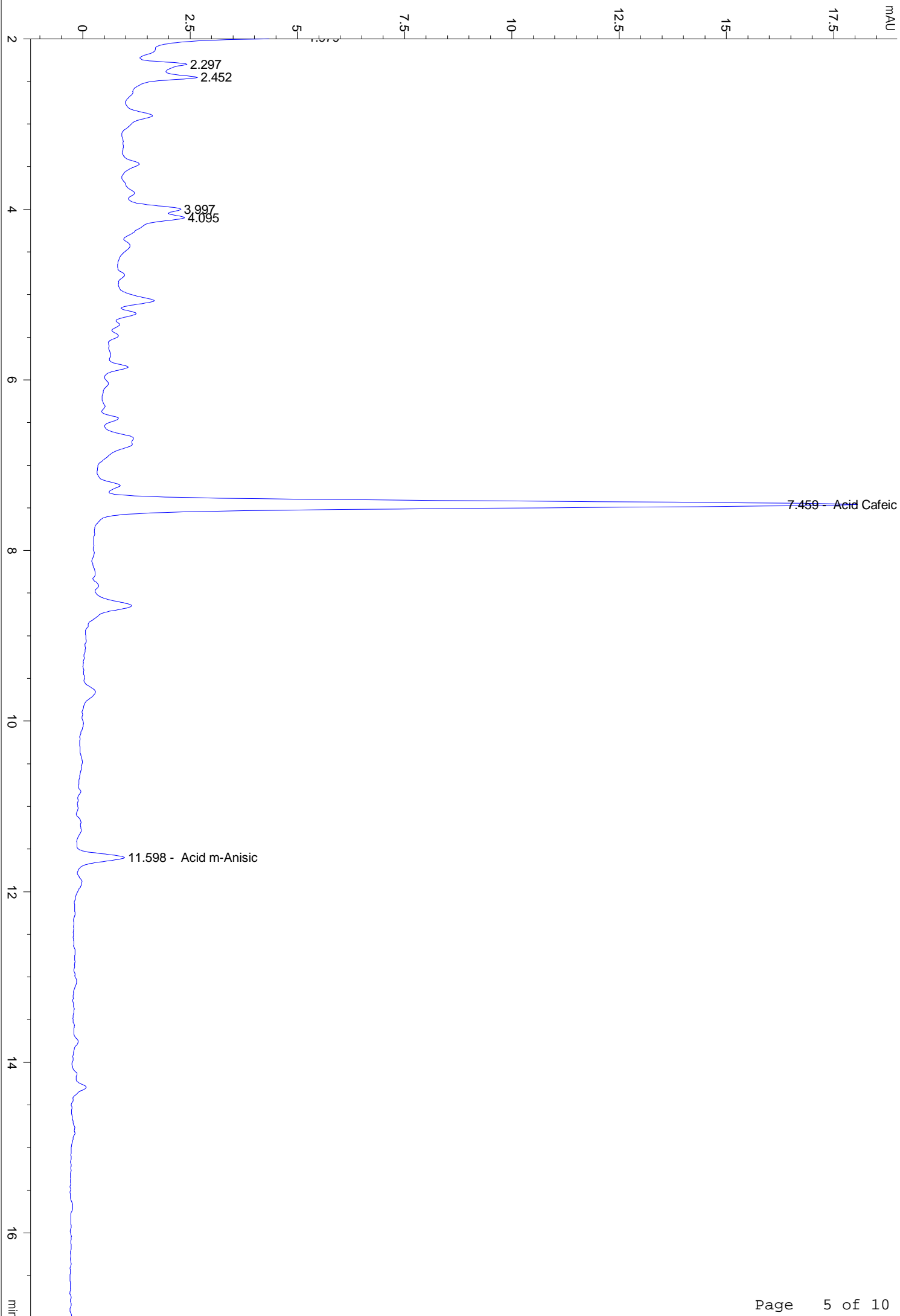


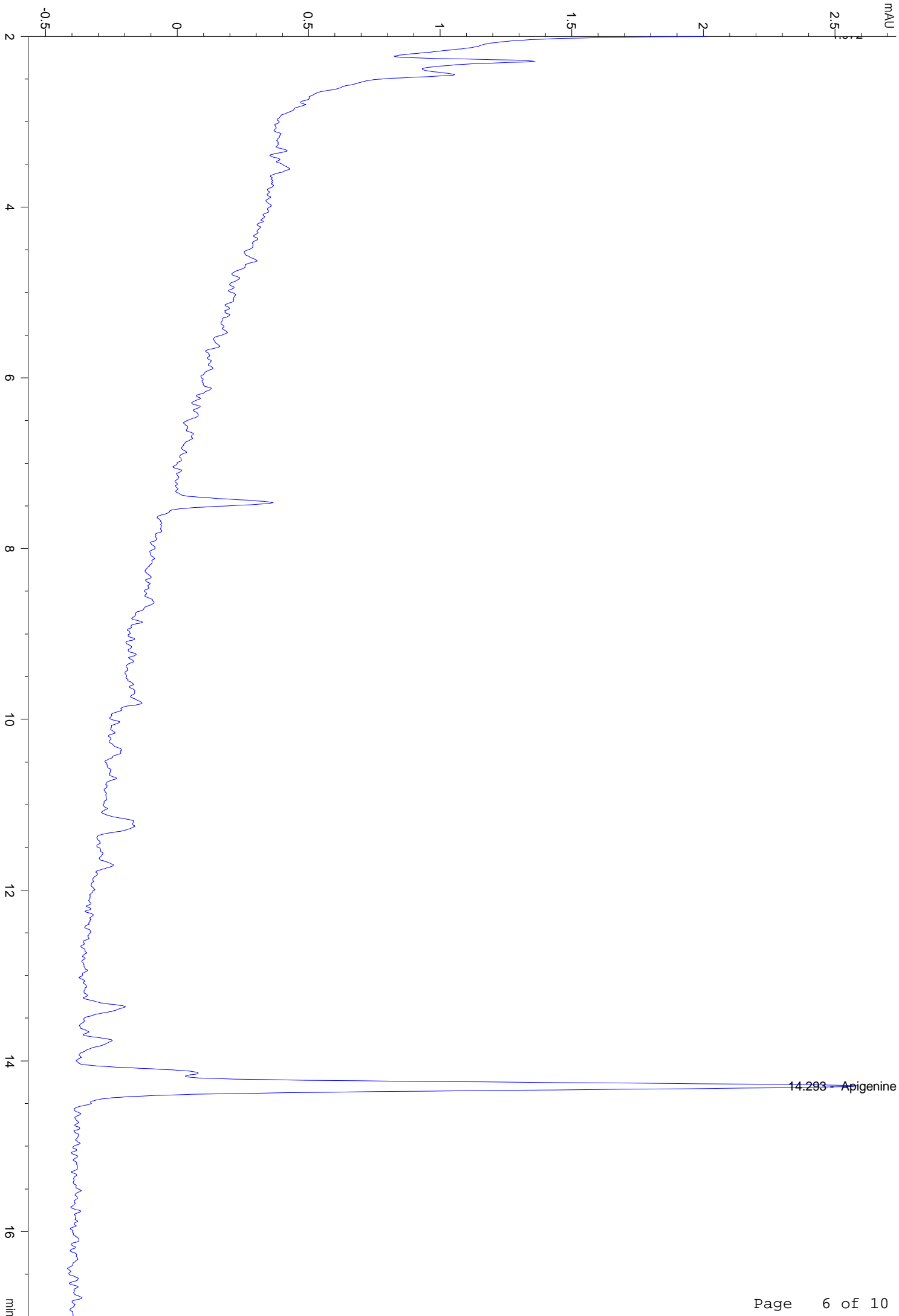


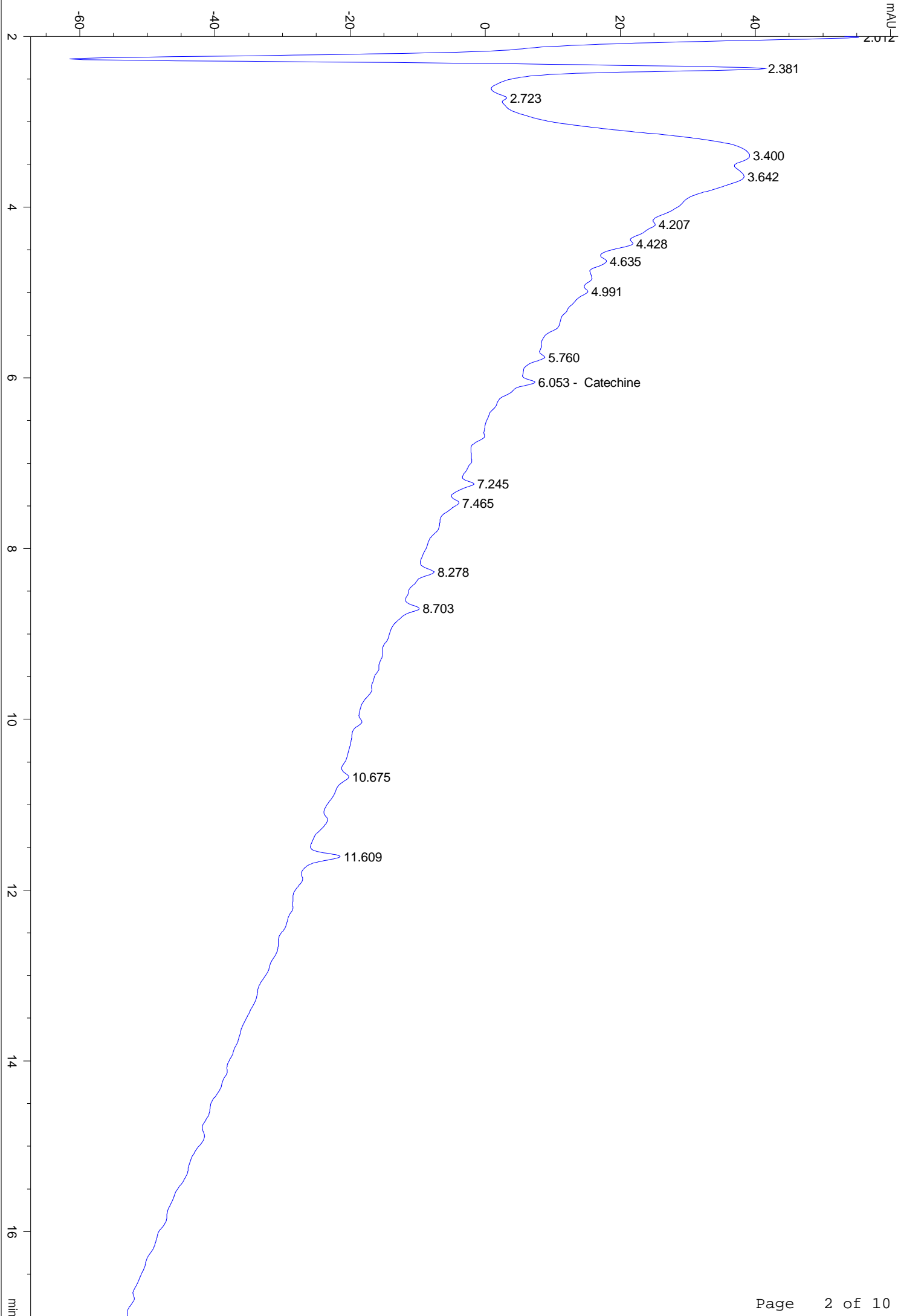


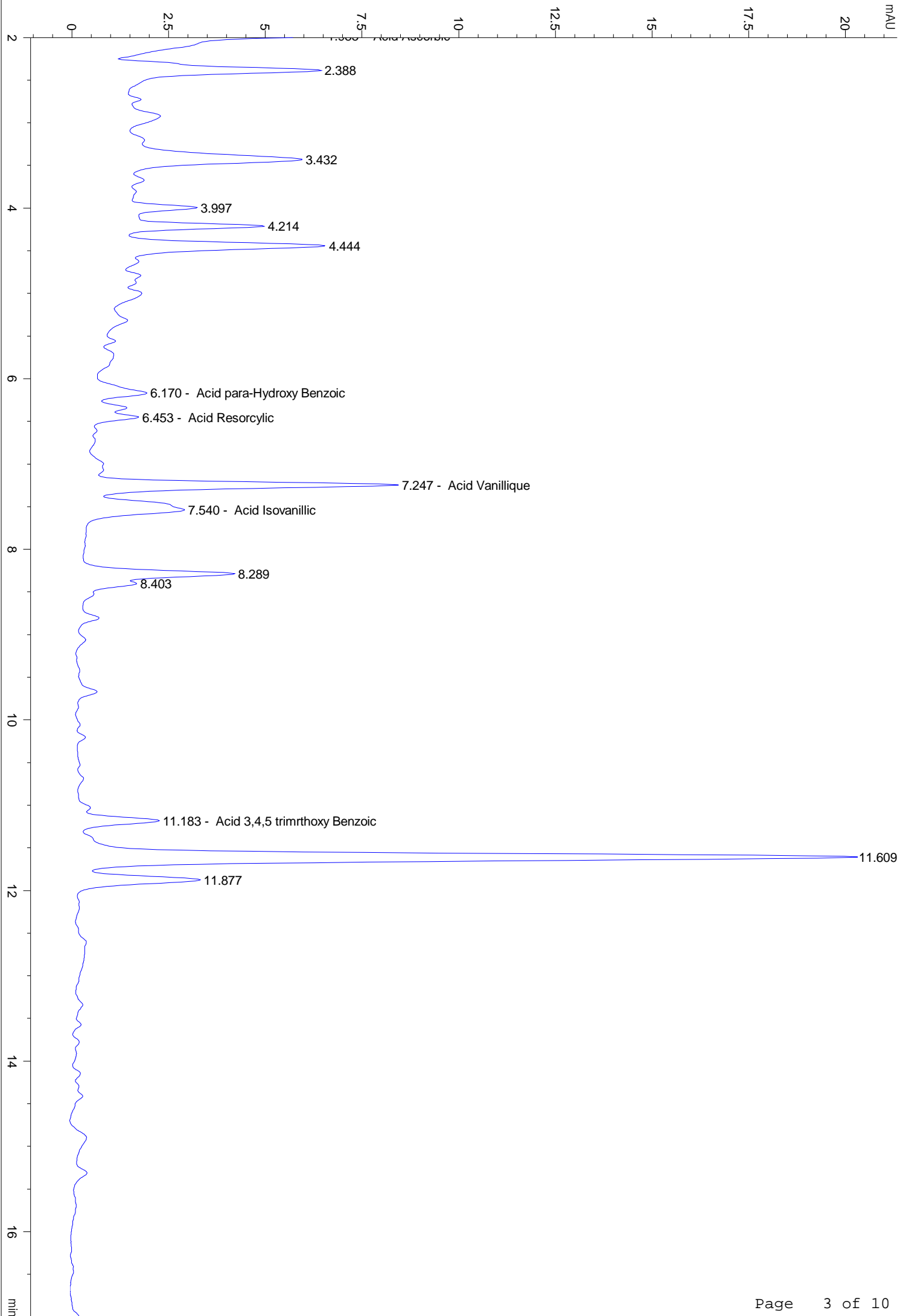


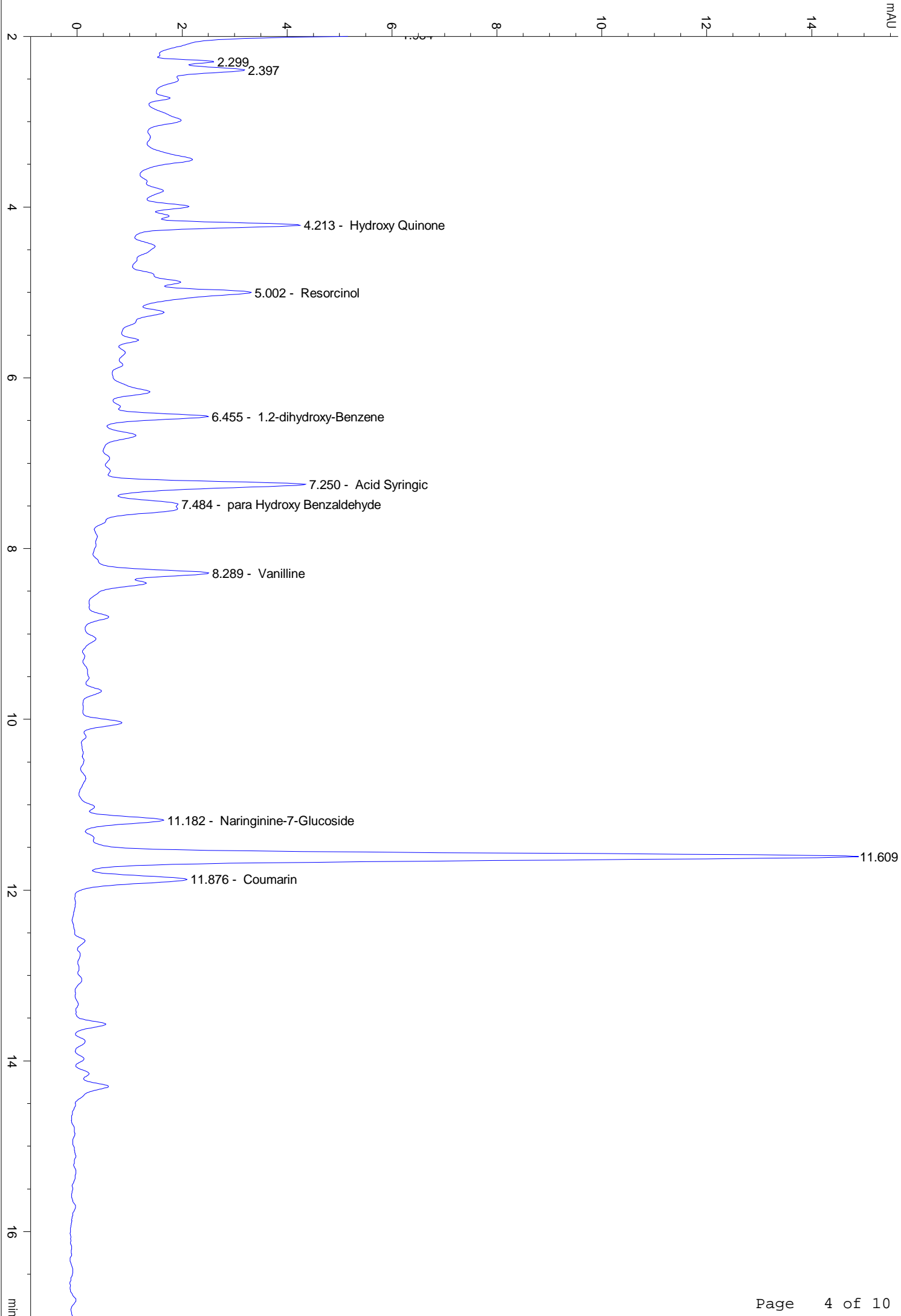


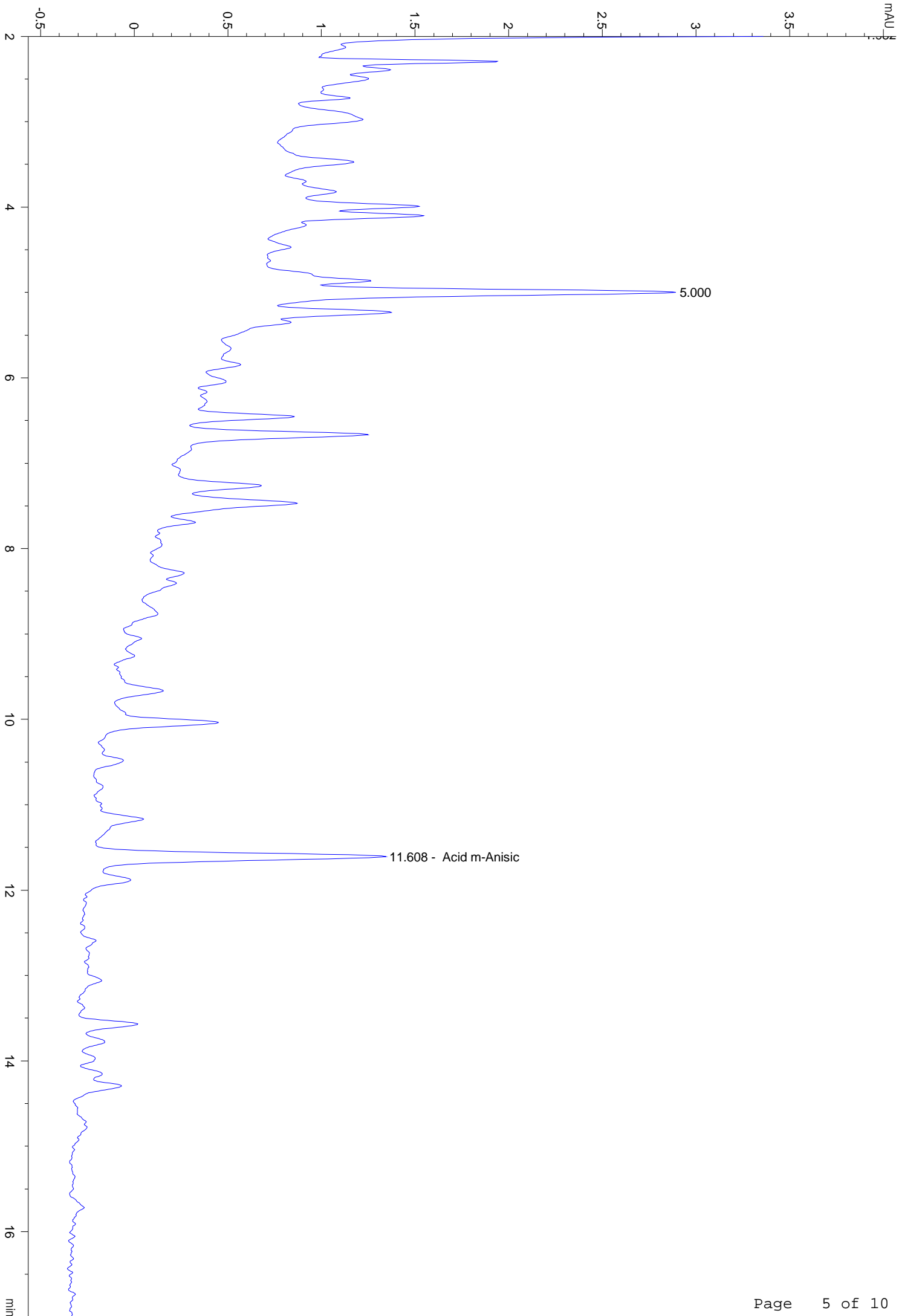


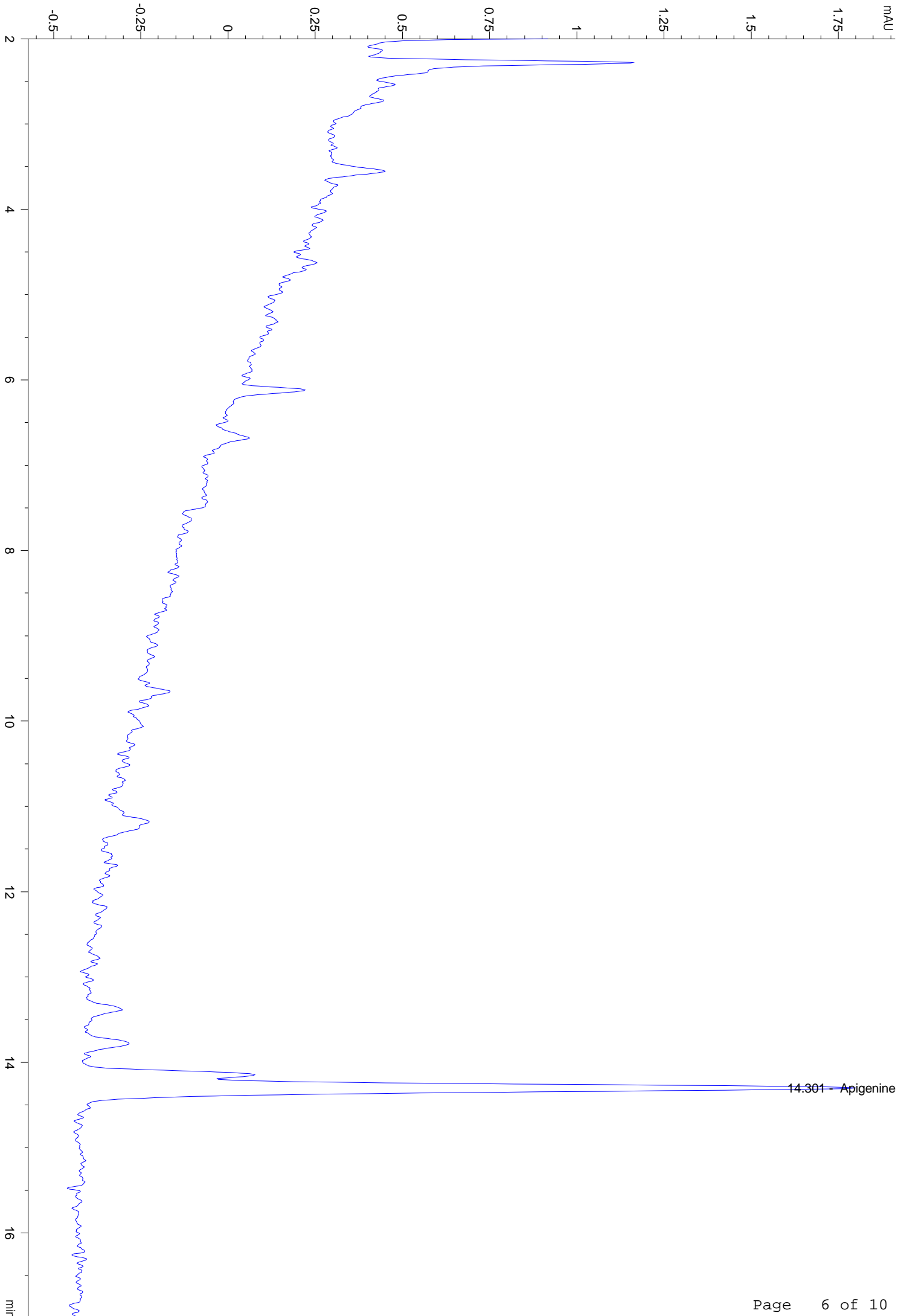


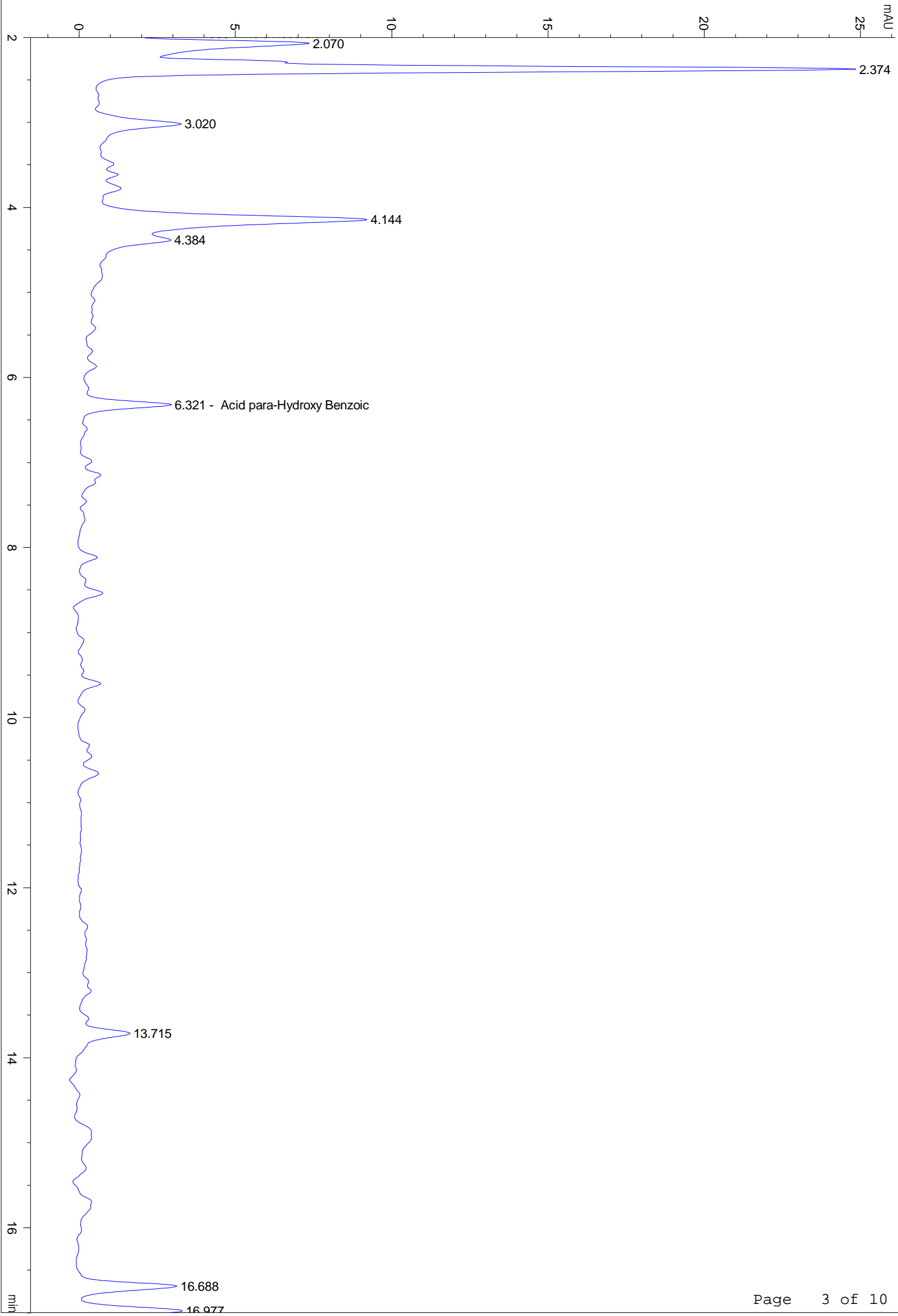


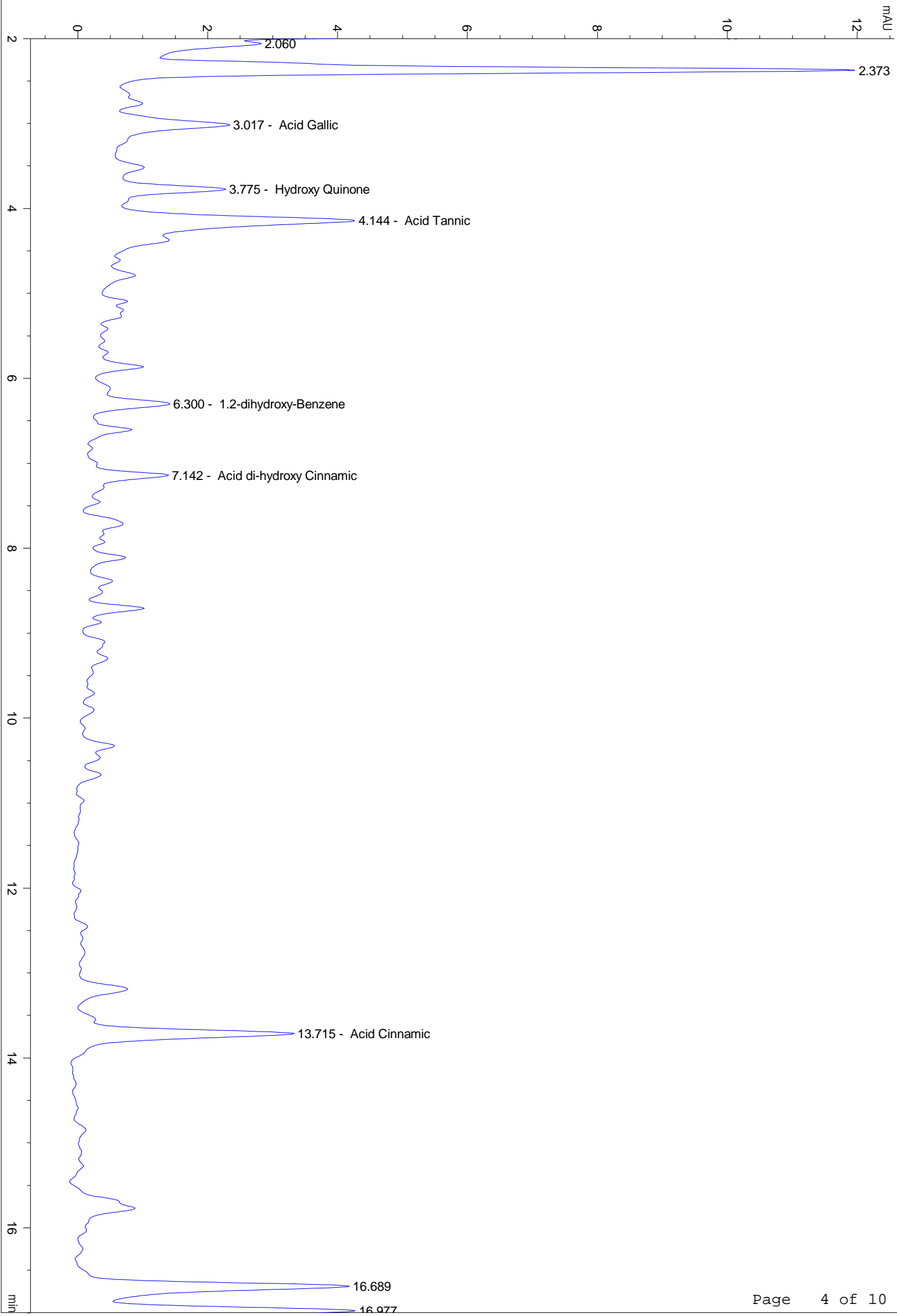


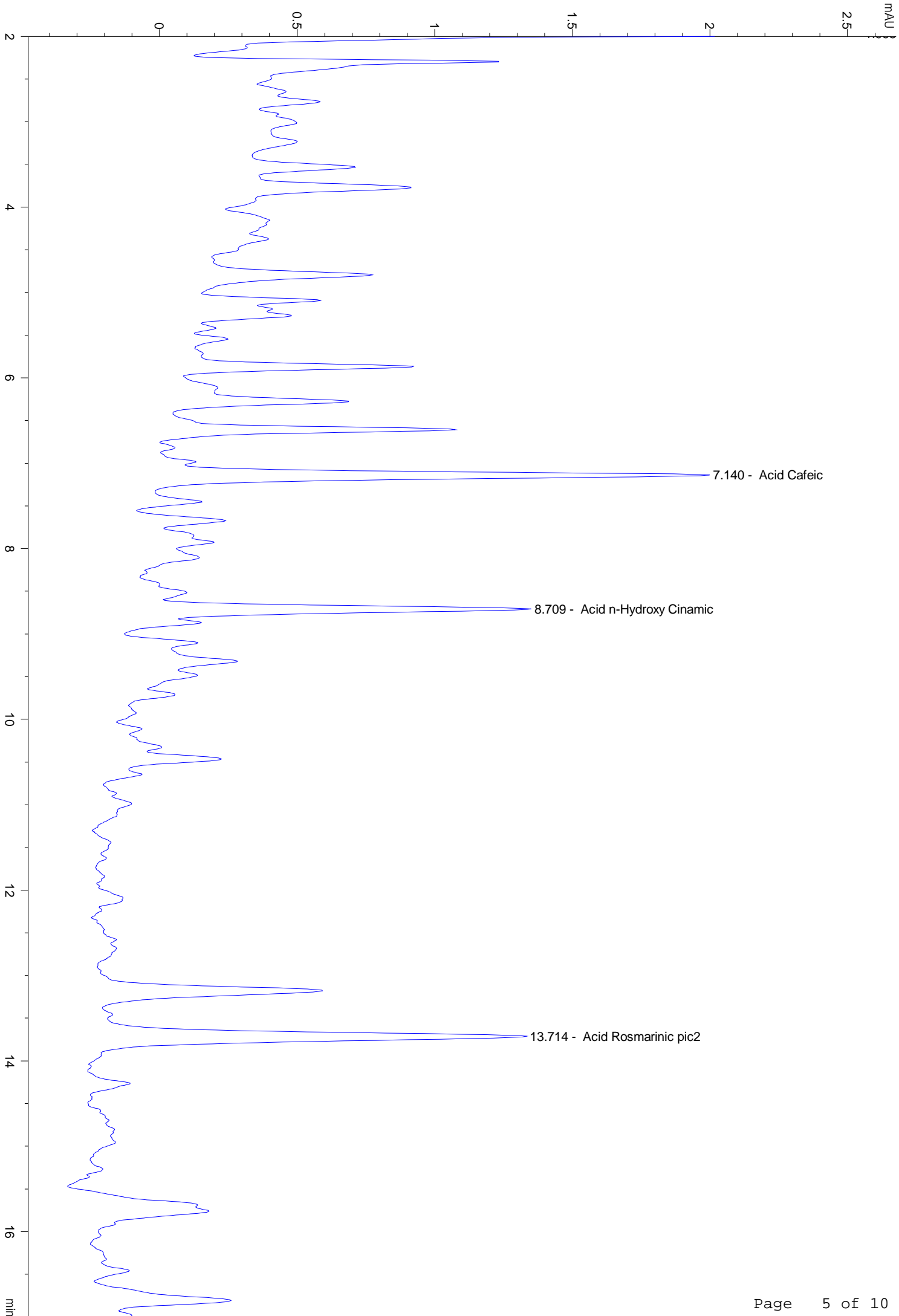


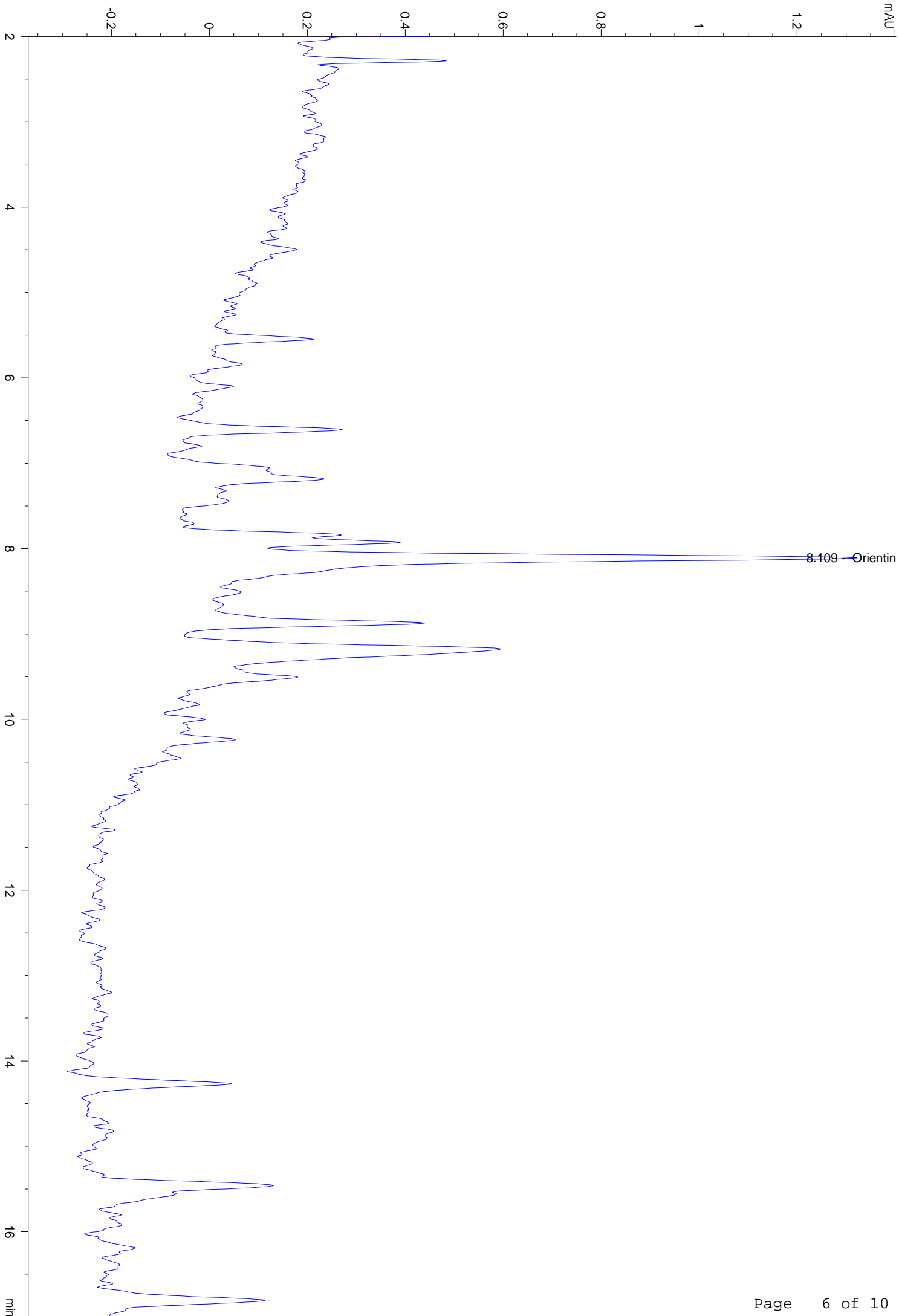


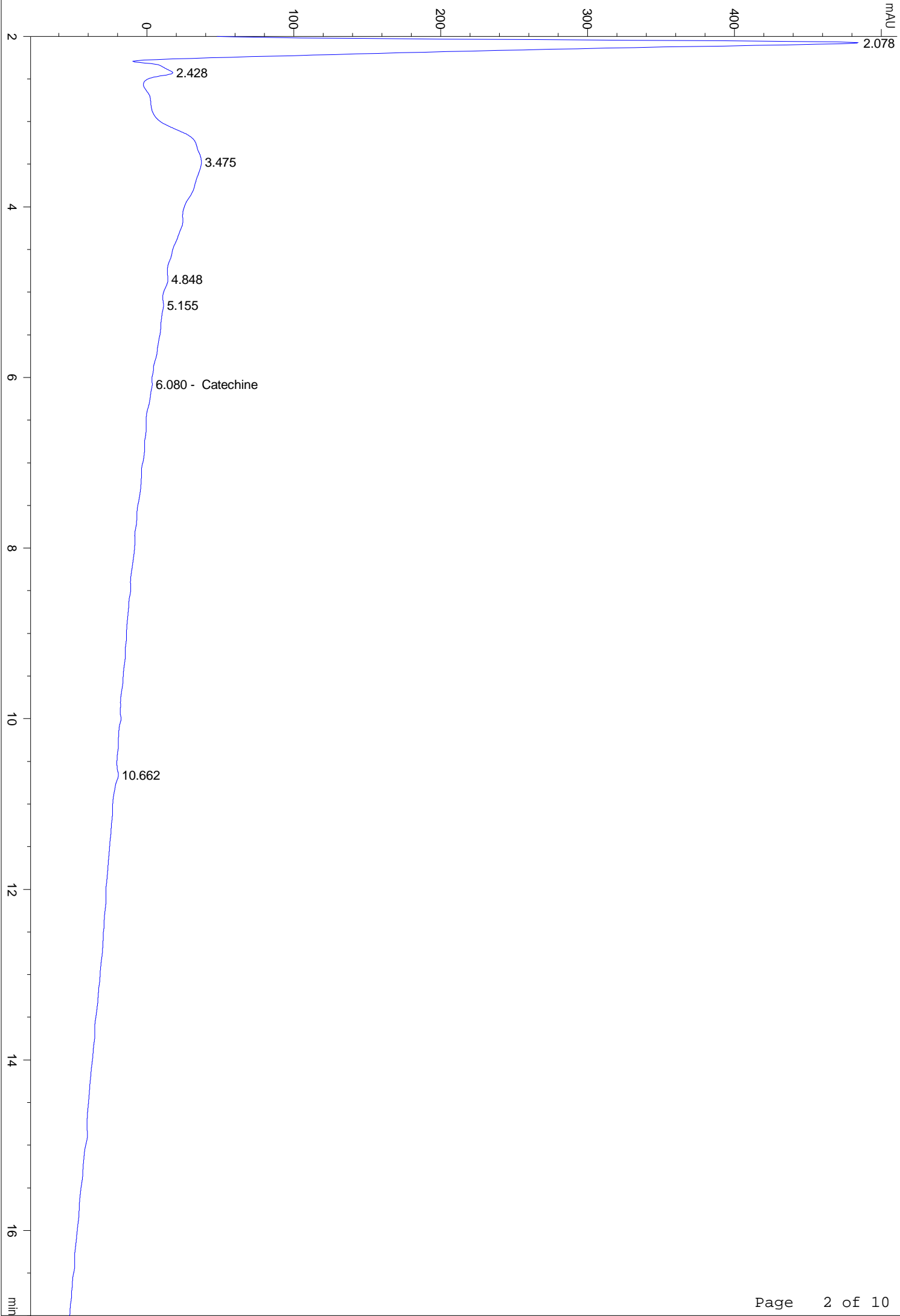


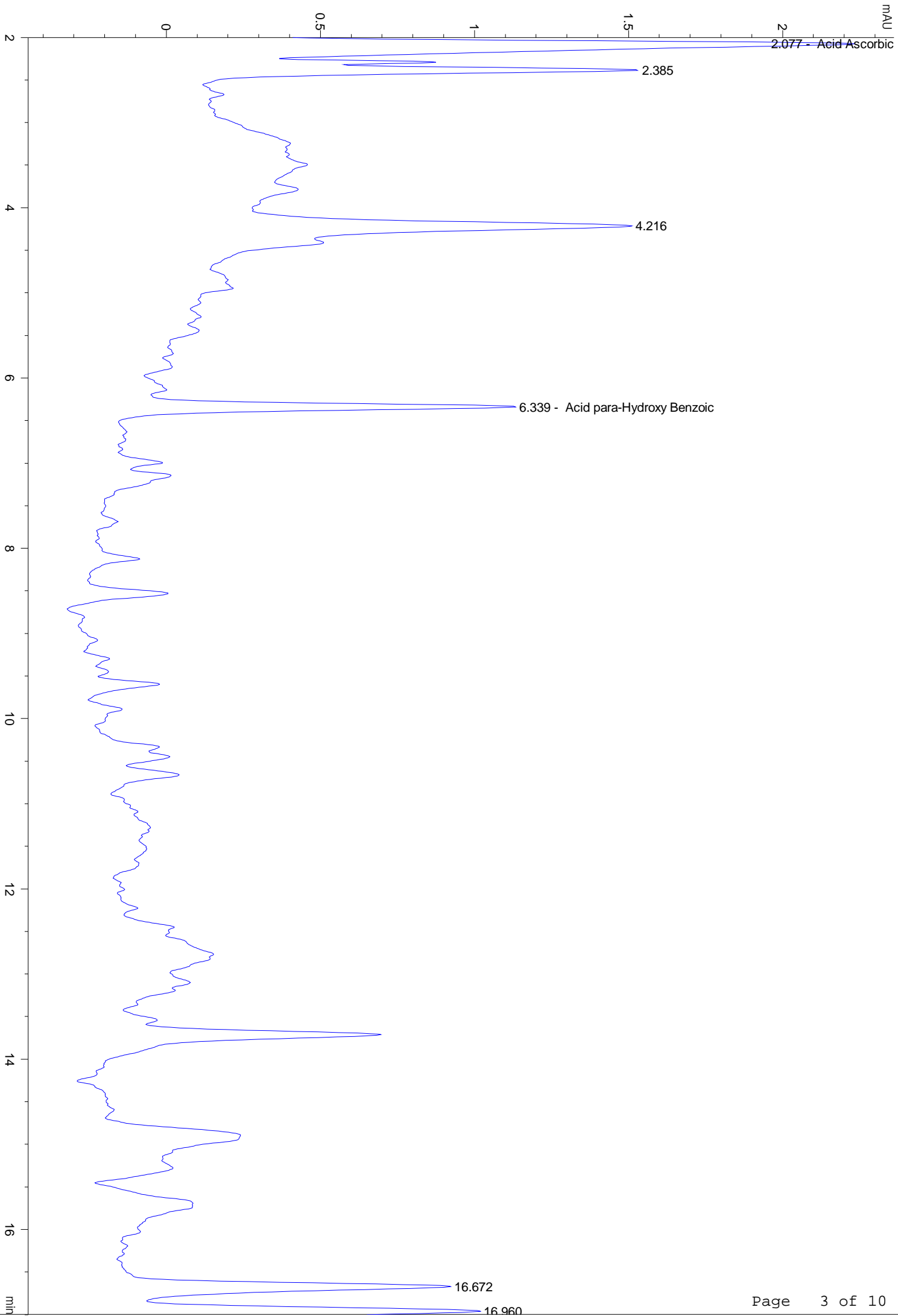


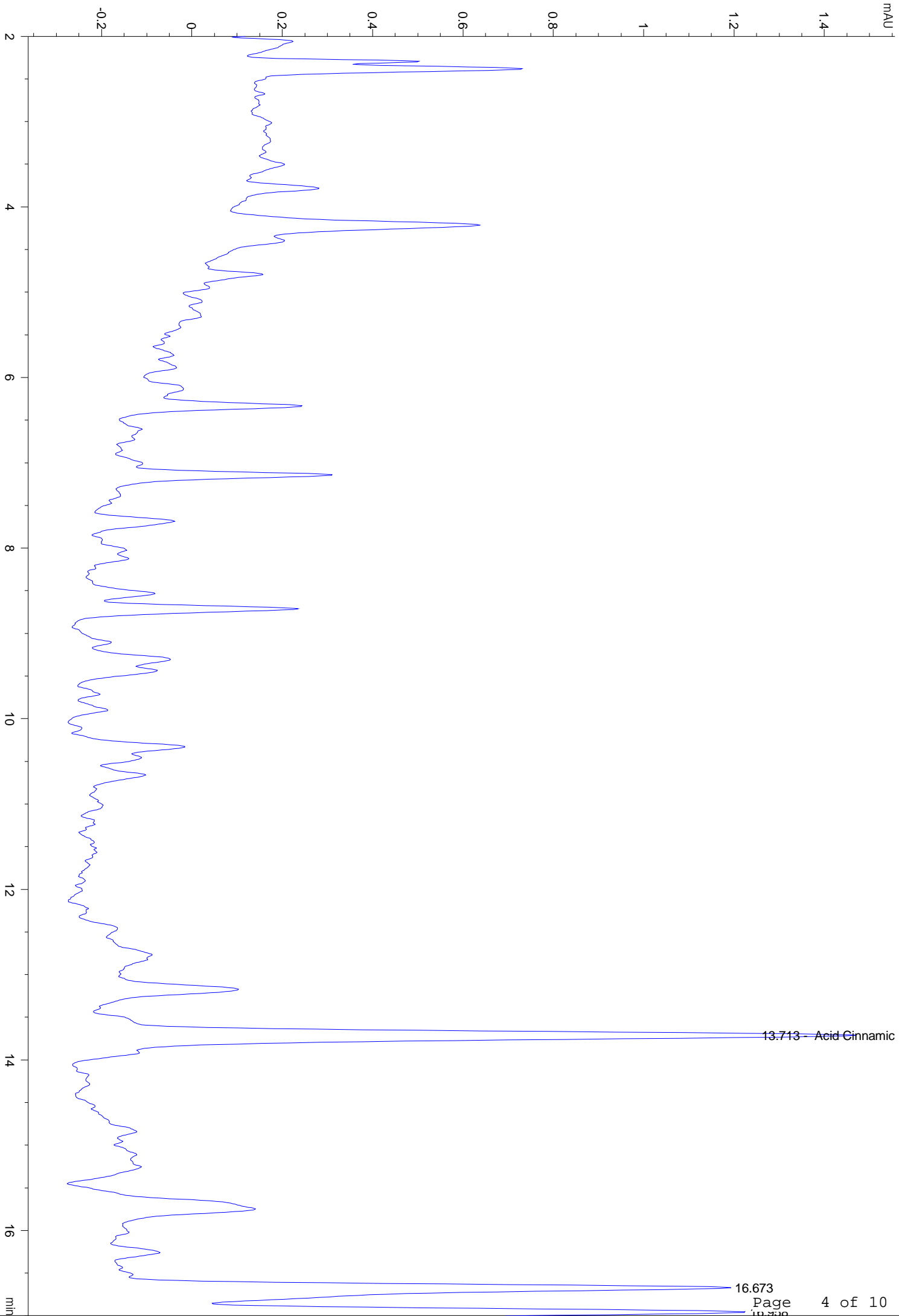














Article

Antibacterial and antioxidant activities of endophytic fungi and nettle (*Urtica dioica* L.) leaves as their host

Djouza Salmi¹, Catherine Riou³, Mohammad Issawi³, Yacine Titouche¹, Veronica Ambrosini³,
Noria Smail-Saadoun², Hocine Abbaci⁴, Karim Houali^{1*}

¹LABAB Laboratory, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi-Ouzou, Algeria

²Natural Resources Laboratory, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi-Ouzou, Algeria

³PEIRENE EA 75000, Faculty of Sciences and Technology, University of Limoges, France

⁴Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia, Algérie

*Correspondence to: houalitizi@yahoo.fr

Received September 10, 2021; Accepted October 25, 2021; Published November 22, 2021

Doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2021.67.3.33>

Copyright: © 2021 by the C.M.B. Association. All rights reserved.

Abstract: Nettle (*Urtica dioica* L.), as a plant rich in biologically active compounds, is one of the most important plants used in herbal medicine. Studies have shown that this plant has antioxidant, antiplatelet, hypoglycemic and hypocholesterolemia effects. In this study, we characterized three *Alternaria* endophytic fungi isolated from their host *U. dioica*. We hypothesized that these endophytic fungi can produce new bioactive metabolites, which may possess the bioactive property with potential application in the medical and pharmaceutical industries. The antibacterial activity was evaluated against reference and isolated strains, including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. A wide range of antimicrobial activities similar to those measured in nettle leaves was detected especially for *Alternaria sorghi*. Furthermore, the highest antioxidant activity detected with DPPH free radical scavenging was measured for *A. sorghi* and nettle leaves ethyl acetate extracts. In addition, whereas catalase activity was similar in the three isolated fungi and nettle leaves, total thiol content and superoxide dismutase activity were significantly higher in leaves. *A. sorghi* showed the best activities compared to other isolated fungi. The characterization and further production of bioactive compounds produced by this endophyte should be investigated to fight bacteria and especially those that develop drug multi-resistance.

Key words: Antibacterial activity; Endophytic *Alternaria* species; Oxidative stress; Superoxide dismutase; Thiols.

Introduction

The emergence of antibiotic multi-resistant bacteria and new diseases for which modern medicine remains powerless led to a renewed interest in traditional medicine based on a solid and ancient knowledge of medicinal plants and their potential hosts. Indeed, medicinal plants produce thousands of molecules from secondary metabolism with therapeutic potential. Moreover, these plants often contain in their tissues or organs so-called endophytic organisms that offer their host resistance to biotic and abiotic stresses (1, 2). Furthermore, these endophytic fungi are known to promote the growth of the host plant and help it to defend itself against pathogens (2, 3). Thus, these fungi are able to produce various molecules with medical and pharmaceutical great interests such as antioxidant, anticancer, antiviral, immunomodulatory or molecules against tuberculosis or plant or animal parasites (1, 2, 4). Moreover, endophytic fungi were also shown to increase the activity of ROS detoxification enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxidases (POD), which promote the host plant's resistance to various stresses such as drought and soil salinity (5, 6).

Our study was focused on the world's widespread and medicinal Nettle (*Urtica dioica* L.) that also shelters endophytic fungi. To our knowledge, this is the first study of its kind to have studied both the biological ac-

tivities of *Urtica dioica* leaves and endophytic colonizing fungi. This study aims to evaluate the antibacterial and antioxidant activity, the content of phenolic compounds and total thiols as well as the activity of ROS detoxifying enzymes (CAT and SOD).

Materials and Methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Germany), Biochem Chemopharma (Quebec), Bio-Red (France), Liofilchem (Italy) or Biokar (France).

Plant material and leaf extract preparation

Nettle (*Urtica dioica* L.) was identified and collected from Larba Nath Irathen (Tizi-Ouzou, Algeria). Fresh leaves were immediately washed with water. The leaves were shade-dried at 40°C for two to three days and powdered. Then, 20g powder was mixed with 200 mL of water or ethyl acetate for 24h. The extracts were filtered on Whatman No.1 paper. The aqueous filtrate was frozen and lyophilized at a pressure of 5 mmHg at -50°C. The ethyl acetate filtrate was concentrated using a rotary vacuum evaporator at reduced pressure at 40°C. The nettle leaves extracts were then stored at -20°C until used.

Isolation of endophytic fungi

Healthy leaves were carefully selected for the isola-

tion of endophytic fungi. Leaves samples were washed thoroughly to remove adhered dust and debris. Under aseptic conditions, the leaf surfaces were sterilized by macerating in 96 % ethanol for 1 min, followed by soaking in 10 % sodium hypochlorite for 4 min and subsequently rinsed with ethanol for 30s. They were then washed in sterile distilled water and blot dried on sterile filter paper (7).

20 plants and 10 leaves per plant that were cut into four segments were placed aseptically on Petri dishes containing potato dextrose agar medium (PDA), supplemented with chloramphenicol (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) to prevent bacterial growth. The Petri dishes were incubated at room temperature for 2 months and checked until mycelium or colonies appeared. All fungal endophytes were then isolated and placed in new PDA plates. After morphological and microscopic identification of all isolates, three of the most abundant endophytic fungi were retained for the rest of this study.

Molecular characterization of endophytic fungi

Genomic DNA was extracted from pure mycelia using the Universal Pathogen Kit (Omega Biotek Mag-Bind) and sequenced using the ribosomal internal transcribed spacer (ITS). PCR amplification of the fungal genomic ITS region 1 and 2 was performed using the following primers: ITS1- Forward primer (TCCG-TAGGTGAACCTGCGG) and ITS4- Reverse primer (TCCTCCGCTTATTGATATGC) according to White *et al.* (8). The sequences were deposited in the NCBI database and the following accession numbers were obtained: MK880626 (*Alternaria sorghi*), MK880625 (*Alternaria tenuissima*) and MK880627 (*Alternaria alternata*).

Fermentation and extraction of endophytic fungi

Endophytic fungi were cultured on PDA at 28°C for 6 days. Subsequently, each fungus was cultivated by placing agar discs containing an actively growing pure culture of fungi isolates (5 mm in diameter) in a 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of potato dextrose broth (PDB)(9).

Each flask was incubated at 28°C for 4 weeks with periodical shaking and was examined for possible contamination. After incubation, the fermented broth was filtered through three layers of muslin cloth to remove the mycelia, then centrifuged at 5000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was frozen and lyophilized or extracted with an equal volume of ethyl acetate. Then, the organic phase was collected and the solvent was removed by evaporation under reduced pressure at 40°C using a rotary vacuum evaporator. The samples were stored at -20°C until used.

Determination of antibacterial activity

Bacterial strains

The antibacterial activity of *Urtica dioica* leaves and endophytic fungi extracts were evaluated against reference and isolated strains. All reference strains were obtained from the Laboratory for Food Safety (Maisons-Alfort, France). The isolated strains from raw milk and acidified milk were obtained by Dr. Titouche, University of Tizi-Ouzou, Algeria (Table 1).

Five Gram-positive bacteria species including *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* LGA 251, *S. aureus* MU 50 and three Gram-negative bacteria species including *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 4352 and *Citobacter freundii* ATCC 8090 were used.

Agar diffusion method (ADM)

The lyophilized crude extracts of nettle leaves and endophytic fungi were diluted in distilled water (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and the ethyl acetate extracts of both were diluted in dimethylsulfoxide (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (DMSO, diluted to 1/10). Initially, the bacterial strains were inoculated on a sterile Muller-Hinton agar plate and incubated at 37°C for 18 h. For each extract, a sterilized 5 mm diameter disc was saturated with 20 μL of crude extract and placed on the Muller-Hinton agar plates containing bacteria with turbidity adjusted to 0.5 Mc Farland in sterile physiological water. Each experiment was carried out in triplicate.

A filter paper disc saturated only with DMSO or distilled water was used as a negative control. Moreover, chloramphenicol disc was used as a positive control (30 $\mu\text{g}/\text{disc}$). All plates were incubated at 37°C for 18 h. Antibacterial activity was evaluated by measuring the diameters of the growth inhibition zones (mm) of the tested pathogenic bacteria against standards (10).

Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations (MIC/MBC)

The MIC of extracts was determined using the serial macro-dilution method in Mueller-Hinton broth (11). The concentrated crude extracts were diluted using the two-fold serial dilution method. Each crude extract was diluted in series at 0.19; 0.39; 0.78; 1.56; 3.12; 6.25; 12.50 and 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The inoculates were prepared in the same medium at a density adjusted to a 0.5 Mc Farland turbidity standard (10^8 colony-forming units (CFU)/mL).

Then, 1 mL of each dilution was added to 1mL of inoculates. Culture medium without samples and other

Table 1. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates.

Strain	Sample type	<i>Spa</i> -type	ST	Toxin genes profile	Phenotype of resistance	Antimicrobial resistance genes
S84	Rawmilk	t024	8	<i>seb, sep</i>	OFX-FOX-TE-NOR-P	<i>tet</i> (K), <i>blaZ</i> , <i>mecA</i>
S95/S96	Acidifiedmilk	t024	8	<i>seb, sep</i>	OFX-FOX-TE-OX-NOR-P	<i>tet</i> (K), <i>blaZ</i> , <i>mecA</i>
S100/S101	Rawmilk	t024	8	<i>seb, sep</i>	OFX-FOX-TE-OX-NOR-P	<i>tet</i> (K), <i>blaZ</i> , <i>mecA</i>

OFX: ofloxacin; Fox: cefoxitin; TE: tetracycline; OX: oxacillin; NOR: norfloxacin; P: penicillin.

ST: sequence-type; *Spa*-type: staphylococcal protein A-type; *tet* (k): gene coding for resistance to tetracycline; *blaZ*: gene coding for resistance to penicillin; *mecA*: gene coding for methicillin resistance.

media without microorganisms were used as controls in the tests. The tubes were incubated at 37°C for 24 h. Bacterial growth was detected by optical density (OD) at 620 nm. The MIC value was defined as the lowest concentration of extracts preparation in which no bacterial growth occurred and which is expressed in mg.mL⁻¹. All tests were repeated three times and confirmed.

The MBC examination consisted of transferring 100 µL of bacterial culture from each well where no growth was observed into the Müller–Hinton Agar plates. The plates were incubated at 37°C for 24 h. Colony growth on the plates was verified after this period. MBC was defined as the lowest concentration of extract which resulted in complete inhibition of bacterial growth and is expressed in mg.mL⁻¹.

Determination of antioxidant activity

DPPH° radical scavenging activity

The total antioxidant activity of crude extracts was measured by DPPH (1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl) radical scavenging capacity according to Brand-Williams *et al.* (12) with modifications. The concentration of leaves and endophytic fungi extracts were diluted in series between 50 and 450 µg.mL⁻¹. Ascorbic acid was used as a positive control. For the negative control and the blank, DPPH solution in methanol and methanol was used respectively. DPPH methanol solutions (0.1 mM, 1.95 mL) were mixed with 50 µL of extracts. The reaction mixture was vortexed and then incubated in dark conditions for 30 min at room temperature. Absorbance was measured using a spectrophotometer at 517 nm. The decrease in the absorbance of the reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity, which was calculated using the following equation: *DPPH scavenging capacity (%) = (A₀ - A₁)/A₀ × 100%* where, A₀ is the absorbance of the control and A₁ is the absorbance of the extract.

The antioxidant activity of all extracts was expressed as IC50 value (µg.mL⁻¹) (Inhibition concentration 50) calculated by linear regression analysis.

Total thiol content

Total thiol assay was performed according to Issawi *et al.* (13). Frozen samples of nettle leaves and endophytic were ground in liquid nitrogen and then extracted into 1 mL of 0.2N HCl. After centrifugation at 16000 g for 4 min, 500 µL of extracted solution were neutralized with 400 µL NaOH (0.2M) and 50 µL NaH₂PO₄ (0.2M); 0.7 mL of 0.12M NaH₂PO₄ (pH 7.5), 6 µL of 1M EDTA, 0.1 mL of 6mM Dithiobis 2-nitro benzoic acid (DTNB) were added to 0.2 mL extract. For the standards, the extract was replaced by 0; 10; 20; 50 and 100 nmol of reduced glutathione (total volume 1 mL). The absorbance at 412 nm was read 5 min after the addition of standards or extract.

Determination of CAT and SOD enzymatic activities

Frozen leaves and endophytic fungi samples were ground to a fine powder in liquid nitrogen (the endophytic fungi were initially cultured in PDA at 28°C for 6 days). Proteins were solubilized into 1 mL of extraction buffer containing 50mM phosphate buffer pH 7.8, 1mM EDTA, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone and 10% (v/v) glycerol and centrifuged at 16000g for 10 min at

4° C. The supernatant was collected and used for protein quantification according to Bradford (14) and then for the assays of enzymatic activities.

Catalase (EC 1.11.1.6) and SOD (EC 1.15.1.1) activities were assayed according to Issawi *et al.* (13). 40µg of total soluble proteins from each sample were diluted in 50 mM phosphate potassium buffer (pH 6.5). CAT activity was computed by calculating the amount of H₂O₂ with a molar extinction coefficient of 43.6M⁻¹ cm⁻¹. SOD activity was estimated by the inhibition of the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) by SOD. One unit of enzyme activity was taken as that amount of enzyme required to inhibit 50% of the NBT reduction.

Statistical analysis

All biological experiments were performed at least three times independently. Results were expressed as mean ± SD. Data were analyzed by Student's t-test and one-way ANOVA using the PAST free software.

Results

Isolation and molecular identification of endophytic fungi

144 isolates were obtained from nettle leaves with a colonization percentage of 18%, calculated as follows: the number of colonized segments on the total number of segments.

Three isolates were selected for this study because they were considered to be the most abundant after the morphological and microscopic characterization of the different isolates. The molecular identification of the three selected isolates was done by sequencing their ITS regions.

The result of identification showed that all isolates belong to *Alternaria* genus. Isolate 1 was closely related to *A. sorghi*, isolate 2 was closely related to *A. tenuisima* and isolate 3 was closely related to *A. alternata* with 99% or more similarity.

Antibacterial activity

The antibacterial activity was evaluated in both water and ethyl acetate extracts of *U. dioica* leaves and the three selected endophytic fungi against isolated and reference strains. All extracts displayed significant antibacterial activity against the tested bacteria in comparison with the positive control (chloramphenicol) (Table 2).

For water extract, *U. dioica* leaves exhibited similar activities to endophytic fungi with the inhibition zones ranging between 9.5 to 15.5 mm against Gram-positive bacteria (Table 2). The maximum inhibition zones were observed against the MRSA strain: MU50 and S.95, with the values of 15.5 and 14 mm respectively. *A. sorghi* exhibited the highest antimicrobial activity compared to the other fungus.

E. coli 25922 was resistant to leaves extract. However, *Alternaria sorghi* presented the highest inhibition zone against this strain with 12.5 mm (Table 2). Overall, except *Alternaria sorghi* extract, the antibacterial activity of all extracts against Gram-positive bacteria was more effective than that observed against Gram-negative bacteria.

Table 2. Antibacterial activity of endophytic fungi and nettle leaves (water and ethyl acetate extracts), evaluated by agar diffusion method.

Bacterial strains	Inhibition zone (mm)							
	Nettleleaves		<i>A. alternata</i>		<i>A. tenuissima</i>		<i>A. sorghi</i>	
	WE	EAE	WE	EAE	WE	EAE	WE	EAE
<i>S. aureus</i> 25923	9.5±0.5	9.5±0.5	11.83±1.60	10.83±0.28	12.5±0.86	12.16±0.76	11.83±0.76	12.83±0.28
<i>S. aureus</i> 43300	10±0.5	9.16±0.28	8.16±1.25	8.16±0.28	10.33±0.57	10.16±0.28	13.16±0.76	11±0.5
<i>S. aureus</i> MU50	15.5±0.5	12.16±0.28	9±1	11.5±0.5	8.66±2.08	11.5±0.86	11.16±0.28	10.66±1.04
<i>S. aureus</i> LGA251	11.16±0.28	11±0.5	9.5±0.5	6.5±0.5	8.16±1.04	10.83±0.28	12.33±0.76	12±0.5
<i>S. aureus</i> S84	12.83±0.76	10±0.5	10.16±0.28	10±0.5	8.5±0.86	9.5±0.5	12.33±0.57	12.16±0.28
<i>S. aureus</i> S95	14±0.5	10.83±0.28	10.5±0.5	8.16±0.28	8.33±0.57	10.83±0.76	11.66±1.44	12.5±0.5
<i>S. aureus</i> S96	11.33±0.28	9.66±0.57	10.5±0.5	9±0.5	9.33±1.52	9.16±1.04	11±0.86	10.16±1.25
<i>S. aureus</i> S100	11.5±0.5	10.33±0.76	9.33±0.57	6.16±0.28	8.33±1.15	9.5±1.32	10.33±1.04	10.5±1.32
<i>S. aureus</i> S101	12.66±0.57	10.66±0.28	9.83±0.28	7.83±1	10.83±0.76	9.16±1.04	12±0.5	8.83±0.76
<i>E. coli</i> 25922	-	9.5±0.86	9±0.28	9.83±0.76	7.83±1.75	10.16±1.25	12.5±0.86	10.16±0.28
<i>K. pneumonia</i> 4352	8±0.5	-	6.25±0.35	8±0.5	7.25±0.35	8.83±0.76	11.16±0.76	7.83±1.32
<i>B. cereus</i> 10876	9.5±0.5	-	8.75±0.35	7.16±1.04	9.83±1.6	10.83±0.28	11±0.86	11.83±0.28
<i>C. freundii</i> 8090	7.83±0.28	9.83±0.28	8.66±0.57	7.5±0.5	9.5±1.32	9.5±0.86	11.66±0.28	8.83±0.76
Chloramphenicol (30 µg/disc)					29.23			
Distilled water					-			
DMSO(diluted 1/10)					-			

WE: Water Extracts, EAE: Ethyl Acetate Extracts, S: *Staphylococcus*, E: *Escherichia*, K: *Klebsiella*, B: *Bacillus*, C: *Citobacter*, DMSO: dimethylsulfoxide, (-): no inhibition. Results are the mean of three independent experiments ± SD.

Table 3. Minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations (mg.mL⁻¹) values of endophytic fungi and nettle leaves (water and ethyl acetate extracts) determined by the macrodilution method.

Bacterial strains	Nettle leaves				<i>A. alternata</i>				<i>A. tenuissima</i>				<i>A. sorghi</i>			
	WE		EAE		WE		EAE		WE		EAE		WE		EAE	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> 25923	3.12	12.50	3.12	12.50	0.78	3.12	1.56	6.25	0.39	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56	0.39	0.39
<i>S. aureus</i> 43300	3.12	12.50	3.12	25	3.12	25	3.12	25	1.56	3.12	1.56	6.25	0.39	0.39	0.78	1.56
<i>S. aureus</i> MU50	0.19	0.39	1.56	1.56	3.12	12.50	1.56	3.12	3.12	12.50	1.56	3.12	0.78	1.56	1.56	3.12
<i>S. aureus</i> LGA251	1.56	3.12	1.56	3.12	3.12	12.50	Na	na	6.25	25	1.56	6.25	0.78	0.78	0.78	1.56
<i>S. aureus</i> 84	0.78	1.56	3.12	12.50	1.56	3.12	3.12	6.25	3.12	12.50	3.12	25	0.78	1.56	0.78	0.78
<i>S. aureus</i> 95	0.39	0.39	3.12	6.25	1.56	6.25	6.25	>25	3.12	25	1.56	12.50	0.78	1.56	0.39	1.56
<i>S. aureus</i> 96	1.56	6.25	6.25	>25	1.56	3.12	3.12	25	3.12	>25	3.12	25	0.78	3.12	1.56	6.25
<i>S. aureus</i> 100	1.56	3.12	3.12	12.50	3.12	25	Na	na	6.25	25	3.12	>25	1.56	6.25	3.12	12.50
<i>S. aureus</i> 101	0.78	1.56	3.12	6.25	3.12	25	6.25	25	1.56	3.12	3.12	>25	0.78	1.56	3.12	25
<i>E. coli</i> 25922	na	na	6.25	>25	3.12	12.50	3.12	6.25	6.25	>25	3.12	25	0.78	1.56	1.56	12.50
<i>K. pneumonia</i> 4352	6.25	>25	na	na	na	na	6.25	>25	6.25	>25	6.25	>25	1.56	12.50	6.25	>25
<i>B. cereus</i> 10876	3.12	25	na	na	6.25	>25	6.25	>25	3.12	12.5	1.56	3.12	1.56	6.25	1.56	3.12
<i>C. freundii</i> 8090	6.25	>25	6.25	25	6.25	>25	6.25	>25	3.12	25	3.12	6.25	0.78	6.25	3.12	>25

WE: Water Extracts, EAE: Ethyl Acetate Extracts, S: *Staphylococcus*, E: *Escherichia*, K: *Klebsiella*, B: *Bacillus*, C: *Citobacter*, DMSO: dimethylsulfoxide, na: not applicable.

For ethyl acetate extract, no activity was exhibited by the leaves extract against *K. pneumonia* 4352 and *B. cereus* 10876, while this extract exhibited stronger activity against the MRSA strain *S. aureus* MU50 with 12.16 mm (Table 2). *A. sorghi* generally displayed stronger antimicrobial activity toward bacterial tested than the other fungi, except for the MRSA strain *S. aureus* MU50. Furthermore, the ethyl acetate extracts had a weak inhibitory effect on Gram-negative strains.

MIC and MBC values of leaves and endophytic fungi preparations, water and ethyl acetate extracts were also determined as an evaluation of their activity against selected bacteria (Table 3). For the antibacterial evaluation, all extracts were able to inhibit the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria, with MIC and MBC values ranging from 0.19 to 25 mg.mL⁻¹. Both extracts of *U. dioica* leaves and endophytic fungi had bacteriostatic and bactericidal activity against all examined bacteria (Table 3).

For water extract, leaves exhibited the highest ac-

tivity against *S. aureus* MU50 with bactericidal activity with MIC and MBC values of 0.19 and 0.39 mg.mL⁻¹ respectively (Table 3). Bactericidal activity against isolated *S. aureus* with MIC and MBC values ranging from 0.39 to 1.56 mg.mL⁻¹ respectively, was also examined. *A. sorghi* extract showed the bactericidal activity against all bacteria tested with MIC and MBC values ranging between 0.39 and 3.12 mg.mL⁻¹.

For ethyl acetate extract, *A. sorghi* exhibited the highest antibacterial activities against reference and isolated *S. aureus* strains with MIC and MBC values ranged between 0.39 to 1.56 mg.mL⁻¹ (Table 3).

DPPH free radical scavenging activity

Antioxidant activity monitored as DPPH radical scavenging activity showed that ethyl acetate extract presented the highest antioxidant activity compared to the water extract since its radical scavenging capacity was similar to that of ascorbic acid (Fig. 1).

For water extracts, *U. dioica* leaves extract had

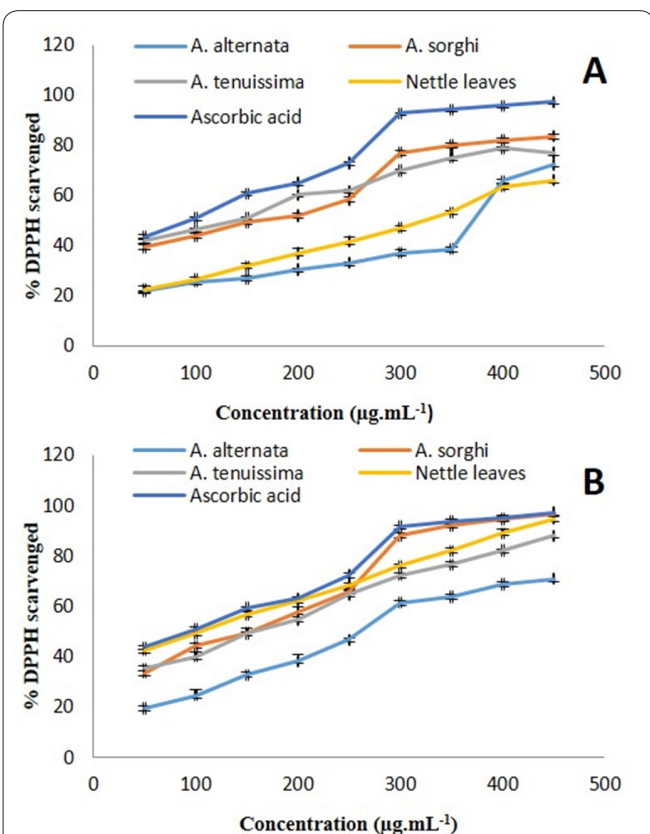


Figure 1. DPPH radical scavenging activities of endophytic fungi and nettle leaves water extracts (A) and ethyl acetate extracts (B) in comparison with ascorbic acid (results are the mean of three independent experiments \pm SD, for all $P < 0.001$).

the lower percentage inhibition of DPPH radical than all fungal extracts excepted for *A. alternata*. The free radical scavenging activities of the endophytic fungi extracts were as following: *A. alternata* (72.10 ± 0.60 %), *A. tenuissima* (76.77 ± 0.84 %) and *A. sorghi* (83.53 ± 0.70 %) at $450 \mu\text{g.mL}^{-1}$ extract. All extracts showed significant difference ($p < 0.001$) when compared with ascorbic acid (97.30 ± 1.05 %).

For the ethyl acetate extracts, the nettle leaves and *A. sorghi* exhibited the greatest antioxidant activity with DPPH free radical scavenging values of 94.87 ± 1.48 % and 96.88 ± 1.15 %, respectively, while *A. tenuissima* and *A.alternata* gave 87.98 ± 0.64 % and 70 ± 1.23 %, respectively. The low IC₅₀ value indicated a high antioxidant activity, thus indicating higher antioxidant activity of the nettle leaves ($104.63 \pm 3.33 \mu\text{g.mL}^{-1}$) than *A. sorghi* ($139.27 \pm 1.56 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Total thiol content and ROS detoxification enzymes

This study also focused on the quantification of total thiol compounds, considered as principal antioxidant molecules and investigated ROS detoxification enzyme activities such as catalases and superoxide dismutases, to assess the potential role of endophytic fungi in the regulation of abiotic and biotic stresses in the plant. Therefore, these enzymes and compounds were measured in nettle leaves and a 6-day old mycelium.

Unexpectedly, all fungi showed nearly the same amount of total phenolic compounds as nettle leaves. However, this was not the case for total thiols; hence, nettle leaves exhibited the highest level as the content of thiols was approximately two-fold more than that of fungi (Fig. 2).

Surprisingly, catalase demonstrated no significant variation between nettle leaves and all fungi. Nevertheless, nettle leaves which had the same SOD activity as *Alternaria alternata* showed significantly increased SOD activity than *Alternaria tenuissima* as well as *Alternaria sorghi* (Fig. 3).

Discussion

The antibacterial activities of the leaves of *Urtica dioica* and its three endophytic fungi were carried out using two types of extraction: water and ethyl acetate.

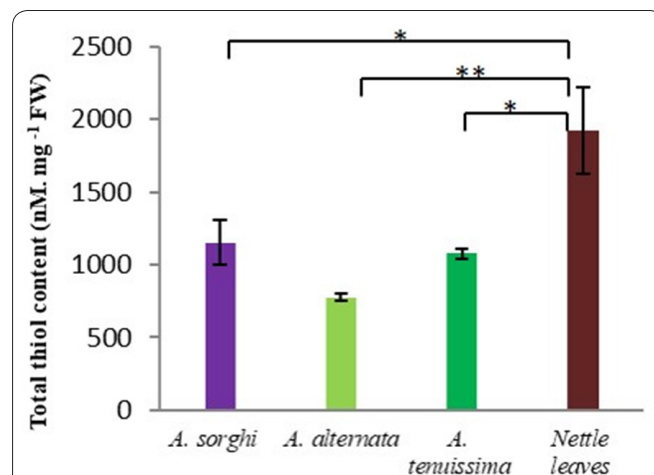


Figure 2. Total thiol contents in nettle leaves and its endophytic fungi (FW: fresh weight, results are the mean of three independent experiments \pm SD, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ns: not significant).

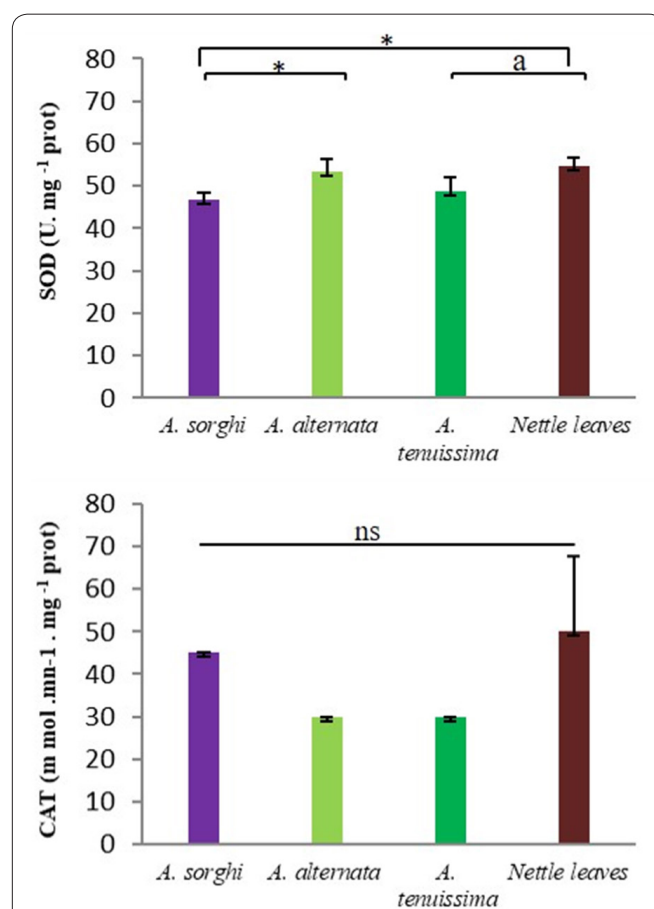


Figure 3. ROS detoxification enzymes specific activities in Nettle leaves and its endophytic fungi, CAT: catalase, SOD: superoxide dismutase (results are the mean of three independent experiments \pm SD, * $P < 0.05$, a: $P < 0.1$, ns: not significant).

This work is reported to be the first of its kind to focus on foliar endophytic fungi of *Urtica dioica*, however, many studies report the predominance of *Alternaria* in different host plants (3, 15). It is true that *Alternaria* species have been described as plant pathogenic fungi, referred to as saprophytes or plant parasites. However, *Alternaria sp.* has been recorded as endophytic fungi colonizing several host plants including medicinal plants (16–19). In addition, Tsai *et al.* (20) showed that endophytic fungi have pathogenic fungi as their ancestors, which have a very different life cycle.

All extracts have interesting inhibition zones against the majority of the bacteria tested, but they remain less than those obtained by the positive control, chloramphenicol. The abundance of molecules of all kinds in the extracts and the interactions that result from them could undoubtedly explain this difference. Gram-positive bacteria are more sensitive to extracts than Gram-negative bacteria. This difference could be attributed to the difference in membrane composition, Gram-negative bacteria, unlike Gram-positive bacteria, have a phospholipid outer membrane containing lipopolysaccharide as a major structural component, making the cell wall more impermeable to antibacterial agents (21).

The results showed that *E. coli* ATCC 25922 strain was resistant to water extract from *Urtica dioica* leaves. Gülcin *et al.* (22) showed low bacterial activity of water extracts of the same species with an inhibition zone of 8 mm while those of Salinas-Sánchez *et al.* (23) reported the inefficiency of ethanol extracts from nettle leaves against *E. coli* ATCC 9837 strain. The ethyl acetate extract of nettle leaves was also inactivated against *K. pneumonia* ATCC 4352. This result is consistent with the results reported by Körpe *et al.* (24), where extracts of *U. dioica* and *U. pilulifera* leaves showed no activity against *K. pneumonia*. However, we showed that the water extract of *A. sorghi* showed an interesting activity against *E. coli* ATCC 25922.

Endophytic fungi and especially *Alternaria sp.* can produce new bioactive compounds such as paclitaxel, podophyllotoxin and camptothecin (25). Moreover, *Aspergillus parasiticus* could transform α -santonin into 3,4-epoxy-¹ α -santonin, with high antibacterial activity (26).

A satisfactory antibacterial activity was also observed during this analysis for the extracts studied against reference MRSA strains or isolated from raw or acidified milk. The water extracts showed the most important activity against *S. aureus* MU50 and *S. aureus* S95 strains with inhibition zones of 15.5 and 14.05 mm respectively. The water extract of *A. sorghi* showed bactericidal activity against strains of *S. aureus* ATCC 43300 (CMI 0.39 mg.mL⁻¹; CMB 0.39 mg.mL⁻¹) and *S. aureus* LGA 251 (MIC 0.78 mg.mL⁻¹; CMB 0.78 mg.mL⁻¹). These results are in good agreement with Gülcin *et al.* (22) and Tasdelen Fisgin *et al.* (27) studies and are particularly interesting as clinical isolates of *S. aureus*, especially those resistant to Methicillin (28).

Alternaria species are known as a source of many bioactive substances with very different structures and activities (29, 30). Thus, boric acid D and Altenusin of *Alternaria sp.*, showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* with CMI of 100 μ g.mL⁻¹ and 25 μ g.mL⁻¹, respectively (31). In addition, some anthra-

quinones of *A. solani* and *Alternaria sp.* showed antibacterial activity on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahemolyticus* (32–34).

Pyrene derivatives of the endophyte fungus *A. tenuissima* of the Chinese medicinal plant, *Salvia przewalskii*, also exhibited antibacterial activity against the following strains: *B. subtilis*, *B. megaterium* and *C. perfringens* (35). Sonaimuthu *et al.* (4) demonstrated that tenuazonic acid is an active compound of *A. alternata* against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (CMI 250 μ g.mL⁻¹).

In this study, the total antioxidant activity of water and ethyl acetate extracts of *A. endophytes* and their host revealed that in general, all the extracts studied have high antioxidant activity. First of all, we performed a DPPH assay that is based on two scavenging mechanisms: electron transfer (ET) and hydrogen transfer (HAT) thus, this assay reflected the typical and global antioxidant capacity (36). Our results showed that the greatest free radical scavenging activity of DPPH was observed with ethyl acetate extracts and particularly those of *A. sorghi* and nettle leaves. Thus, ethyl acetate extracts from the leaves of *U. dioica* and *A. sorghi* exhibited the highest anti-free radical activity with a DPPH trapping rate of 94.86% and 96.87%, respectively. Such results were consistent with extracts of *A. sorghi* and nettle leaves rich in phenolic compounds that are extracted by polar solvents as ethyl ether (data not shown). Our results indicated that nettle leaves and endophytic fungi are an important source of total thiols. As it has been shown that alterations in cell thiol content are the main determinant of changes in the total antioxidant capacity of the cell, which would make it a useful parameter for the evaluation of oxidative stress (37). Thus, the highest rates of total thiols in the nettle leaves indicated that endophytic fungi helped their hosts to increase thiol antioxidants conferring them to withstand biotic and abiotic stresses (38).

This work also focused on ROS detoxification enzymes, including catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). It is well known that in plants, catalase eliminates H₂O₂ generated during photorespiration and fatty acid oxidation, it also plays an important role in detoxifying active oxygen species generated by various types of environmental stress (39). Superoxide dismutase catalyses the dismutation of the superoxide anion (O₂⁻) into O₂ and H₂O₂. The oxygen peroxide thus produced will then be eliminated by catalase and/or peroxidases (40). Results showed that while there was no significant variation in catalase activity in nettle and fungi, the SOD dismutation capacity increased markedly in *U. dioica* leaves. Indeed, SOD represents the first line of defense against superoxide anion scavenging and enzymes than catalase such as peroxidases (glutathione peroxidase, ascorbate and guaiacol peroxidases) are involved in the defense against hydrogen peroxide production (41).

However, Bonnet *et al.* (42) reported the presence of the endophyte *Epichloë lolii* modified the metabolism by promoting catalase catalysis of H₂O₂ and improving the host's defence capacity. Especially since an increase in the activity of ROS detoxification enzymes

has been shown in individuals of *E. dahuricus* exposed to drought (6).

To date, the mechanisms highlighted by endophytic fungi to improve the plant's defence systems remain unknown. Therefore, the SOD gene was isolated in *E. lolii*, which provides a new approach for studying the role of gene expression in the detoxification capacity of ROS and the interaction mechanism between endophyte and plant. Zhang *et al.* (5) showed that relative expression of the genes encoding SOD, POD and CAT and their corresponding enzymes increased in wheat seedlings under saline stress when *Trichoderma longibrachiatum* T6 strain was applied, indicating that this strain significantly protected seedlings from salt-related stress.

The study showed that *A. sorghi* presented the best activities compared to other isolated fungi, in fact, it is common for a plant to be colonized by fungi belonging to the same genus or species and only one or more biotypes of a given fungus will produce a biological active compounds in culture, that will need further investigations to characterize.

Acknowledgments

Thank to Pr. Sol V. to have welcome us in his laboratory as well as Pr. Riba A. and Dr. Hamdouche Y. for fungal strain identification.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect*2003;5:535-544.
2. Aziziarham, Z., Bilal, I., Zhong, Y., Mahmud, A., Roshandel, M. Protective effects of curcumin against naproxen-induced mitochondrial dysfunction in rat kidney tissue. *Cell Mol Biomed Rep* 2021; 1(1): 23-32.
3. Kumar S, Kaushik N, Edrada-Ebel R, Ebel R and Proksch P Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. *World J Microbiol Biotechnol*2011; 27 (3): 571-577.
4. Sonaimuthu V, Parihar S, Thakur JP, Luqman S, Saikia D, Chanotiya CS, Jhonpaul M and Negi A. Tenuazonic acid: A promising antitubercular principle from *Alternaria alternata*. *Microbiol Res*2011; 2 (2): 63-65.
5. Zhang S, Gan Y and Xu B. Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. *Front Plant Sci*2016; 7(1405): 1-11.
6. Zhang Y, Zhou Y, Zhang X, Duan T and Nan Z. Effects of *Epichloë* endophyte on antioxidant enzymes activities, photosynthesis and growth of three ecotypes of *Elymus dahuricus*. *Front Agr Sci Eng*2018; 5(1): 148-158.
7. Schulz B, Wanke S, Draeger S and Aust HJ. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol Res*1993;97(12): 1447-1450.
8. White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*1990; 18: 315-22.
9. Nath A, Raghunatha P and Joshi SR Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi of *Embllica officinalis*, an Ethnomedicinal Plant of India. *Mycobiol*2012;40(1): 8-13.
10. Valgas C, Machado de Souza S, Smania EFA and Smania A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol*2007;38 (2): 369-380.
11. Saha A and Rahman MS. Antimicrobial Activity of Crude Extract from *Calycopteris floribunsa*. *Bang J Microbiol*2008;25 (2): 137-139.
12. Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*1995; 28: 25-30.
13. Issawi M, Guillaumot D, Sol V and Riou C. Responses of an adventitious fast-growing plant to photodynamic stress: comparative study of anionic and cationic porphyrin effect on *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*2018; 162 (3): 379-390.
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*1976; 72: 248-254.
15. Khan R, Shahaz S, Choudhary MI, Khan SA and Ahmad A. Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pak J Bot*2010; 42 (2): 1281-1287.
16. Aly AH, Edrada-Ebel R, Indriani ID, Wray V, Müller WE, Totzke F, Zirrgiebel U, Schächtele C, Kubbutat MH, Lin WH, Proksch P and Ebel R. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J Nat Prod*2008;71(6): 972-980.
17. Naik BS, Shashikala J and Krishnamurthy YL. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. *Fungal Ecol*2008; 1(2): 89-93.
18. Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M and Crous PW (2013) *Alternaria* redefined. *Stud Mycol* 75 (1): 171-212.
19. Govindappa M, Channabasava R, Sadananda TS, Chandrappa CP and Umashankar T. Identification of bioactive metabolites by GC-MS from an endophytic fungus, *Alternaria alternata* from *Tabebuia argentea* and their in vitro cytotoxic activity. *Int J Biolo Pharm Res*2014; 5(6):527-534.
20. Tsai HF, Liu JS, Staben C, Christensen MJ, Latch GC, Siegel MR and Scharndl CL Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proc Natl Acad Sci USA*1994;9 (7): 2542-2546.
21. Kaushik A, Aron A, Mihreteab S, Mohamedkassm N and Michael Kidane E. Phytochemical screening and antimicrobial activity of medicinal plants used by eritrean traditional healers. *World J Pharm Res* 2015; 4 (4): 501-509.
22. Gülçin I, Küfrevioğlu OI, Oktay M and Büyükkökuroğlu ME. Antioxidant, Antimicrobial, Antiulcer and Analgesic Activities of Nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol* 2004;90(2-3): 205-215.
23. Salinas-Sánchez DO, Arteaga-Najera GL, Leon-Rivera I, Dorado Ramirez O, Guadalupe Valladares Cisneros M and Navarro García VM. Antimicrobial Activity of Medicinal Plants from the Huautla Sierra Biosphere Reserve in Morelos (México). *Polibotánica*2009; 28: 213-225.
24. Körpe DA, İşeri ÖD, Sahin FI, Cabi E and Haberal M. High-antibacterial activity of *Urtica spp.* Seed extracts on food and plant pathogenic bacteria International. *J Food Sci Nutr* 2013; 64(3): 355-362.
25. Zhao J, Shan T, Mou Y and Zhou L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11(2): 159-168.
26. Siddhardha B, Gadupudi R and Basaveswara Rao MV. Bio-transformation of (-)-a-santonin by *Aspergillus parasiticus* and antimicrobial efficacy of the transformed products. *Curr Biotechnol* 2012; 1(3): 194-198.
27. Tasdelen Fisgin N, Tanriverdi Cayci Y, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B and Tulek N. Antimicrobial activity of plant

- extract Ankaferd Blood Stopper. *Fitoterapia* 2009;80(1):48-50.
28. Gould IM. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2005; 61 (4): 277-282.
29. Liebermann B, Elling R and Ihn W. ACTG-toxins produced by a strain of *Alternaria alternata*. That does not originate from *Citrus* species. *Phytopathology* 1994;140 (4): 385-388.
30. Tan RX and Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 2001;18(4): 448-459.
31. Xu X, Zhao S, Wei J, Fang N, Yin L and Sun J. Porric acid D from marine-derived fungus *Alternaria sp.* isolated from Bohai Sea. *Chem Nat Compd* 2012; 47(6): 893-895.
32. Okamura N, Haraguchi H, Hashimoto K and Yagi A. Altersolanol-related antimicrobial compounds from a strain of *Alternaria solani*. *Phytochemistry* 1993;34(4):1005-1009.
33. Yagi A, Okamura N, Haraguchi H, Abo T and Hashimoto K. Antimicrobial tetrahydroanthraquinones from a strain of *Alternaria solani*. *Phytochemistry* 1993;33(1): 87-91.
34. Zheng CJ, Shao CL, Guo ZY, Chen JF, Deng DS, Yang KL, Chen YY, Fu XM, She ZG, Lin YC and Wang CY. Bioactive hydroanthraquinones and anthraquinone dimers from a soft coral-derived *Alternaria sp.* fungus. *J Nat Prod* 2012;75 (2): 189-197.
35. Wang XZ, Luo XH, Xiao J, Zhai MM, Yuan Y, Zhu Y, Crews P, Yuan CS and Wu QX. Pyrone derivatives from the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* SP-07 of Chinese herbal medicine *Salvia przewalskii*. *J Fitote* 2014;99: 184-190.
36. Liang N and Kitts DD. Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules* 2014; 19 (11):19180-208.
37. Balcerczyk A and Bartosz G. Thiols are Main Determinants of Total Antioxidant Capacity of Cellular Homogenates. *Free Radic Res* 2003;37(5): 537-541.
38. Kasotia A and Choudhary DK. Role of Endophytic Microbes in Mitigation of Abiotic Stress in Plants. In: Parvaiz A and Saiema R (ed.), *Emerging technologies and management of crop stress tolerance*. Elsevier, San Diego, London, Waltham 2014; pp. 97-108.
39. Scandalios JG. Regulation of the antioxidant defence genes Cat and Sod of maize. In: Scandalios, JG (ed.), *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1992; pp. 117-152.
40. Racchi ML. Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus spp.* *Antioxidants* 2013; 2 (4): 340-369.
41. Dastogeer KMG, Li H, Sivasithamparam K, Jones MGK and Wylie SJ. Fungal endophytes and a virus confer drought tolerance to *Nicotiana benthamiana* plants through modulating osmolytes, antioxidant enzymes and expression of host drought responsive genes. *Environ Exp Bot* 2018; 149: 95-108.
42. Bonnet M, Camares O and Veisseire P. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *J Exp Bot* 2000; 51(346): 945-953.