

**Université KASDI MERBAH-OUARGLA**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département des Sciences Biologique**



**Mémoire**  
**Master ACADEMIQUE**

**Domaine :** Science de la Nature et de la Vie

**Filière :** Biologie

**Spécialité :** Microbiologie Appliquée

**Présenté par**

. AOUARIB Khadidja

. LEMSARA Roqaya

**Thème**

**Etude des activités antimicrobienne et  
enzymatique des champignons endophytes  
isolés à partir d'*Artemisia absinthium***

Soutenu publiquement

Le : 05/06/2016

Devant le jury

Président	OULED EL HADJ Mohamed Didi	Pr	Univ. Ouargla
Encadreur	OULED EL HADJ-KHLIL Aminata	Pr	Univ. Ouargla
Co-Encadreur	BAOUNE Hafida	Doctorant	Univ. Ouargla
Examineur	BENSACI Messaoud Bacha agha	M.A.A	Univ. Ouargla

**Année Universitaire : 2015/2016**

## Dédicaces

*Au nom du Dieu clément et miséricordieux et  
que le salut du Dieu soit sur son prophète*

*MOHAMMED*

*Je dédie ce Modest travail*

*A tout qui sont les plus chère au monde :*

*A ma chère maman*

*A mon père et mon frère*

*A mes chères sœurs*

*A ma famille LEMSARA*

*A tous mes collègues de la promotion*





## Dédicaces

*Au nom du DIEU clément et miséricordieux et que  
le salut du Dieu soit sur son prophète MOHAMED*

*Je dédie ce Modest travail*

*Ames parents sans lesquels je ne serai pas arrivé  
jusque là*

*A mon marie Salahhe Eldinne pour son  
encouragement et son aide*

*A mon fils MOHAMED OUAÏL*

*Mes chères soeurs : Souhir, Khawla, Houda et Hala*

*A mes chères frères : Zoubir, Abd Elhalim, Hocine*

*A mes famille AOUARIB et ChENINE surtout  
Bouchra et Khawla et le nouveau né Saif eddinne*

*Ames amis aimes Alia, Rebha, Amel, Amina, Imane*

*Je désire exprimer mes vifs remerciements à mon  
binôme Roqaya pour sa patience et sa gentillesse  
devant ce travaille.*

*A tous mes collègues de la promotion*

*khadija*



## *Remerciements*

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

*Nous tenons à exprimer notre grande gratitude à Madame OULD EL HADJ KHELIL AMINATA . professeur au département des sciences biologiques de faculté de la Nature de la vie de l'université KASDI MERBAH -OUARGLA pour son soutien et ses encouragements. Nous remercions infiniment notre Co-promoteur Melle BAOUNE HAFIDA*

*A monsieur MOHAMMED DIDI OULD EL HADJ de nous avoir honoré de présidé le jury et à Mr BENSASI MESSAOUD BACHA AGHA d'avoir accepté d'être notre examinateur*

*Nous remercions également le personnel du laboratoire pédagogique faculté de l'ITAS de l'université de Kasdi Merbah d'Ouargla*

*Le personnel du laboratoire de l'hôpital de MOHAMMED BOUDIAF d'Ouargla*

*Particulière nous présentons nos remerciements à Mr Bahi et la pharmacienne spécialiste de parasitologie et de mycologie pour ses encouragements et leur aide.*

*Et nous remercions tous les personnes qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre.*

## Liste des abréviations

<b>A</b>	<i>Aspergillus.</i>
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribo-Nucléique.
<b>ATCC</b>	American type culture collection.
<b>C</b>	<i>Candida.</i>
<b>E</b>	<i>Enterococcus.</i>
<b>E</b>	<i>Escherichia.</i>
<b>ERO</b>	Espèce réactive de l'oxygène.
<b>F</b>	<i>Fusarium.</i>
<b>GYEP</b>	Glucose Yeast Extract Peptone.
<b>h</b>	heure.
<b>mec A+</b>	méticilline et amoxicilline.
<b>P</b>	<i>Pseudomonas.</i>
<b>PAM</b>	Peptone Agar Medium.
<b>PDA</b>	Potato Dextrose Agar.
<b>R</b>	Rayon.
<b>S</b>	<i>Staphylococcus.</i>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Classification de l’Absinthe .....	3
<b>Tableau II:</b> Endophytes et leurs produits naturels avec fonction spécifique.....	19
<b>Tableau III:</b> Souches bactériennes testées .....	21
<b>Tableau IV :</b> Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques endophytes. ....	29

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes. (KUSARI. S et SPITELLER. M., 2012).....	6
<b>Figure 2:</b> Représentation schématique des modes de transmission des champignons endophytes du genre <i>Neotyphodium</i> (SAIKKONEN <i>et al.</i> , 2004).....	9
<b>Figure 3:</b> Développement symbiotique d'endophytes fongiques (SELIM <i>et al.</i> , 2012).....	11
<b>Figure 4:</b> La balance de l'antagonisme entre les endophytes virulents et la réponse de la défense résultant d'une colonisation asymptomatique (SCHULZ et BOYLE,2006).	13
<b>Figure 5:</b> Quelques substances antibactériennes produites par les champignons endophytes (GIMENEZ <i>et al.</i> , 2007). .....	15
<b>Figure 6:</b> Structure d'une substance antifongique produite par les champignons endophytes (KUMAR <i>et al.</i> ,2014). .....	16
<b>Figure 7:</b> Structure de quelques substances antivirales produites par les champignons endophytes (GIMENEZ <i>et al.</i> , 2007). .....	17
<b>Figure 8:</b> Structure de quelques substances anticancéreux produites par les champignons endophytes. (GIMENEZ <i>et al.</i> , 2007). .....	18
<b>Figure 9:</b> Structure d'aurasperone. A, agent antioxydant produit par les champignons endophytes. (GIMENEZ <i>et al.</i> , 2007). .....	18
<b>Figure 10:</b> Diamètres d'inhibition des bactéries pathogènes Gram positif par les champignons endophytes. ....	40
<b>Figure 11:</b> Diamètre d'inhibition des bactéries pathogènes Gram négatif par les champignons endophytes isolées.....	41
<b>Figure 12:</b> Diamètres d'inhibition de la levure <i>Candida albicans</i> par les champignons endophytes.....	42
<b>Figure 13:</b> Pourcentage d'inhibition de croissance d' <i>Aspergillus niger</i> par les souches fongiques endophytes .....	43
<b>Figure 14:</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance de <i>Penicillium sp.</i> par les souches fongiques endophytes étudiées.....	44
<b>Figure 15:</b> Diamètres des zones de dégradation de l'amidon par les champignons endophytes .....	47
<b>Figure 16:</b> Diamètres des zones de dégradation de la gélatine par les champignons endophytes.....	48

**Figure 17:** Diamètres des zones de dégradation de la caséine par les champignons endophytes

.....49

**Figure 18:** Diamètres des zones de dégradation des lipides par les champignons endophytes50



## Liste des photos

<b>Photo 1.</b> Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de Scotch (CHABASSE, 2002).	23
<b>Photo 2.</b> Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de micro-culture (CHABASSE, 2002).	23
<b>Photo 3:</b> Technique des cylindres d'agar	25
<b>Photo 4:</b> Activité antimicrobienne sur <i>Enterococcus faecium</i> (Gram+)	40
<b>Photo 5 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur <i>Staphylococcus mec A+(Gram+)</i>	40
<b>Photo 6 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur <i>Staphylococcus mec A+(Gram+)</i>	40
<b>Photo 7 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram+)	40
<b>Photo 8 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur <i>E. coli</i> (Gram -)	41
<b>Photo 9 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram -)	41
<b>Photo 10 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur <i>Candida albicans</i>	42
<b>Photo 11 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques (S1) étudiées sur <i>Aspergillus niger</i>	43
<b>Photo 12 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques (S7) étudiées sur <i>Aspergillus niger</i>	43
<b>Photo 13 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques (S9) étudiées sur <i>Aspergillus niger</i>	43
<b>Photo 14 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques (S9) étudiées sur <i>Penicilium sp</i>	44
<b>Photo 15 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques (S1) étudiées sur <i>Penicilium sp</i>	44
<b>Photo 16 :</b> Activité antimicrobienne des souches fongiques (S16) étudiées sur <i>Penicilium sp</i>	44
<b>Photo 17 :</b> Activité amylolytique des souches fongiques (S7)	47
<b>Photo 18 :</b> Activité amylolytique des souches fongiques (S8)	47

<b>Photo 19</b> : Activité protéolytique (dégradation de la gélatine) des souches fongiques (S7) ..	48
<b>Photo 20</b> : Activité protéolytique (dégradation de la gélatine) des souches fongiques (S8) ..	48
<b>Photo 21</b> : Activité protéolytique (dégradation de la caséine) des souches fongiques (S8) ...	49
<b>Photo 22</b> : Activité protéolytique (dégradation de la caséine) des souches fongiques (S7) ...	49
<b>Photo 23</b> : Activité estérasique des souches fongiques (S7) .....	50
<b>Photo 24</b> : Activité estérasique des souches fongiques (S8) .....	50

## Table des matières

Dédicace	
Remerciement	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Table des matières	
Introduction .....	1
I.1.Présentation du genre <i>Artemisia</i> .....	3
I.2. Absinthe ( <i>Artemisia absinthium</i> ) .....	3
I.2.1. Classification .....	3
I.2.2. Noms communs .....	3
I.2.3. Noms vernaculaires .....	3
I.2.4. Historique .....	4
I.2.5. Description Morphologique.....	4
I.2.6. Origine et distribution.....	4
I.2.7. Période de récolte .....	5
I.2.8. Propriétés thérapeutiques.....	5
I.3. Champignons endophytes (Mycoendophytes) .....	5
I.3.1. Définition des microorganismes endophytes.....	5
I.3.2. Origine des endophytes .....	6
I.3.3. Diversité des endophytes .....	7
I.3.4. Mode de transmission.....	7
I.3.4.1. Croissance végétative des hyphes .....	8
I.3.4.2. Croissance par le biais des spores .....	8
I.3.6. Spécificité des tissus.....	10
I.3.7. Interaction hôte- endophyte .....	10
I.4. Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs .....	14
I.4.1. Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes (antibiotiques).....	14

I.4.2. Champignons endophytes comme source de substances antifongiques et anti-levuriennes .....	15
I.4.3. Champignons endophytes comme source de substances antivirales .....	16
I.4.4. Champignons endophytes comme source de substances anticancéreuses.....	17
I.4.5. Champignons endophytes comme source de substances antioxydantes .....	18
I.4.6. Autres molécules bioactives des endophytes.....	18
I.4.7. Enzymes .....	19
II.1. Matériels biologique .....	21
II.1.1. Champignons endophytes étudiés .....	21
II.1.2. Souches bactériennes testées .....	21
II.1.3. Souches fongiques testées .....	21
II.2.Méthodologie de travail .....	22
II.2.1. Repiquage des souches fongiques .....	22
II.2.2. Pré-identification.....	22
II.2.2.1. Pré-identification des genres par la technique de scotch .....	22
II.2.2.2. Pré-identification des genres par la technique de micro-culture .....	23
II.2.3. Activités antimicrobiennes.....	24
II.2.3.1. Activité antibactérienne et anti-levurienne.....	24
II.2.3.2. Activité antifongique .....	25
II.2.4. Activité enzymatique.....	26
II.2.4.1. Activité amylolytique .....	26
II.2.4.2. Activité protéolytique .....	27
III. Résultats et discussion .....	28
III.1. Pré-identification des isolats fongiques .....	28
III.1.1. Genres fongiques pré-identifiés par les méthodes de micro-culture et de Scotch	28
III.2. Activité antimicrobienne.....	40
III. 2.1. Activité antibactérienne.....	40
III. 2.2. Activité antifongique.....	42
III.2.3. Discussion .....	45
III.3. Activité enzymatique .....	47
III.3.1.Activité amylolytique .....	47
III. 3.2.Activité protéolytique.....	48
III.3.3.Activité estérasique .....	50
III.3.4. Discussion .....	50

Conclusion et perspectives .....	52
Références bibliographiques.....	54
Annexes .....	63



# *Introduction*

**Promotion 2015**



## **Introduction**

L'absinthe (*Artemisia absinthium*) est l'une des plus anciennes plantes médicinales appartenant au genre *Artemisia* connue pour ses propriétés antifongique, antibiotiques, insecticides et ses huiles essentielles qui ont d'autres activités biologiques (WRIGHT, 2002). Ce genre est aussi connue pour son pouvoir d'héberger des endophytes (GUO *et al.*, 2006 ; SCHAUENBERG *et al.*, 2013).

Les endophytes sont des microorganismes qui vivent asymptomatiquement à l'intérieur des tissus de la plante hôte. Le terme endophyte englobe des bactéries, des algues et des champignons (SURENDRA *et al.*, 2011). Ces derniers sont les microorganismes les plus fréquemment isolés en tant qu'endophytes (STROBEL *et al.*, 2004).

Les champignons endophytes peuvent jouer le rôle de mutualistes, de pathogènes ou de saprophytes. Dans le cas du mutualisme, ils peuvent prévenir la plante hôte des herbivores et des microorganismes pathogènes grâce au pouvoir qu'ils ont de produire des antibiotiques, des antifongiques et une variété d'enzymes extracellulaires, ils peuvent aussi être une source d'éléments minéraux, comme ils peuvent délivrer la plante hôte de l'effet nocif des métaux lourds présents dans le sol (SHANRAR *et al.*, 2008).

Pour s'établir au sein de la plante hôte, les champignons endophytes ont la capacité de produire des molécules biologiquement actives telles que les alcaloïdes, les polykétides, les acides phénoliques, flavonoïdes, quinones, stéroïdes, terpenoïdes, les cétones et les enzymes extracellulaires (GARY, 2006 ; GIMENEZ *et al.*, 2007 ; JALGAONWALE *et al.*, 2011 ; GUSTAVA *et al.*, 2012). Ces molécules leur permettent de cataboliser certains constituants de la plantes (tissus morts), d'améliorer ses conditions environnementales et de la protéger de ses ennemis naturels (SAIKKONEN *et al.*, 1998).

La contribution de la plante hôte dans cette association est d'assurer aux champignons endophytes l'hébergement, la nutrition organique et la dissémination à la génération suivante dans le cas de transmission verticale (SAIKKONEN *et al.*, 1998).

La co-existence des champignons endophytes et des plantes qui les hébergent peut conduire à la modification de certains caractères des endophytes expliquée par le phénomène de transfert de gènes entre les deux partenaires (GARY et STROBEL, 2003). En effet,

certains champignons endophytes n'expriment pas la pathogénicité décrite chez leurs homologues pathogènes (PROMPUTHA *et al.*, 2007 ; SUNITHA *et al.*, 2013).

Cependant, l'intérêt biologique de ces endophytes dissociés de leur plante hôte est peu documenté, c'est pourquoi nous nous sommes intéressées à la recherche des activités antimicrobiennes et enzymatique de quelques souches fongiques endophytes isolées de l'*Artemisia absinthium*, plante médicinale reconnue pour ses vertus médicales dues à la présence de molécules propres à la plante ou provenant des endophytes qu'elle héberge.



## CHAPITRE I

# *Synthèse bibliographique*

Promotion 2015

## I.1. Présentation du genre *Artemisia*

Le genre *Artemisia* est l'un des plantes le plus largement distribué; de la famille d'*Asteraceae* (WRIGHT, 2002), il se compose d'environ 500 espèces réparties à travers le monde (GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2012).

Selon les études détaillées de Wagner en 1977 sur les propriétés pharmaceutiques des *Asteraceae*, il a également souligné le rôle éminent du genre *Artemisia* en plus de leurs propriétés antifongique, antibiotiques, insecticides et leur huiles essentielles qui ont d'autres activités biologiques (WRIGHT, 2002).

## I.2. L'absinthe (*Artemisia absinthium*)

### I.2.1. Classification

La classification de l'Absinthe est montrée dans le tableau suivant :

**Tableau I : Classification de l'Absinthe (GUIGNARD *et al.*, 1983).**

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous-classe</b>	Aseridae
<b>Ordre</b>	Asterales
<b>Famille</b>	Asteraceae
<b>Genre</b>	<i>Artemisia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Artemisia absinthium</i>

### I.2.2. Noms communs

Elle est connue sous le nom d'armoise (Royaume-Uni), absinthe (France) et aussi sous le nom de la Grande absinthe (WRIGHT, 2002), armoise amère, herbe sainte (WRIGHT, 2002 ; LUCIENNE, 2010), absinthe suisse, absinthe (WRIGHT, 2002), herbe aux vers, herbe sainte, et l'armoise absinthe (LUCIENNE, 2010).

### I.2.3. Noms vernaculaires

Chedjret meriem, chaibet el adjouz, chih quoraçani, degnatech cheik, siba, chiba (LUCIENNE, 2010) et l'afsintine (HALIMI, 1997).

#### I.2.4. Historique

Le nom *Artemisia absintium* dérive de l'*Artemisia*, le nom de la déesse Artémis, le nom grecque de Diana, qui a découvert les vertus de la plante, tandis que *absinthium* vient du grecque « apsinthion » qui signifie ‘ ‘ imbuvable’ ’, ce qui reflète la nature très amère de la plante (WRIGHT, 2002). Tandis que le nom commun d'absinthe est dérivé de ses propriétés anthelminthiques qui ont été reconnus par les anciens Egyptiens. Elle a été utilisée depuis le 18<sup>ème</sup> siècle, comme des remèdes pour tous les usages (LACHENMEIER, 2010).

#### I.2.5. Description Morphologique

L'Absinthe est un sous-arbrisseau vivace (ROUX et CATIER, 2007) pouvant atteindre 50 cm d'environ (LUCIENNE, 2010) à 1m de haut, à tige souterraine ligneuse, dressée et rameuse, avec des feuilles alternes aromatiques (GUIGNARD *ET AL.*, 1983) de couleur grise pâle (LUCIENNE, 2010) sur les deux faces (GUIGNARD *ET AL.*, 1983) ou bleue verte; due à la présence d'azulène (BOTINEAU, 2010).

Les inflorescences sont de petits capitules floraux jaunes (GUIGNARD *et al.*, 1983) à jaune-vert (BOTINEAU, 2010), globuleux (ROUX et CATIER, 2007), disposées en grappes composées ramifiées (GUIGNARD *et al.*, 1983) et d'odeur particulière très forte (LUCIENNE, 2010). Le fruit est un akène très petit, lisse et sans aigrette. Les fragments de tige, rigides, gris argentés à l'extérieur, ils sont anguleux et possèdent une moelle interne (GUIGNARD *et al.*, 1983).

#### I.2.6. Origine et distribution

L'absinthe est originaire des pays chauds méditerranées, habituellement trouvée dans les lieux des déchets secs tels que les routes, préférant les lieux riches en azote, elle est aussi originaire des îles britanniques (WRIGHT, 2002), disséminée dans les régions incultes, pierreuses et arides d'Asie et d'Europe. L'absinthe est assez commune dans les Alpes jusqu'à 2000 m d'altitude, elle est trouvée également en Afrique du Nord et en Amérique (GUIGNARD *et al.*, 1983) surtout dans les montagnes. Elle pousse sur les murs et les roches secs par grosses touffes de feuilles recouvertes d'un fin duvet gris pâle (LUCIENNE, 2010).

### I.2.7. Période de récolte

*L'A. absinthium* est collectée généralement entre le printemps et l'été (LUCIENNE, 2010).

### I.2.8. Propriétés thérapeutiques

L'usage médical de *L'A. absinthium* remonte à l'époque romaine (LACHENMEIER, 2010). Elle possède des vertus stimulantes, stomachiques, diurétiques, fébrifuges et vermifuges et une action antitoxique en cas d'intoxication au plomb (LUCIENNE, 2010). Ses drogues sont traditionnellement utilisées pour stimuler l'appétit et pour les règles douloureuses (ROUX et CATIER, 2007). Elle a une activité antifongique, antiprotozoaire contre *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* et *Plasmodium falciparum* et antibactérienne contre *Mycobacterium* (GONZALEZ-COLOMA *et al.*, 2012).

## I.3. Champignons endophytes (Mycoendophytes)

### I.3.1. Définition des microorganismes endophytes

La définition la plus couramment utilisée pour décrire les endophytes est celle de Petrini (1991), qui définit les endophytes comme étant tous les microorganismes qui vivent dans les organes internes des plantes à un certain moment de leur vie et peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommage apparents chez l'hôte (HYDE ET SOYTONG, 2008).

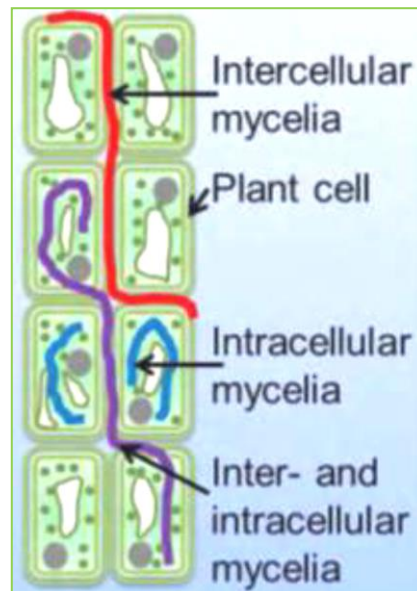
Littéralement, le mot endophyte est dérivé du grec, «endo» signifie « intérieur » et « phyton » signifie « plante » (JALGAONWALA *et al.*, 2010). Le terme endophyte a été utilisé pour la première fois par Debray en 1866 pour décrire les champignons qui colonisent l'intérieur des tissus végétaux des tiges et des feuilles (MORICCA et RAGAZZI., 2008 ; MANSOURI, 2011). Le terme endophyte englobe des bactéries, des algues et des champignons (SURENDRA *et al.*, 2011).

Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolés en tant qu'endophytes (STROBEL *et al.*, 2004). Ce sont des champignons qu'ils peuvent croître de façon intra et/ou intercellulaires dans les tissus internes des plantes, sous la couche des cellules épidermiques, résident d'une manière asymptomatique dans le tissu interne des



plantes (MORICCA et RAGAZZI, 2008 ; VEGA *et al.*, 2008 ; PIMENTEL *et al.*, 2011) (figure 01). Ils sont présents et ont été isolés de toutes les plantes déjà étudiées, et leurs façons de croître asymptomatiquement dans les tissus de plantes a induit que leurs relations avec l'hôte était de l'ordre du mutualisme et de la symbiose mais leur biodiversité suggère qu'ils peuvent être également des saprophytes ou des pathogènes opportunistes (STROBEL *et al.*, 2004 ; HYDE ET SOYTONG, 2008).

Ils ont longtemps pensé que ces champignons n'avaient aucune fonction, ni aucun intérêt; cependant, dans les dernières décennies, les recherches ont commencé à s'intéresser aux endophytes (MORICCA et RAGAZZI, 2008) qu'il considère maintenant comme des sources de beaucoup de composés d'intérêt tels les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticide, etc. (MAHESHWARI, 2006).



**Figure 1: Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes. (KUSARI. S et SPITELLER. M., 2012).**

### I.3.2. Origine des endophytes

L'ubiquité des champignons endophytes chez les plantes et au sein de leur tissus démontrent que les champignons ont été associés avec les plantes depuis la première colonisation de la terre, donnent à penser que les plantes et les endophytes partagent une longue et intime histoire. (HECKMEN *et al.*, 2001). Certains scientifiques ont suggérés

que certains endophytes peuvent être d'origine des tissus de la plante elle-même (HOLLAND, 1997).

L'évidence de l'association des microorganismes, avec les plantes est confirmée par leur présence dans les tissus fossiles des tiges et feuilles. En effet, les associations endophytes-plantes hôte ont pu évoluer depuis que les plantes sont apparues sur terre (STROBEL, 2003 ; et ZHANG *et al.*, 2006).

Les symbioses des endophytes avec les plantes datent probablement depuis l'émergence des plantes vasculaires (RODRIGUEZ et REDMAN., 1997 ; ZHANG *et al.*, 2006).

Les endophytes des graminées et des plantes ligneuses pourraient être évolués à partir des champignons parasites ou pathogènes. Les endophytes des plantes ligneuses sont étroitement liées à des champignons pathogènes, et probablement évolués à partir de ces derniers via une extension des périodes de latence et une réduction de la virulence (SAIKKONEN *et al.*, 1998).

Beaucoup de champignons endophytes sont considérés comme des phytopathogènes opportunistes qui peuvent induire des symptômes infectieux sur la plante hôte, une fois que cette dernière soit fragilisée ou stressée dans son environnement par un ou plusieurs facteurs de nature abiotique ou biotique (CARROLL., 1988).

### **I.3.3. Diversité des endophytes**

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

### **I.3.4. Mode de transmission**

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction :

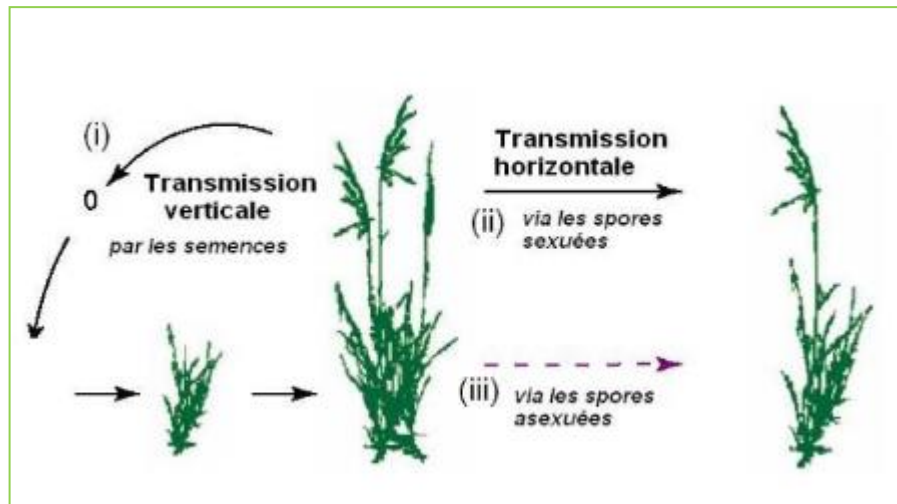
#### I.3.4.1. Croissance végétative des hyphes

Elle est accompagnée par la transmission verticale, la croissance se fait complètement à l'intérieur des tissus de la plante hôte (SELOSSE et SCHARDL., 2007). La transmission verticale est connue notamment chez les Graminées (FAETH, 2002). ainsi les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les biais des graines (SAIKKONEN *et al.*, 2004). C'est le principal mode de transmission des champignons endophytes (SAIKKONEN *et al.*, 2010). C'est le cas des Poacées ; cela peut procurer à la plante hôte plusieurs bénéfices : augmentation de la tolérance à la sécheresse, protection contre les herbivores et résistance contre les pathogènes (CLAY et SCHARDL, 2002) (Figure 02).

#### I.3.4.2. Croissance par le biais des spores

Ce groupe de champignons se transmet horizontalement (SAIKKONEN *et al.*, 2004), c'est-à-dire que le champignon est transmis par les spores sexuées ou asexuées et va donc infecter les autres plantes (ARNOLD *et al.*, 2003 ; GALLERY *et al.*, 2007). En général ; la transmission horizontale des endophytes est associée aux tissus photosynthétique de la plante (la feuille) (HIGGIES *et al.*, 2007). Ce mode de transmission nécessite la production des spores externes et leur dispersion aéroportée pour infecter d'autres plantes (ZABALGOGEAZCOA, 2008).

Les insectes phytophages peuvent également participer à la propagation des endophytes, car les spores de certaines espèces de champignons sont résistantes à la digestion intestinale, et sont présents dans leurs excréments. La transmission horizontale semble être le mécanisme prédominant de la dispersion des espèces endophytes (ZABALGOGEAZCOA, 2008). (Figure 02).



**Figure 2: Représentation schématique des modes de transmission des champignons endophytes du genre *Neotyphodium* (SAIKKONEN *et al.*, 2004).**

### I.3.5. Spécificité de l'hôte

Les relations des endophytes avec une ou plusieurs plantes peuvent être décrites en termes de spécificité de l'hôte, la récurrence de l'hôte, sélectivité de l'hôte et préférence d'hôte (COHEN, 2006 ; ZHOU et HYDE, 2001).

La première est la relation qui lie le champignon avec un seul hôte ou un groupe mais des espèce apparentées, et pas avec d'autres plantes indépendantes dans le même habitat (HUANG *et al.*, 2008). La deuxième, c'est la fréquence ou la prédominance d'un champignon sur une plante ou sur une gamme de plantes (ZHOU et HYDE., 2001). Quand un champignon endophyte peut se lier avec deux espèces de plantes apparentées, mais avec une préférence pour l'une d'elle, la relation est appelé sélectivité de l'hôte. La préférence de l'hôte, quant à elle, est souvent utilisée pour indiquer la dominance ou la survenance unique d'un champignon sur un hôte particulier (BETTUCCI *et al.*, 2004 ; SURYANARAYANAN et KUMARESAN, 2000).

Certains champignons auraient une large gamme d'hôtes, tels *Alternaria*, *Penicillium* et *Periformospora*, qui ont des hôtes appartenant à des genres ou des familles différentes de plantes, contrairement à d'autres endophytes comme par exemple *Neotyphodium* qui est un champignon endophyte qui a une gamme d'hôtes restreinte, elle est limitée à une ou deux espèces végétales (ZABALGOGEAZCOA., 2008).

Nombreuses sont les études qui permettent de dire que les facteurs environnementaux, tels l'application d'engrais, le stress hydrique et des régimes d'humidité saisonnière, en plus de l'espèce de l'hôte, peuvent avoir un effet sur les communautés des champignons endophytes (FUJIMURA *et al.*, 2008 ; GONTHIER *et al.*, 2006 ; SEGHERS *et al.*, 2004 ; SURYANARAYANAN *et al.*, 2002).

### **I.3.6. Spécificité des tissus**

Beaucoup d'endophytes infectent localement des parties de la plante, se limitant à une petite zone du tissu (ZABALGOGEAZCOA., 2008).

Des différences d'assemblage des champignons endophytes ont été trouvés dans les différents tissus de la même espèce végétale, ou même dans les différents tissus d'une plante unique, ceci révèle une spécificité des tissus de certains champignons endophytes (COLLADO *et al.*, 2011). Certains endophytes peuvent être trouvés dans des parties de plantes spécifiques tels les racines, feuilles, tandis que d'autres peuvent infecter plusieurs de ces pièces, comme les espèces systémiques *Neotyphodium* et *Epichloë* infectant les espaces intercellulaire des feuilles, les tiges et les graines de leurs hôte, ils peuvent être isolés à partir de différentes parties de la même plante (ZABALGOGEAZCOA., 2008).

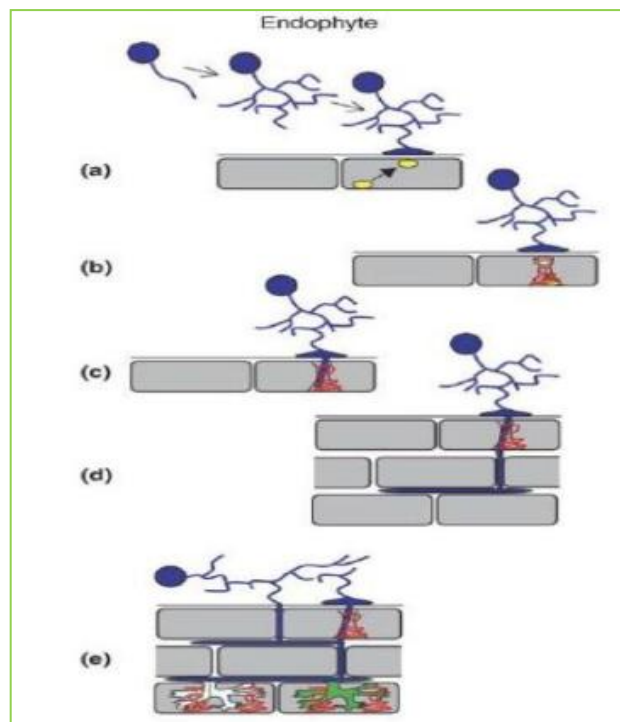
Parfois, les composés chimiques de certains tissus peuvent altérer la colonisation de différents champignons endophytes, cependant certains de ces endophytes peuvent tolérer certaines toxines produites par l'hôte, ce qui influe sur l'abondance, la diversité et la composition en espèces des communautés fongiques (HAMMERSCHMIDT., 1999, OSBOURN., 1999, VANETTEN *et al.*, 2001 ; OSBOURN *et al.*, 2003;). Il y a aussi l'âge de l'hôte ; avec le temps, les tissus âgés de la plante hôte accumulent de plus en plus d'endophytes contrairement aux tissus jeunes (ZABALGOGEAZCOA, 2008).

### **I.3.7. Interaction hôte- endophyte**

L'établissement d'une relation symbiotique entre la plante et ces champignons endophytes s'effectue en plusieurs étapes (Figure 03) :

- (a) Une fois que les spores germent et approchent un appareil végétatif de l'hôte, la dominance apicale est abandonnée et le branchement d'hyphes est déclenché par le 5-désoxy-strigol ;

- (b) Dès le premier contact physique, le champignon forme un appressorium qui paraît induire le mouvement du noyau de la plante vers le site du contact ;
- (c) Les éléments cytosquelettiques et le réticulum endoplasmique forment l'appareillage de la pré-pénétration le long de l'axe du mouvement nucléaire ;
- (d) Quand le champignon atteint finalement le cortex intérieur, il pénètre la paroi cellulaire et forme une structure hyphale (comme un réseau filamenteux) ;
- (e) La colonisation des tissus commence. L'infection initiale est accompagnée par une induction équilibrée de gènes de la défense de la plante (AKIYAMA *et al.*, 2005 ; SELIM *et al.*, 2012).



**Figure 3: Développement symbiotique d'endophytes fongiques (SELIM *et al.*, 2012).**

(a) Germination, branchement, signalisation (b) Reconnaissance : Programmation de l'hôte, préparation cellulaire pour la pénétration (c) Pénétration : Réorganisation cellulaire (d) Colonisation (e) Entretien de compatibilité : Survie cellulaire de l'hôte transfert des nutriments, effet systémique propagation fongique.

Les endophytes sont susceptibles d'adopter la même stratégie que les champignons pathogènes afin de pénétrer dans une plante hôte (SIEBER, 2007 ; SURYANARAYANAN *et al.*, 2009). Dans le cas de la pénétration directe des champignons pathogènes, la surface de l'épiderme de l'hôte est la première ligne de défense (HEATH, 2002 ; SURYANARAYANAN *et al.*, 2009). L'induction de phytoalexine et de protéines liées à la



pathogénèse observées pour les interactions hôte-pathogène (SURYANARAYANAN *et al.*, 2009) sont également actives pour les interactions hôte-endophytes (SIEBER, 2007 ; SURYANARAYANAN *et al.*, 2009).

Les endophytes possèdent différents modes de vie, donnant différentes interactions qui sont variables d'un endophyte à un autre et d'un hôte à un autre (ZABALGOGEAZCOA, 2008). ils dépendent des facteurs abiotiques, des interactions avec d'autres espèces, de la géographie et de la phylogénie (SAIKKONEN *et al.*, 1998), et varient de l'antagonisme au mutualisme (ZABALGOGEAZCOA, 2008). Il existe une relation complexe entre les endophytes et leurs plantes hôtes (SELIM *et al.*, 2012). Les interactions hôte-endophytes peuvent varier d'un mutualisme vers un commensalisme ou parasitisme, selon les dispositions génétiques des deux partenaires, leur stade de développement et l'état nutritionnel, mais aussi sur les facteurs environnementaux (JOHNSON *et al.*, 1997, REDMAN *et al.*, 2001, SCHULZ *et BOYLE.*, 2005).

Le commensalisme apporte un bénéfice à l'endophyte en permettant une existence paisible et un apport d'éléments nutritifs sans affecter l'hôte. Parallèlement La relation mutuelle profite aux champignons endophytes grâce à la fourniture d'énergie électrique, les éléments nutritifs et la protection contre les stress environnementaux (SELIM *et al.*, 2012).

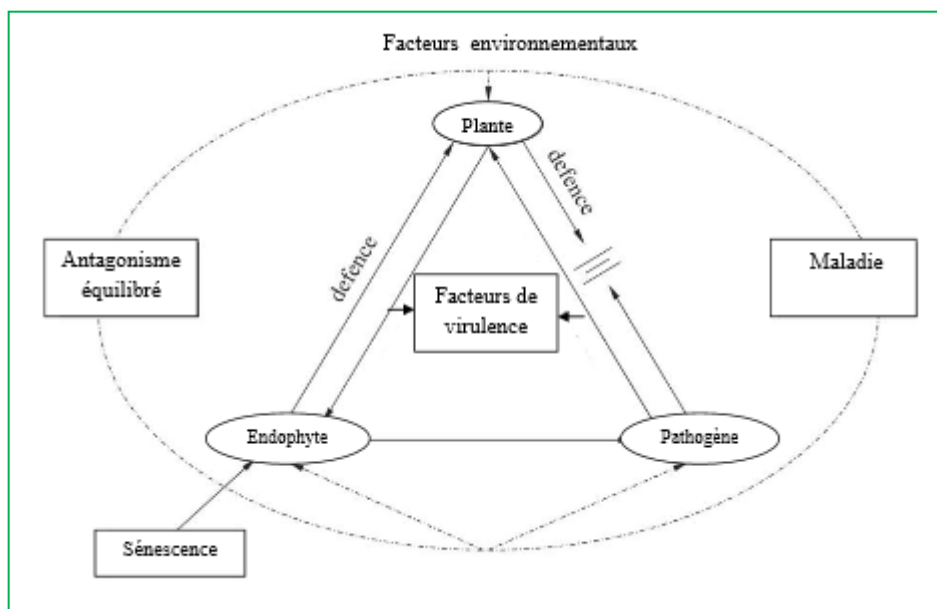
D'autre part les champignons endophytes favorisent indirectement la croissance des plantes en produisant des substances spéciales principalement des métabolites secondaires et des enzymes, qui sont responsables de l'adaptation des plantes aux stress abiotiques tels que la lumière, la sécheresse et aux stress biotiques, comme les herbivore, les insectes et les attaques de nématodes ou d'envahir pathogènes (BARZ *et al.*, 1988, KOEGEL *et al.*, 2006, SELIM *et al.*, 2012). Sous certaines conditions, les endophytes peuvent devenir des parasites, et devenir des agents pathogènes provoquant une infection symptomatique (BROWN *et al.*, 1998). Inversement, la mutation génétique de certains pathogènes a entraîné la perte d'un facteur de virulence et sa transformation à un champignon endophyte (FREEMAN et RODRIGUEZ., 1993).

Par conséquent, le parasitisme est une exception dans les interactions plantes-endophytes; il peut être considéré comme un état déséquilibré d'une symbiose lorsque l'hôte est stressée et les conditions physiologiques ou écologiques favorise la virulence (MÜLLER *et al.*, 2005, SCHULZ et BOYLE., 2005, KOEGEL *et al.*, 2006, SELIM *et al.*, 2012).

Les endophytes de certaines plantes pourraient être des agents pathogènes pour d'autres plantes, en fonction de l'équilibre entre la pathogénicité et l'endophytisme du micro-organisme dans les différents hôtes (SAIKKONEN *et al.*, 2004, SELIM *et al.*, 2012).

SCHULZ et BOYLE (2005) ont proposé que la colonisation asymptomatique des endophytes peut être soit un équilibre des antagonismes entre la plante hôte et l'endophyte, où la virulence de l'endophyte et la défense des plantes sont en équilibre et l'interaction reste asymptomatique.

Une fois que l'interaction hôte-endophyte devient déséquilibrée le mécanisme de défense de la plante tue le champignon endophyte pathogène. Que l'interaction est équilibrée ou déséquilibrée dépend de l'état général des partenaires, la virulence du champignon, et les défenses de l'hôte où les deux sont variables et influencées par des facteurs environnementaux, l'état nutritionnel et les stades de développement des partenaires. Par conséquent, le commensalisme et le mutualisme ont besoin d'un équilibre entre les réactions de défense de la plante et de la demande en éléments nutritifs de l'endophyte (KOEGL *et al.*, 2006, SELIM *et al.*, 2012). Les résultats d'intervention de défense des plantes dans la colonisation asymptomatique sont montrés dans la figure (04) (SCHULZ et BOYLE, 2006).



**Figure 4: La balance de l'antagonisme entre les endophytes virulents et la réponse de la défense résultant d'une colonisation asymptomatique (SCHULZ et BOYLE, 2006).**

#### I.4. Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs

Le développement de résistance aux médicaments de plusieurs bactéries, l'augmentation de l'incidence des infections fongiques, ainsi que d'autres problèmes de santé et d'environnement, poussent à rechercher de nouvelles substances bioactives, ceux produites par des champignons endophytes, en plus d'être impliqués dans la relation hôte-endophyte, ils peuvent aussi avoir des applications en médecine, agriculture et industrie (STROBEL, 2002).

Les champignons endophytes sont considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs, produisant le plus grand nombre de métabolites secondaires par rapport aux autres catégories de microorganismes, ainsi qu'une grande diversité structurale comprenant des alcaloïdes (amines, amides...), peptides, stéroïdes, terpénoïdes, phénols, quinones, composés aliphatiques, flavonoïdes etc. (TAN et ZOU, 2001; STROBEL *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2010).

Ces substances naturelles produites par les champignons endophytes possèdent un large spectre d'activité biologique, comprenant des composés antibiotiques, antifongiques, antiviraux, immunosuppresseurs, agents anticancéreux, antioxydants, insecticides et agents de contrôle biologiques et autres molécules bioactives de rôle fonctionnel différent (STROBEL et DAISY, 2003 ; STROBEL *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006 ; GUO *et al.*, 2007).

##### I.4.1. Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes (antibiotiques)

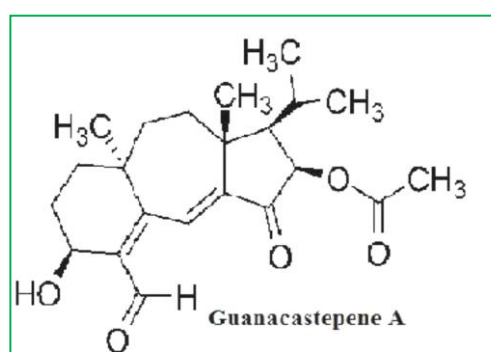
La fréquence croissante des souches pathogènes multirésistantes a limité l'effet d'un traitement antimicrobien traditionnel, ce qui implique le besoin de nouveaux agents thérapeutiques contre les maladies infectieuses (STROBEL et DAISY, 2003 ; LARSEN *et al.*, 2005).

Les antibiotiques sont définis comme des molécules organiques naturelles produites par des microorganismes, sont les produits bioactifs les plus isolés à partir des endophytes. (GUO *et al.*, 2006).

Guanacastepenes sont des molécules existantes dans les champignons endophytes ont une activité antimicrobienne, spécialement guanacastepene A, qui a une activité antibiotique contre *Staphylococcus aureus* *Enterococcus faecalis*, l'antibiotique periconicine A, et B

contre *S. aureus* et aussi altersetine, purifié à partir de l'endophyte *Alternaria sp.* qui affiche une activité puissante contre des bactéries pathogènes à Gram positif (HELLWIG *et al.*, 2002 ; GIMENEZ *et al.*, 2007) (Figure 05).

Une nouvelle cytochalasine, phomopsichalasinine a été isolée de l'endophyte *Phomopsis sp.*. Dans sa structure, le macrocycle des autres cytochalasines est remplacé par un système tricyclique, ce métabolite a démontré une activité lors des essais avec une concentration de quatre µg/disque contre *Bacillus subtilis*, *Salmonella gallinarum* et *Staphylococcus aureus* (STROBEL *et al.*, 2004).



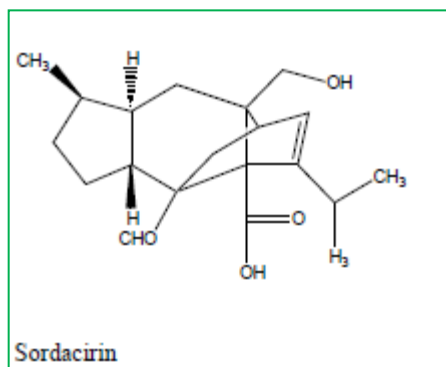
**Figure 5: Structure d'une substance antibactérienne produite par les champignons endophytes (GIMENEZ *et al.*, 2007).**

#### **I.4.2. Champignons endophytes comme source de substances antifongiques et anti-levuriennes**

Une grande diversité de structures qui ont une propriété antifongique isolés à partir des champignons endophytes, Sordarines représentent une famille très importante d'agents antifongique. Sordrine était le premier isolé par Sigg et Stoll en 1966 à partir de *Sordaria araneosa*. Autre exemple est moriniafungine isolé de *Morinia pestalozzioides* (ascomycète) (GIMENEZ *et al.*, 2007) (Figure 06).

Le champignon endophyte *Cryptosporiopsis quercina* isolé d'une plante médicinale originaire d'Eurasie *Tripterigeum wilfordii*, serait à l'origine de la production de cryptocandine A un peptide antimycosique lié aux échinocandines et pneumocandines, et démontrant une activité contre *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea* (STROBEL *et al.*, 2004). Cryptocandine et ses dérivés sont mis à l'étude pour lutter contre certain nombre de maladies fongiques de la peau et des ongles (STROBEL *et al.*, 2004; STROBEL, 2002).

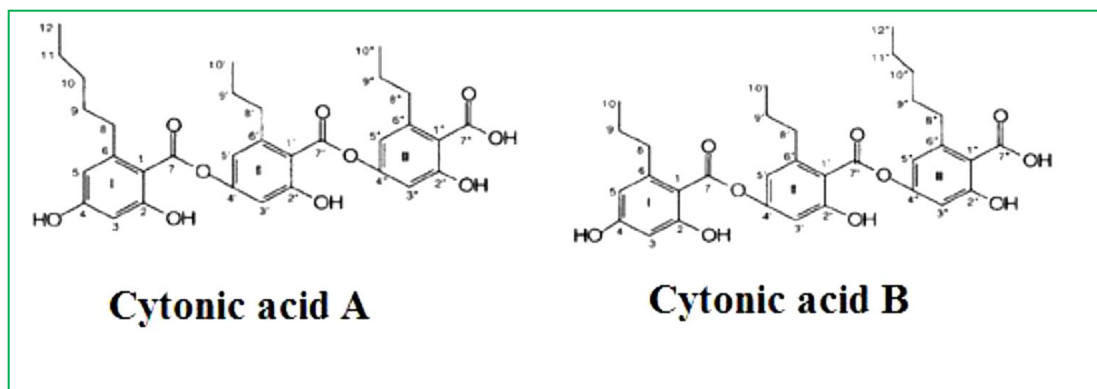
D'autre part, un nouvel agent antifongique CR377 à été isolé a partir du bouillon de culture du champignon endophyte *Fusarium sp.* isolé de *Selaginella pallescens* et a montré une puissante activité contre *Candida albicans* dans les essais de diffusion en gélose (BRADY et CLARDY, 2000).



**Figure 6: Structure d'une substance antifongique produite par les champignons endophytes (KUMAR *et al.*,2014).**

#### I.4.3. Champignons endophytes comme source de substances antivirales

Comme on l'a déjà mentionné, l'émergence de résistance aux médicaments, et de l'épidémie du VIH ainsi que les infections opportunistes associées à cette dernière, tels les cytomegalovirus et polyomavirus, rend le développement de nouveaux médicaments antiviraux une priorité. Deux inhibiteurs de la protéase du cytomégalo virus, cytonics acid A et B ont été isolés à partir de la culture du champignon endophyte *Cytonaema sp.* isolé du *Quercus sp.*, il y a aussi xanthoviridicats E et F qui inhibent la réaction de clivage de l'intégrase du VIH-1, il a été produit par l'endophyte *Penicillium chrysogenum* (GUO *et al.*, 2000 ; SINGH *et al.*, 2003) (Figure 07).



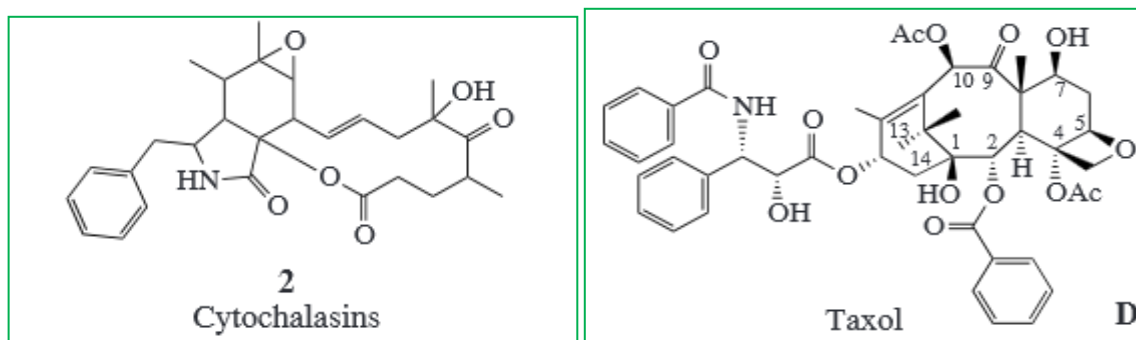
**Figure 7: Structure de quelques substances antivirales produites par les champignons endophytes (GIMENEZ *et al.*, 2007).**

#### I.4.4. Champignons endophytes comme source de substances anticancéreuses

De nombreux produits naturels de plantes ou de microorganismes ont été identifiés en tant qu'agents anticancéreux; récemment les endophytes et leurs métabolites sont étudiés pour leurs propriété anticancéreuses (PIMENTEL *et al.*, 2011).

Les alcaloïdes l'un des agents anticancéreux, habituellement trouvé dans les champignons endophytes. Trois cytochalasins sont identifiés comme des molécules d'activité anti tumorale, d'un endophyte, *Rhinocladiella sp* (RODRIGUER R. J. *et al.*, 2008). Certains endophytes produisent des métabolites secondaires similaires à ceux de la plante hôte, il est possible qu'il est du à un Transfert et expression d'un génome de la plante, comme dans le cas des espèces productrice de taxol, le premier médicament anticancéreux produit par les champignons endophytes un composé d'importance pharmaceutique, un anti tumoral produit par *Taxus sp* trouvés au niveau de son endophytes, *Taxomyces andreae*, *Tubercularia sp.* (GARY et STROBEL, 2003 ; GIMENEZ *et al.*, 2007) (Figure 08).

Le taxol a été trouvé dans un certain nombre de différents genres de champignons endophytes, soit associés ou non aux ifs tels que *P. microspora*, *Periconia sp*, *Taxodium distichum*, *Wollemia nobilis*, *Phyllosticta spinarum*, *Bartalinia robillardoides* (Gangadevi et Muthumary, 2008) et *Botryodiplodia theobromae* (STROBEL *et al.*, 1993 ; STROBEL *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 1998 ; KUMARAN *et al.*, 2008 ; PANDI *et al.*, 2010).

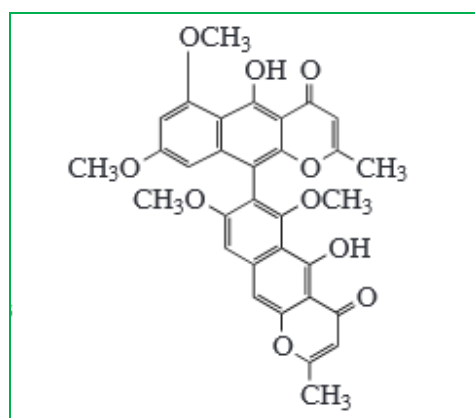


**Figure 8: Structure de quelques substances anticancéreux produites par les champignons endophytes. (GIMENEZ et al., 2007).**

#### I.4.5. Champignons endophytes comme source de substances antioxydantes

L'importance des composés ayant une activité antioxydante réside dans le fait qu'ils sont très efficaces contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les radicaux libres dérivés de celui-ci tels les dommages de l'ADN, cancérogénèse et une dégénérescence cellulaire. Les antioxydants naturels sont généralement trouvés dans les plantes médicinales, les légumes et les fruits, et les champignons endophytes peuvent être une source potentielle de nouveaux antioxydants (Pimentel *et al.*, 2011).

Deux cérébrosides isolés à partir de l'endophyte *Fusarium sp.* ont démontré une activité inhibitrice de la xanthine oxydase (SHU *et al.*, 2004). *Aspergillus niger* un endophyte de *Cynodon dactylon* aussi produit aurasperone A (Figure 09) qui inhibe également la xanthine oxydase (SONG *et al.*, 2004).



Aurasperone A

**Figure 9: Structure d'aurasperone. A, agent antioxydant produit par les champignons endophytes. (GIMENEZ et al., 2007).**

#### I.4.6. Autres molécules bioactives des endophytes

Parmi les produits naturels isolés des endophytes, il y a d'autres molécules bioactives qui ont une spéciale ou plus d'un type de fonctions différentes. (RODRIGUER *et al.*, 2008). Autres produits naturels bioactifs de fonction spécifique (Tableau 1) comme par exemple pectine, lyase et subglutionol comme agent immunosuppressive ; pestacine et isopestacine comme un antioxydant, agent antidiabétique et antivirale, etc. (RODRIGUER *et al.*, 2008).

Tableau II: Les endophytes et leurs produits naturels avec fonction spécifique.

Métabolite	Endophyte	Hôte	Fonction
Naphthopyrone	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Cyndon dactylon</i>	Co-inhibiteurs de xanthine oxydase
Subglutionol	<i>F. subglutinans</i>	<i>Triptergium wilfordii</i>	Immunosuppresseurs
Nonpeptid L-783, 281	<i>Pseudomassaria sp.</i>	Africanan rainforest /	Agent antidiabétique
A. cytonique	<i>Cytonaema sp.</i>	<i>Coffea arabica</i>	Agent antiviral
Pectine lyase	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	Activité pectine lyase
Pestacine, isopestacine	<i>Pestalotiopsis microspora</i>		Antioxydant

#### I.4.7. Enzymes

Les champignons endophytes ont la capacité de produire des enzymes extracellulaires ; comme pectinase, cellulase, lipase, amylase, laccase et protéinases. Ces enzymes fongiques jouent un rôle dans la biodégradation et les processus d'hydrolyses qui sont des mécanismes importantes contre les infections et pour aboutir leur besoin nutritionnel de la plante hôte. (SUNITH *et al.*, 2013). la capacité des endophytes de produire des enzymes a été reportée par CHOI *et al.*, 2005 ; SUNITH *et al.*, 2013. Ils sont donc très utiles dans l'industrie agro-alimentaire (affinage du fromage et du saussion) et pharmaceutique, comme par exemple les *Penicillium* (CHABASSE, 2002).

Autres études montrent que les endophytes fournir d'autres propriétés améliorant l'aptitude de leur plante hôte, par l'augmentation de pouvoir compétitif de la plante, principalement en augmentant l'efficacité de l'utilisation de l'eau. En outre, comme les alcaloïdes d'endophytes sont souvent concentrés dans les semences, ça va prévenir les graines de prédateurs et d'augmenter ainsi la dispersion des graines. (SAIKKONEN *et al.*, 2013).





## CHAPITRE II

# *Matériel et méthodes*

Promotion 2015

Le présent travail consiste à effectuer l'identification des dix champignons endophytes isolés d'une plante médicinale *Artemisia absinthium* et étudier l'activité antimicrobienne et enzymatique.

## II.1. Matériels biologique

### II.1.1. Champignons endophytes étudiées

Dix souches de champignons endophytes ont été isolées des racines d'*Artemisia absinthium* de la pépinière de Batna. Elles ont été conservées à 4°C dans des tubes contenant de gélose incliné de Sabouraud additionné du chloramphénicol à fin d'inhiber la croissance des bactéries.

### II.1.2. Souches bactériennes testées

Des bactéries pathogènes ont été utilisées pour le dépistage de l'activité antimicrobienne des champignons endophytes.

Le matériel microbien comprend cinq bactéries pathogènes trois bactéries Gram positif et deux bactéries Gram négatif.

Les souches bactériennes utilisées sont référencées par American type culture collection (ATCC) sont récupérées de laboratoire interne de biologie de l'établissement public Hospitalier d'OUARGLA et d'autres par le laboratoire privé à Batna (Tableau III).

**Tableau III:** les souches bactériennes testées

Souche	Référence	Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Positif
<i>Staphylococcus mec A+</i>	Référencée dans laboratoire privé de Batna	
<i>Enterococcus faecium</i>	Référencée dans laboratoire privé de Batna	

### II.1.3. Souches fongiques testés

Pour tester l'activité antifongique de ces champignons endophytes trois espèces fongiques sont utilisés ; *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* Les deux souches sont référencées et récupérées de laboratoire interne de biologie de l'établissement public Hospitalier d'OUARGLA et une levure pathogène *Candida albicans* référencie et récupéré à partir du laboratoire d'analyse privé à Ouargla.

## II.2.Méthodologie de travail

### II.2.1. Repiquage des souches fongiques

A partir des tubes de conservation, les souches ont été repiquées sur une gélose Sabouraud; un fragment de la colonie est ensemencé sur la gélose par la méthode de touche, les boites sont ensuite mises en incubation à 25°C pendant cinq à sept jours.

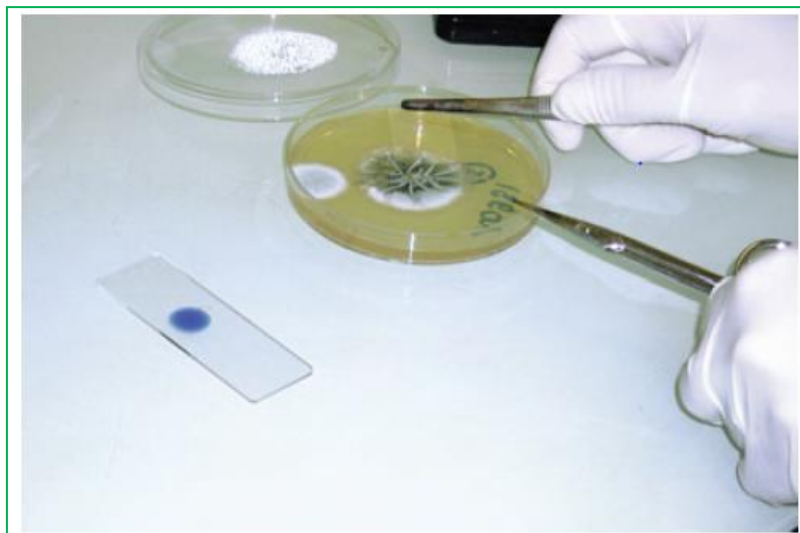
### II.2.2. Pré-identification

L'identification fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques des moisissures isolées à l'état pure (BOTTON *et al.*, 1990) :

- **Caractères cultureux** : ce sont les critères macroscopiques tels que la vitesse de croissance, texture et couleur du thalle, couleur du revers de la culture, odeur de l'exsudat et présence ou absence d'un pigment diffusible.
- **Caractères morphologiques** : c'est l'étude microscopique du mycélium, nature des organes différenciés.

#### II.2.2.1. Pré-identification des genres par la technique de scotch

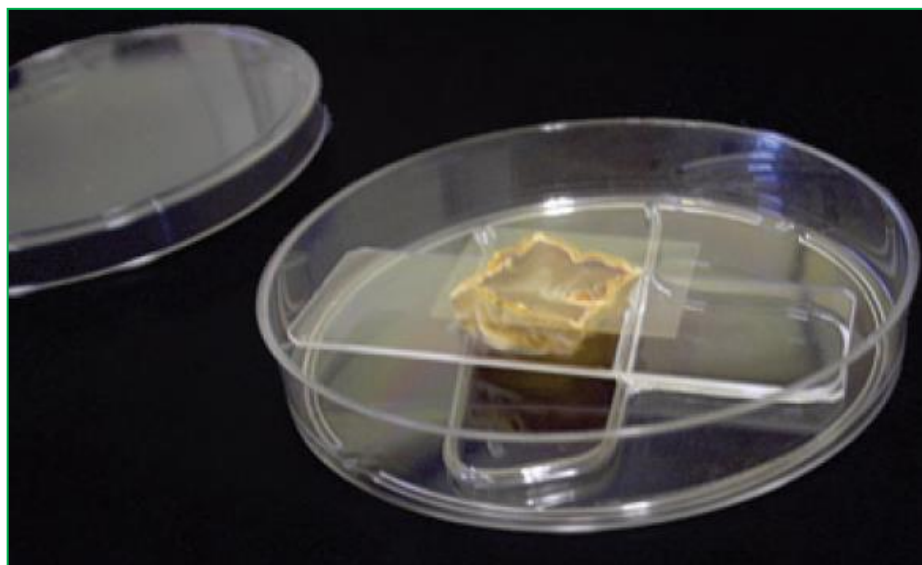
La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch (technique du drapeau) une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (Photo01) (CHABASSE, 2002) et à partir des mêmes cultures on prend un autre fragment de scotch et on le recolle sur une lame préalablement étalée par une goutte de bleu de méthylène diluée avec deux goutte de l'eau physiologique (GUEZLANE *et al.*, 2011). Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements  $\times 10$ ,  $\times 40$  et  $\times 100$  à l'aide d'un microscope.



**Photo 1. Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de Scotch (CHABASSE, 2002).**

#### **II.2.2.2. Pré-identification des genres par la technique de micro-culture**

Décrite par HARIS (1989), la technique de micro-culture consiste à inoculer les spores des moisissures sur une lame menée de petits carrés, de milieu PDA et les recouvrir par une lamelle. Les spores sontensemencées sur les limites périphériques du milieu pour leur fournir un potentiel d'oxygène élevé afin qu'elles puissent germer. L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubé à  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 3 à 5 jours (Photo 02).



**Photo 2. Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de micro-culture (CHABASSE, 2002).**

Après incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements  $\times 10$ ,  $\times 40$  et  $\times 100$ . Les genres sont déterminés par les caractères culturels et microscopiques en se référant au manuel de BARNETT et HUNTER (1972).

### **II.2.3. Activités antimicrobiennes**

Pour rechercher l'activité antimicrobienne des champignons endophytes, deux méthodes ont été utilisées. La première est la méthode de cylindre d'agar pour l'activité antibactérienne et anti-levurienne, et la deuxième est la technique de la double culture pour l'activité antifongique.

#### **II.2.3.1. Activité antibactérienne et anti-levurienne**

##### **II.2.3.1.1. Préparation des microorganismes d'essai**

Les souches sélectionnées ont été revivifiées dans des tubes contenant 9 ml de bouillon nutritif « Nutrient broth » à l'aide d'une pipette Pasteur flambée et incubées à 37°C et la levure à 30°C pendant 24 heures avant d'être utilisées dans les tests de l'activité. A partir de chaque tube de bouillon nutritif mentionnant un trouble, on a ensemencé par stries une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive puis incubées à 37°C pendant 18 heures. Après incubation on a raclé à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, puis on a déchargé la pipette dans 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne doit être bien homogénéisée et la turbidité après a été ajusté pour correspondre à 0.5 McFarland pour les bactéries, et ajusté à  $10^6$  UFC/ml pour la levure (DEVARAJU et SATISH, 2011).

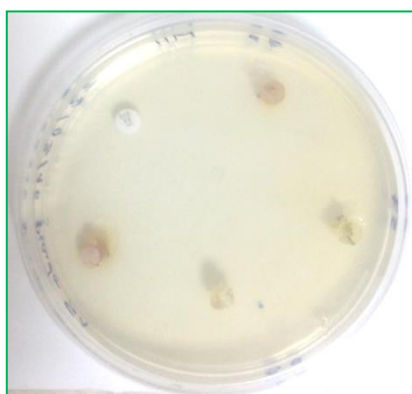
##### **II.2.3.1.2. Ensemencement**

La suspension bactérienne a été ensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton (MH). L'écouvillon a été trempé dans la suspension bactérienne, puis il est essoré on le faire tournant sur la paroi interne de tube afin de le décharger au maximum. Le milieu MH a été frotté sur la totalité de leur surface gélosée de haut en bas, en stries serrés (BOUGHACHICHE *et al.*, 2005).

### II.2.3.1.3. Technique des cylindres d'agar

Cette technique consiste à prélever des cylindres d'agar de 6mm de diamètre de culture de champignons de 7 jours sur la gélose Sabouraud et de les déposer sur un milieu Muller -Hinton gélosé préalablement ensemencé en surface avec les bactéries pathogènes et la levure (BOUGHACHICHE *et al.*, 2005).

L'ensemble est placé à 4°C pendant deux heures ou à température ambiante, pour permettre une pré-diffusion des substances actives sécrétées par les champignons, après incubation à 37 °C pendant 24 h, les zones d'inhibition sont mesurées (LAMMI, 2011 ; POUTHONG, 2013) (Photo 03).



**Photo 3: Technique des cylindres d'agar**

### II.2.3.2. Activité antifongique

#### II.2.3.2. 1. Technique de la double culture

L'activité antifongique a été dépistée en utilisant la méthode de la double culture décrit par FATMA *et al.*, (2010). Elle consiste à mettre un disque de 6 mm de diamètre du champignon endophyte provenant d'une culture de 7 jours sur l'extrémité d'une boîte de Pétri contenant du Sabouraud, ensuite un autre disque du même diamètre de champignon pathogène est mis à l'autre extrémité de la boîte avec une distance de 50 mm entre les deux disques (RAHUL *et al.*, 2015).

Chaque boîte ainsi que la boîte contrôle qui ne contient pas l'endophyte ont été répétées trois fois, et incubé à 30°C à l'obscurité.

Après cinq 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 (NUANGMEK *et al.*, 2008; OROLE et ADEJUMO, 2009; TING *et al.*, 2009) :

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

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

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

Si le pourcentage d'inhibition est:

<30% = faible activité antifongique.

30 <50% = activité antifongique modérée.

50 <70% = activité antifongique élevée.

≥70% = activité antifongique très importante.

#### II.2.4. Activité enzymatique

La production des enzymes extracellulaires a été recherchée et déterminée pour nos souches fongiques par la digestion du substrat dissous dans des plaques de gélose (ANANDA *et al.*, 2012 ; SUNITHA *et al.*, 2013).

##### II.2.4.1. Activité amylolytique

La recherche de l'amylase est mise en évidence par la méthode décrite par ANANDA *et al.*, 2012, l'ensemencement des champignons sur le milieu GYP (Glucose yeast extract peptone) additionné de 0,2% d'amidon soluble. Après incubation à 28°C pendant trois à cinq jours, après incubation la culture est inondée avec 1% d'iode et à 2% d'iodure de potassium. L'apparition de zone claire entourant la colonie a été considérée comme positive pour l'amylase (SUNITHA *et al.*, 2013).

## **II.2.4.2. Activité protéolytique**

### **II.2.4.2.1. Activité protéolytique (dégradation de la gélatine)**

Pour la recherche de la gélatinase, on a utilisé le milieu GYP (glucose yeast extract peptone) auquel on a ajouté 0,4% de gélatine (8g/100ml d'eau distillée) (SUNITHA *et al.*, 2013), l'apparition de la zone claire formée autour de la colonie révèle la présence de l'enzyme.

### **II.2.4.2.2. Activité protéolytique (dégradation de la caséine)**

L'hydrolyse de la caséine est mise en évidence sur un milieu GYP contenant 5% de caséine. Après 3 à 7 jours d'incubation à 30°C, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la colonie fongique indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (SUNITHA *et al.*, 2013).

### **II.2.4.2.3. Activité estérasique (dégradation des lipides)**

Pour tester l'activité estérasique, le milieu utilisé est PAM (Peptone Agar Medium) par l'addition de Tween 80 comme substrat ajouté au milieu à raison de 1 ml pour 100 ml du milieu.

L'activité estérasique est déterminée par la présence ou non d'une zone claire autour de la colonie (CARRIM *et al.*, 2006 ; ANANDA *et al.*, 2012 ). Les milieux ainsi préparés ont été inoculés avec des fragments mycéliens de 3 mm et incubés à 30°C pendant trois à sept jours (ANANDA *et al.*, 2012).





## CHAPITRE III

# *Résultats et discussion*

Promotion 2015



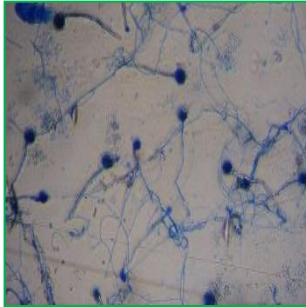
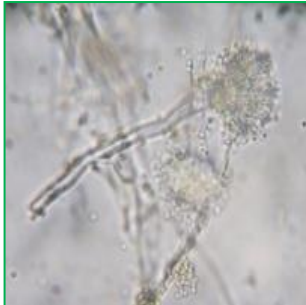
### **III. Résultats et discussion**

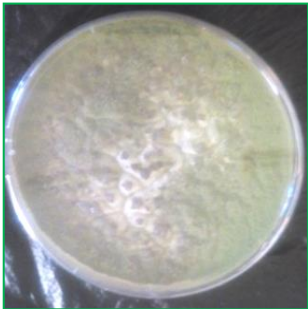

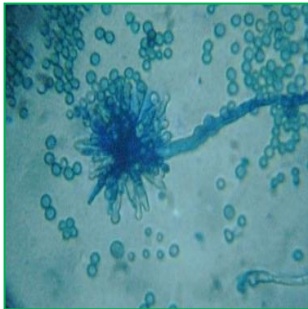
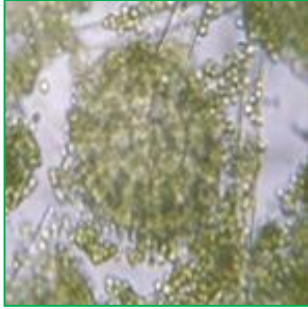
#### **III.1. Pré-identification des isolats fongiques**

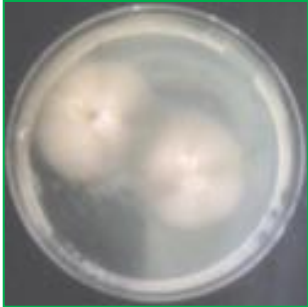

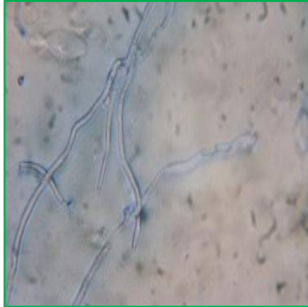

##### **III.1.1. Genres fongiques pré-identifiés par les méthodes de micro-culture et de Scotch**

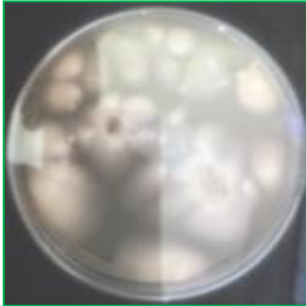
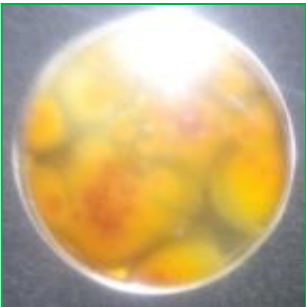

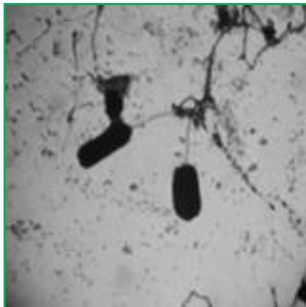
L'identification des souches fongiques endophytes est réalisée en tenant compte de leurs caractères macroscopiques (couleur, aspect de colonie et le revers des boites) d'après des cultures de 7 jours sur milieu Sabouraud et microscopiques (forme de thalle et des spores). Ceci est rendu possible grâce à la clé d'identification de BARNETT ET HUNTER (1972). Les souches fongiques endophytes pré-identifiées sont consignées dans le tableau III.

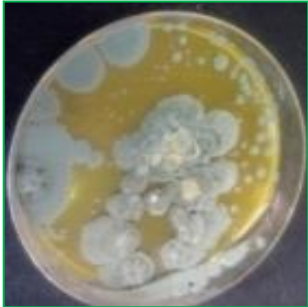
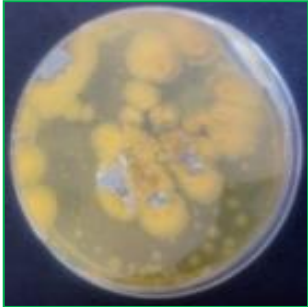
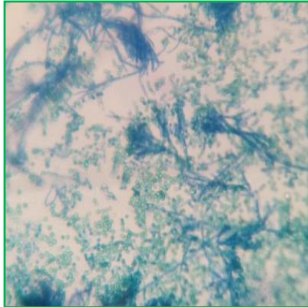
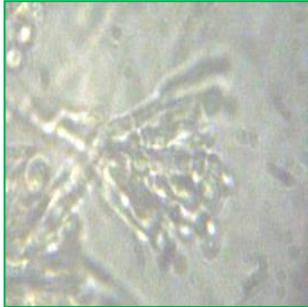
Tableau IV : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques endophytes.



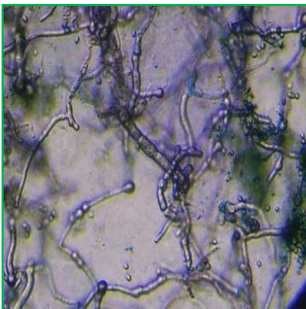

Souches Fongiques	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques	Genres et espèces
S1	<p>- Colonies de couleur beige à brune noisette, - Texture poudreuse, - Croissance rapide de 3 à 5 jours.</p> <p><b>Recto</b></p>  <p><b>Verso</b></p> 	<p>- Thalle est cloisonné et porte le conidiophore et ce dernier porte des métules. - Conidiophore se termine par une vésicule qui porte des phialides et des conidies enchainés.</p> <p><b>Gx10</b></p>  <p><b>Gx40</b></p> 	<p><b>Règne:</b> champignons <b>Division:</b> Deuteromycotina <b>Classe:</b> Hyphomycètes <b>Famille:</b> Moniliaceae <b>Ordre:</b> Moniliales <b>Genre:</b> <i>Aspergillus</i> <b>Espèce:</b> <i>Aspergillus sp1</i></p>

<p>S2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonie de couleur d'abord blanche, puis jaune, puis vert-jaune Texture duveteuse à poudreuse,</li> <li>- Relief planes,</li> <li>- Revers peu jaune,</li> <li>- Croissance rapide et extensive de 2 à 3 jours.</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Recto</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Verso</span>  </div> </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thalle est cloisonné</li> <li>- Conidiophore long, et non cloisonné, hyalines porte des phialides qui donne des conidies globulaires ; vert pâle, échinulées. tête aspergillaire : unisériée, radiée.</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx40</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx40</span>  </div> </div>	<p><b>Règne:</b> champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Aspergillus  <b>Espèce:</b> <i>Aspergillus sp2</i></p>
-----------	--	--	--

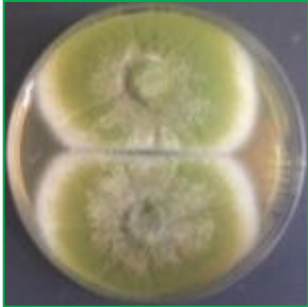

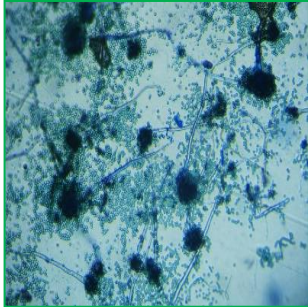
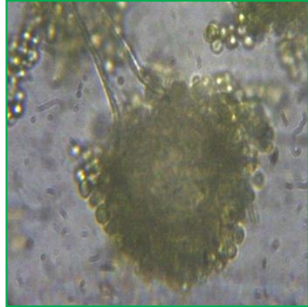
<p>S3</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies de couleur blanche, plane,</li> <li>-Texture humide, muqueuse puis poudreuse.</li> <li>- Revers brune.</li> <li>- Croissance rapide de 2 à 3 jours, restreinte.</li> </ul> <div style="text-align: center;"> <p><b>Recto</b></p>  </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> <p><b>Verso</b></p>  </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mélange de courts filaments septés irréguliers dont certains sont fragmentés en petits éléments ou arthrospores ; et de blastospores.</li> <li>- Phialides directement inséré sur filament végétale et très allongé.</li> <li>- Conidies groupé en amas et la forme elliptique.</li> </ul> <div style="text-align: center;"> <p><b>Gx10</b></p>  </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> <p><b>Gx40</b></p>  </div>	<p><b>Règne:</b> champignons  <b>Division:</b> Ascomycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Acremonium  <b>Espèce:</b> <i>Acremonium sp</i></p>
-----------	--	---	--

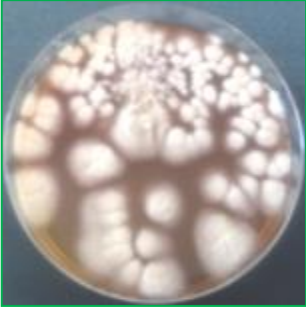

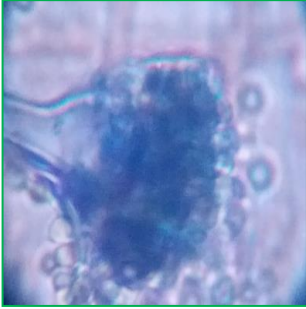
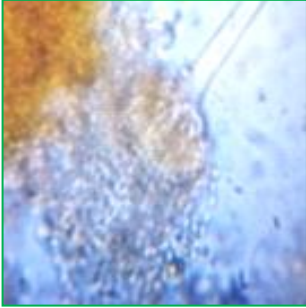
<p>S5</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies de couleur beige à brune noisette,</li> <li>- Texture poudreuse,</li> <li>- Revers des boites brun-orange,</li> <li>- Croissance rapide de 3 à 5 jours.</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 20px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Recto</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Verso</span>  </div> </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Thalle est cloisonné</li> <li>-Conidiophore long, et non cloisonné, hyalines porte des phialides qui donne des conidies globulaires</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 20px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx40</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx10</span>  </div> </div>	<p><b>Règne:</b> champignons  <b>Division:</b>Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Aspergillus  <b>Espèce:</b> <i>Aspergillus sp3</i></p>
-----------	--	--	---


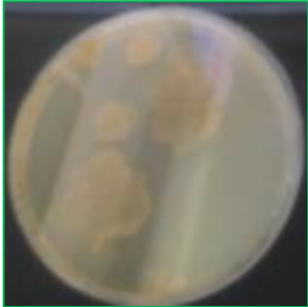


<p>S6</p>	<p>- Colonies de couleur blanche puis bleu vert, -Texture poudreuse, Revers des boites est jaune. - Croissance lente de 5à 7 jours</p> <p><b>Recto</b></p>  <p><b>Verso</b></p> 	<p>- Hyphes septés, hyalins - Conidiophores à l'extrémité se disposent des phialides en verticilles insérées par l'intermédiaire de deux rangées successives de métules (<i>Penicillium</i> triverticillé). - Conidies sont rondes à ovoïdes, hyalins, lisse.</p> <p><b>Gx40</b></p>  <p><b>Gx100</b></p> 	<p><b>Règne:</b> champignons <b>Division:</b>Deuteromycotina <b>Classe:</b> Hyphomycètes <b>Famille:</b> Moniliaceae <b>Ordre:</b> Moniliales <b>Genre:</b> <i>Penicillium</i> <b>Espèce:</b> <i>Penicillium</i> sp.</p>
-----------	--	--	--


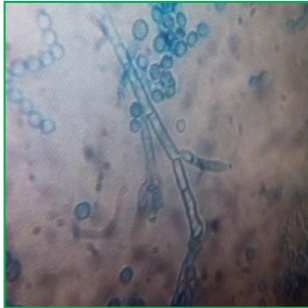


<p>S7</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonies de couleur blanche au centre et verte à la périphérie,</li> <li>- Texture poudreuse,</li> <li>- Revers des boîtes est jaune.</li> <li>- Croissance rapide de 3 à 5 jours.</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Recto</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Verso</span>  </div> </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphes septés hyalins apparaissent des petites conidiophores bien différenciés simples.</li> <li>- Phialides sont fixées à angle droit sur les conidiophores.</li> <li>- Conidies, lisse ou échinulées, globuleuses. Elles se rassemblent en amas au sommet des phialides, et forment ainsi des « fausses têtes ».</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx40</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx40</span>  </div> </div>	<p><b>Règne:</b> champignons  <b>Division:</b> Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> Trichoderma  <b>Espèce:</b> <i>Trichoderma sp</i></p>
-----------	---	---	---



<p>S8</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonie de couleur d'abord blanche, puis jaune, puis vert-jaune duveteues à poudreuse, et de Relief planes, le revers peu jaune.</li> <li>- Croissance rapide et extensive de 2 à 3 jours.</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 20px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Recto</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Verso</span>  </div> </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thalle est cloisonné</li> <li>- Conidiophore long, et non cloisonné, hyalines porte des phialides</li> <li>- Conidies globulaires ; vert pâle, échinulées.</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 20px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx10</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx40</span>  </div> </div>	<p><b>Règne:</b> champignons  <b>Division:</b>Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> <i>Aspergillus</i>  <b>Espèce:</b> <i>Aspergillus sp4</i></p>
-----------	---	---	--

<p>S9</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonie de couleur beige à brune noisette,</li> <li>- Revers est brune orange,</li> <li>-Texture poudreuse.</li> <li>- Croissance rapide de 3 à 5 jours.</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 20px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Recto</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Verso</span>  </div> </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thalle cloisonné</li> <li>- Conidiophore court, et non cloisonné, incolore termine par une vésicule hémisphérique porte des phialides dressées, densément groupées</li> <li>- Conidies globuleuses ; petites.</li> <li>-Tête aspergillaire : unisériée, en colonne compacte, assez grande</li> </ul> <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 20px;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx100</span>  </div> <div style="display: flex; align-items: center;"> <span style="color: red; font-weight: bold; margin-right: 10px;">Gx100</span>  </div> </div>	<p><b>Règne:</b> champignons  <b>Division:</b>Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> <i>Aspergillus</i>  <b>Espèce:</b> <i>Aspergillus sp5</i></p>
-----------	--	---	--

<p>S10</p>	<p>- Colonies de couleur crème lisse, lissée de type levuforme, et de Relief ; planes. - Croissance rapide de 2 à 3 jours.</p> <p><b>Recto</b></p>  <p><b>Verso</b></p> 	<p>- Mélange de courts filaments septés irréguliers dont certains sont fragmentés en petits éléments ou arthrospores et de blastospores.</p> <p><b>Gx40</b></p>  <p><b>Gx40</b></p> 	<p><b>Règne:</b> champignons <b>Division:</b>Deuteromycotina <b>Classe:</b> Blastomycètes <b>Ordre:</b>Cryptococcales <b>Genre:</b><i>Trichosporon</i> <b>Espèce:</b> <i>Trichosporon sp</i></p>
------------	---	---	--

<p>SI1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colonie de couleur vert olive au brun olive très foncé, le revers est brun noir.</li> <li>-Texture floconneuse, et de relief; surélevées.</li> <li>- Croissance très lente de 5 à 7 jours.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphes septé, pigmentés.</li> <li>- Conidiophres de longueur variable.</li> <li>- Les premières conidies sont de grand taille, uni ou pluricellulaires. L'ensemble forme de longues chaînes acropètes, ramifiées, réalisant des arbuscules fragiles qui dissocient lors du montage.</li> </ul>	<p><b>Règne:</b> champignons  <b>Division:</b>Deuteromycotina  <b>Classe:</b> Hyphomycètes  <b>Famille:</b> Moniliaceae  <b>Ordre:</b> Moniliales  <b>Genre:</b> <i>Cladosporium</i>  <b>Espèce:</b> <i>Cladosporium sp.</i></p>
	<p style="color: red; text-align: center;"><b>Recto</b></p> 	<p style="color: red; text-align: center;"><b>Gx40</b></p> 	
<p style="color: red; text-align: center;"><b>Verso</b></p> 	<p style="color: red; text-align: center;"><b>Gx40</b></p> 		

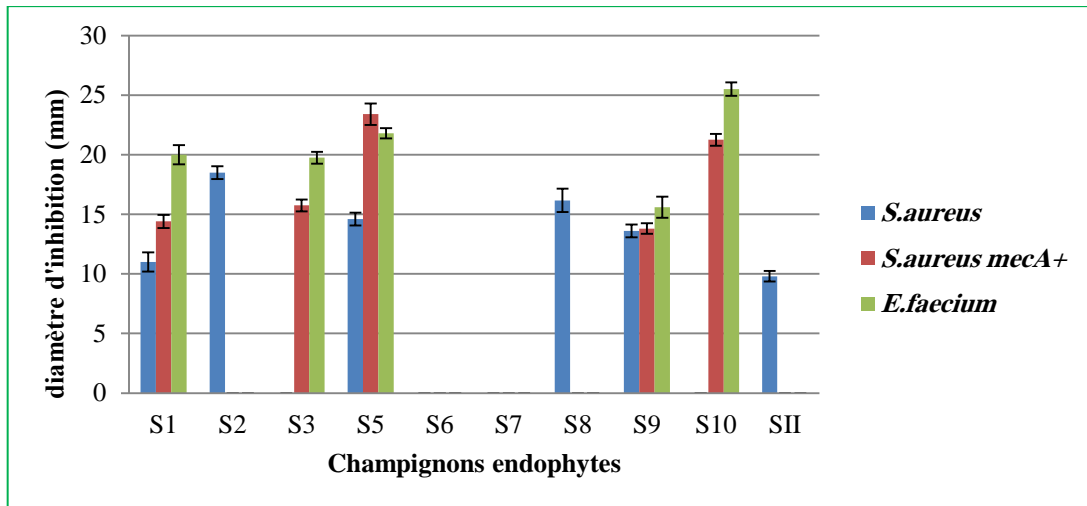
L'identification nous a permis de classer nos isolats dans la classe des Ascomycètes et des Deutéromycètes qui est considérée parmi celles auxquelles appartient la plupart des champignons endophytes (SAAR *et al.*, 2001).

Cinq des dix isolats décrits ci-dessus dans le tableau appartiennent au genre *Aspergillus* (Souches 1,2, 5, 8 et 9), un genre très diversifié comptant 180 espèces, dont certaines ont une valeur commerciale et médicale, comme on en dénombre des espèces pathogènes (LUBERTOZZIA et KEASLING, 2009). Ce genre est capable de croître sur presque tout type d'habitat, et a déjà été isolé en tant qu'endophyte à partir de plusieurs plantes médicinales (HUANG *et al.*, 2008; ILYAS *et al.*, 2009; ABDEL-MOTAAL *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2010; NAGARAJA et DEVKAR, 2010; SHANKAR et SHASHIKALA, 2010).

En plus des cinq genres d'*Aspergillus* il y en a un qui appartient au genre *Penicillium* (Souche 6), un genre qui comporte plus de 200 espèces, certaines utilisées dans l'industrie fromagère ou pour la production de métabolites, d'autres peuvent être responsables de dégradations. C'est un genre très répandu dans la plupart des environnements terrestres, mais il a aussi été isolé comme endophyte à partir de plusieurs plantes médicinales (BOTTON *et al.*, 1990; KHARWAR *et al.*, 2008; MOHANTA *et al.*, 2008; RAKOTONIRIANA *et al.*, 2008; ILYAS *et al.*, 2009; PETIT *et al.*, 2009; ABDEL-MOTAAL *et al.*, 2010; BHAGOBATY *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2010; NAGARAJA et DEVKAR, 2010; SHANKAR et SHASHIKALA, 2010).

Le troisième genre isolé est *Cladosporium* (Souche SII), un genre mondialement répandu, il regroupe environ 35 espèces parasites de végétaux ou saprophytes très communs (BOTTON *et al.*, 1990), comme il a été isolé en tant qu'endophyte à partir de *Cephalotaxus mannii* par SAITHONG *et al.* (2010) et de *Acacia catechu* Willd par NAGARAJA et DEVKAR (2010). Le quatrième genre étudié de cette classe est *Trichosporon* et *Acremonium* le seul genre étudié qui appartient à la classe des Ascomycètes.

Tous les isolats fongiques endophytes ont été conservés dans des tubes contenant le milieu Sabouraud enrichi de Chloramphénicol incliné.



**Figure 10: Diamètres d'inhibition des bactéries pathogènes Gram positif par les champignons endophytes.**



**Photo 4: Activité antimicrobienne sur *Enterococcus faecium* (Gram+)**



**Photo 5 : Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur *Staphylococcus mec A+*(Gram+)**



**Photo 6 : Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur *Staphylococcus mec A+*(Gram+)**



**Photo 7 : Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur *Staphylococcus aureus* (Gram+)**





## III.2. Activité antimicrobienne

### III. 2.1. Activité antibactérienne

#### III. 2.1.1. Bactérie Gram positif

Les dix souches isolées à partir d'*Artemisia absintium* ont été testées par la méthode de cylindre d'agar contre cinq (05) bactéries pathogènes. Ces souches ont montré une activité antibactérienne plus ou moins importante, les diamètres des zones d'inhibition moyens mesurés varient entre 0 et 25,5 mm (Figure 10).

L'activité des souches fongiques étudiées sur les bactéries pathogènes Gram positif se fait plus sentir sur les espèces *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus mec A+*. En effet, les plus grande zones d'inhibition constatées sont celles d'*Enterococcus faecium* en présence de S10 ( $25,57 \pm 0,57$  mm), S5 ( $21,8 \pm 0,44$  mm), S1 ( $20 \pm 0,81$  mm), S3 ( $19,75 \pm 0,5$  mm) et S9 ( $15,6 \pm 0,89$  mm) (Photo 04).

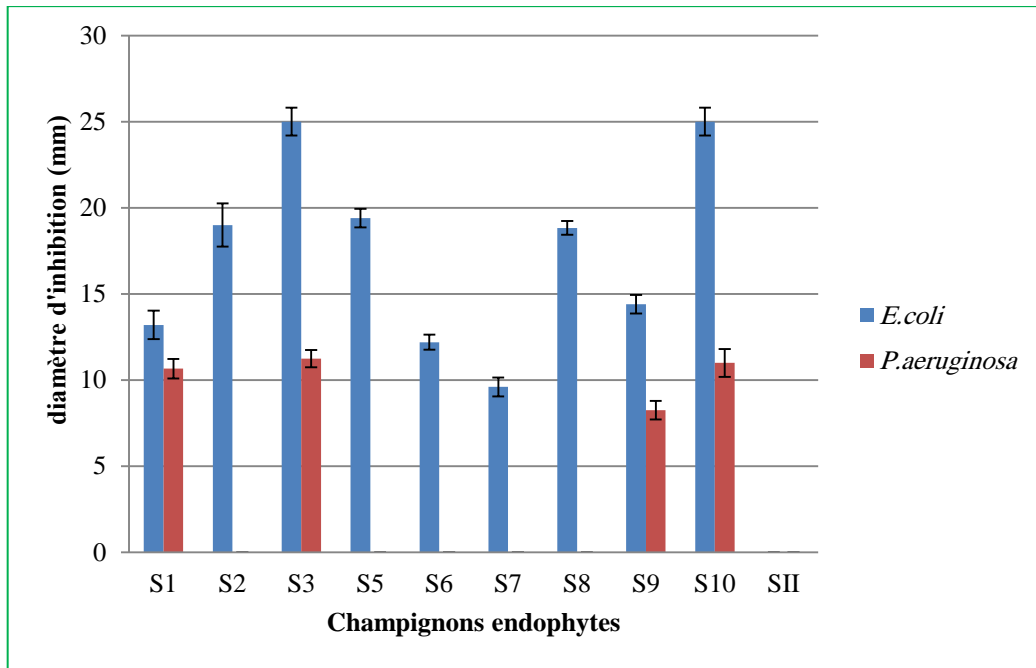
La bactérie *Staphylococcus aureus mec A+* est fortement inhibée par S5 où l'on relève une zone d'inhibition de  $23,4 \pm 0,89$  mm et par S10 avec une zone d'inhibition de  $21,25 \pm 0,5$  mm. Les souches S1, S3 et S9 ont des effets moins remarquables sur cette bactérie pathogène (Photo 05 et 06).

Parmi les souches fongiques étudiées, S1, S2, S6, S7, S8 et SI1 ne présentent aucune activité contre *Staphylococcus aureus mec A+* et *Enterococcus faecium*.

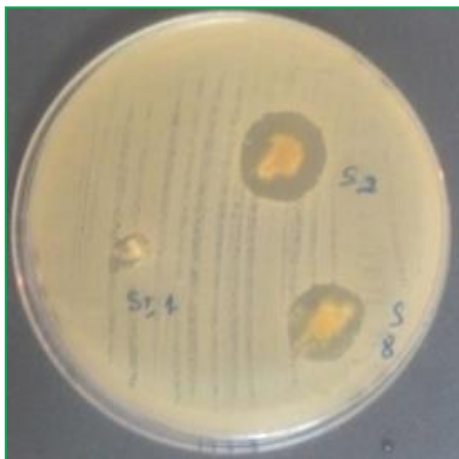
*Staphylococcus aureus* semble la moins affectée par les dix champignons étudiées. Cependant, elle s'est révélée sensible aux souches S2, S8, S5, S9 et SI1 où la zone d'inhibition maximale a été relevée en présence de S2 ( $18,5 \pm 0,54$  mm) et de S8 ( $16,16 \pm 0,98$  mm) (Photo 07). En revanche, Cette espèce semble moins sensible aux trois souches fongiques S1, S5 et S9, au contact desquelles elle développe les plus petites zones d'inhibition. Les souches S3, S6, S7 et S10 ne semblent avoir aucune activité contre cette bactérie.

**Parmi les champignons endophytes étudiés 30% (S1, S5, S9), appartenant au genre *Aspergillus* ont une activité antibactérienne sur les trois souches pathogènes Gram positif testées (*Staphylococcus aureus mec A+*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), 20% (S3,S10) appartenant aux genres *Acremonium* et *Trichosporon* montrent une activité contre deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus mec A+* et *Enterococcus faecium*), 30% de ces champignons endophytes (S2, S8), appartenant au genre *Aspergillus* et (SI1) appartenant au genre *Cladosporium* ont une activité sur seulement une bactérie Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et 20% ( S6, S7) de ces champignons ne présentent aucune activité contre les bactéries Gram positif utilisées dans cette étude.**





**Figure 11: Diamètre d'inhibition des bactéries pathogènes Gram négatif par les champignons endophytes isolées**



**Photo 8 : Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur *E. coli* (Gram -)**



**Photo 9 : Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur *P. aeruginosa* (Gram -)**

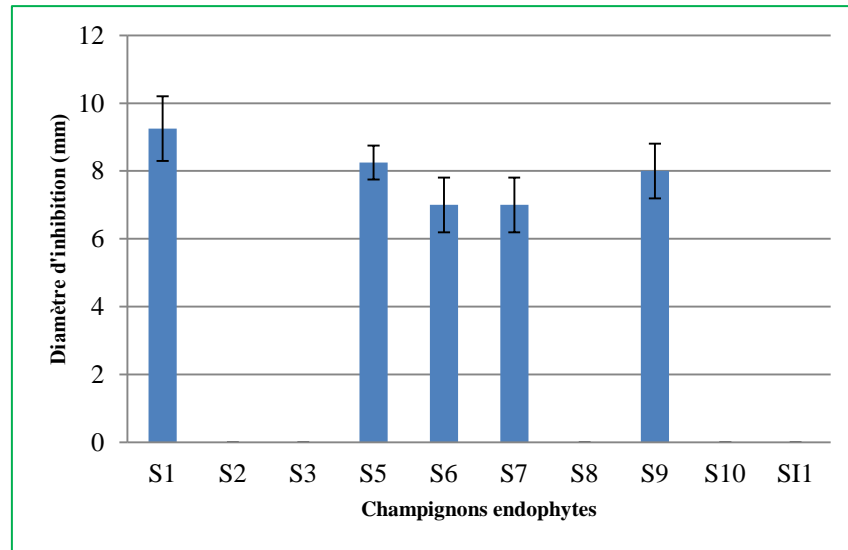
### III.2.1.2. Bactéries Gram négatif

L'activité antibactérienne de nos souches fongiques a également été testée sur deux souches bactériennes de Gram négatif, *E.coli* et *P. aeruginosa* (Figure 11).

Parmi Les deux souches bactériennes pathogènes étudiées, *E.coli* apparaît la plus sensible à neuf sur les dix souches fongiques endophytes isolées, la souche S11 n'ayant pas montré d'activité inhibitrice sur cette bactérie. Les zones d'inhibition maximales de cette bactérie sont observées en présence de S3 et S10 ( $25 \pm 0.81$ mm et  $25 \pm 0,5$  mm respectivement) et la zone d'inhibition minimale est remarquée au contact de la souche fongique S7 ( $9.6 \pm 0,54$  mm) (Photo 08).

L'activité contre la deuxième bactérie pathogène Gram négatif *P. aeruginosa* est semble plus résistante à la majorité de nos souches fongiques (S2, S5, S6, S7, S8 et S11). Les quatre souches fongiques S3, S10, S1 et S9 montrent une activité contre cette bactérie. Les zones d'inhibition maximale de cette bactérie en présence des trois souches fongiques S3, S10, S1 ( $11,25 \pm 0,5$  mm,  $11 \pm 0,81$  mm et  $10,66 \pm 0,57$  mm respectivement), et la petite zone d'inhibition est obtenu au contact S9 ( $08,25 \pm 0,54$ mm) (Photo 09).

**Parmi les champignons endophytes étudiés 40% (S1, S9, S3, et S10), appartenant aux genres *Aspergillus*, *Acremonium* et *Trichosporon*, montrent une activité antibactérienne sur les deux bactéries pathogènes Gram négatif étudiés ; *P. aerogenosa* (ATCC 27853), *E.coli* (ATCC 25922), 50% (S2, S5, S8, S6 et S7) appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma*, ont une activité sur seulement une bactérie Gram négatif *E. coli*, 10% de ces isolats fongique ne présentent aucune activité antibactérienne contre les deux bactéries Gram négatif.**



**Figure 12: Diamètres d'inhibition de la levure *Candida albicans* par les champignons endophytes.**



**Photo 10 : Activité antimicrobienne des souches fongiques étudiées sur *Candida albicans***

### III. 2.2. Activité antifongique

L'activité des souches fongiques endophytes a également été testée sur une levure, *Candida albicans* et sur deux champignons pathogènes, *Aspergillus niger* et *Penecilium sp.*.

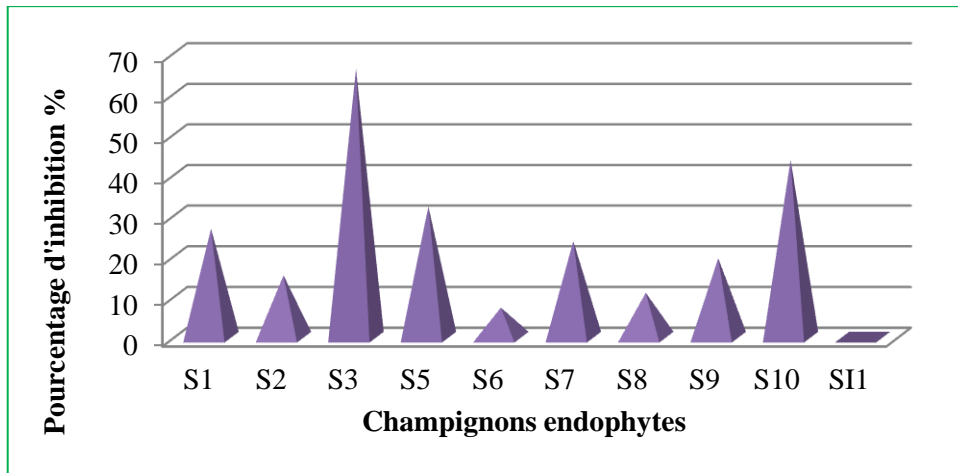
#### III. 2.2.1. Activité sur *Candida albicans*

Parmi les dix souches fongiques testées, cinq (S1, S5, S6, S7, S9) ont montré une activité sur *Candida albicans* (Figure 12).

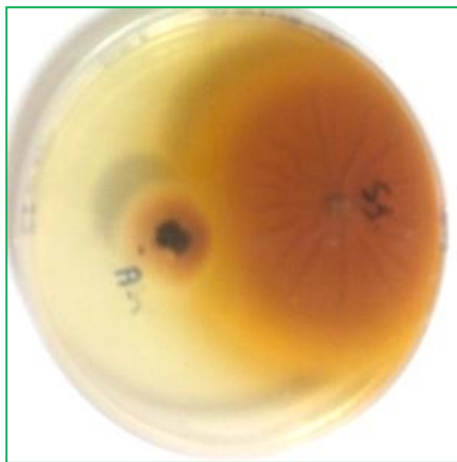
Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance de *Candida albicans* cultivée en présence des différentes souches fongiques varient entre 7 et 9.25 mm, la plus grande zone d'inhibition est observée au contact de la souche S1 ( $09,25 \pm 0,95\text{mm}$ ) et la petite zone d'inhibition est au contact des souches S6 et S7 avec un même diamètre d'inhibition ( $07 \pm 0,81\text{ mm}$ ) (Photo 10).

On signale que cette levure pathogène est plus résistante aux autres souches fongiques S2, S3, S8, S10, SI1 au contact desquelles aucune zone d'inhibition n'est observée.

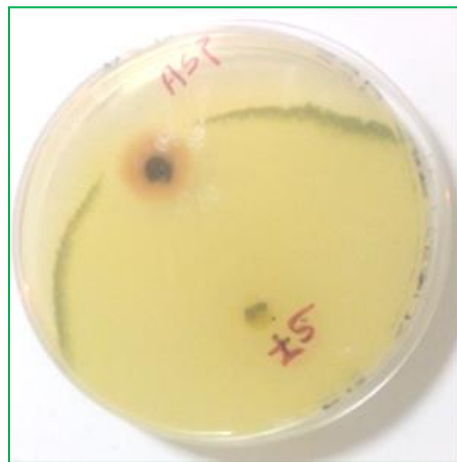
**Parmi les dix souches endophytes étudiées, S1, S5, S9, S6 et S7, soit 50% du total, appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma* ont une faible activité contre la levure pathogène *C. albicans*. Les autres 50% (S2, S3, S8, S10 et SI1) appartenant aux genres *Aspergillus*, *Trichosporon* et *Cladosporium* ne présentent aucune activité antilevurienne.**



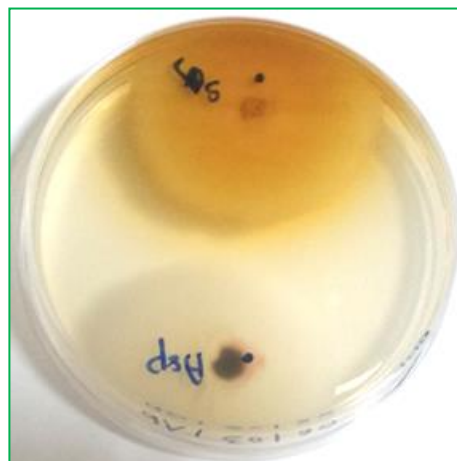
**Figure 13: Pourcentage d'inhibition de croissance d'*Aspergillus niger* par les souches fongiques endophytes**



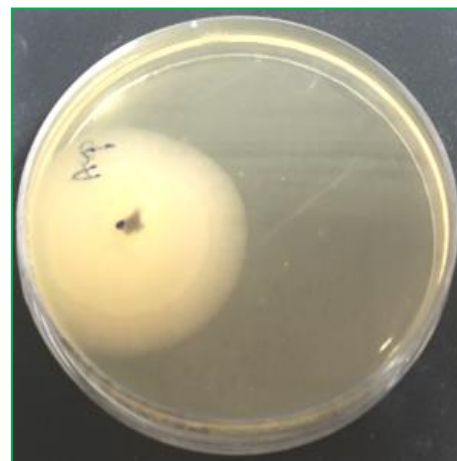
**Photo 11 : Activité antimicrobienne des souches fongiques (S1) étudiées sur *Aspergillus niger***



**Photo 12 : Activité antimicrobienne des souches fongiques (S7) étudiées sur *Aspergillus niger***



**Photo 13 : Activité antimicrobienne des souches fongiques (S9) étudiées sur *Aspergillus niger***



**Contrôle**

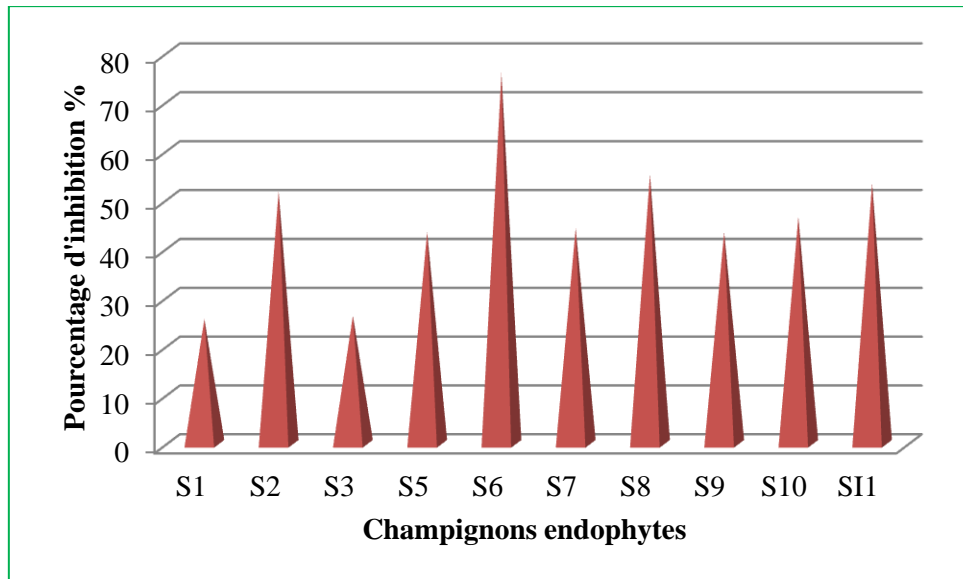
### III. 2.2.2. Activité sur les champignons pathogènes

#### III. 2.2.2.1. Activité sur *Aspergillus niger*

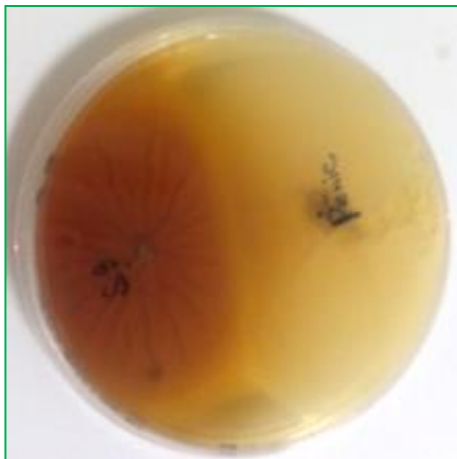
D'après les résultats obtenus, on constate que la quasi-totalité des souches fongiques endophytes montrent une activité sur *Aspergillus niger* à l'exception de la souche SI1 qui ne montre aucune activité (Figure 13).

La souche fongique S3 semble être plus efficace contre *Aspergillus niger* avec un pourcentage d'inhibition de 66,07%, considéré comme élevé. Les deux souches S10 et S5 présentent un pourcentage d'inhibition compris entre 30% et 50% (43,63% et 32,12% respectivement). Des pourcentages d'inhibition assez faibles sont obtenus au contact des souches fongiques endophytes S1, S2, S6, S8 et S9 contre ce champignon pathogène, dont les plus faibles sont au contact des deux souches S8 et S6 (10.9% et 7.27% respectivement) (Photo 11, 12, 13).

**Les souches endophytes étudiées appartenant aux genres *Aspergillus*, *Trichosporon* et *Penicillium* et plus précisément, les souches S1, S2, S3, S5, S8, S9, S10 et S6, soit 90% de la totalité présentent une activité contre le *A. niger*. La SI1 appartenant au genre *Cladosporium* ne montre aucune activité sur ce champignon.**



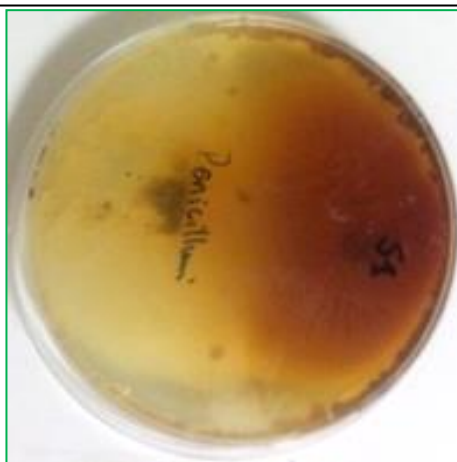
**Figure 14: Pourcentage d'inhibition de la croissance de *Penicillium sp.* par les souches fongiques endophytes étudiées.**



**Photo 14 : Activité antimicrobienne des souches fongiques (S9) étudiées sur *Penicillium sp.***



**Photo 15 : Activité antimicrobienne des souches fongiques (S1) étudiées sur *Penicillium sp.***



**Photo 16 : Activité antimicrobienne des souches fongiques (S16) étudiées sur *Penicillium sp.***



**Contrôle**

### III. 2.2.2.2 Activité contre *Penicillium sp.*

Les résultats de l'activité des souches fongiques contre *Penicillium sp.* indiquent que les dix souches endophytes parviennent à inhiber de façon variable ce champignon pathogène (Figure 14).

La souche S6 a un pourcentage d'inhibition très important (75,97%), les souches S8, S11 et S2 montrent un pourcentage d'inhibition comparables sur *Penicillium sp* (55,17%, 53,44% et 51,72%). Des pourcentages d'inhibition modérés sont observés au contact des souches S10, S7, S9 et S5 (46,51%, 44,18% et 43,41%). Les deux souches S3 et S1 montrent un pourcentage d'inhibition faible de 26,3% et 25,58% respectivement (Photos 14, 15, 16).

**L'activité antifongique est de 100% contre le deuxième champignon pathogène testé *Penicillium sp*, S6 avec une activité antifongique important, S2, S8 et S11 avec une activité antifongique élevée, S10, S7, S9 et S5 avec une activité antifongique modérée et S3 et S1 avec une faible activité antifongique.**



### III.2.3. Discussion

L'activité antimicrobienne par la méthode de cylindre d'agar de dix souches fongiques isolées à partir d'*Artemisia absinthium* a été recherchée sur trois bactéries Gram positif et deux bactéries Gram négatif et contre deux champignons pathogènes, *Aspergillus niger* et *Penicillium sp* et une levure *Candida albicans*.

L'activité antibactérienne et antifongique des souches fongiques endophytes testées sur au moins l'un des agents pathogènes étudiés serait due à leur résistance aux toxines produites par les agents pathogènes. Des études signalent que des champignons endophytes isolés de différentes plantes peuvent avoir une activité antimicrobienne, ils résisteraient à l'invasion et inhiberaient une grande variété de microorganismes nocifs pour l'Homme, les animaux et les plantes par la production de métabolites secondaires (NISCHIOKA *et al.*, 2001 ; HARPER *et al.*, 2003; STROBEL *et al.*, 2004 ; PIMENTEL *et al.*, 2011).

Parmi les champignons endophytes étudiés, ceux supposés appartenant au genre *Aspergillus*, S1, S5 et S9 ont une activité sur toutes les souches bactériennes et fongiques testées. Le genre *Aspergillus*, selon les travaux d'AMADI *et al.* (2009) ; AVASTHI *et al.* (2010) et INDIRA *et al.* (2015) possède une activité antimicrobienne. Cette activité conduisant à la réduction de la croissance de bactéries ou de champignons par différents mode d'action des mycotoxines produites par *A. terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, des endophytes responsables de la production d'alcaloïdes, de fumiclavine A et B et de fumiclaycine B. La plupart de ces métabolites fongiques de structure complexe, inhibent la division cellulaire et le transport du glucose (GIMENEZ *et al.*, 2007 ; AMADI *et al.*, 2009).

L'activité antimicrobienne de la souche S6 appartenant au genre *Penicillium* sur une seule bactérie Gram négatif, et sur *C. albicans*, *Aspergillus niger* et *Penicillium sp*. pourrait être due à la capacité de celle-ci à synthétiser les polykétides, qui inhibent la division cellulaire, tel que le berkeleydione produit par *Penicillium sp*. (GIMENEZ *et al.*, 2007). Cette réaction entre deux espèces du même genre suggère un antagonisme développé entre ces souches différemment situées (endo et épiphyte) dû probablement à l'acquisition de la résistance aux pathogènes d'origine végétale par le phénomène de transfert de gènes entre la plante et l'endophyte (GARY et STROBEL, 2003).

L'activité antifongique du genre *Acremonium* auquel appartient la souche S3, pourrait être due à la présence de composés qui offrent à cette souche une activité antagoniste sur une

variété de champignons pathogènes pour l'homme et pour les plantes (SURENDRA *et al.*, 2011).

Les endophytes possèdent des liens structurels similaires à ceux des agents pathogènes et les deux possèdent plusieurs facteurs de virulence communs tels que la production de métabolites phytotoxiques et les exoenzymes qui sont nécessaires pour infecter et coloniser l'hôte (SELIM *et al* 2012). Ils sont considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (STROBEL *et al.*, 2004; TAN ET ZOU, 2001).

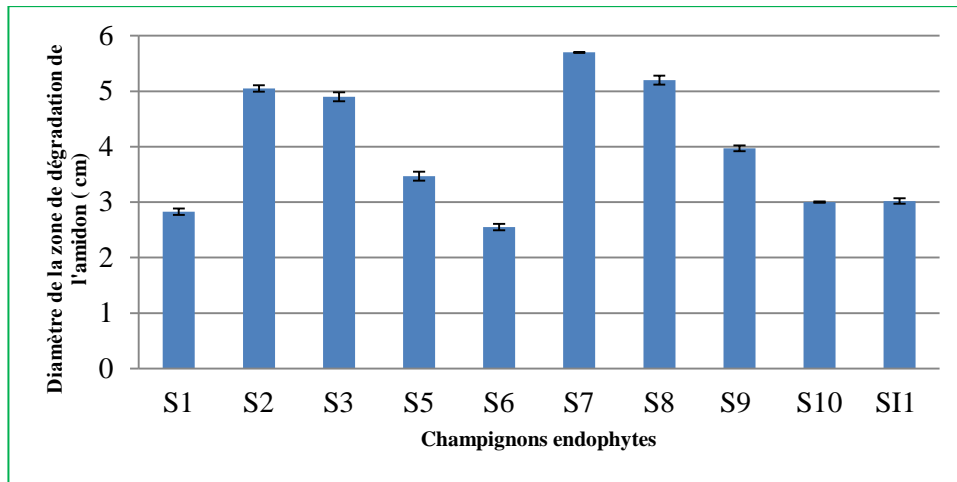


Figure 15: Diamètres des zones de dégradation de l'amidon par les champignons endophytes

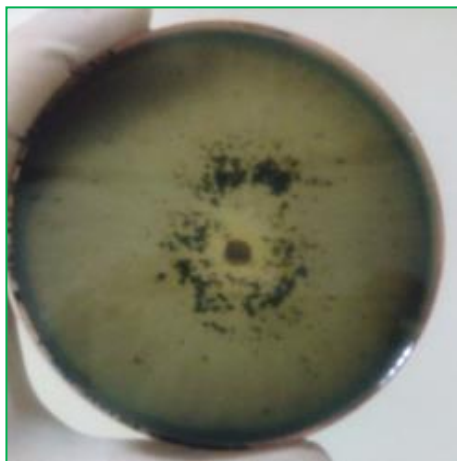


Photo 17 : Activité amyolytique des souches fongiques (S7)



Photo 18 : Activité amyolytique des souches fongiques (S8)

### III.3. Activité enzymatique

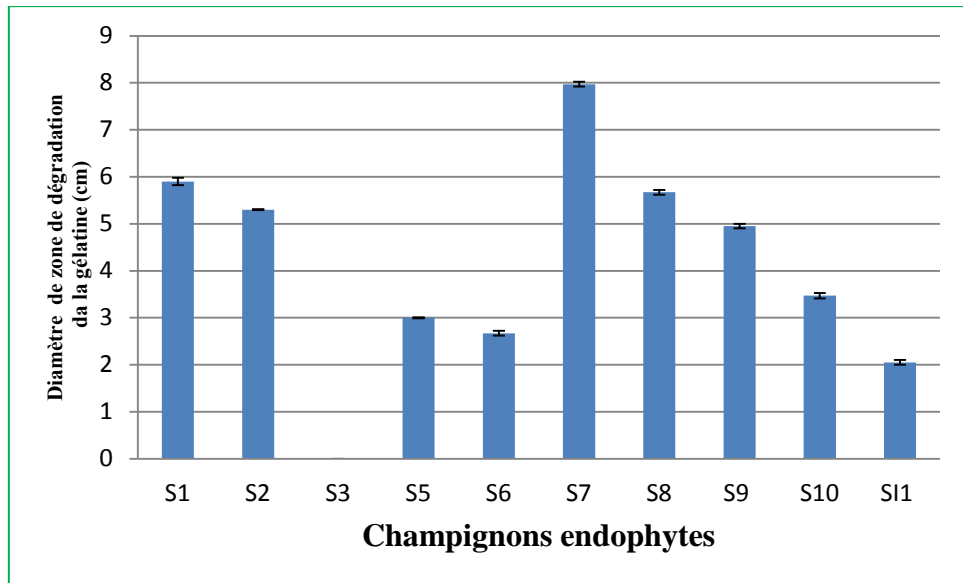
La production d'enzymes extracellulaires à partir des souches fongiques endophytes par la méthode de diffusion radiale en milieu solide est effectuée par les tests qualitatifs. Ces tests ont permis d'évaluer l'activité de trois enzymes produites par les souches fongiques testées, l'amylase, la protéase et l'estérase.

#### III.3.1. Activité amylolytique

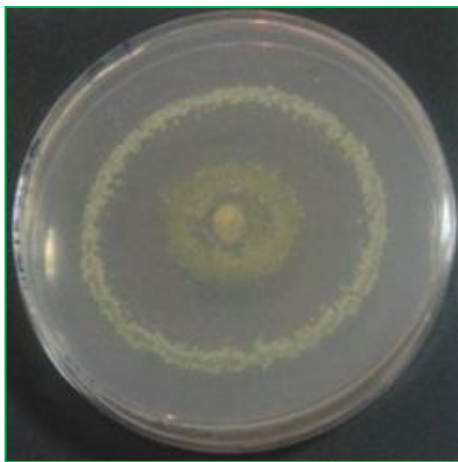
D'après la figure 15 on constate que la totalité de souches fongiques étudiées sont dotée d'une activité amylolytique. Ceci se traduit par leur aptitude à dégrader l'amidon présent dans le milieu de culture en développant des zones de dégradation de diamètres variables.

La zone de dégradation de l'amidon en présence de S7 (Photo 17), avec un diamètre de  $5,7 \pm 0,00\text{cm}$  qu'en présence des souches S2, S3 et S8 (Photo 18) développant des zones de dégradation de  $5,05 \pm 0,057\text{cm}$ ,  $4,9 \pm 0,081\text{cm}$  et  $5,2 \pm 0,081\text{cm}$  respectivement. Les isolats S1, S5, S6, S10 et S11 ont permis l'apparition des zones de dégradation les plus petites, comprises entre  $2,55 \pm 0,057$  et  $3 \pm 0,00\text{cm}$ .

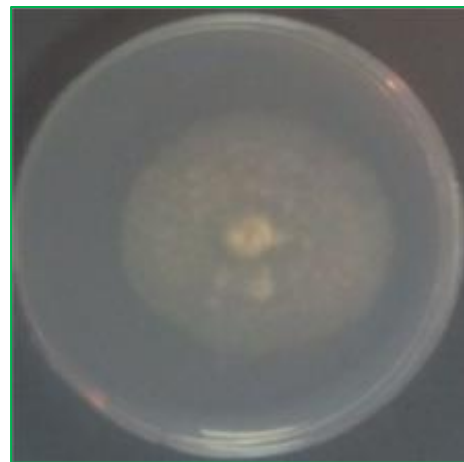
**Tous les champignons endophytes testés présentent une activité amylolytique, la plus importante étant celle de S7 appartenant au genre *Trichoderma* et la plus faible, celle de S6 appartenant au genre *Penicillium*.**



**Figure 16: Diamètres des zones de dégradation de la gélatine par les champignons endophytes**



**Photo 19 : Activité protéolytique (dégradation de la gélatine) des souches fongiques (S7)**



**Photo 20 : Activité protéolytique (dégradation de la gélatine) des souches fongiques (S8)**

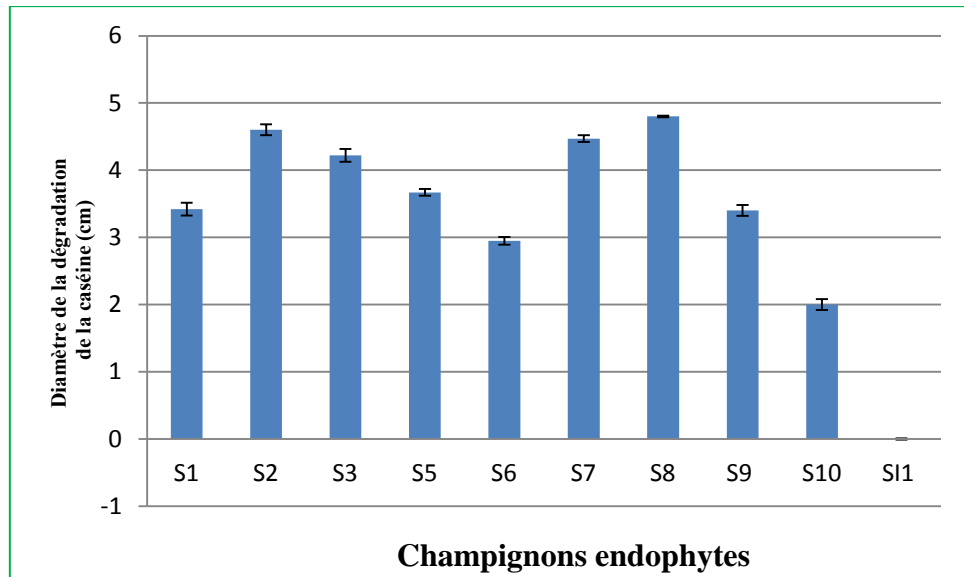
### III. 3.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique des souches fongiques étudiées sur deux protéines, la gélatine et la caséine a aussi été recherchée.

#### III. 3.2.1. Dégradation de gélatine

Les résultats obtenus révèlent une activité protéolytique des champignons endophytes traduite par la dégradation de la gélatine (Figure 16). Cette activité est plus importante chez la souche S7 (Photo 19) autour de laquelle une zone de dégradation de  $7,97 \pm 0,081$ cm a été observée. Pour les souches S1, S2, S8 (Photo 20) et S9 cette activité est moins importante, les diamètres moyens des zones de dégradation sont respectivement de  $5,9 \pm 0,081$ cm,  $5,3 \pm 0,01$ cm et  $5,67 \pm 0,05$ cm. Les souches S10, S5, S6 et S11 présentent les activités protéolytiques les plus faibles avec des zones de dégradation de la gélatine comprises entre  $2,05 \pm 0,057$  et  $3,475.05 \pm 0,05$ . Cette activité est totalement absente pour la souche S3 (figure 16).

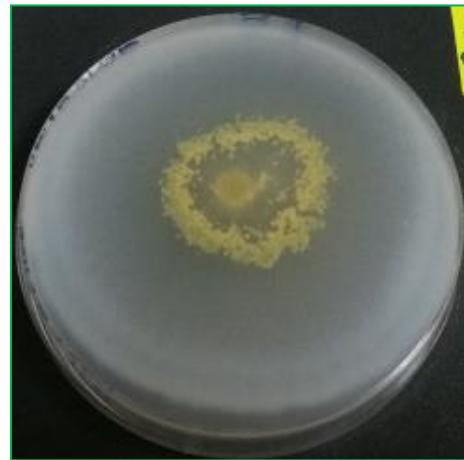
**Il ressort des résultats obtenus que parmi les champignons endophytes étudiés, 90% sont dotés d'une activité protéolytique (dégradation de la gélatine), La plus importante étant celle de la souche S7 appartenant au genre *Trichoderma*.**



**Figure 17: Diamètres des zones de dégradation de la caséine par les champignons endophytes**



**Photo 21 : Activité protéolytique (dégradation de la caséine) des souches fongiques (S8)**



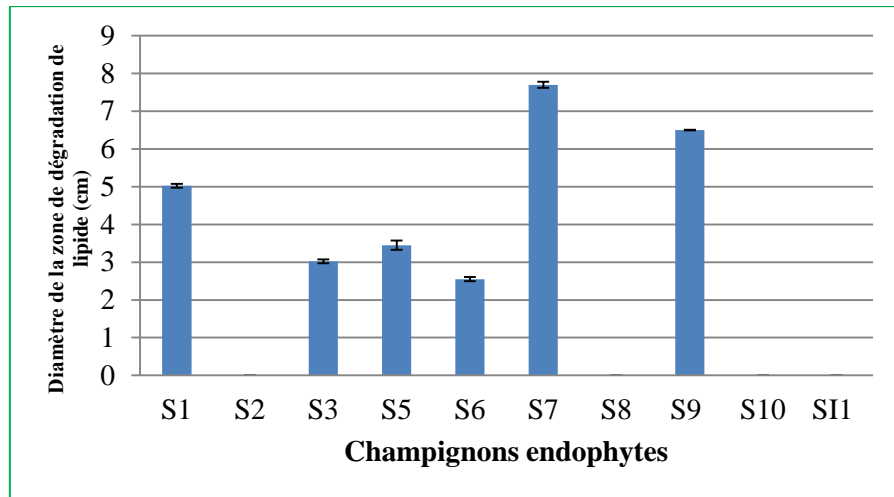
**Photo 22 : Activité protéolytique (dégradation de la caséine) des souches fongiques (S7)**

### III. 2.3.2.2. Dégradation de la Caséine

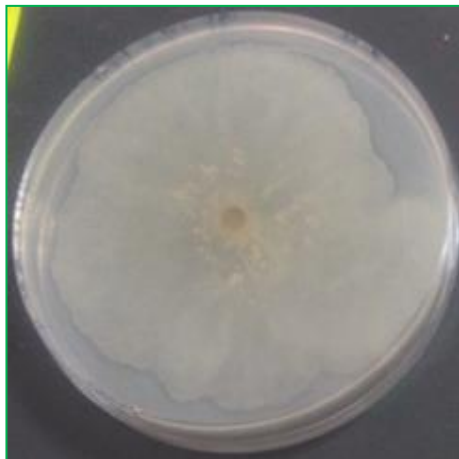
Les résultats obtenus révèlent une activité protéolytique des champignons endophytes traduite par la dégradation de la caséine (figure 17). Cette activité est plus importante en présence des deux souches S8 (Photo 21) et S2 avec des diamètres de dégradation de  $4,8 \pm 0,01$  cm et  $4,6 \pm 0,081$  cm respectivement. Les souches S7 (Photo 22), S3, S5, S1, S9, S6 et S10 présentent une activité protéolytique avec des zones de dégradation comprise entre  $2,00 \pm 0,081$  et  $4,47 \pm 0,05$ . La souche S11 ne présente pas d'activité protéolytique.

**Parmi les champignons endophytes étudiés, S1, S2, S3, S5, S6, S7, S8, S9 et S10, soit 90% des souches sont capable de dégrader la caséine, où la plus grande activité caractérise la souche S8 appartenant au genre *Aspergillus*.**

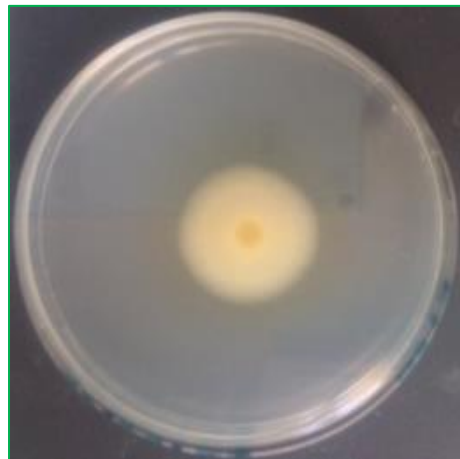




**Figure 18: Diamètres des zones de dégradation des lipides par les champignons endophytes**



**Photo 23 : Activité estérasique des souches fongiques (S7)**



**Photo 24 : Activité estérasique des souches fongiques (S8)**



### III.3.3. Activité estérasique

Les résultats obtenus révèlent une activité estérasique des champignons endophytes traduite par la dégradation de lipide (Figure 18). Cette activité est plus importante chez la souche S7 (Photo 23) autour de laquelle une zone de dégradation de  $7,7 \pm 0.081\text{cm}$  a été observée. La souche S9 est également capable de dégrader la matière grasse présente dans le milieu de culture en développant une zone de dégradation moyenne de  $6,5 \pm 0.01\text{cm}$ . Pour les souches S1, S5, S3 et S6 cette activité est moins importante, les diamètres moyens des zones de dégradation sont respectivement de  $5.02 \pm 0.05\text{cm}$ ,  $3,45 \pm 0.12\text{cm}$ ,  $3,02 \pm 0.05$  et  $2,55 \pm 0.057\text{cm}$ . (Photo 24). Cette activité est absente chez les souches S2, S8, S10 et S11.

**Parmi les champignons endophytes étudiés, 60% sont dotés d'une activité estérasitique (dégradation des lipides). Cette activité est plus importante chez la souche S7 appartenant au genre *Trichoderma*.**

### III.3.4. Discussion

Les enzymes sont des protéines essentielles pour le système métabolique de tous les organismes vivants, elles peuvent être isolées à partir d'animaux, de plantes et de microorganismes, ces derniers sont de bonnes sources d'enzymes dont la stabilité est plus importante que celles d'origine animale ou végétale (MARIA *et al.*, 2005).

Les activités amylolytique, protéolytique et estérasique mises en évidence chez toutes les souches fongiques testées et plus particulièrement chez la souche S7 appartenant au genre *Trichoderma* pourrait être due à la capacité de ce genre à produire plus d'enzymes extracellulaires telles que l'amylase, la protéase et l'estérase.

Selon les travaux de CHOI *et al.*, (2005), SUNITHA *et al.* (2013) et SELIM *et al.* (2012), les champignons endophytes sont parmi les microorganismes qui produisent des hydrolases extracellulaires pour résister à l'invasion des pathogènes et pour assurer la nutrition de l'hôte. Ces enzymes sont essentielles au système métabolique de ces champignons endophytes car elles leur permettent d'envahir et de coloniser les tissus végétaux.

La capacité de tous les isolats à dégrader l'amidon pourrait être expliquée par le fait que l'amidon est la source organique de carbone la plus abondante dans l'environnement (SELIM *et al.*, 2012). Le potentiel amylolytique de ces champignons endophytes peut les

aider à dégrader l'amidon qui est disponible lors de la sénescence de la plante (SUNITHA *et al.*, 2013).

Parmi les souches étudiées, celles appartenant au genre *Aspergillus*, ont également les activités enzymatiques recherchées. Plusieurs endophytes du genre *Aspergillus* ont été signalés comme étant une source d'enzymes amylase, lipase et protéase (MARIA *et al.*, 2005 ; ALVES *et al.*, 2002 et CHOI *et al.*, 2005).

Les activités enzymatiques mises en évidence chez les souches fongiques endophytes testées sont aussi trouvées chez les pathogènes. En revanche, la connaissance du rôle fonctionnel des endophytes nécessite la connaissance du substrat utilisé par ces derniers et les enzymes qu'ils produisent (CARROL *et al.*, 1983). S'ils sont des parasites ou des pathogènes latents, ils produiraient des protéases et des pectinases, mais s'ils sont des mutualistes, ils produiraient des mannases, des cellulases et des xylanases (BRETT, 1990 b, REDDY *et al.*, 1996; POINTING, 1999). Cependant, les endophytes peuvent produire les mêmes enzymes de dégradation que leurs homologues saprophytes sans pour autant que ces dernières conduisent à la destruction des tissus de la plante hôte (POMOTHA, 2007). Maccheroni *et al.*, (2004) rapportent que la présence de l'amylase et de lipase chez les endophytes n'est pas synonyme d'activité. En effet, l'amylase de ces endophytes n'est pas active à pH alcalin mais l'amidon est dégradé par cette enzyme à un pH neutre à acide. La lipase n'est pas produite à pH acide mais elle est sécrétée à un pH neutre à alcalin. Ces enzymes interviendraient dans la dégradation des tissus végétaux sénescents ou la décomposition des tissus morts des plantes (SUN *et al.*, 2011). Cet aspect met en évidence l'intérêt écologique de ces endophytes.

La sécrétion d'estérases extracellulaire par les endophytes étudiées peut avoir un double intérêt, permettant d'une part le maintien de la physiologie et du métabolisme à l'état d'équilibre en détoxifiant les systèmes vivants de diverses substances toxiques environnementales, et d'autre part, en altérant les surfaces des plantes pour faciliter l'adhésion des spores fongiques à ces dernières (SUNITHA *et al.*, 2013).

Selon SUNITHA *et al.* (2013), la production d'enzymes diffère en fonction des champignons et correspond souvent à des exigences de son habitat. Cela peut être dû aux nombreux facteurs de changement dans l'hôte comme l'âge, les facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques et la situation géographique pouvant influencer la biologie des champignons.



# *Conclusion et perspectives*

**Promotion 2015**

## Conclusion et perspectives

Les champignons endophytes sont d'excellentes sources de nouveaux produits naturels bioactifs avec un potentiel d'exploitation dans une grande variété de domaines médicaux, agricoles et industriels.

La présente étude a été effectuée dans le but de rechercher des activités antimicrobienne et enzymatique des champignons endophytes isolés d'une plante médicinale l'*Artemisia absinthium*.

L'identification préliminaire nous a permis de classer nos isolats dans la classe des Ascomycètes à laquelle appartient le genre *Acremonium* et la classe des Deutéromycètes à laquelle appartiennent les autres genres ; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Trichosporon* et *Cladosporium*. Cette classe est considérée parmi celles auxquelles appartiennent la plupart des champignons endophytes.

Les résultats obtenus montrent que parmi les champignons endophytes étudiés ceux appartenant au genre *Aspergillus*, présentent une activité antibactérienne sur les bactéries pathogènes Gram positif (*Staphylococcus aureus* mec A+, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* ATCC) et les bactéries Gram négatif (*P. aerogenosa*, *E.coli*) testées et une activité antifongique sur une levure pathogène (*Candida albicans*) et deux champignons pathogènes (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp.). Cette activité pourrait être due à l'action des mycotoxines ou des antibiotiques produits, conduisant à l'inhibition de la division cellulaire, du transport du glucose, à la perturbation du passage d'eau et des ions par la création de canaux au niveau de la membrane plasmique et à l'inhibition de la synthèse de certains composés de structure.

Il apparait aussi que la plupart des souches endophytes testées présentent les activités enzymatiques recherchées. Leur aptitude à dégrader l'amidon, la gélatine, la caséine et les lipides suggère qu'elles sont dotées d'un bagage enzymatique conséquent comprenant les amylases, les protéases et les estérases extracellulaire. Cependant, il faut rappeler que l'activation ou la sécrétion de certaines de ces enzymes n'est possible que si les conditions de pH sont optimales, d'où l'absence de dégâts chez les plantes hôtes associées aux endophytes.

Les résultats obtenus sont prometteurs. Ils ont permis de mettre en évidence l'aptitude des champignons endophytes dissociés de leur plante hôte à inhiber des bactéries et des champignons pathogènes et à produire des enzymes pouvant être utiles dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et industriel.

Afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus et de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces microorganismes, il serait souhaitable d'effectuer des études complémentaires sur :

- L'identification des champignons étudiés par des outils moléculaires ;
- Extraction, purification de molécules produites par les champignons endophytes ;
- Détermination de la composition, la structure, et la bioactivité des extraits d'*Artemisia absinthium* ;
- Optimisation de la production enzymatique par ces champignons endophytes ;
- Recherche de l'activité antimicrobienne des endophytes sur d'autres souches pathogènes référencées.



# *Références bibliographiques*

**Promotion 2015**



Références bibliographiques

- ABDEL-MOTAAL F. F., NASSAR M. S. M., EL-ZAYAT S. A., EL-SAYED M. A. AND ITO S. I, (2010)- Antifungal activity of endophytic fungi isolated from egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* l.). *Pakistan Journal of Botany*. 42: pp 2883-2894.
- Akiyama.K, Matsuzaki.K and Hayashi.H, (2005) – Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435, 824–827.
- ALVA. P, MCKENZIE. E. H. C, POINTING. S. B, PENA-MURALLA, HYDE.R. K. D, (2002)- Do sea grasses harbor endophytes? *Fungal Diversity Research Series*. 7: pp 167-178.
- ALVES M. H., TAKAKI G. M. C., PORTO A. L. F. AND MILANEZ A. I, (2002)- Screening of *Mucor* spp. For the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*.33: pp 325-330.
- Ananda. K, Sathish.L, Pavithral. N, 2012- Antimicrobial and Enzyme Activity of Endophytic Fungi Isolated from Tulsi. 16: p12.
- ARNOLD. A. E, (2007)- Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges and frontiers. *Fungal Biology Reviews*. 21: pp 51-66.
- BARNETT. H.L AND HUNTER.B.B, (1972). Illustrated genera of Imperfect fungi. 3thEd, Burgess publishing company, Minnesota.pp 62- 197.
- BARZ. W, DANIEL. S, HINDERER. W, JAQUES. U, KESSMANN. H, KOSTER. J, TIEMANN. K, (1988)- Plant Cell Biotechnology (Pais M, Mavituna F, Novais J, eds.): Springer (NATO ASI series), Berlin, Heidelberg, New York. pp 211–213
- BETTUCCI. L, SIMETO. S, ALONSO. R, LUPO. S, (2004)- Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. *Sydowia*. 56: pp 8-23.
- BHAGOBATY R. K., JOSHI S. R. AND KUMAR R, (2010)- *Penicillium verruculosum* RS7PF: A root fungal endophyte associated with an ethno-medicinal plant of the indigenous tribes of Eastern India. *African Journal of Microbiology Research*. 4: pp 766-770.
- BOTINEAU. M, (2010)- Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs 4<sup>ème</sup> Edition : Pp1187-1188. Paris.
- BOTTON. B, BRETON. A, FEVRE. M, GUY. P.H, IARPENT. J.P, SANGLIER. J.J, VAYSSIER. V AND VEAU.P, (1990)- Moisissures utiles et nuisibles. Importance Industrielle. Masson. pp. 20-191
- BOUGHACHICHE.F, REGHIOUA. S, OULMI. L, ZERIZER.H,KITOUNI.M, BOUDMEMAGH. A, BOULAHROUF. A, (2005)- Isolement d'actinomycetales productrice de substance antimicrobiennes à partir de la SEBKHA DE AIN MLILA.n°23: pp 5-10.
- BRADY. S. F. AND CLARDY J, (2000)- CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products*. 63: pp 1447-1448.

- BRETT.C.T, (1990b). Cell wall degradation. In: Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls. Eds., C.T. Brett and K. Waldron. Unwin, Hyman, London, pp: 169-179.
- CARRIM. A. J. I, BARBOSA. E. C. AND VIEIRA. J. D. G, (2006)- Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49: pp 353-359.
- CARROL.G.C, (1988) - Fungal endophytes In stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symiont. *Ecology*.Vol (69): pp 2-9.
- CARROLL. G.C AND PETRINI.O, (1983)- Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia*., 75: pp 53-63.
- CHABASSE.D, (2002)- Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale. pp 25-27.
- CHOI. Y. W, HODGKISS. I. J AND HYDE. K. D, (2005)- *Enzyme* production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*.1: pp 55-66.
- CLAY. K AND SCHARDL. C, (2002)- Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*.160 4: S99-S127.
- COHEN. S. D, (2006)- Host selectivity and genetic variation of *Discula umbrinella* isolates from two oak species: analyses of intergenic spacer region sequences of ribosomal DNA. *Microbial Ecology*. 52: pp 463-469.
- COLLADO. J, PLATAS. G, PELAEZ. F, (2011)- Identification of an endophytic *Nodulisporium* sp from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. *Mycologia*. 93: pp 875-886.
- DEVARAJU. R AND SATISH. S, (2011)- Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian Journal of Experimental Sciences*.2: pp75-79
- FAETH.S.H, SAIKKONEN.K, WALI.P, HELANDER.M, (2004)- Evolution of endophyte- plante symbioses-Trends in plant science.Vol (9) n°6:pp 275-280.
- FATMA. F, MORTADA. S.M, NASSAR. A, SOAD. A, MAGDI. A, SHIN.I, (2010) - Antifungal activity of endophytic fungi isolated from Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus*). *Pak. J. Bot.* 42(4): pp 2883-2894
- FERNANDES. M. R. V, COSTA. E, SILVA. T. A, PFENNING. L. H, DA. COSTA. N. C. M, HEINRICH T. A, ALENCAR. S. M, LIMA. M. A. AND KEGAKI. M, (2009). Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 45: pp 678-685.
- FREEMAN. S, RODRIGUEZ. R.J, (1993) - Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260 : pp 75-78.

- FROHLICH. J, HYDE. K. D AND PETRINI. O, (2000)- Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*.104: pp 1202-1212.
- FUJIMURA. K. E, EGGER. K. N AND HENRY. G. H, (2008)- The effect of experimental warming on the root-associated fungal community of *Salix arctica*. *International Society for Microbial Ecology Journal*. 2: pp 105-114.
- GALLERY. R. E, DALLING. J. W AND ARNOLD. A. E, (2007)-Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with *Cecropia*. *Ecology*. 88: pp 582-588.
- GIMENEZ. C, CABRERA.R, REINA2. M AND GONZÁLEZ-COLOMA.A, (2007)- Bentham Science Publishers Ltd. Fungal Endophytes and their Role in Plant Protection.current organic 28006.
- GONTHIER. P, GENNARO. M AND NICOLOTTI. G, (2006)- Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity*. 21: pp 69-80.
- GONZALEZ-COLOMA. A, MARIA. B, CARMEN. E. DIAZ, BRAULIO. M. FRAGA, RAFAEL. MARTÍNEZ.D, GUSTAVO. E. Z, RODRIGO. A. C, RAIMUNDO. C, JESUS.B, (2012)-Major components of Spanish cultivated *Artemisia absinthium* populations: Antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects. *Industrial Crops and Products*. 37: pp 401-407.
- GUEZLANE.B, TBIBEL.N, KAHLOUCHE.B, ATMANI.G.S, (2011)- microbiologie Travaux Pratiques 2<sup>ème</sup> année TCB et LMD, 4<sup>ème</sup> édition corrigée.
- GUIGNARD. J. LOUIS. P.M, (1983)- Abrégé de botanique.5ème Edition. Pp 158-160.
- GUO. B, DAI. J. R, NG. S, HUANG. Y, LEONG. C, ONG. W AND KARTE. B. K, (2000)- Cytonic acids A and B: Novel tridepside inhibitors of hCMV protease from he endopytic fungus *Cytonaema* species. *Journal of Natural Products*.63: pp 602-604.
- GUO. B, WANG. S, SUN. X, TANG. K, (2006)- Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review1. *A Biochem Microbiol*.44: pp136–142.
- GUO.L.D, HYDE.K.D, LIEW.E.C.Y, (2000)- Identification of endophytic Fungi from *livistona chinensis* based on morphology and r DNA sequences.*New phytol*.Vol (147): pp 617-630.
- HALIMI ABD EL-KADAR.( 1997 ) les plantes médicinales الطبية النباتات.Pp : 9-58.
- HAMMERSCHMIDT. R, (1999)- PHYTOALEXINS: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*.37: pp 285-306.
- HARIS. C, (1989)- Introduction to modern microbiology. blackwell scientific publication. pp179.
- HECKMAN.D.S, GÉNESER.D.M, EIDELL.B.R, STANFFER.R.L, KARDOS.N.L, HEDGES.S.B, (2001)- Molecular Evidence for the Early colonization of land by Fungi and plants. *Science*.Vol (293): pp1129-1133.

- HELLWIG.V, GROTHE.T, MAYER.B.A, ENDERMANN. R, GESCHKE.F. U, HENKEL. T, AND STADLER. M. A, (2002)- a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *J. Antibiot.* 55(10): pp 881-892
- HIGGINS.K.L, ARNOLD.A.E, MIADLIKOUSKA.J, SARVATE.S.D, LUTZONI.F, (2007)- Phylogenetic relationships, host affinity and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Mol.phyl.and Evol.vol* (42): pp 543-555.
- HUANG. W. Y, CAI. Y. Z, HYDE. K. D, CORKE. H AND SUN. M, (2008)- Biodiversity of endophytic fungi with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*; 33: pp 61-75.
- HYDE K. D. AND SOYTONG K, (2008)- The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*; 33: pp 163-173.
- ILYAS M., KANTI A., JAMAL Y., HERTINA AND AGUSTA A, (2009)- Biodiversity of endophytic fungi associated with *Uncaria gambier* roxb. (Rubiaceae) from West Sumatra. *Biodiversitas.* 10: pp 23-28.
- JALGAONWALA R. E., MOHITE B. V. AND MAHAJAN R. T, (2010)- Evaluation of endophytes for their antimicrobial activity from indigenous medicinal plants belonging to north Maharashtra region India. *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research.*1: pp 136-141.
- JOHNSON. N.C, GRAHAM. J.H, SMITH. F.A, (1997)- Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytologist.*135: pp 575-585.
- KHAN. R, SHAHZAD. S, CHOUDHARY. M. I, KHAN. S. A AND AHMAD. A, (2010)- Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pakistan Journal of Botany*; 42: pp1281-1287.
- KHARWAR. R. N, VERMA. V. C, STROBEL. G AND EZRA. D,(2008)-The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Current Science.* 95: pp 228-233.
- KOGEL.K.H, FRANKEN.P, HUCKELHOVEN.R, (2006)- current opinion in plant Biology.Vol (9): pp 358-363.
- KUMAR.S, RAVINDRA. P, AHARWAL, HARSHITA.S, RAJAK. R.C AND SARDUL. S, (2014)-Endophytic fungi: as a source of antimicrobials bioactive compounds.Vol 3, Issue 2, 1179-1197.
- KUMARAN. R. S, MUTHUMARY. J AND HUR. B. K, (2008) - Production of taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Engineering in Life Sciences.* 8: pp 438-446.
- KUSARI. S, SPITELLER. M, (2012)-Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites : progress, challenges and opportunities. *Metabolomics.* (1866): pp 241–66.

- KUSARIS, SPITELLER. M, (2011)- Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Nat Prod Rep.* 28: pp 1203-1207.
- LACHENMEIER. D.W, (2010). Wormwood (*Artemisia absinthium L.*)-A curious plant with both neurotoxic and neuroprotective properties? *Journal of Ethnopharmacology.*131: pp 224–227.
- LAMMI SARAH,( 2011)-Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens
- LARSEN. T. O, SMEDSGAARD. J, NIELSEN. K. F, HANSEN. M. E AND FRISVAD. J. C, (2005)- Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports.* 22: pp 672-695.
- LI. J. Y, SIDHU. R. S, FORD. E, HESS.W.M AND STROBEL. G. A, 1998-The induction of taxol production in the endophytic fungus – *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*20(5): pp 259-264.
- LI. J.Y, STROBEL.G.A, SIDHU.R, HESS.W.M, FORD.E, (1996)- Endophytic Taxol producing fungi from Bald cypress *Taxodium distichum*. *Microbiology.*Vol (142) : pp 2223-2226.
- LI. W. C, ZHOU. J, GUO. S.Y. AND GUO. L. D, (2007) - Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity;* 25: pp 69-80.
- LUBERTOZZIA. D AND KEASLING. J. D,(2009)- Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression . *Biotechnology Advances;* 27: 53-75.
- LUCIENNE. A. D, (2010) - Les plantes médicinales d'Algérie 2<sup>ème</sup> Edition. pp : 24-25.Alger.
- MACCHERONI. J.R, W, ARAÚJO.W.L AND AZEVEDO.J.L, (2004)-Ambient pH - Regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Sci. Agric.* 61(3): pp 298-302.
- MAHESHWARI. R, (2006) - What is an endophytic fungus? *Current Science.*90: p 1039.
- MANSOURI A, (2011)- Les champignons endophytes chez le blé dur (*Triticum durum*.Desf): occurrence et rôle dans la tolérance au stress hydrique. pp : 17-22.
- MARIA. G. L, SRIDHAR. K. R AND RAVIRAJA. N. S, (2005)- Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology.* 1:pp 67-80.
- MOHANTA. J., TAYUNG. K AND MOHAPATRA. U, (2008)- Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Simlipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology.*5(2).
- MORICCA. S AND RAGAZZI. A, (2008)- Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* 98: pp 380-386.

- MÜLLER.C.B, KRAUSS. J, (2005). Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: pp 450- 456.
- NAGARAJA. T. G. AND DEVKAR. P. G, (2010)-Seasonal occurrence of endophytic mycoflora of inner bark of medicinal plant *Acacia catechu* willd. *The Bioscan*.5: pp 243-245.
- NUANGMEK. W, MCKENZIE. E. H. C AND LUMYONG. S, (2008)- Endophytic fungi from wild banana (*Musa acuminata* Colla) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*. *Research Journal of Microbiology*.3: pp 368-374.
- OROLE. O AND ADEJUMO. T. O, (2009)- Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research*.3: pp 969-973.
- OSBOURN. A. E, (1999)- Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genet Biol*. 26: pp163-168.
- OSBOURN. A. E, QI X, TOWNSEND. B AND QIN. B, (2003)- Dissecting plant secondary metabolism constitutive chemical defenses in cereals. *New Phytologist*.159: pp 101-108.
- OSÉS. R, VALENZUELA. S, FREER. J, SANFUENTES. E AND RODRIGUEZ. J, (2008)- Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*. 33: pp 77-86.
- PANDI. M, MANIKANDAN. R AND MUTHUMARY. J, (2010)- Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague dawley rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.64: p53.
- PETIT P., LUCAS E. M. F., ABREU L. M., PFENNING L. H. AND TAKAHASHI J. A, (2009)- Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*.pp12: 1-9.
- PIMENTEL. M. R, MOLINA. G, DIONISIO. A. P, MAROSTICA. JUNIOR. M. R AND PASTORE. G. M, (2011)- The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int*.
- POINTING.S.B,( 1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Divers.*, 2: 17-33.
- POWTHONG. P, JANTRAPANUKORN.B , THONGMEE.A AND SUNTORNTITICHAROEN.P,( 2013)- Screening of Antimicrobial Activities of the Endophytic Fungi Isolated from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. Vol. 15:pp 1513-1522.
- PROMPUTTHA. I, S. LUMYONG.S , DHANASEKARAN.V, MCKENZIE.E.H.C, K.D. HYDE.K.D AND R. JEEWON.R , (2007)- A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*. 53: pp 579-590.
- RAHUL. Y, AJAY. V, SINGH., SAMIKSHA. J AND MANISH. K, (2015)-Antifungal and enzyme activity of endophytic fungi isolated from *Ocimum sanctum* and *Aloe vera*. vol.9: pp1783-1788.



- RAKOTONIRIANA. E. F, MUNAUT.F, DECOCK. C, RANDRIAMAMPIONONA. D, ANDRIAMBOLOLONIAINA. M, RAKOTOMALALA. T, RAKOTONIRINA. E. J, RABEMANANTSOA. C, CHEUK.K, RATSIMAMANGA. S. U, MAHILLON. J, EL-JAZIRI. M, QUETIN.L. J AND CORBISIER. A. M, (2008)- Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 93: pp 27-36.
- REDDY. P.V, LAM.C.K AND F.C. BELANGER.F.C, (1996)- Mutulastic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant. Physiol.*, 111: pp 1209-1218.
- REDMAN. R.S, SHEEHAN. K.B, STONT. R.G, RODRIGUEZ. R.J, HENSEN. J.M, (2002)- Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. *Science*. Vol (298).
- RODRIGUEZ. R. J, REDMAN. R. S AND HENSON. J. M, (2004)- The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Migration and Adaptation Strategies for Global Change*. 9: pp 261-272.
- ROUX. D, ODILE. C, (2007)- Botanique pharmacognosie phytothérapie. Pp 85 ,3<sup>ème</sup> édition.
- SAAR. D. E, POLANS. N. O, SORENSEN.P. D AND DUVALL. M. R, (2001)-Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter*.19: pp 249-260.
- SAIKKONEN. K, FAETH. S. H, HELANDER. M AND SULLIVAN. T. J, (1998)- Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 29: pp 319-343.
- SAIKKONEN. K, WALI. P, HELANDER. M AND FAETH. S. H, (2004)- Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*. 9: pp 275-280.
- SAIKKONEN.K, WALI. P. R AND HELANDER. M, (2010)- Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PLoS One*. 5(6): 11395.
- SAITHONG P., PANTHAVEE W., STONSAOVAPAK S. AND CONGFA L, (2010) - Isolation and primary identification of endophytic fungi from *Cephalotaxus mannii* trees. *Maejo International Journal of Science and Technology*; 4: 446-453.
- SCHULZ. B AND BOYLE. C, (2005)- The endophytic continuum. *Mycological Research*. 109: pp 661-686.
- SCHULZ.B, BOYLE.C, DRAEGER.S, ROMMERT.A, KROHN.K, (2002)- Endophytic fungi : A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol.Res*.Vol (106) n°9: pp 996-1004.
- SEGHERS. D, WITTEBOLLE. L, TOP. E. M, VERSTRAETE. W AND SICILIANO. S. D, (2004)- Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology*.70: pp 1475-1482.

- SEIBER.T.N, (2007)- Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Review*.Vol (21): pp75-89.
- SELIM.K.A, ELBEIH.A, ABDEL-RAHMAN.T.M, EL-DIWANY.A.I, (2012). *Biology of Endophytic Fungi*.
- SELOSSE. M. A AND SCHARDL. C. L, (2007)- Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist*. 173: pp 452-458.
- SHANKAR. N. B AND SHASHIKALA. J, (2010)-Diversity and structure of fungal endophytes in some climbers and grass species of Malnad region, Western Ghats, Southern India. *Mycosphere* 1: 265-274.
- SHU. R. G, WANG. F. W, YANG. Y. M, LIU.Y AND TAN. R. X, (2004)- Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium* sp. IFB-121, an endophytic fungus in *Quercus variabilis*. *Lipids*.39: pp 667-673.
- SINGH. S. B, ZINK. D. L, GUAN. Z, COLLADO. J, PELAEZ. F, FELOCK. P. J AND HAZUDA. D. J, (2003)- Isolation, structure, and HIV-1 integrase inhibitory activity of xanthoviridicatin E and F, two novel fungal metabolites produced by *Penicillium chrysogenum*. *Helvetica Chimica Acta*. 86: pp 3380-3385.
- SONG. Y. C, LI.H, YE. Y. H, SHAN. C. Y, YANG. Y. M AND TAN. R X, Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters* 2004. 241: pp 67-72.
- STONE. J. K, WHITE. J. F AND POLISHOOK .J. D, (2004)- Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills G and Foster M.(eds). *Measuring and Monitoring Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*, Elsevier Academic Press, Boston, MA. pp. 241-270.
- STROBEL. G, DAISY B, CASTILLO. U AND HARPER. J, (2004 )- Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67: pp 257-268.
- STROBEL. G. A, (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*.22: pp315-333.
- STROBEL. G. A, HESS.W. M AND LI. J.Y, (1997)- *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany*; 45: pp 1073-1082.
- STROBEL. G. A, YANG. X, SEARS.J, KRAMER. R, SIDHU. R. S AND HESS. W M, (1993)- Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology*; 142: pp 435-440.
- STROBEL. G. AND DAISY B, 2003- Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: pp 491-502.
- SUN. X, GUO.L.D AND HYDE.K.D, (2011)- Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Divers*. 47:pp 85-95.



- SUNITHA. V.H., D. NIRMALA.D., SRINIVAS.C., 2013- Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants.9 (1): pp 01-09.
- SURENDRA.K.G, ASHISH.M, VIJAY. K.S, SHARMA.S.K.V. JITEDRA.K. RAVINDRA.N.K. ANUJ.K, 2011- Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. 53: pp113-121
- SURYANARAYANAN. T. S AND KUMARESAN.V, (2000)-Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. *Mycological Research*. 104: pp1465-1467.
- SURYANARAYANAN. T. S., MURALI T. S, VENKATESAN.G, (2002). Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany*. pp80: pp 818-826.
- TAN. R. X AND ZOU.W. X, (2001)-Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. 18: pp 448-459.
- TING. A. S. Y, MAH. S. W AND TEE. C. S, (2009)- Prevalence of Endophytes Antagonistic Towards *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Cubense* Race 4 in Various Plants. *Am - Eurasian J Sustain Agric*.3: pp 399-406.
- VANETTEN. H, TEMPORINI. E AND WASMANN. C, (2001)-Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* . 59: pp 83-93.
- VEGA. F. E, POSADA. F, AIME. M. C, RIPOLL. M. P, INFANTE. F AND REHNER. S. A, (2008)- Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* . 46: 72-82.
- WRIGHT. C.W, (2002). *Artemisia*.First Edition.Vol 8. pp 1-79. London
- YU. H, ZHANG. L, LI. L, ZHENG. C, GUO.L, LI. W, SUN.P, QIN.L, (2010) - Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*. 165: pp 437-449.
- ZABALGOGEAZCOA. I, (2008)-Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*.6: pp138-146.
- ZHANG. H. W, SONG. Y. C AND TAN. R. X, (2006)- Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*. 23: pp 753-771.
- ZHOU. D AND HYDE. K. D, (2001)- Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research*. 105: pp 1449-1457.
- ZHOU.S.L, YAN.S.Z, LIU.Q.S, CHEN.S.L, (2015)- Diversity of Endophytic Fungi Associated with the Foliar Tissue of a Hen-Parasitic plant *Macrosolen cochinchinensis*.*current Microbial*. Vol (70) : pp 58-66.



# *Annexes*

**Promotion 2015**

**Annexes****Annexe 01****Composition des milieux de culture****Sabouraud dextrose agar (SDA)**

Dextrose.....	40 g
Peptone.....	10 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 5.6	

**Sabouraud + Chloramphénicol**

Milieu de Sabouraud .....	1000 ml
Chloromphénicol.....	0.5%

**Potato dextrose agar (PDA)**

Pomme de terre épluchées et coupées.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 5.6	

**Malt extract agar (MEA)**

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

**Bouillon nutritif (NB) :**

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

**Gélose nutritive (GN):**

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	5 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml
pH = 7,2	

**Glucose yeast extract peptone (GYP)**

Glucose.....	1 g
Extrait de levure.....	0.1g
Peptone.....	0.5g
Agar.....	16 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH= 6	

**Glucose yeast extract peptone (GYP) + Amidon**

Glucose yeast extract peptone (GYP).....	1000 ml
Amidon.....	0,2%

**Glucose yeast extract peptone (GYP) + Gélatine**

Glucose yeast extract peptone (GYP).....	1000 ml
Gélatine.....	0,4%

**Glucose yeast extract peptone (GYP) + Caséine**

Glucose yeast extract peptone (GYP).....	1000 ml
Caséine.....	5%

**Peptone agar medium (PAM)**

Peptone.....	10 g
NaCl.....	5 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O.....	0.1 g
Agar.....	16 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH= 6	

**Peptone agar medium (PAM) + Tween 80**

Peptone agar medium (PAM).....	1000 ml
Tween 80.....	1 ml

Annexe 02Solutions et réactifs**NaOH**

NaOH.....40g  
Eau distillée..... 100mL

**HCl**

HCl.....8,15g  
Eau distillée..... 100mL

**Lugol**

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

**Lactophénol**









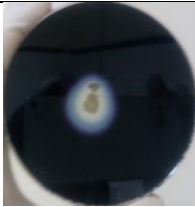


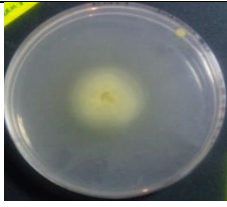
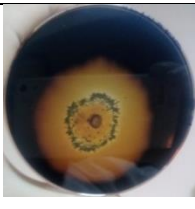
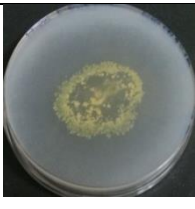
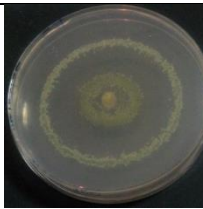





Phénol pur cristallisé.....20g  
Acide lactique.....20 ml  
Glycérol pur.....40 ml

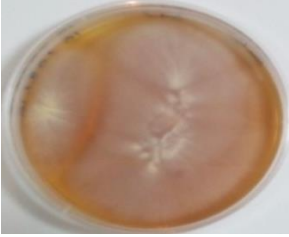
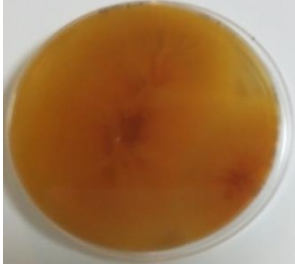
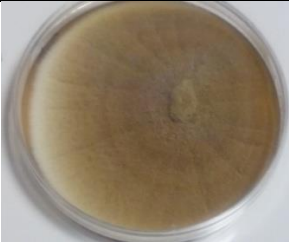



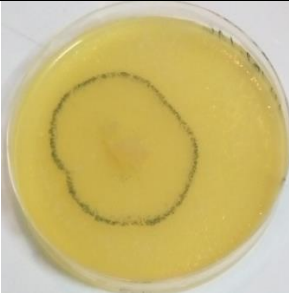
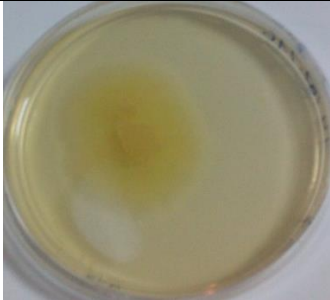
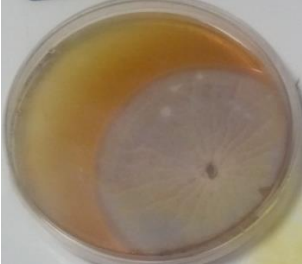
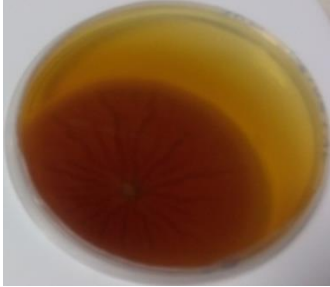
**Bleu de méthylène.....0,3%**

**Eau physiologique**

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

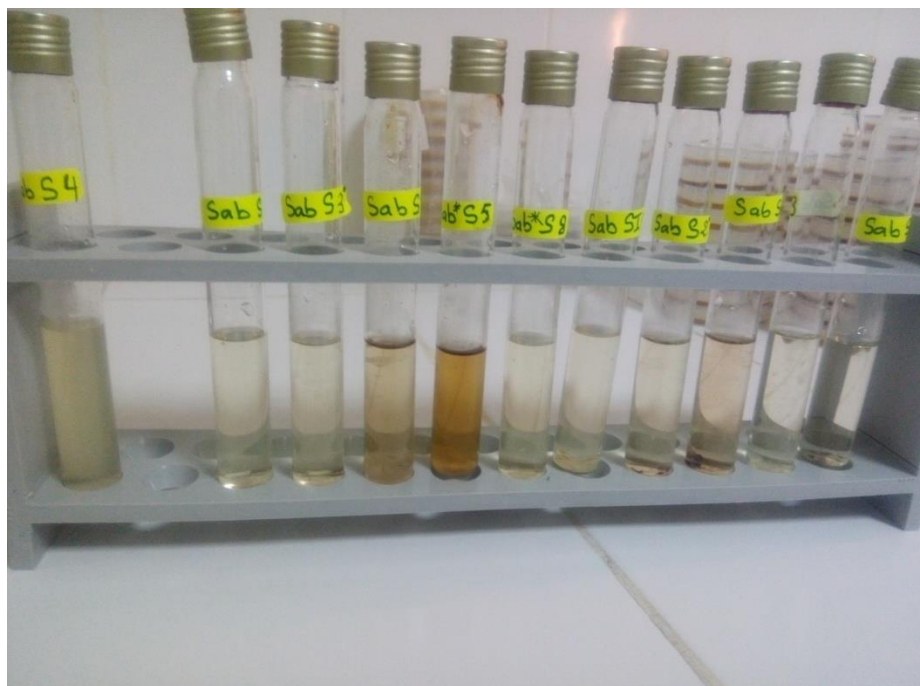
## Annexe 03

Les isolats	Amylase	protéase		Estérase
		Caséine	Gélatinase	
S1				
S5				
S6				
S7				
S9				

		Aspect macroscopique	
		recto	verso
<b>S1</b>			
<b>S5</b>			
<b>S6</b>			
<b>S7</b>			
<b>S9</b>			



**Photo :** les 5 isolats fongiques (S1, S5, S6, S7 et S9) contre *S. aureus* mec A+



**Photo:** des isolats fongique inoculés dans un milieu Sabouraud liquide



## Résumé

Notre travail vise à effectuer une identification préliminaire des champignons isolées à partir d'*Artemisia absinthium*, une plante médicinale collecté de la région de Batna et d'évaluer leurs activités antimicrobiennes et enzymatiques.

Parmi les dix souches étudiées, une souche appartenant à la classe d'Ascomycète (*Acremonium*) et les autres appartenant à la classe Deutéromycète dont cinq sur les dix souches appartenant au genre (*Aspergillus*), une au genre (*Penicillium*), et d'autre au genre (*Trichosporon*), et une au genre (*Cladosporium*) et au genre (*Trichoderma*).

L'activité antimicrobienne a été effectuée sur trois bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mec A+* et *Enterococcus faecium*), deux bactéries Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), sur une levure pathogène (*Candida albicans*) par la technique des cylindres d'agar et contre deux champignons pathogènes (*Aspergillus niger* et *Penicillium sp*) par la méthode de double culture. Toutes les souches fongiques étudiées présentent une activité antimicrobienne au moins au contact de l'un des microorganismes pathogènes testés. Parmi ces souches, 80% présentent une activité antibactérienne sur les bactéries Gram positif, 90% sur les bactéries Gram négatif, 50% sur *Candida albicans* et 90% sur les deux champignons pathogènes.

La production d'enzymes extracellulaires (l'amylase, la protéase et l'estérase) a été recherchée et déterminée pour nos souches fongiques par la digestion du substrat dissous dans la gélose.

L'évaluation de l'activité enzymatique des champignons endophytes a montré que, 100% des champignons endophytes sont dotés d'amylase, 90% de protéases et 60% d'estérase. La production de ces enzymes diffère entre les champignons et dépend souvent de l'hôte et les facteurs écologiques souvent.

**Mots clés :** champignons endophytes, *Artemisia absinthium*, activité antimicrobienne, activité enzymatique, molécules bioactives.

## المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تصنيف أولي للفطريات الداخلية المعزولة من عشبة طبية تتمثل في *Artemisia absinthium* التي تم الحصول عليها من منطقة باتنة وكذلك تقييم أنشطتها المضادة للميكروبات و أنشطتها الإنزيمية.

من بين الفطريات العشر المدروسة نجد فطر ينتمي إلى صنف الفطريات Ascomycètes وهي من نوع (*Acremonium*) وباقي الفطريات تنتمي إلى صنف الفطريات Deutéromycètes من بينها خمسة تنتمي إلى نوع (*Aspergillus*) و الباقي من أنواع مختلفة وهي (*Penicillium*, *Trichoderma*, *Trichosporon*, *Cladosporium*).

تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات الفطرية المدروسة على ثلاث أنواع من بكتيريا موجبة الجرام (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mec A+ et Enterococcus faecium*) و نوعين من البكتيريا سالبة الجرام (*Escherichia coli et Pseudomonas aeruginosa*) وخميرة واحدة ممرضة *Candida albicans* بواسطة تقنية cylindres d'agar وعلى نوعين من الفطريات الممرضة للنباتات (*Aspergillus niger et Penicillium sp*) بواسطة التقنية double culture للفطر الممرض والفطر المدروس.

جميع الفطريات الداخلية المدروسة أظهرت نشاط مضاد للميكروبات الضارة الممرضة التي تم اختبارها، حيث 80% من هذه الفطريات لديها نشاط مضاد للبكتيريا الموجبة الجرام ، 90 % منها ضد البكتيريا السالبة الجرام ، 50 % منها ضد الخميرة الممرضة و 90 % ضد الفطريين الممرضين.

إنتاج الإنزيمات خارج الخلية الفطرية (l'amylase, la protéase et l'estérase) تم كذلك البحث عنه عند الفطريات المدروسة وهذا بواسطة تفكيك المادة المنحلة في الوسط الغذائي، فقد أظهر تقييم النشاط الإنزيمي للفطريات المدروسة أن 100% تنتج إنزيم Amylase، 90 % Protéase و 60 % منها تنتج estérase. إنتاج هذه الإنزيمات يختلف من فطر إلى آخر، وهذا يعود إلى العوامل الخاصة بالنبات المضيف مثل العمر وعوامل ببنية و التي تؤثر على فيزيولوجية الفطر.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات الداخلية، الأنشطة المضادة للميكروبات، الأنشطة الإنزيمية، المركبات الفعالة.

## Summary

Our work is to make a preliminary identification of fungi isolated from *Artemisia absinthium*; an herb collected from Batna region and assesses their microbial and enzymatic activities.

Among the ten strains studied a strain belonging to the class of Ascomycete (*Acremonium*) and the other belonging to the class Deuteromycete including five of the ten strains of the genus (*Aspergillus*), one genus (*Penicillium*), and other genus (*Trichosporon*), and at genus (*Cladosporium*) and genus (*Trichoderma*).

The antimicrobial activity was performed on three Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus mec A+* and *Enterococcus faecium*), two gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), a pathogenic yeast (*Candida albicans*) by the technique of agar cylinders and against two fungal pathogens (*Aspergillus niger* and *Penicillium sp*) by the dual culture method.

All tested fungal strains exhibit antimicrobial activity at least in contact with one of the tested pathogenic microorganisms. Of these strains, 80% have antibacterial activity against Gram-positive bacteria, 90% of the gram-negative bacteria, 50% of *Candida albicans* and 90% over the two pathogenic fungi.

The production of extracellular enzymes (amylase, protease and esterase) was investigated and determined for our fungal strains by the digestion of the substrate dissolved in agar.

The evaluation of the enzymatic activity of endophytic fungi showed that 100% of endophytic fungi are provided with amylase, 90% of protease and 60% of esterase. The array of enzymes produced differs between fungi and often depends on the host and their ecological factors.

**Key words:** endophytic fungi, *Artemisia absinthium*, antimicrobial activity, enzymatic activity, bioactive molecules.