

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°/SNV/2021

Thèse

Présentée par

ZERROUG Amina

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Filière : Biologie

Spécialité : MICROBIOLOGIE

Thème

**Champignons endophytes des plantes médicinales de la région de
Sétif : Isolement, Identification et activités biologiques**

Soutenue publiquement le **28/02/2021**

Devant le Jury

Président

ZERROUG Mohamed Mihoub

Pr. UFA Sétif 1

Directeur

HARZALLAH Daoud

Pr. UFA Sétif 1

Examineurs

BETTACHE Azzeddine

MCA. UAM Béjaïa

MENACEUR Fouad

MCA. ULT Tébessa

BENDIF Hamdi

MCA. UMB M'sila

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

Remerciements

Les travaux de recherches de cette thèse ont été réalisés en grande partie au Laboratoire de Microbiologie Appliquée FSNV-UFA Sétif 1, sous la direction du Professeur **HARZALLAH Daoud** à qui j'adresse mes remerciements les plus sincères, pour m'avoir guidé, surveillé le déroulement et l'exécution du travail de cette thèse en me prodiguant tout aide possible, et en me consacrant beaucoup de son temps précieux.

Ma vive reconnaissance va au Pr. **ZERROUG Mohamed Mihoub**, professeur à l'université de Sétif, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de thèse, ainsi qu'au Pr. **BETTACHE Azzeddine**, de l'université de Béjaïa, le Pr. **MENACEUR Fouad** de l'université de Tébessa, le Pr. **BENDIF Hamdi** de l'université de M'sila d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci à mon collègue, époux et compagnon de route **SADRATI Nouari** pour son soutien quotidien, ses encouragements et sa collaboration dans ce travail.

Un merci tout particulier au Professeur **Rasime DEMIREL** pour son accueil dans son laboratoire, son aide, ses conseils et son amitié.

Je remercie vivement le Professeur **Jean Marc ROLAIN** pour son accueil, sa collaboration, et toutes les facilités accordées pour permettre la réalisation d'une partie des travaux.

Merci à tous.

Dédicace

A **maman** et à **papa**, sans vous je ne serai jamais arrivée jusque-là. Je ne vous remercierais jamais assez pour tous ce que vous avez fait et faites encore pour moi.

A ma **filie**, qui m'a supporté toute cette période.

Je vous aime

Le mieux est l'ennemi du bien

Sommaire

المخلص.....	I
Résumé	II
Abstract.....	III
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux	VII
Liste des abréviations	VIII
Introduction	1

I. Revue bibliographique

I.1. Définition des endophytes.....	3
I.2. Diversité et classification des champignons endophytes	3
I.3. Applications biotechnologiques des champignons endophytes	5
I.3.1. Application en biomédecine et en pharmaceutique.....	5
I.3.1.1. Les métabolites secondaires.....	5
I.3.1.1.1. Molécules antibactériennes.....	5
I.3.1.1.2. Molécules antifongiques	7
I.3.1.1.3. Molécules antivirales	9
I.3.1.1.4. Molécules antioxydantes	10
I.3.1.1.5. Molécules anticancéreuses.....	12
I.3.1.1.6. Molécules antiparasitaires	13
I.3.1.1.7. Molécules antidiabétiques	15
I.3.1.1.8. Molécules anti-inflammatoires	16
I.3.1.2. Nanoparticules	17
I.3.2. Application en industrie agricole.....	18
I.3.2.1. Résistance aux stress biotiques	18
I.3.2.1.1. Résistance aux microorganismes phytopathogènes.....	18
I.3.2.1.2. Résistances aux herbivores	20
I.3.2.2. Résistance aux stress abiotiques	20
I.3.2.3. Stimulation de la croissance des plantes.....	21
I.3.2.3.1. Mécanismes directs.....	22
I.3.3. Applications dans l'énergie et les biocatalyseurs.....	23
I.3.3.1. Biosynthèse des biocarburants	23
I.3.3.2. Biosynthèse d'enzymes.....	24
I.3.4. Applications dans la bioremediation de l'environnement	24

I.4. Les plantes médicinales et leurs champignons endophytes	25
I.4.1. <i>Mentha pulegium</i> L.....	25
I.4.2. <i>Juniperus phoenicea</i> L.	26
I.4.3. <i>Cedrus atlantica</i> Man.	27
I.4.4. <i>Taxus baccata</i>	28

II. Matériel et méthodes

II.1. Produits chimiques.....	30
II.2. Matériel végétal	30
II.3. Matériel microbien.....	30
II.4. Lignées cellulaires	30
II.5. Echantillonnage	32
II.6. Isolement des champignons endophytes.....	33
II.7. Conservation des champignons endophytes	34
II.8. Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne	34
II.8.1. Préparation des microorganismes cibles	34
II.8.2. Activité antibactérienne et antilevurienne.....	34
II.8.3. Activité antifongique.....	35
II.9. Identification des champignons endophytes	35
II.9.1. Identification morphologique.....	35
II.9.2. Identification par spectrométrie de masse au Maldi-Tof MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time of Flight Mass Spectrometry)	35
II.9.2.1. Préparation de la matrice	35
II.9.2.2. Lyse et extraction des protéines fongiques.....	36
II.9.2.3. Préparation de la plaque et lecture des résultats.....	36
II.9.3. Identification moléculaire	36
II.9.3.1. Extraction et purification de l'ADN génomique	37
II.9.3.2. Amplification de l'ADN.....	37
II.9.3.3. Révélation sur gel d'électrophorèse	37
II.9.3.4. Purification des produits de PCR	39
II.9.3.5. Réaction de séquence (BigDye)	39
II.9.3.6. Purification de la réaction de séquence par sephadex et séquençage.....	40
II.9.3.7. Analyses phylogénétiques	40
II.10. Choix du milieu de culture optimum	40
II.11. Choix du type de fermentation et du solvant d'extraction.....	41

II.11.1. Fermentation sur milieu solide et liquide	41
II.11.2. Extraction des métabolites secondaires.....	41
II.11.3. Activité antimicrobienne	42
II.12. Fermentation à grand volume	42
II.13. Activité antimicrobienne contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les dermatophytes.....	42
II.14. Détermination des CMI et des CMB	43
II.15. Détermination de la concentration minimale fongistatique (CMF).....	44
II.16. Cinétique de létalité	46
II.17. Activité antioxydante	49
II.17.1. Détermination de la teneur totale en composés phénoliques	49
II.17.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes.....	49
II.17.3. Activité de piégeage du radical DPPH.....	49
II.17.4. Capacité de piégeage du radical libre cationique ABTS ⁺	50
II.17.5. Activité antioxydante réductrice du fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power).....	51
II.18. Activité antiproliférative des extraits fongiques	51
II.19. Criblage de la production du L-asparaginase par les champignons endophytes	52
II.20. Estimation de l'enzyme L-asparaginase chez les isolats producteurs	53
II.21. Analyses statistiques	53

III. Résultats et discussion

III.1. Isolement et fréquences de colonisation.....	55
III.2. Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne.....	57
III.3. Identification des champignons endophytes.....	60
III.3.1. Isolat MPR1	60
III.3.2. Isolats JPF2, JPF3 et JPF4	63
III.3.3. Isolat CAR11	66
III.3.4. Isolat TBT7	68
III.3.5. Isolat TBT10.....	71
III.4. Choix du milieu de culture optimum.....	74
III.5. Choix du type de fermentation et du solvant d'extraction.....	77
III.6. Activité antimicrobienne contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les dermatophytes.....	80
III.7. Détermination de la CMI/ CMF et de la CMB.....	90
III.8. Cinétique de létalité.....	94

III.9. Activité antioxydante.....	97
III.9.1. Détermination de la teneur totale en composés phénoliques et en flavonoïdes.....	97
III.9.2. Activité antiradicalaire (DPPH et ABTS ⁺)	98
III.9.3. Activité antioxydante réductrice du fer.....	101
III.10. Activité antiproliférative.....	103
III.11. Criblage et estimation de la production de L-asparaginase	107
Conclusion et perspectives	110
Références bibliographiques	113

الملخص

يهدف هذا العمل إلى عزل بعض الفطريات الداخلية لأربعة نباتات طبية: *Juniperus*، *Mentha pulegium* L.، *Cedrus atlantica* Man.، *phoenicea* L. و *Taxus baccata*، وتحديد هويتها، وكذلك تقييم بعض الأنشطة البيولوجية لمستخلصاته. بعد تعقيم سطح الأجزاء المختلفة من النباتات، تم عزل 115 عزلة فطرية وبعد الاختبارات الأولية لنشاطيتها المضادة للميكروبات، تم اختيار سبعة منها. بناء على الخصائص المورفولوجية والبيولوجيا الجزيئية، حددت هوية كل من العزلات MPR1، CAR11 و TBT10 على أنها تنتمي إلى الأنواع *Penicillium griseofulvum*، *Penicillium canescens* و *Anthostomelloides leucospermi* على التوالي، في حين كل من العزلات الثلاثة JPF2، JPF3، JPF4 و العزلة TBT7 تم اقتراحهم على أساس أنواع جديدة تنتمي إلى الأجناس *Micronematobotrys* و *Dermea* على التوالي. اختبارات اختيار وسط الزرع المناسب، نوع التخمر والمذيب العضوي الأنسب لإستخلاص أمثل للجزيئات النشطة بيولوجيا، مكن من اختيار الوسط MEA لجميع العزلات ما عدا العزلة TBT10 كان الـ PDA هو وسط الزرع الأمثل. أعطى التخمر في الوسط السائل مستخلصات أكثر نشاطاً لكل من العزلات MPR1 و TBT10، بينما كان أكثر فعالية منه في الوسط الصلب بالنسبة لكل من العزلات JPF2، CAR11 و TBT7. بالنسبة للمذيب، تم اختيار الأسيتات إيثيل لجميع العزلات باستثناء العزلة JPF2، كان ثنائي كلورو ميثان هو المذيب الأنسب. النشاطية المضادة للميكروبات للمستخلصات الفطرية تم تقييمها ضد مجموعة مكونة من 12 بكتيريا إيجابية الجرام و 13 سلبية الجرام، بعضها مقاوم أو متعدد المقاومة للمضادات الحيوية بالإضافة إلى خمسة أنواع فطرية ممرضة للجلد. جميع العزلات كان لها نشاط مثبط لجميع البكتيريا الموجبة الجرام، في حين تم تثبيط البكتيريا سالبة الجرام فقط بواسطة مستخلص العزلة MPR1. بالنسبة للفطريات الجلدية، *Candida albicans* كانت مقاومة لمستخلص كل من العزلات TBT7 و TBT1، بينما تم تثبيط جميع الفطريات الجلدية الأخرى بواسطة جميع المستخلصات. مستخلص TBT7 كان هو المستخلص الأكثر نشاطاً ضد البكتيريا الموجبة للجرام بقيم MICs تتراوح من 0.73-23 ميكروغرام / مل، يليه مستخلص العزلة JPF2 من 6.25-200 ميكروغرام / مل، MPR1 من 25-200 ميكروغرام / مل و أخيراً TBT10 من 562.5 إلى 4500 ميكروغرام / مل. فيما يتعلق بالفطريات الجلدية، كانت مستخلصات MPR1 و JPF2 هي الأكثر نشاطاً. من خلال حساب نسبة MIC / CMB، كانت مستخلصات جميع العزلات لها اثر قاتل لمعظم البكتيريا المسببة للأمراض، وهذا ما أكده اختبار حركية القتل مقارنة بالزمن و التركيز. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للأكسدة، تحتوي جميع المستخلصات على نسب معتبرة من متعددات الفينولات ونسب اقل من الفلافونويدات. أظهر مستخلص العزلة CAR11 التأثير الإزاحي الأكبر لجذور DPPH و $ABTS^{+}$ حيث كانت قيم IC_{50} بين 0.18 ± 84.82 ميكروغرام / مل و 0.024 ± 219.8 ميكروغرام / مل على التوالي، بالإضافة إلى إظهاره لقدرة إرجاعيه أكبر 2.59 ± 1746 ميكرومول Fe^{2+} / ملغ من المستخلص. تم الحصول على نشاط جيد للغاية مضاد لتكاثر الخلايا السرطانية لكل من مستخلصات MPR1، JPF2 و TBT10 مع CC_{50} تتراوح من 0.2 إلى 10.49 ميكروغرام / مل، في حين أن مستخلص TBT7 لم يظهر أي نشاط مضاد لهذه الاخيرة. التقدير الكمي للإنتاج العزلات L-asparaginase، اثبت أن العزلة MPR1 لها القدرة على إنتاج نسب جد مرتفعة (142.5 ± 3126 وحدة دولية / مل)، يليه CAR11 (42.19 ± 6.69 وحدة دولية / مل) ثم TBT10 (4.2 ± 24 وحدة دولية / مل)

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية، النشاط المضاد للميكروبات، مضادات الأكسدة، المضادة للسرطان، متعدد المقاومة.

Résumé

L'objectif de ce travail est l'isolement des champignons endophytes à partir de 4 plantes médicinales *Mentha pulegium* L., *Juniperus phoenicea* L., *Cedrus atlantica* Man. et *Taxus baccata*, leur identification ainsi que l'évaluation des activités biologiques de leurs extraits. Après stérilisation de la surface des différentes parties de plantes, 115 isolats fongiques ont été isolés. L'activité antimicrobienne de ces isolats a été criblée et sept d'entre eux ont été sélectionnés. L'identification de ces isolats a été faite sur la base des caractéristiques morphologiques et de la biologie moléculaire. Les résultats ont permis d'identifier les isolats MPR1, CAR11 et TBT10 comme étant *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium canescens* et *Anthostomelloides leucospermi*, les isolats JPF2, JPF3, JPF4 et l'isolat TBT7 ont été proposé comme étant des nouvelles espèces appartenant aux genres *Micronematobotrys* et *Dermea* respectivement. Le choix du milieu de culture, du type de fermentation ainsi que le solvant permettant la meilleure production et extraction des molécules bioactives, ont permis de sélectionner le MEA pour tous les isolats sauf pour TBT10 pour lequel c'est le milieu PDA qui a été choisi. La fermentation en milieu liquide est celle qui a donné les extraits les plus actifs pour les isolats MPR1 et TBT10, alors que pour JPF2, CAR11 et TBT7 c'était la fermentation en milieu solide. Pour le solvant, l'acétate d'éthyle a été choisi pour tous les isolats sauf pour JPF2, pour lequel c'était le dichlorométhane. L'activité antimicrobienne des extraits fongiques a été évaluée contre une gamme de 12 bactéries à Gram positif, 13 à Gram négatif dont certaines étaient des bactéries résistantes ou multi-résistantes aux antibiotiques et 5 dermatophytes. Toutes les bactéries à Gram positif ont été inhibées par tous les extraits fongiques, contrairement aux bactéries à Gram négatif qui n'ont été inhibées que par l'extrait de l'isolat MPR1. Pour les dermatophytes, seule *Candida albicans* a résisté aux extraits des isolats TBT7 et TBT10, alors que tous les autres dermatophytes ont été inhibés par tous les extraits. L'extrait de TBT7 a été le plus actif des extraits contre les bactéries à Gram positif avec les CMI les plus basses (0.73 à 23.4 µg/mL), suivie de JPF2 (6.25 à 200 µg/mL), MPR1 (25 à 200 µg/mL) et TBT10 (562.5 à 4500 µg/mL). Concernant les dermatophytes, les extraits de MPR1 et JPF2 étaient les plus actifs. En calculant le rapport CMB/CMI, tous les extraits étaient bactéricides pour la plupart des bactéries pathogènes, ceci a été confirmé par le test de la cinétique de létalité. Concernant l'activité antioxydante, tous les extraits contenaient des polyphénols et des flavonoïdes. L'extrait de l'isolat CAR11 a montré l'activité antiradicalaire la plus grande dans le test du DPPH ($IC_{50}=84.82\pm 0.18$ µg/mL) et le test ABTS⁺ ($IC_{50}=219.8\pm 0.024$ µg/mL) ainsi que le meilleur pouvoir réducteur du fer (1746 ± 2.59 µmol Fe²⁺/mg d'extrait). Une importante activité antiproliférative a été obtenue avec les extraits de MPR1, JPF2 et TBT10 avec des CC₅₀ allant de 0.2 à 10.49 µg/mL, alors que l'extrait de TBT7 n'a montré aucune activité antiproliférative. Après la sélection par un criblage préliminaire des isolats producteurs de L-asparaginase, une quantification de cette production a révélé la grande production obtenue avec l'extrait de MPR1 (142.5 ± 3.126 UI/mL) suivi de CAR11 (42.19 ± 6.69 UI/mL) et de TBT10 (24 ± 4.27 UI/mL).

Mots Clés : Champignons endophytes, activité antimicrobienne, Antioxydante, Anticancéreuse, multi-résistance.

Abstract

The objective of this work is the isolation of endophytic fungi from four medicinal plants *Mentha pulegium* L., *Juniperus phoenicea* L., *Cedrus atlantica* Man. and *Taxus baccata*, their identification as well as the evaluation of the biological activities of their extracts. After sterilization of the surface of different plants parts, 115 fungal isolates were purified. The antimicrobial activity of these isolates was screened and seven of them were selected for further studies. The identification of these isolates was made on the basis of morphological characteristics and molecular biology. MPR1, CAR11 and TBT10 isolates were identified as belonging to *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium canescens* and *Anthostomelloides leucospermi* species respectively. Regarding the three isolates JPF2, JPF3, JPF4 and TBT7 isolate were proposed as new species belonging to the *Micronematobotrys* and *Dermea* genera respectively. The choice of the culture medium, the type of fermentation as well as the solvent allowing the best production and extraction of the bioactive molecules, made it possible to select the MEA for all the isolates, except for TBT10 for which it is the PDA medium that was chosen. Fermentation in a liquid medium gave the most active extracts for MPR1 and TBT10 isolates, whereas for JPF2, CAR11 and TBT7 it was fermentation in solid medium. For the solvents, ethyl acetate was selected for all isolates except for JPF2, for which it was dichloromethane. The antimicrobial activity of the fungal extracts was evaluated against a range of 12 Gram-positive, 13 Gram-negative bacteria, some of which were resistant or multi-resistant to antibiotics and five dermatophytes. All Gram-positive bacteria were inhibited by all fungal extracts, whereas Gram-negative bacteria were inhibited only by MPR1 extract. For dermatophytes, only *Candida albicans* resisted to extracts of TBT7 and TBT10, while all other dermatophytes were inhibited by all extracts. TBT7 extract was the most active extract against Gram-positive bacteria with the lowest MICs (0.73-23 $\mu\text{g} / \text{mL}$), followed by JPF2 (6.25-200 $\mu\text{g} / \text{mL}$), MPR1 (25-200 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and TBT10 (562.5 to 4500 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Regarding dermatophytes, MPR1 and JPF2 extracts were the most active. According to the CMB/MIC ratio, all extracts were bactericidal for most pathogenic bacteria, this was confirmed by the lethality kinetics test. Regarding antioxidant activity, all extracts contained polyphenolics and flavonoids compounds. Extract of CAR11 isolate showed the highest antiradical activity in the DPPH test ($\text{IC}_{50} = 84.82 \pm 0.18 \mu\text{g} / \text{mL}$) and the ABTS^{•+} test ($\text{IC}_{50} = 219.8 \pm 0.024 \mu\text{g}/\text{mL}$) as well as the best reducing power of iron ($1746 \pm 2.59 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ of extract). An important antiproliferative activity was obtained with the extracts of MPR1, JPF2 and TBT10 with CC50 ranging from 0.2 to 10.49 $\mu\text{g} / \text{mL}$, whereas the extract of TBT7 showed no antiproliferative activity. After selection by preliminary screening of L-asparaginase producing isolates, a quantification of this production revealed that the high production was obtained with MPR1 isolate ($142.5 \pm 3.126 \text{ IU} / \text{mL}$) followed by CAR11 ($42.19 \pm 6.69 \text{ IU} / \text{mL}$) and TBT10 ($24 \pm 4.27 \text{ IU} / \text{mL}$).

Key words: Endophytic fungi, antimicrobial activity, Antioxidant, Anticancer, Multidrug resistance.

Liste des figures

Figure 1. Structure de certaines molécules antibactériennes produites par les champignons endophytes	6
Figure 2. Structure de certaines molécules antifongiques produites par les champignons endophytes. 8	
Figure 3. Structure de certaines molécules antivirales produites par les champignons endophytes.	10
Figure 4. Structure de certaines molécules antioxydantes produites par les champignons endophytes.	11
Figure 5. Structure de certaines molécules anticancéreuse produites par les champignons endophytes	13
Figure 6. Structure de certaines molécules antiparasitaires produites par les champignons endophytes	14
Figure 7. Structure de certaines molécules antidiabétiques produites par les champignons endophytes.	16
Figure 8. Structure de certaines molécules anti-inflammatoires produites par les champignons endophytes.....	17
Figure 9. Photographie de la plante <i>Mentha pulegium</i> L..	26
Figure 10. Photographie de la plante <i>Juniperus phoenicea</i> L.	27
Figure 11. Photographie de la plante <i>Cedrus atlantica</i> Man.	28
Figure 12. Photographie de la plante <i>Taxus baccata</i>	29
Figure 13. Sites d'échantillonnage.	33
Figure 14. Les étapes de la micro-dilution en milieu liquide.	44
Figure 15. Schéma représentant la dilution des extraits des champignons endophytes	45
Figure 16. Préparation de la microplaque pour la détermination de la CMF.	46
Figure 17. Les étapes de la cinétique de létalité.	48
Figure 18. Fréquences de colonisation de chaque organe des différentes plantes utilisées.	55
Figure 19. Zones d'inhibition obtenues lors du criblage préliminaire.	59
Figure 20. Morphologie de l'isolat MPR1.	61
Figure 21. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l'analyse des séquences des régions ITS et β -tubuline produit par l'analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences de l'isolat MPR1 et celles des espèces les plus proches répertoriées sur NCBI	62
Figure 22. Morphologie des isolats JPF2(1), JPF3(2) et JPF4(3).	63
Figure 23. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l'analyse des séquences des régions ITS et LSU produit par l'analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences des isolats JPF2, JPF3 et JPF4 et celles des espèces les plus proches appartenant à la famille des Pyronemataceae répertoriées sur NCBI.....	65
Figure 24. Morphologie de l'isolat CAR11.....	66

Figure 25. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l'analyse des séquences des régions ITS et β -tubuline produit par l'analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences de l'isolat CAR11 et celles des espèces les plus proches répertoriées sur NCBI.	67
Figure 26. Morphologie de l'isolat TBT7 (Forme asexuelle).	68
Figure 27. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l'analyse des séquences des régions ITS, β -tubuline, LSU, RPB2 et produit par l'analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences de l'isolat TBT7 et celles des espèces les plus proches répertoriées sur NCBI.	70
Figure 28. Morphologie de l'isolat TBT10..	71
Figure 29. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l'analyse des séquences des régions ITS, β -tubuline, LSU et RPB2 produit par l'analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences de l'isolat TBT10 et celles des espèces les plus proches répertoriées sur NCBI.....	72
Figure 30. Activité antimicrobienne du champignon endophyte MPR1 après croissance sur différents milieux de culture.....	74
Figure 31. Activité antimicrobienne du champignon endophyte JPF2 après croissance sur différents milieux de culture.....	75
Figure 32. Activité antimicrobienne du champignon endophyte CAR11 après croissance sur différents milieux de culture.....	75
Figure 33. Activité antimicrobienne du champignon endophyte TBT7 après croissance sur différents milieux de culture.....	76
Figure 34. Activité antimicrobienne du champignon endophyte TBT10 après croissance sur différents milieux de culture.....	77
Figure 35. Activité antimicrobienne des différents extraits des champignons endophytes après fermentation sur milieu solide et liquide.....	78
Figure 36. Activité antimicrobienne des différents extraits des champignons endophytes après extraction avec trois différents solvants.....	80
Figure 37. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de MPR1 contre les bactéries à Gram positif.	81
Figure 38. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de MPR1 contre les bactéries à Gram négatif.	82
Figure 39. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat MPR1.	82
Figure 40. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de MPR1 contre les dermatophytes.....	83
Figure 41. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat MPR1.....	83
Figure 42. Activité de l'extrait de dichlorométhane de JPF2 contre les bactéries à Gram positif.	84
Figure 43. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait de dichlorométhane de l'isolat JPF2.....	84
Figure 44. Activité de l'extrait de dichlorométhane de JPF2 contre les dermatophytes.	85
Figure 45. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait de dichlorométhane de l'isolat JPF2.....	85
Figure 46. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de TBT7 contre les bactéries à Gram positif.....	86
Figure 47. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de TBT7 contre les dermatophytes.....	86
Figure 48. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat TBT7.....	87
Figure 49. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de TBT10 contre les bactéries à Gram positif.....	87

Figure 50. Zones d'inhibition obtenues avec les extraits d'acétate d'éthyle des isolats TBT7 (E1) et TBT10 (E2)	88
Figure 51. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de TBT10 contre les dermatophytes	88
Figure 52. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat TBT10	88
Figure 53. La cinétique de létalité de l'extrait de MPR1.	94
Figure 54. La cinétique de létalité de l'extrait de JPF2	95
Figure 55. La cinétique de létalité de l'extrait de TBT7.	95
Figure 56. La cinétique de létalité de l'extrait de TBT10.	96
Figure 57. Activité antiradicalaire des extraits fongiques et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH	98
Figure 58. Valeurs des IC ₅₀ des différents extraits fongiques et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH.....	99
Figure 59. Activité antiradicalaire des extraits fongiques et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical ABTS ^{•+}	100
Figure 60. Valeurs des IC ₅₀ des différents extraits fongiques et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical ABTS ^{•+}	101
Figure 61. Le pouvoir réducteur des différents extraits fongiques et de l'acide ascorbique.	102
Figure 62. Effet des extraits de MPR1, TBT10 et JPF2 vis-à-vis de la lignée cellulaire A549.	104
Figure 63. Effet des extraits de MPR1, TBT10 et JPF2 vis-à-vis la lignée cellulaire U251.....	104
Figure 64. Effet des extraits de MPR1, TBT10 et JPF2 vis-à-vis de la lignée cellulaire MDA-MB 231.	105
Figure 65. Effet de l'extrait de TBT7 vis-à-vis de la lignée cellulaire saine HaCaT.	106
Figure 66. Effet de l'extrait de TBT7 vis-à-vis de la lignée cellulaire saine C8-D1A.	106
Figure 67. Production de L-asparaginase par certains isolats fongiques en milieu solide	107
Figure 68. Activité asparaginase des isolats fongiques.	108

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différentes souches bactériennes et fongiques pathogènes utilisées.	31
Tableau 2. Les plantes ainsi que leurs organes utilisés lors de l'isolement.	32
Tableau 3. Liste des régions d'ADN et leurs amorces utilisées lors de l'amplification et du séquençage pour chacun des isolats fongiques.....	38
Tableau 4. Les programmes des cycles thermiques de la PCR pour chaque région de l'ADN	39
Tableau 5. Résultats du criblage préliminaire contre les bactéries pathogènes	57
Tableau 6. Résultats du criblage préliminaire contre les dermatophytes.	58
Tableau 7. Résultats du blast des séquences des différentes régions utilisées pour chaque isolat avec les souches les plus proches.	73
Tableau 8. Les valeurs des CMI et des CMB ($\mu\text{g/mL}$) obtenues par l'extrait d'acétate d'éthyle de MPR1 contre les différentes bactéries pathogènes.....	91
Tableau 9. Les valeurs des CMI et des CMB ($\mu\text{g/mL}$) obtenues par l'extrait de dichlorométhane de JPF2, et ceux d'acétate d'éthyle de TBT7 et TBT10 contre les différentes bactéries pathogènes.....	92
Tableau 10. Les valeurs des CMF ($\mu\text{g/mL}$) obtenues par les extraits des champignons endophytes contre les différents dermatophytes.....	93
Tableau 11. Teneurs des extraits fongiques en polyphénols totaux et en flavonoïdes.....	97
Tableau 12. Les valeurs de CC_{50} des extraits de MPR1, JPF2, TBT7 et TBT10 vis-à-vis de la lignée cellulaire HepG2.	103
Tableau 13. Les valeurs de CC_{50} des extraits de fongiques vis-à-vis des différentes lignées cellulaires.	105
Tableau 14. Indices enzymatiques des isolats fongiques producteurs de L-asparaginase.	108

Liste des abréviations

AA : Acide ascorbique
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ATCC : American Type Culture Collection
CC₅₀ : Concentration cytotoxique à 50%
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB : Concentration Minimale Bactéricide
CMF : Concentration Minimale Fongistatique
CMI: Concentration Minimale Inhibitrice
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO: Diméthylsulfoxyde
FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power
GAs : Acides Gibbérelliques
IC₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50%
ITS: Internal Transcribed Spacer
LSU: Large-subunit
Maldi-Tof MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time of Flight Mass Spectrometry
McDox: Modified Czapek Dox's agar
MEA: Malt Extract Agar
MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7
MHA: Mueller Hinton Agar
MHB: Mueller Hinton Broth
ML: Maximum likelihood
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NCI: National Cancer Institute
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDA: Potato Dextrose Agar
RPB2: RNA polymerase II second largest subunit
rpm: Rotation par minute
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
SD: Standard Déviation
SDA: Sabouraud's Dextrose Agar
SSU: Small-subunit
TBE: Tris/Borate/EDTA
UFC: Unité Formant Colonie
YEA: Yeast Extract Agar
YMEA: Yeast Malt Extract Agar
TBTZ: 2,4,6- Tris (2-pyridyl)-s-triazine
DPPH: 1, 1- diphenyl-2-picryl-hydrazyl
ABTS: Acide 2,2-azino-bis-3-(thylBenzoThiazoline-6-Sulfonique)
MTT: 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales comme toutes les plantes, sont en interaction continue avec différents microorganismes, aussi bien pathogènes que bénéfiques, vivant à la surface de la plante (épiphytes), en interactions avec ces racines (mycorhizes) et même à l'intérieur (endophytes) (Passari *et al.*, 2015). Ces derniers sont des microorganismes endosymbiotiques qui durant tout ou une partie de leur cycle de vie vivent de façon inter et/ou intracellulaire à l'intérieur de leur plante hôte sans lui causer aucun symptôme apparent (Gouda *et al.*, 2016).

Face à plusieurs problèmes dont : (1) La résistance croissante des bactéries pathogènes aux antibiotiques observée dans le monde et récemment en Algérie (Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014). (2) L'émergence des champignons pathogènes résistants au nombre limité d'agents antifongiques couramment utilisés. (3) Les nombreuses maladies dues au stress oxydatif telles que le cancer, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires (Liguori *et al.*, 2018), ainsi que (4) Les cancers et tumeurs multi-résistantes, il est essentiel de perpétuer la recherche de molécules naturelles possédant diverses propriétés.

Dans ce contexte, les champignons endophytes vivant en symbiose avec les plantes et jouant un rôle important dans la protection de ces dernières contre les ravageurs, les virus, les champignons et les bactéries phytopathogènes, ont reçu un énorme intérêt et se sont révélés être une bonne source de molécules naturelles bioactives de divers structures telles que les phénols, les quinolones, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes, les xanthones, etc., possédant un potentiel thérapeutique variés, et pouvant être utilisées dans différentes industries agricoles, médicale, alimentaire, cosmétique, etc. (Gouda *et al.*, 2016).

L'objectif de cette thèse est l'isolement des champignons endophytes à partir de 4 plantes médicinales ayant une histoire ethnobotanique intéressante en Algérie, *Mentha pulegium* L., *Juniperus phoenicea* L., *Cedrus atlantica* Man. et *Taxus baccata*, ainsi que l'étude des activités biologiques potentielles de leurs extraits.

On présentera cette étude en trois chapitres :

Le premier est consacré à une revue bibliographique divisée en deux parties. La première partie mettra en valeur les champignons endophytes ainsi que leurs métabolites secondaires et leurs utilisations dans les divers domaines de la santé, de l'agriculture, des industries et de l'environnement, et la deuxième partie sera consacrée à un bref descriptif des plantes médicinales utilisées dans cette étude.

Dans le second chapitre, le détail des travaux réalisés est abordé en commençant par l'isolement des champignons endophytes, le criblage et la sélection des isolats potentiellement actifs, leur identification morphologique et moléculaire, l'optimisation de certains paramètres, la fermentation et extraction des molécules bioactives, suivie d'une mise en évidence des différentes activités biologiques des extraits fongiques.

Le dernier chapitre est réservé aux résultats obtenus et de leur interprétation.

Revue bibliographique

I.1. Définition des endophytes

La définition des endophytes a été introduite par De Bary's (1866) où il les définissait comme étant tous les organismes colonisant les tissus internes des plantes. Carroll (1986) restreint l'utilisation de ce terme aux organismes causant des infections asymptomatiques au niveau des tissus végétaux en excluant les champignons pathogènes et les mycorhizes.

La définition la plus utilisée maintenant est celle de Petrini (1991) où il a élargi la définition de Carroll et a inclus les organismes endophytes ayant une phase épiphyte ainsi que les agents pathogènes latents pouvant vivre à l'intérieur de leur hôte pendant au moins un certain temps de leur cycle de vie sans causer de symptômes à ce dernier. Ces organismes endophytes englobent aussi bien les bactéries, les archées, les champignons que les protistes; cependant, les champignons sont les plus répandus (Patil *et al.*, 2016; Yan *et al.* 2018).

I.2. Diversité et classification des champignons endophytes

Des estimations récentes basées sur des méthodes de séquençage à haut débit suggèrent qu'il existe 5,1 millions d'espèces fongiques (Blackwell, 2011), incluant au moins un million d'espèces endophytes dont leur relation avec les plantes date depuis plus de 400 millions d'années (Mane *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018). Ces champignons endophytes sont exceptionnellement divers avec une prédominance des Ascomycetes, ils sont ubiquistes, colonisant diverses plantes telles que les mousses, les plantes non vasculaires, les fougères, les conifères et les plantes à fleurs, des plantes qui poussent dans différents écosystèmes, incluant le désert, toundra arctique, mangroves, forêts tempérées et tropicales, prairies et savanes ainsi que les terres cultivées (Yan *et al.*, 2018).

Ces champignons se divisent en deux grands groupes, différents par leurs taxonomie, hôtes, modes de transmission et de colonisation, spécificités tissulaires et leurs fonctions écologiques : les endophytes Clavicipitaceae et les non-Clavicipitaceae, ces deux groupes sont à leur tour divisés en 4 classes (Rodriguez *et al.*, 2009).

Les endophytes Clavicipitaceae (Classe 1) : Inclue un petit nombre de champignons apparentés phylogénétiquement appartenant aux *Ascomycota* et *Hypocreales*, fastidieux en culture, tels que les *Balanica* spp., *Neotyphodium* spp., *Epichloe* spp. et *Claviceps* spp.. Ils se développent de façon systémique à l'intérieur des cellules des graminées et les carex, et se transmettent verticalement à travers les graines (Rodriguez *et al.*, 2009). Selon l'espèce de l'hôte, et des conditions environnementales, ces champignons peuvent conférer à leurs hôtes une augmentation de la biomasse, une tolérance à la sécheresse, et peuvent également

produire des molécules toxiques pour les animaux et les herbivores protégeant ainsi leurs plantes hôtes (Mishra *et al.*, 2014).

Les endophytes non-Clavicipitaceae, un groupe très diversifié phylogénétiquement, appartenant principalement aux ascomycètes. Ils ont été isolés à partir de toutes les plantes étudiées de tous les écosystèmes terrestres allant des tropiques à la toundra. Ils sont divisés en trois classes selon le type de colonisation, le mécanisme de transmission et les avantages conférés à leurs hôtes (Rodriguez *et al.*, 2009).

Classe II : La plupart appartiennent aux *Ascomycota* et une minorité aux *Basidiomycota*. Ils colonisent aussi bien les parties aériennes que les parties au dessous du sol d'une large gamme de plantes hôtes en formant des infections étendues dans les plantes (Hardoim *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2015). Ils colonisent les espaces intracellulaires des plantes via des structures infectieuses telles que les appressoria ou par pénétration directe des tissus de l'hôte via les hyphes, ils peuvent par ailleurs se transmettre verticalement via les graines. Ils permettent la stimulation de croissance de l'hôte en absorbant les nutriments et le protègent contre le stress abiotique (Rodriguez *et al.*, 2009).

Classe III : Ce groupe inclut un ensemble très diversifié d'endophytes appartenant aux *Ascomycota* et *Basidiomycota*, associés exclusivement aux parties aériennes d'une large gamme de plantes hôtes englobant les plantes non vasculaires, vasculaires, les conifères, les angiospermes des régions tropicales, boréales, arctiques et antarctiques. Leur transmission est horizontale avec induction d'une infection localisée et non étendue (Rodriguez *et al.*, 2009; Hardoim *et al.*, 2015). En raison de leur grande diversité, leurs rôles ne sont pas bien définis, on sait cependant qu'ils sont très variés. Il a été montré que ces champignons jouent un rôle dans la protection des arbres de l'orme contre la maladie hollandaise, ainsi que la diminution de la formation de lésions et la mort des feuilles de *Theobroma cacao* causées par *Phytophthora* sp. (Rodriguez *et al.*, 2009).

Classe VI : Les endophytes de ce groupe sont des champignons bruns cloisonnés. Ils appartiennent généralement aux *Ascomycota*, formant des conidies ou stériles, ainsi que des structures (hyphes et les microsclérotés) mélanisées intra et/ou intercellulaires dans les racines de divers plantes hôtes appartenant à des écosystèmes très diversifiés. Ils se transmettent horizontalement (Rodriguez *et al.*, 2009). Selon Mandyam et Jumpponen, (2005) en plus de stimuler la croissance de leurs hôtes, les champignons de ce groupe peuvent aussi les protéger contre les microorganismes pathogènes en diminuant le taux de carbone dans la rhizosphère.

Ils peuvent aussi grâce aux taux élevé de mélanine, produire des métabolites secondaires toxiques pour les herbivores.

I.3. Applications biotechnologiques des champignons endophytes

I.3.1. Application en biomédecine et en pharmaceutique

Les champignons endophytes sont à l'origine d'un grand nombre de métabolites secondaires très variées structurellement, comprenant les terpénoïdes, alcaloïdes, quinones, xanthonnes, peptides, stéroïdes, flavonoïdes et composés phénoliques ainsi que des nanoparticules (Alurappa *et al.*, 2018), ces différentes molécules possèdent des activités biologiques très variées comprenant l'activité antibactérienne, antifongique, antivirale, anticancéreuse, antioxydante, antidiabétique, etc. (Sharma *et al.*, 2019).

I.3.1.1. Les métabolites secondaires

I.3.1.1.1. Molécules antibactériennes

La société américaine de lutte contre les maladies infectieuses reconnaît que la résistance aux antibiotiques est l'une des plus grandes menaces pour la santé humaine dans le monde (van Duin et Paterson, 2016). Parmi les molécules bioactives synthétisées par les champignons endophytes, il existe une très grande diversité de molécules à activité antibactérienne pouvant être utilisés pour palier à ce problème. Dans ce sens, plusieurs études ont été faites permettant l'isolement et l'identification des molécules antibactériennes à partir des champignons endophytes (figure 1), tels que les 5 composés, Dicerandrol A (**1**), Dicerandrol B (**2**), Dicerandrol C (**3**), Deacetylphomoxanthone B (**4**) et Fusaristatin A (**5**) produits par le champignon endophyte *Phomopsis longicolla* S1B4. Toutes ces molécules ont une activité antibactérienne, où le deacetylphomoxanthone B a montré un effet antibactérien contre *Xanthomonas oryzae* KACC10331 plus élevé que celui obtenu par le contrôle positif avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 4 µg/mL. Le dicerandrol A, quant à lui a montré une activité comparable à celle obtenue par le contrôle positif et parfois plus élevée contre *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Bacillus subtilis* KCTC 1021 et *Xanthomona oryzae* KACC 10876 (Chaesung *et al.*, 2010). Un autre métabolite produit aussi bien par le champignon endophyte *Periconia* sp., ainsi que par son hôte *Piper longum* L., la piperine (**6**) a montré une activité contre *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium smegmetis* avec des CMI de 1.74 et 2.62 µg/mL respectivement (Verma *et al.*, 2011).

Bauhinia guianensis, une plante médicinale de l'Amazonie a permis l'isolement de *Aspergillus* sp. EJC08 producteur de Pseurotin A (**7**) et fumigaclavine C (**8**). Ces deux

alcaloïdes ont montré une activité contre *Bacillus subtilis* (15.62 et 7.81 µg/mL) *Escherichia coli* (31.25 et 62.50 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (31.25 µg/mL) et *Staphylococcus aureus* (15.62 µg/mL) (Pinheiro *et al.*, 2012).

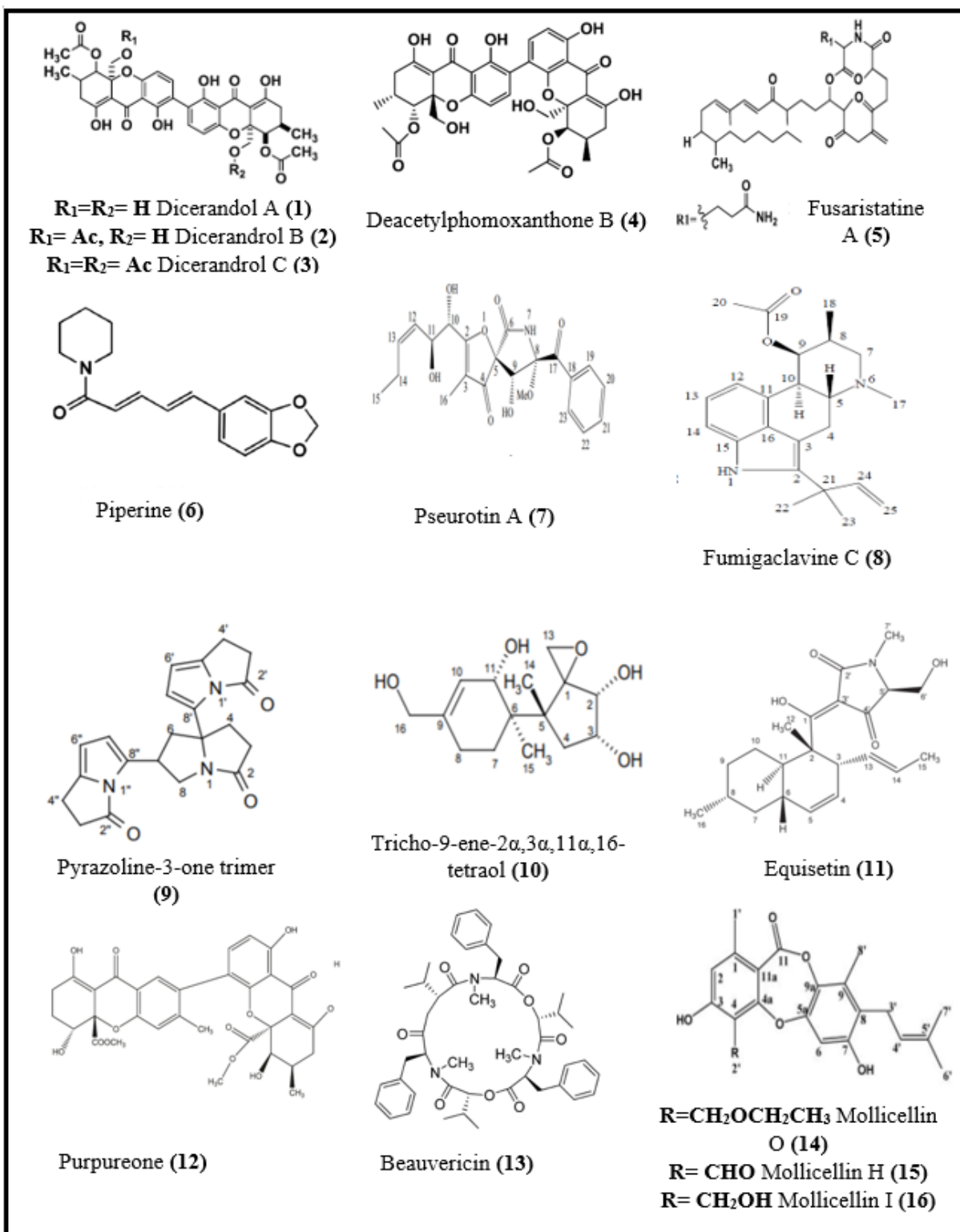


Figure 1. Structure de certaines molécules antibactériennes produites par les champignons endophytes.

Shaaban *et al.*, (2013) ont rapporté l'activité antibactérienne de 10 molécules produites par *Aspergillus fumigatus* R7, un endophyte isolé à partir des feuilles de *Ipomoea batatas*. Les deux composés les plus actifs étaient pyrazoline-3-one trimer (**9**) et Tricho-9-ene-2 α ,3 α ,11 α ,16-tetraol (**10**) avec une activité uniquement contre les bactéries à Gram positif. En 2015, Ratnaweera et ses collaborateurs ont isolé un *Fusarium* sp. à partir de *Opuntia dillenii* produisant de l'equisetin (**11**), un dérivé de l'acide tétramique qui possède une activité contre *Bacillus subtilis* (8 μ g/mL), *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (16 μ g/mL). Un nouveau dérivé d'ergochromone, le Purpureone (**12**) a été identifié parmi les molécules produites par le champignon endophyte *Purpureocillium lilacinum* isolé à partir des racines de *Rauvolfia macrophylla*. Cette molécule a montré une bonne activité contre *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Providencia stuartii* avec des CMI ne dépassant pas les 62.6 μ g/mL (Lenta *et al.*, 2016).

Le champignon endophyte *Epicoccum nigrum* a permis l'isolement et l'identification de la beauvericin (**13**) qui a inhibé d'une façon remarquable *Bacillus cereus* et *Salmonella typhimurium* avec des CMI de 3.12 and 6.25 μ g/mL respectivement (Dzoyem *et al.*, 2017). Récemment, parmi les 7 molécules produites par *Chaetomium* sp. Eef-10, un endophyte isolé à partir des graines de *Eucalyptus exserta*, une nouvelle molécule la mollicellin O (**14**), ainsi que deux connues mollicellin H (**15**) et I (**16**), ont montré une activité contre *Staphylococcus aureus* ainsi que *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (Ouyang *et al.*, 2018).

I.3.1.1.2. Molécules antifongiques

De nombreuses études ont été faites sur les champignons endophytes et leur molécules antifongiques (figure 2) pour essayer de faire face à l'augmentation des infections fongiques retrouvées surtout chez les patients ayant subi des transplantations d'organes, ou étant sous chimiothérapie (Rajamanikyam *et al.*, 2017).

Oliveira et ses *al.*, (2011) ont isolé pour la première fois, le (3R,4R)-3,4-dihydro-4,6-dihydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-isochromene-5-carboxylic acid (**17**), à partir de la culture de *Xylaria* sp., un champignon endophyte de *Piper aduncum*. Cette nouvelle molécule a montré une activité inhibitrice modérée contre *Cladosporium cladosporioides* et *Cladosporium sphaerospermum*.

Un autre nouveau composé phénolique, le 4-(2,4,7-trioxa-bicyclo[4.1.0]heptan-3-yl)phenol (**18**) a été isolé à partir de la culture de *Pestalotiopsis mangiferae*, un champignon endophyte associé aux feuilles de *Mangifera indica* Linn.. Il a montré une puissante activité

contre *Candida albicans* avec une CMI de 0.039 µg/mL (Subban *et al.*, 2013). *Colletotrichum gloeosporioides* un endophyte de *Michelia champaca*, a permis l'isolement de 8 molécules dont une nouvelle, 2-phenylethyl 1H-indol-3-yl-acetate (**19**). Cette dernière a montré une bonne activité contre *Cladosporium cladosporioides* et *Cladosporium sphaerospermum* similaire à celle obtenue avec le contrôle positif (nystatine) (Chapla *et al.*, 2014).

En 2015, Pereira et ses collaborateurs ont montré l'activité antifongique contre *Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus gattii* de deux acides eicosanoïques, le (2S,3R,4R)-(E)-2-amino-3,4-dihydroxy-2 (hydroxyméthyl)-14-oxoeicos 6,12-dienoic acid (**20**) (CMI= 1.3 et 2.5 µg/mL) et le myriocin (**21**) (CMI= 0.5 µg/mL) produits par le champignon endophyte *Mycosphaerella* sp. UFMGCB 2032 associé à *Eugenia bimarginata* DC. Récemment, une nouvelle molécule, l'isoshamixanthone (**22**) ainsi qu'une autre connue l'epiisoshamixanthone (**23**) produites par le champignon endophyte *Aspergillus* sp. ASCLA isolé à partir des feuilles de *Callistemon subulatus*, ont montré une activité inhibitrice contre *Candida albicans* (Kamel *et al.*, 2019).

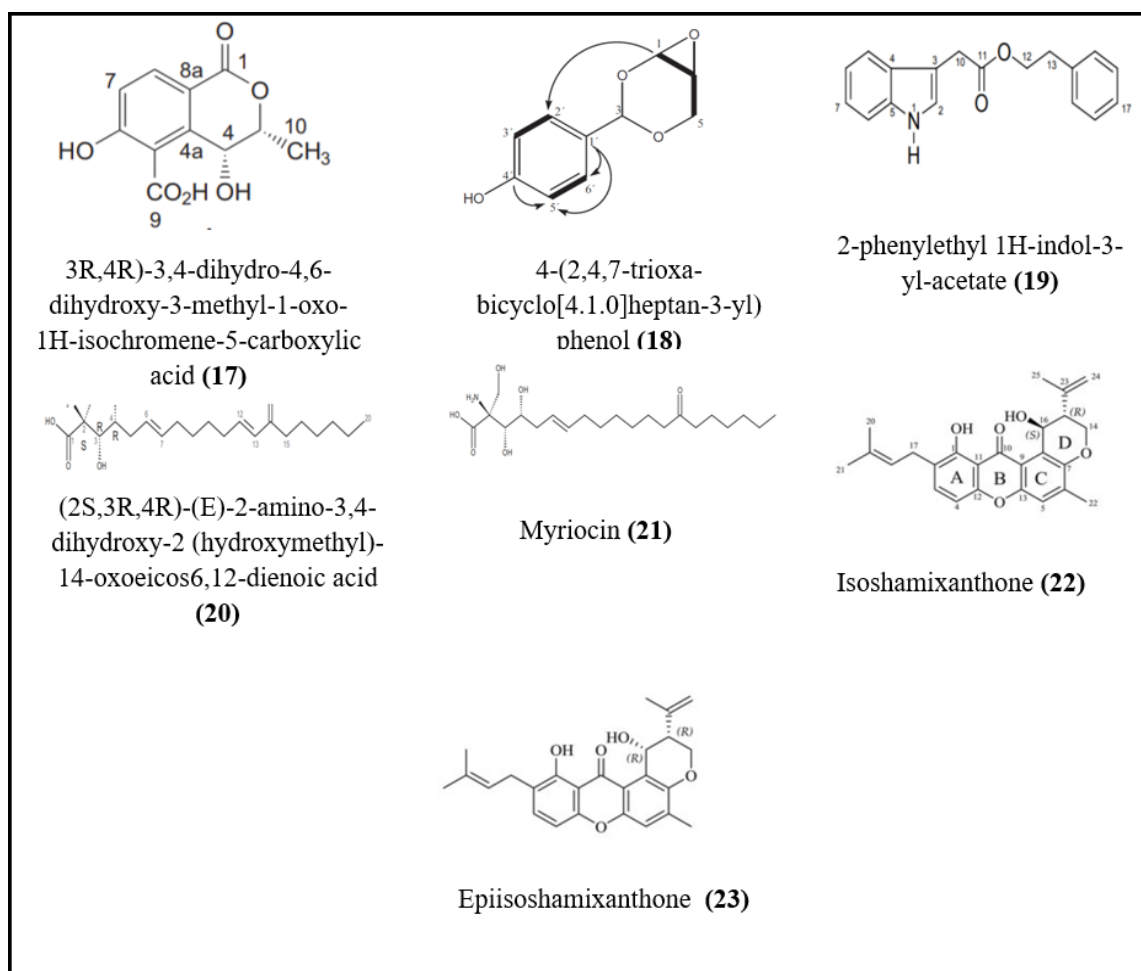


Figure 2. Structure de certaines molécules antifongiques produites par les champignons endophytes.

I.3.1.1.3. Molécules antivirales

La recherche et la découverte des molécules antivirales produites par les champignons endophytes n'est qu'à son début, peu d'études ont été faites sur ce sujet. Cependant, le peu de résultats obtenus est encourageant et prometteur pour la recherche de nouveaux médicaments afin de faire face à l'évolution de divers virus dangereux (Kaul *et al.*, 2012). Parmi ces études, on peut citer celle de Zhang *et al.*, (2011) où ils ont isolé et purifié deux nouvelles molécules, l'emerimidine A (**24**) et B (**25**) à partir de *Emericella* sp. (HK-ZJ) un champignon endophyte isolé à partir de l'écorce de *Aegiceras corniculatum* et testé leur activité sur le virus H1N1, qui s'est révélée modérée avec des valeurs des concentrationc d'inhibition à 50% (IC₅₀) de 42.07 µg/mL et 62.05 µg/mL respectivement.

Une autre étude a permis l'isolement et l'identification d'une nouvelle molécule, versicomarin A (**26**) à partir de *Aspergillus versicolor*, un endophyte associé au rhizome de *Paris marmorata* Stearn. Cette molécule a montré une grande activité contre le virus de la mosaïque du tabac avec un taux d'inhibition de 28.6% proche de celui obtenu avec le contrôle positif (ningnanmycine) qui était de 31.5% (Ye *et al.*, 2014). Pericoannosin A (**27**) et D (**28**), deux nouvelles molécules produites par *Periconia* sp. F-31 un endophyte isolé de *Annona muricata* ont permis l'inhibition du virus de l'immunodéficience humaine avec des IC₅₀ de 69.6 et 29.2 µM (Zhang *et al.*, 2015). *Fagara zanthoxyloides*, a permis l'isolement d'un champignon endophyte *Pestalotiopsis thea* producteur de chloroisosulochrin (**29**), une molécule avec une puissante activité contre le virus respiratoire syncytial avec une IC₅₀ de 4.22 ± 1.03 µM comparable à celle obtenue par le témoin positif, la ribavirine de 4.91 ± 1.85 µM (Uzor *et al.*, 2016). Brefeldin A (**30**) et Brefeldin A 7-O-acetate (**31**) deux nouvelles molécules produites par le champignon endophyte *Penicillium* sp. isolé à partir des racines de *Panax notoginseng* ont montré une forte activité contre le virus de l'hépatite C avec des ID₅₀ de 0.022 et 0.0132 µM respectivement et celui de l'hépatite B avec des ID₅₀ >0.008 et >0.004 µM respectivement (Xie *et al.*, 2017). L'activité antivirale de l'extrait du champignon endophyte *Pleospora tarda* isolé à partir de la plante médicinale *Ephedra aphylla* contre le virus de l'herpès simplex de type 2 et celui de la stomatite vésiculaire a été attribuée aux deux molécules produites par ce champignon, l'alternariol (**32**) et l'alternariol-(9)-methyl ether (**33**) (Selim *et al.*, 2018). Les molécules antivirales présentées ci-dessus sont résumées dans la figure 3.

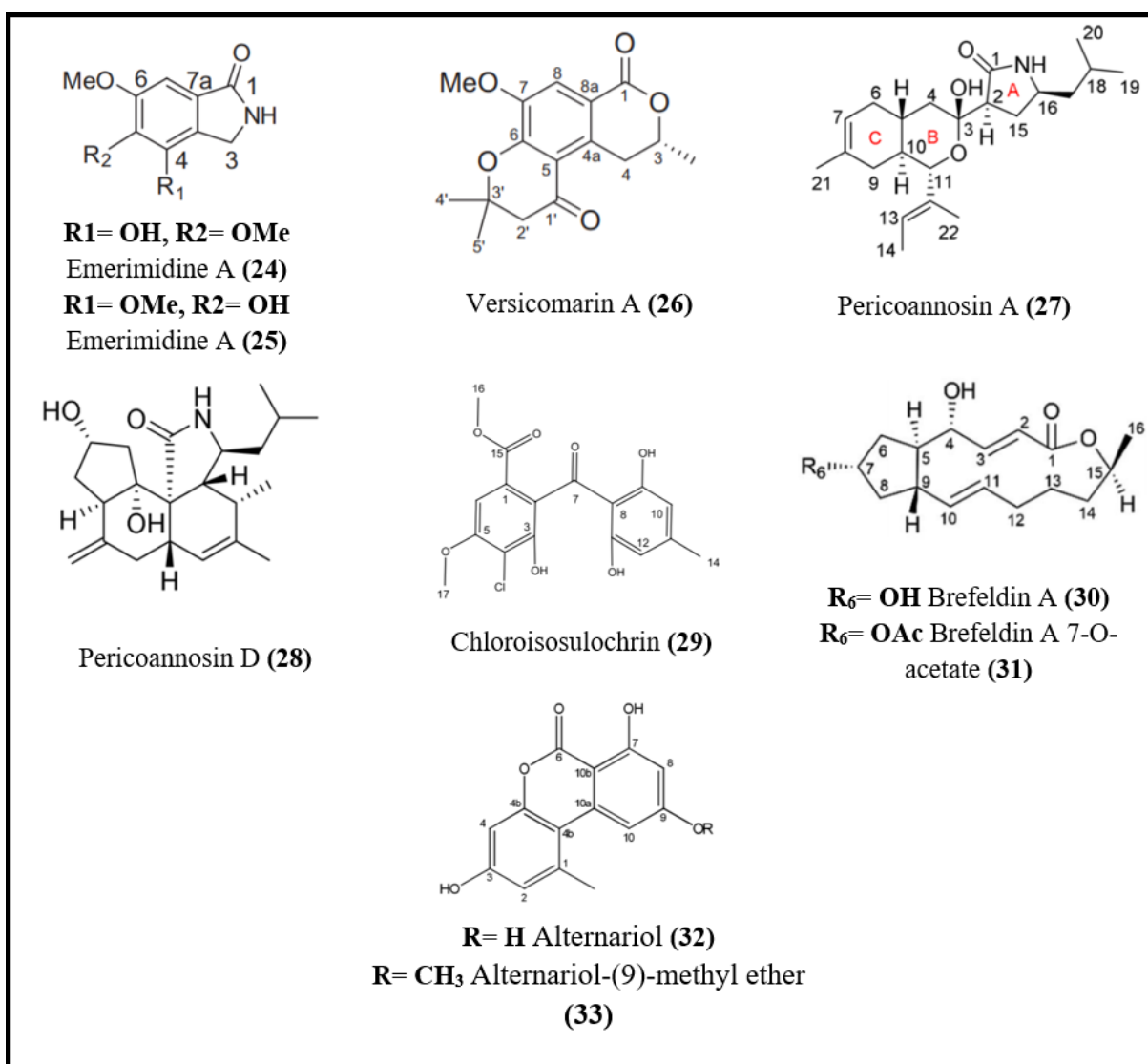


Figure 3. Structure de certaines molécules antivirales produites par les champignons endophytes.

I.3.1.1.4. Molécules antioxydantes

Les antioxydants sont des molécules susceptibles de protéger les cellules contre les radicaux libres, qui sont des molécules instables, responsables de beaucoup de maladies dégénératives (Kaul *et al.*, 2012). Bien que les antioxydants naturels soient généralement extraits à partir des plantes médicinales, des fruits et des légumes, les champignons endophytes représentent une nouvelle source d'antioxydants puissants (Sharma *et al.*, 2019).

Le champignon endophyte *Cephalosporium* sp. AL031 isolé à partir de *Sinarundinaria nitida* a permis l'isolement et l'identification d'un nouveau dérivé d'isobenzofuranone, le 4,6-dihydroxy-5-methoxy-7-methylphthalide (34) (figure 4), ainsi que de 3 composés connus, 4,5,6-trihydroxy-7-methyl-1,3-dihydroisobenzofuran (35), 4,6-dihydroxy-5-methoxy-7-methyl-1,3-dihydroisobenzofuran (36) et 4,5,6-trihydroxy-7-

methylphthalide (**37**), possédant une puissante activité de piégeage des radicaux 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) avec des EC₅₀ de 10, 7, 22 et 5 µM respectivement (Huang *et al.*, 2012). Deux nouveaux dérivés de cyclohexenone et de cyclopentenone, le (±)-(4R*,5S*,6S*)-3-amino-4,5,6-trihydroxy-2-methoxy-5-methyl-2-cyclohexen-1-one (**38**) et le (±)-(4S*,5S*)-2,4,5-trihydroxy-3-methoxy-4-methoxycarbonyl-5-methyl-2-cyclopenten-1-one (**39**) produits par le champignon endophyte *Alternaria* sp. R6 isolé à partir de *Myoporium bontioides* A. possèdent une puissante activité de piégeage de l'Acide 2,2-azino-bis-3-(thylBenzoThiazoline-6-Sulfonique) (ABTS) avec des EC₅₀ de 8.19 ± 0.15 et de 16.09 ± 0.01 µM respectivement (Wang *et al.*, 2015).

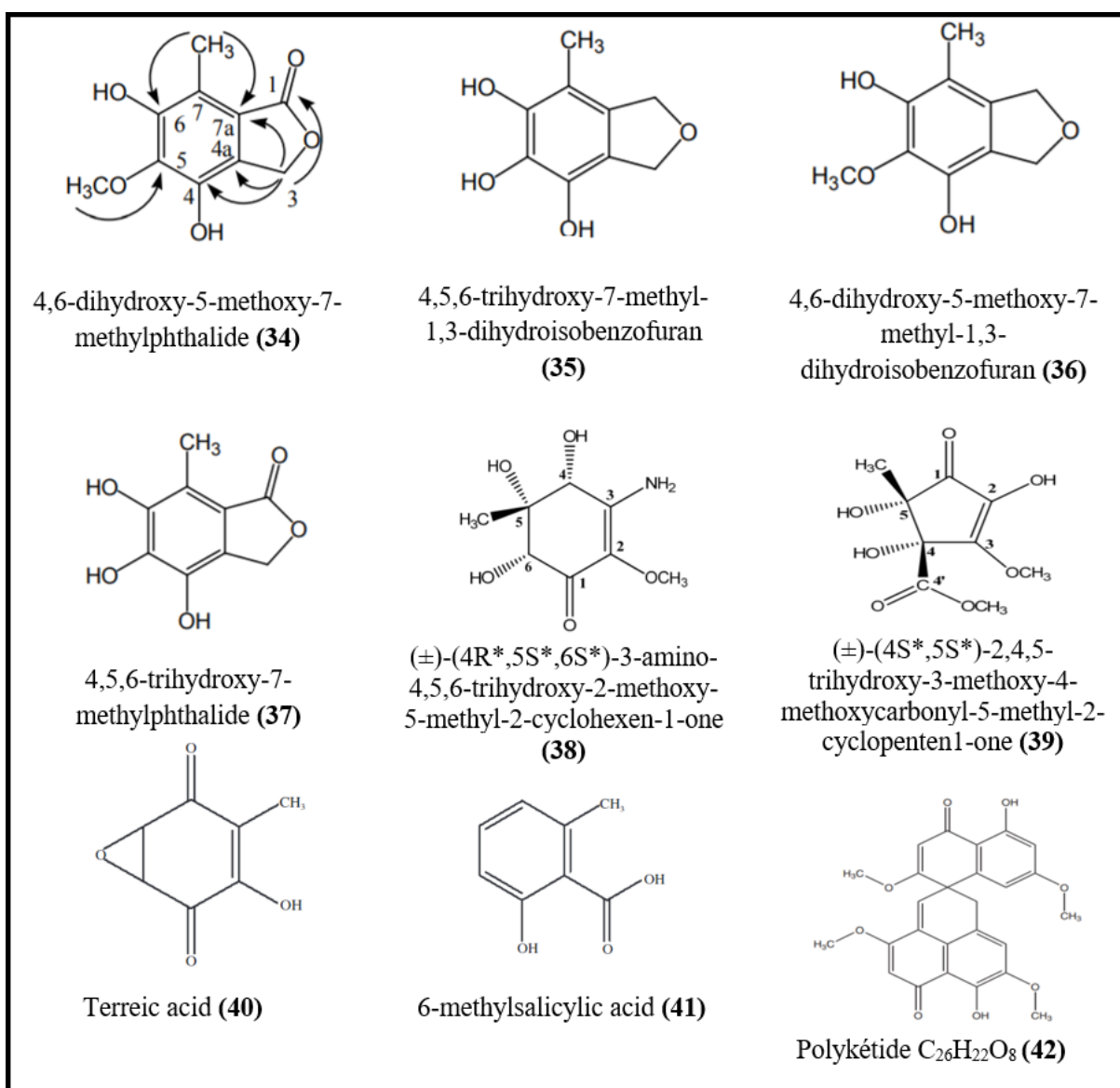


Figure 4. Structure de certaines molécules antioxydantes produites par les champignons endophytes.

Elaeocarpus sylvestris a permis l'isolement du champignon endophyte *Pseudocercospora* sp. ESL 02 qui produit deux molécules avec une bonne activité de piégeage des radicaux DPPH, le terreic acid (**40**) et le 6-methylsalicylic acid (**41**) avec des IC₅₀ de 0.22 ± 0.02 mmol/L et 3.87 ± 0.27 mmol/L respectivement (Prihantini et Tachibana, 2017). Un polykétide C₂₆H₂₂O₈ (**42**) produit par le champignon endophyte *Preussia* sp. isolé à partir du lichen *Canoparmelia* sp. a montré une forte capacité de réduction du DPPH avec une IC₅₀ de 3 µg / mL (Paudel *et al.*, 2018).

I.3.1.1.5. Molécules anticancéreuses

En plus de l'inefficacité de certaines chimiothérapies utilisées contre certains cancers ou des tumeurs multi-résistantes, l'accès limité à ces chimiothérapies anticancéreuses, leurs effets secondaires, ainsi que leur coût élevé, rendent la recherche de nouvelles molécules naturelles intéressant et important. Les champignons endophytes représentent une source de molécules anticancéreuses prometteuse (Kharwar *et al.*, 2011). Pour cela, plusieurs études ont été faites et parmi elles on peut citer les travaux de (Wang, 2012) qui a isolé et identifié trois molécules, l'ergosterol peroxide (**43**) (figure 5), cyclo-(Tyr-Leu) (**44**) et cyclo-(Phe-Pro) (**45**) produites par le champignon endophyte *Guignardia* sp. associé aux feuilles de *Undaria pinnatifida*. Ces molécules ont montré une activité contre la lignée cellulaire KB de la tumeur épidermoïde nasopharyngée humaine avec des IC₅₀ de 20, 10 et 10 µg/mL respectivement. Naphthoquinone antibiotique herbarin (**46**) produit par *Dendryphion nanum*, un champignon endophyte isolé à partir des feuilles de *Ficus religiosa* a présenté une puissante inhibition de la production des cytokines TNF-α et IL-6 de la lignée cellulaire mononucléées humaine (THP-1) avec une IC₅₀ de 0,60 ± 0,100 µM et de 0,06 ± 0,009 µM, respectivement (Mishra *et al.*, 2013).

Une nouvelle molécule, myrotheciumone A (**47**) a été isolée et identifiée à partir de *Myrothecium roridum*, un champignon endophyte associé à *Ajuga decumbens*, elle possède une forte cytotoxicité vis-à-vis de différentes lignées cellulaires, HepG2 (IC₅₀ = 5.36 ± 0.26 µM), SMMC-7721 (IC₅₀ = 6.56 ± 0.58 µM), A549 (IC₅₀ = 5.88 ± 0.68 µM), MCF-7 (IC₅₀ = 7.56 ± 0.76 µM), QSG-7701 (IC₅₀ = 16.30 ± 0.31 µM) et HL-7702 (IC₅₀ = 20.69 ± 4.69 µM) (Lin *et al.*, 2014).

Arora *et al.* (2016) ont montré la capacité cytotoxique d'une nouvelle molécule xylarione A (**48**) ainsi qu'une autre connue (-) 5-methylmellein (**49**) produites par le champignon endophyte *Xylaria psidii* isolé à partir des feuilles de la plante médicinale *Aegle marmelos* contre la lignée cellulaire du cancer du pancréas (MIA-PA-Ca-2) avec des IC₅₀ de

16 et 19 μM respectivement. Récemment, en 2018 Sharma et ses collaborateurs ont isolé et identifié une nouvelle molécule, jammosporin A (**50**) à partir du champignon endophyte *Rosellinia sanctae-cruciana* associé aux feuilles de la plante médicinale *Albizia lebeck*. Cette molécule possède une bonne cytotoxicité par rapport à la lignée cellulaire de la leucémie humaine (MOLT-4) avec une IC_{50} de 20 μM .

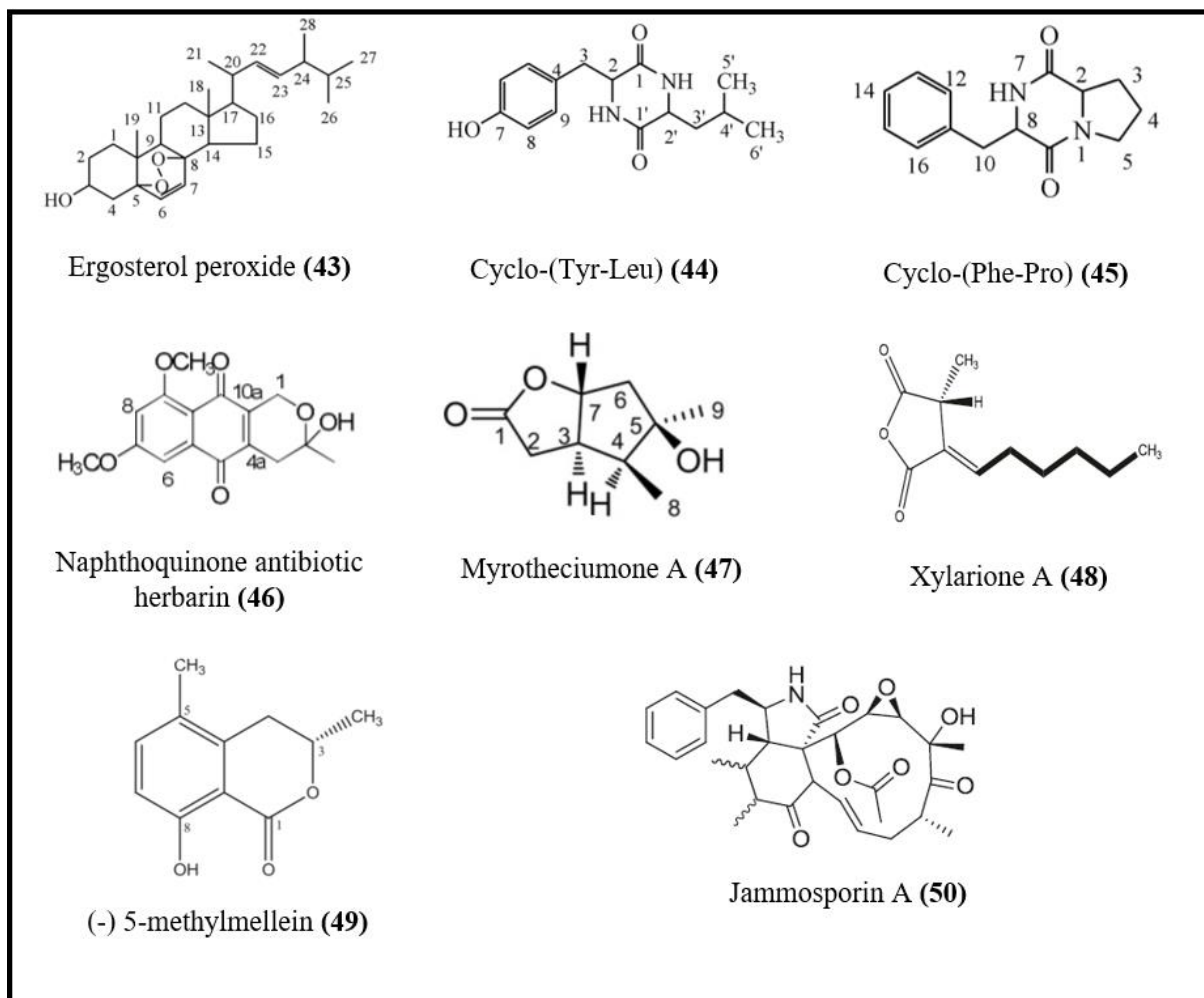


Figure 5. Structure de certaines molécules anticancéreuses produites par les champignons endophytes.

I.3.1.1.6. Molécules antiparasitaires

Selon Martínez-luis *et al.*, (2012a), 25% de la population humaine est infectée par des vers parasites, dont la résistance aux médicaments ne fait qu'augmenter, avec des traitements pour la plupart toxiques et peu efficaces. D'un autre côté, la complexité de leur organisation multicellulaire, leur développement en plusieurs étapes, et leur impressionnante variabilité antigénique posent des problèmes au développement des vaccins antiparasitaires, il est donc urgent de rechercher de nouveaux médicaments à partir de nouvelles sources naturelles, telles que les champignons endophytes. Ces derniers se sont révélés être la source de plusieurs

molécules antiparasitaires efficaces (figure 6) ; on citera à ce propos : le nouveau sesquiterpène, le phomoarcherin B (**51**) isolé et identifié à partir du champignon endophyte *Phomopsis archeri* des tiges de *Vanilla albidia*, cette molécule a montré une bonne activité contre le parasite *Plasmodium falciparum*, l'agent responsable de la malaria avec une IC₅₀ de 0.79 µg/mL (Hemtasin *et al.*, 2011). *Aspergillus* sp. F1544 isolé à partir des feuilles de *Guapira standleyana* produit cinq molécules, pseurotin A (**52**), 14-norpseurotin A (**53**), FD-838 (**54**), pseurotin D (**55**) et fumoquinone B (**56**), toutes possèdent une bonne activité contre *Leishmania donovani* responsable de la leishmaniose avec des IC₅₀ de 5.8, 4.4, 0.2, 0.5 et 0.5 µg/mL respectivement (Martínez-Luis *et al.*, 2012b).

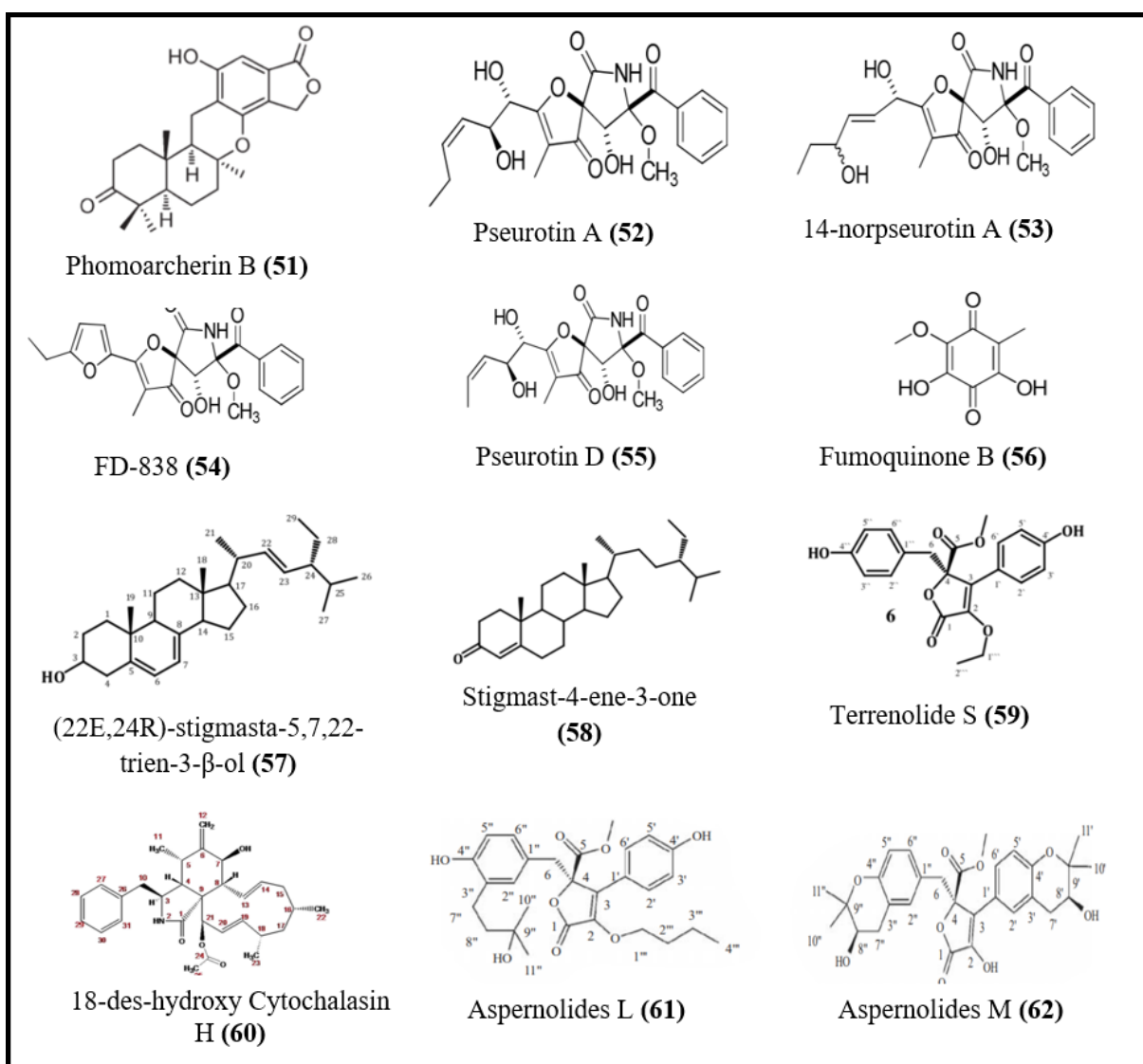


Figure 6. Structure de certaines molécules antiparasitaires produites par les champignons endophytes.

(22E,24R)-stigmasta-5,7,22-trien-3-β-ol (**57**), stigmast-4-ene-3-one (**58**) et un nouveau dérivé de buténolide, le terrenolide S (**59**), produits par *Aspergillus terreus*, un champignon

endophyte associé aux racines de *Carthamus lanatus* ont montré une activité antiparasitaire contre *Leishmania donovani* avec des IC₅₀ de 11.24, 15.32 et 27.27 µM respectivement (Elkhayat *et al.*, 2016). En 2017, Brissow et ses collaborateurs ont montré l'activité du 18-des-hydroxy Cytochalasin H (**60**) produit par *Diaporthe phaseolorum-92C* endophyte des racines de *Combretum lanceolatum* led, où une concentration de 50 µg/mL a tué 50% des vers adultes de *Schistosoma mansoni*. Une réduction de la viabilité des promastigotes de *Leishmania amazonenses* (IC₅₀= 9,2 µg / mL) a aussi été observée. Aspernolides L (**61**) et M (**62**), deux molécules produites par *Aspergillus versicolor* isolé à partir de *Pulicaria crispa* ont montré une activité contre *Leishmania donovani* avec des IC₅₀ de 2.31 et 3.47 mM, et des IC₉₀ de 5.67 et 3.89 mM respectivement (Ibrahim et Asfour, 2018).

I.3.1.1.7. Molécules antidiabétiques

Selon Rivera-Chávez *et al.*, (2015), le diabète est un problème de santé croissant et considérable dans le monde, la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'α-glucosidase utilisé dans le traitement du diabète du type II est très importante. Plusieurs inhibiteurs de cette enzyme ont été obtenus à partir des champignons endophytes (figure 7), Huang *et al.*, (2011) ont montré l'activité inhibitrice de cette enzyme de deux nouveaux p-terphényles, le 6'-O-desmethylterphenyllin (**63**), 3-hydroxy-6'-O-desmethylterphenyllin (**64**), ainsi que d'un autre p-terphényles connu qui est le 3,3''-dihydroxy-6'-O-desmethylterphenyllin (**65**) produits par *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2), un champignon endophyte isolé à partir des racines de *Kandelia candel*. Ces trois molécules inhibaient fortement l'α-glucosidase avec des IC₅₀ de 0.9, 4.9 et 2.5 µM respectivement, plus basses que celle obtenue avec le contrôle positif (la génistéine (9.8 µM)).

6-demethylpenisimplicissin (**66**) et 2''-epihydroxydihydrovermistatin (**67**), deux nouvelles molécules produites par *Penicillium* sp. HN29-3B1 un champignon endophyte associé à *Cerbera manghas*, qui inhibent l'α-glucosidase avec des IC₅₀ de 9.5 ± 1.2 et 8.0 ± 1.5 µM respectivement (Liu *et al.*, 2014). Trois molécules (S)-(+)-2-cis-4-trans-abscisic acid (**68**), 7'-hydroxy-abscisic acid (**69**) et 4-des-hydroxyl altersolanol A (**70**) isolées à partir de *Nigrospora oryzae*, un champignon endophyte associé à *Combretum dolichopetalum* ont permis la réduction de la glycémie à jeun des souris de 46.37%, 44.96% et 43.70% après 3 h, 9 h et 9 h de traitement respectivement (Uzor *et al.*, 2017).

Récemment Wu *et al.*, (2018) ont isolé un autre champignon endophyte *Aspergillus flavus* QQSG-3 à partir de *Kandelia obobata*, producteur de deux nouveaux sesquiterpenoids C₂₂H₂₈O₃ (**71**) et C₃₀H₄₆O₅ (**72**) ainsi que de peniciaculin A (**73**) et expansol D (**74**). L'activité

inhibitrice de l' α -glucosidase de ces quatre molécules était haute avec des IC₅₀ de 4.5, 3.1, 1.5 et 2.3 μ M respectivement.

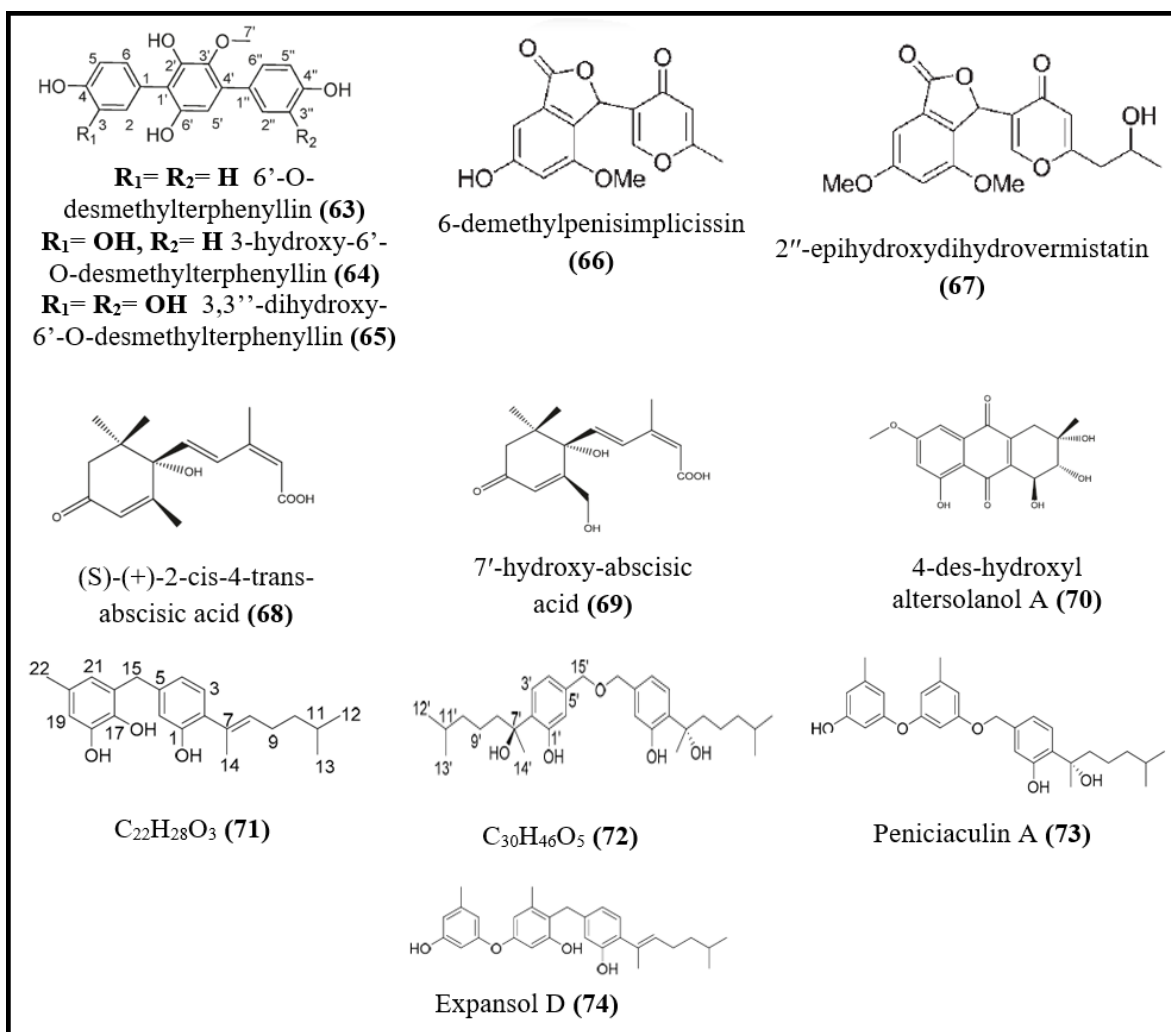


Figure 7. Structure de certaines molécules antidiabétiques produites par les champignons endophytes.

I.3.1.1.8. Molécules anti-inflammatoires

Les champignons endophytes peuvent également être la source de molécules anti-inflammatoires naturelles, plusieurs études ont été faites dans ce sens-là (figure 8).

Ju *et al.*, (2016) ont extrait et identifié une nouvelle molécule, botryosphaerin B (**75**) à partir de *Botryosphaeria* sp. SCSIO KcF6 un champignon endophyte associé à la partie interne des fruits de *kandelia candel*. Cette molécule a montré une activité inhibitrice de l'enzyme cyclo-oxygénase 2 avec une IC₅₀ de 1.12 μ M.

L'algue rouge marine *Pterocladia capillacea* a permis l'isolement d'un champignon endophyte *Phoma* sp. NTOU4195, producteur d'un nouveau polykétide, le phomaketide C (**76**) qui inhibe la production induite par le lipopolysaccharide de l'oxyde nitrique dans les

macrophages RAW 264.7 avec une IC_{50} de $8.8 \mu M$ (Lee *et al.*, 2016). L'inhibition de la production de l'oxyde nitrique dans les macrophages RAW 264.7 induite par le lipopolysaccharide a été également observée avec l'amestolkolide B (77) produit par *Talaromyces amestolkiae* YX un champignon endophyte de *Kandelia obovata*, par contre cette molécule a été plus efficace avec une IC_{50} de $1.6 \pm 0.1 \mu M$ (Chen *et al.*, 2018).

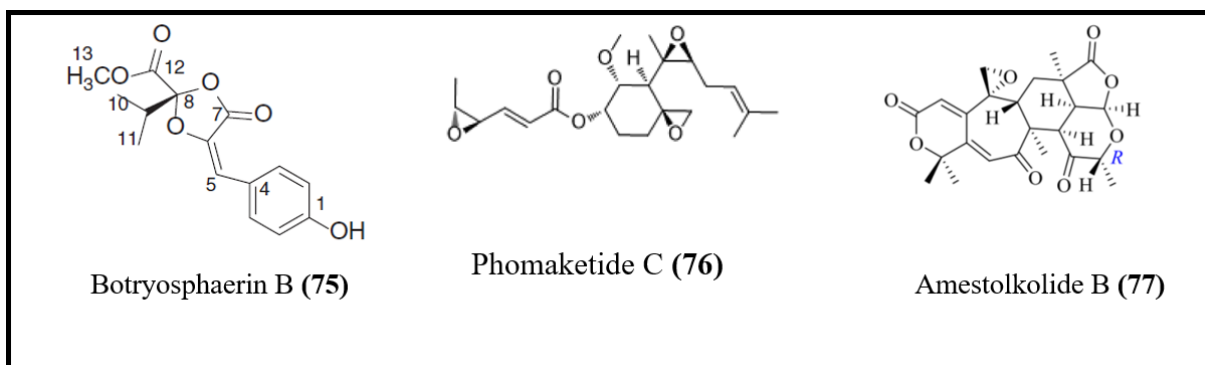


Figure 8. Structure de certaines molécules anti-inflammatoires produites par les champignons endophytes.

I.3.1.2. Nanoparticules

Le mot 'nano' dérive du mot grecque 'nanos' qui signifie nain ou extrêmement petit, on parle dans ce cas de milliardième de mètre. La nanotechnologie permet la synthèse, la conception et la manipulation d'éléments de petite taille allant de 1 à 100 nm. Ces nanoparticules sont synthétisées en utilisant différentes méthodes telles que la méthode chimique, physique ou biologique, cette dernière méthode contrairement aux deux premières est simple, rapide, rentable, respecte l'environnement, et permet la production de nanoparticules non toxiques (Netala *et al.*, 2016; Rahman *et al.*, 2019).

Les champignons endophytes sont capables de synthétiser des nanoparticules de différentes tailles, possédant différentes activités biologiques, telles que : les nanoparticules d'argent (1-15 nm) synthétisées par le champignon endophyte *Epicoccum nigrum* isolé à partir de *Phellodendron amurense* qui ont inhibé tous les champignons pathogènes utilisés avec des CMI allant de 0.125 à 1 $\mu g/mL$ (Qian *et al.*, 2013). Un autre champignon, *Pencillium* sp. isolé à partir des feuilles de *Curcuma longa* produits des nanoparticules d'un diamètre de 25 nm, ces dernières et à une concentration de 80 μL ont inhibé *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 21 mm; *Klebsiella pneumoniae* (15 mm); *Salmonella typhimurium* et *Enterobacter aerogenes* (14 mm) et *Escherichia coli* (13 mm) (Singh *et al.*, 2013).

Des nanoparticules d'argent d'une taille de 2 à 10 nm sont produites par *Pestalotiopsis microspora* VJ1/VS1, un champignon endophyte associé aux feuilles de *Gymnema sylvestris* ont montré une activité de piégeage des radicaux DPPH avec des IC₅₀ de 76.95±2.96 µg/mL, en plus d'une cytotoxicité contre les cellules A549 (adénocarcinome du poumon humain, IC₅₀ de 39.83±3.74 µg/mL) et PC3 (cancer de la prostate humaine, IC₅₀ de 27.71±2.89 µg/mL) (Netala *et al.*, 2016).

I.3.2. Application en industrie agricole

I.3.2.1. Résistance aux stress biotiques

I.3.2.1.1. Résistance aux microorganismes phytopathogènes

De nombreux champignons endophytes produisent des molécules antimicrobiennes, inhibant les microorganismes phytopathogènes et protégeant leurs plantes hôtes contre ces derniers, tels que, la Cytochalasin H et J produites par deux isolats de *Diaporthe miricariae* associés aux deux plantes médicinales tropicales, *Copaifera pubiflora* et *Melocactus ernestii* qui ont montré une activité antifongique contre 7 champignons phytopathogènes, avec une inhibition de la croissance de *Phomopsis obscurans* et de *Phomopsis viticola* de 73% et 61% (Cytochalasin H) et de 36% et 58% (Cytochalasin J) en utilisant une concentration de 300 µM (Carvalho *et al.*, 2018). Goutam *et al.*, (2017) ont testé l'activité antifongique de 4,5-Dihydroxy-3-(1-propenyl)-2-cyclopenten-1-one, une molécule produite par *Aspergillus terreus* JAS-2, un endophyte isolé à partir de *Achyranthus aspera*. Cette molécule réduisait de 52.5% le diamètre de croissance de *Aspergillus flavus*, et de 91.25% celui de *Alternaria alternata* à une concentration de 10 µg/µL, par contre la réduction du diamètre de *Phytophthora drechsleri* était de 100% en utilisant 1 µg/µL. *Penicillium janczewskii*, un champignon endophyte isolé à partir du phloème de *Prumnopitys andina* synthétise la Pseurotin A et cycloaspeptide A des molécules avec une activité antibactérienne modérée observée contre deux bactéries phytopathogènes, *Erwinia carotovora* et *Pseudomonas syringae* avec des IC₅₀ de 220 and 112 µg/ mL (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2008). L'activité antibactérienne et antifongique de (4S, 5S, 6S)-5, 6-epoxy-4-hydroxy-3-methoxy-5-methylcyclohex-2-en-1-one produit par le champignon endophyte *Amphirosellinia nigrospora* JS-1675 isolé à partir des tiges de *Pteris cretica* a été testé contre 14 bactéries et 9 champignons phytopathogènes. Cette molécule a montré une activité contre 13 des bactéries testées avec la plus forte activité observée contre *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, l'agent causal du mildiou bactérien du riz avec une CMI de 31.2 µg/mL, et une activité antifongique contre 7 des 9 champignons testés avec la plus forte activité observée contre *Magnaporthe oryzae* responsable du souffle du riz avec une CMI de 125 µg/mL (Nguyen *et al.*, 2019).

L'infection et la réplication du virus de la mosaïque du tabac a été fortement inhibé par la Malformin A1, une molécule produite par le champignon endophyte *Aspergillus tubingensis* FJBJ11 associé à *Brucea javanica* (L.) Merr. Avec des IC₅₀ de 19,7 et 45,4 µg /mL respectivement (Tan *et al.*, 2015).

Certains champignons endophytes utilisent un autre mécanisme pour résister aux microorganismes phytopathogènes, qui est l'induction de la synthèse des métabolites secondaires et immunologiques par leurs plantes hôtes afin d'augmenter leur tolérance aux microorganismes phytopathogènes. C'est le cas des champignons endophytes *Fusarium* sp. I et *Fusarium* sp. II, qui après leur inoculation dans la plante *Euphorbia pekinensis*, Gao *et al.*, (2011) ont observé que le taux de terpénoïdes dans la plante a augmenté, ainsi que sa biomasse. Siddaiah *et al.*, (2017) ont montré que le traitement des semences par *Trichoderma hamatum* UoM 13 isolé à partir des racines de *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., a entraîné une immunité systémique et durable contre le mildiou du mil, aussi bien dans des conditions de serre qu'au champ. Cette immunité a été expliquée par une surexpression significative de l'acide salicylique endogène, des enzymes de défense importantes, des protéines de pathogénèse et des glycoprotéines riches en hydroxyproline induite par le champignon endophyte.

La compétition pour l'espace entre le champignon endophyte et le microorganisme phytopathogène est un autre mécanisme de résistance utilisé par les champignons endophytes. Cependant, il n'est pas utilisé seul, étant donné que l'effet de la compétition ne se fait que localement, c'est le cas du champignon endophyte *Heteroconium chaetospora* BC2HB1 dont la colonisation des racines de *Brassica napus* L. était négativement corrélée avec les symptômes de la maladie en présence d'une faible concentration de *Plasmodiophora brassicae* ; par contre, en augmentant la concentration du pathogène, l'effet se réduisait. D'un autre côté, il a été démontré que ce champignon endophyte était impliqué dans la régulation d'une résistance induite chez la plante afin de combattre efficacement *Plasmodiophora brassicae* (Lahlali *et al.*, 2014).

Les champignons endophytes utilisent également le mycoparasitisme pour protéger leurs plantes hôtes contre les microorganismes phytopathogènes. Selon Latz *et al.*, (2018) le mycoparasite obtient directement des éléments nutritifs d'un autre champignon, le parasite peut ne pas tuer l'autre champignon et se nourrit de ses cellules, comme il peut aussi le tuer pour se nourrir des cellules mortes. Afin de libérer les nutriments, le parasite peut produire des enzymes dégradant les parois cellulaires, des antibiotiques et des toxines ou bien enrôle

ces hyphes autour de celles du parasite et il peut même pénétrer à l'intérieur du parasite (Gao *et al.*, 2010). *Talaromyces pinophilus* utilise le mycoparasitisme contre *Botrytis cinerea*, l'agent pathogène de la flétrissure et de la brûlure d'ombelle des semences d'oignons, ces hyphes se développaient et s'enroulaient autour de ceux de *Botrytis cinerea*, avec une désintégration de la paroi cellulaire observée au niveau du site de pénétration. La microscopie électronique en transmission a montré que la pénétration des hyphes de l'endophyte provoquait une désorganisation cytoplasmique distincte. Ce champignon endophyte produisait également des enzymes dégradant la paroi cellulaire telles que la chitinase, la lipase et la protéase impliquées dans le mycoparasitisme (Abdel-Rahim et Abo-Elyousr, 2018).

I.3.2.1.2. Résistances aux herbivores

Les champignons endophytes protègent leurs plantes hôtes des herbivores en produisant des substances toxiques pour ces derniers comme les alcaloïdes. Ceci a été montré par exemple par Shrivastava *et al.*, (2015) avec le champignon endophyte *Beauveria bassiana* qui, en l'inoculant dans les plants de tomate les concentrations des cinq terpénoïdes, présents aussi dans les plants de tomate contrôles, avaient augmenté de 1 à 3 fois. Ils ont aussi détecté la production d'un nouveau monoterpène, le myrcène, qui n'était pas produit par les plants de tomates contrôles. Les plants contrôles et ceux inoculés avec l'endophyte ont été donnés comme nourriture à *Spodoptera exigua* Hübner, le légionnaire de la betterave pour voir la différence, et il s'est avéré que les larves nourries avec des plants de tomates inoculés par le champignon endophyte ont gagné beaucoup moins de poids que celles nourries avec des plants témoins non inoculés, ceci a été attribué en partie à la différence de niveaux de terpénoïdes entre les deux plants.

D'autres champignons endophytes ont la capacité de moduler les phytohormones en utilisant la voie de l'acide salicylique qui influe sur la défense de la plante contre les pathogènes biotrophiques et quelques insectes suceurs de sève, ainsi que celle de l'acide jasmonique qui influe quand elle sur la défense de la plante contre les pathogènes nécrotrophiques et herbivores, comme cela a été décrit par (Waqas *et al.*, 2015) où les deux champignons endophytes *Penicillium citrinum* LWL4 et *Aspergillus terreus* LWL5 procurent aux tiges de *Helianthus annuus* L. une résistance à *Sclerotium rolfsii* en régulant les réseaux de signalisation hormonale impliqués dans la défense de la plantes.

I.3.2.2. Résistance aux stress abiotiques

Les stress abiotiques ont un impact négatif aussi bien sur la morphologie que sur la physiologie des plantes, ce qui endommage la régulation génétique des voies cellulaires

entraînant une accumulation d'espèce réactives de l'oxygène, un dysfonctionnement de la membrane et un déséquilibre hormonal (Yan *et al.*, 2019). L'augmentation de la résistance des plantes hôtes aux divers stress abiotiques est l'un des avantages les plus importants dans la relation symbiotique liant les champignons endophytes et leurs hôtes (Yan *et al.*, 2018).

Selon l'endophyte, cette tolérance aux stress abiotiques se fait par plusieurs mécanismes comprenant l'induction et l'expression des gènes sensibles aux stress, la génération de molécules de piégeage comme les espèces réactives de l'oxygène et la synthèse de métabolites antistress (Govindasamy *et al.*, 2018; Khare *et al.*, 2018). *Piriformospora indica* protège les plantes de maïs contre la sécheresse en régulant positivement aussi bien l'activité antioxydante des catalases et des superoxyde dismutases, que les gènes liés à la sécheresse, DREB2A, CBL1, ANAC072 et RD29A. La teneur en proline a également augmenté. Cependant, l'accumulation de malondialdéhyde indicateur des dommages de la membrane a diminué dans les plantes colonisées par le champignon endophyte (Xu *et al.*, 2017).

Les champignons endophytes peuvent aussi réguler les activités physiologiques de leurs plantes hôtes contre le stress abiotique en libérant et/ou en renforçant la capacité de leurs hôtes à produire des phytohormones. Ces dernières servent de composés de signalisation lors des stress et réagissent différemment; l'indole acide 3-acétique est connue pour contrôler la croissance des racines en présence de stress de salinité, inhiber la production de H₂O₂ et favoriser la croissance globale des plantes (Gul Jan *et al.*, 2019), L'acide abscissique régule la fermeture des stomates afin de minimiser la perte de l'eau lors du stress hydrique, la croissance des plantes et leur développement dans des conditions stressantes, l'acide salicylique contrôle la croissance, le développement, l'induction florale, la réponse stomatique, la synthèse d'éthylène et la respiration des plantes. De même, on sait que l'acide jasmonique joue un rôle dans la biosynthèse de métabolites et de protéines secondaires défensifs (Ismail *et al.*, 2018).

I.3.2.3. Stimulation de la croissance des plantes

Les champignons endophytes peuvent améliorer la croissance de leurs hôtes soit par des mécanismes directs (absorption et assimilation de certains éléments nutritifs tels que le phosphate, le nitrogène, la production de sidérophores et de phytohormones), soit par des mécanismes indirects (par contrôle des phytopathogènes précédemment décrit dans la partie I.3.2.1.1. Résistance aux microorganismes phytopathogènes) (Patle *et al.*, 2018).

I.3.2.3.1. Mécanismes directs

Le phosphore est l'un des principaux macronutriments nécessaires à la croissance et au développement des plantes. Cependant, même s'il est présent en abondance dans les sols, sa forme soluble se trouve en faible quantité (Yadav et Yadav, 2017). Certains champignons endophytes ont la capacité de solubiliser du phosphore inorganique insoluble pour le rendre disponible aux plantes, tels que *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177) isolé à partir des racines latérales de *Lens esculenta* Moench (Rinu *et al.*, 2014). La fixation du nitrogène est un autre mécanisme utilisé par les champignons endophytes afin de stimuler la croissance de leurs plantes hôtes. Adnan *et al.*, (2018) ont montré que les plantes du piment inoculées par *Xylaria regalis*, endophyte de *Thuja plicata*, possèdent une teneur en chlorophylle, nitrogène et phosphore plus grande que celles observées chez les plantes contrôles dont la longueur des pousses et des racines n'était pas aussi grande que celle des plantes inoculées.

De nombreux champignons endophytes synthétisent des agents chélateurs du fer, les sidérophores, permettant la solubilisation du fer du sol afin d'augmenter sa disponibilité dans les environs immédiats des racines de leurs plantes hôtes (Kajula *et al.*, 2010). Parmi ces endophytes, on peut citer, *Phialocephala fortinii* endophyte des racines de *Pinus sylvestris* (Bartholdy *et al.*, 2001), 7 champignons endophytes isolés à partir des racines de tomate (Chada *et al.*, 2015) et *Acremonium sclerotigenum* isolé à partir de *Terminalia bellerica* roxb.(Prathyusha *et al.*, 2015).

Les champignons endophytes, surtout ceux des racines, sont connus également pour leur pouvoir de produire une variété d'hormones de croissance et peuvent même induire la synthèse de ces phytohormones par la plante hôte. Parmi ces hormones, on peut citer, l'indole acide 3-acétique, qui augmente la croissance de racines améliorant ainsi la disponibilité des nutriments en occupant de vastes zones de sol fertile permettant ainsi à la plante hôte d'augmenter sa production de biomasse et de se protéger des maladies (Khan *et al.*, 2015). Plusieurs champignons endophytes ont montré un pouvoir de production de l'IAA, tels que *Fusarium tricinctum* RSF-4L et *Alternaria alternata* RSF-6L, isolés à partir des feuilles de *Solanum nigrum* où l'analyse de leurs filtrats qui ont permis la stimulation de croissance des plants de riz a révélée la présence de 54 et 30 µg/mL de IAA respectivement (Khan *et al.*, 2015). Deux isolats de l'espèce *Fusarium oxysporum* isolés à partir de *Phyllanthus niruri* Linn. avaient montrer une production de l'IAA avec des concentrations de 23,52 µg / mL et de 5,95 µg / mL (Junaidi et Bolhassan, 2017). Waqas *et al.*, (2014) ont montré que les filtrats des champignons endophytes, *Phoma glomerata* LWL2 et *Penicillium sp.* LWL3 contenaient

aussi bien l'IAA que les acides gibbérelliques (GAs) (GA₁, GA₃, GA₄ et GA₇) à différentes concentrations. Les GAs jouent un rôle essentiel dans les processus de croissance et de développement des plantes, ils interviennent dans la germination des graines, l'élongation des tiges, la floraison et le développement des fruits (Leitão et Enguita, 2016). Plusieurs autres études ont montré la capacité des champignons endophytes à synthétiser une grande variété de GAs, on citera celle de Khan *et al.*, (2012) qui ont montré que le filtrat de la culture de *Paecilomyces formosus* LHL10, un champignon endophyte isolé à partir de *Cucumis sativus* L. permet l'augmentation de la croissance des plantules de riz, parce qu'il contient différents GAs (GA₁, GA₃, GA₄, GA₈, GA₉, GA₁₂, GA₂₀ et GA₂₄) et même de l'IAA.

Les acides gibbérelliques (GA₁, GA₃ et GA₄) ont été détectés et quantifiés dans le filtrat de *Aspergillus clavatus* Y2H0002, endophyte de *Nymphoides peltata*, ce filtrat a permis la stimulation de la croissance des plantules du riz, et ceci a été attribué aux acides gibbérelliques présents dans le filtrat (You *et al.*, 2015).

D'autres études ont montré la capacité des champignons endophytes à stimuler la croissance des plantes en utilisant d'autres phytohormones telles que l'acide abscissique (Dai *et al.*, 2008), l'acide salicylique (Ismail *et al.*, 2018) et les cytokinines (Vadassery *et al.*, 2008).

I.3.3. Applications dans l'énergie et les biocatalyseurs

I.3.3.1. Biosynthèse des biocarburants

Les problèmes environnementaux causés par l'émission de gaz à effet de serre due aux combustibles a créé un besoin de nouvelles sources d'énergie alternatives et durables. Récemment, de nombreux champignons endophytes ont été découverts comme des producteurs de composés organiques volatiles principalement des hydrocarbures et autres composés oxygénés qui peuvent être une bonne alternative aux composés fossiles (Yan *et al.*, 2018). Cette capacité a été attribuée selon Wu *et al.*, (2017) au pouvoir des champignons endophytes en tant que symbiote de plantes à synthétiser des enzymes lignocellulolytiques permettant la conversion de la lignocellulose en mycodiesel.

Shaw *et al.*, (2015) ont montré la capacité de *Nigrograna mackinnonii* E5202H un endophyte associé aux tiges de *Guazuma ulmifolia* à produire une série de composés volatiles incluant une nouvelle molécule non oxygénée avec une longue chaîne (3E, 5E, 7E) -nona-1,3,5,7-tétraène, qui peut être une bonne substitution à l'essence. L'analyse des composés organiques volatiles de quatre champignons endophytes *Hypoxylon* sp. CI4A, *Hypoxylon* sp.

EC38, *Hypoxylon* sp. CO27 et *Daldinia eschscholzii* EC12 a révélé leur capacité à produire un large éventail d'hydrocarbures, dont la majorité sont des monoterpènes et des sesquiterpènes (Wu *et al.*, 2017).

I.3.3.2. Biosynthèse d'enzymes

Les champignons endophytes, doivent synthétiser une variété d'enzymes pour franchir les barrières des plantes lors de l'infection, contrer les produits chimiques de défense des plantes, et dégrader les parois cellulaires des tissus végétaux sénescents dans le cas où la plante meurt, ces enzymes peuvent avoir différentes applications dans les domaines de la santé, de la production alimentaire, de l'énergie et de l'environnement (Suryanarayanan *et al.*, 2012).

Parmi ces enzymes synthétisées par les champignons endophytes, on peut citer la L-asparaginase dont la production a été démontré par Silva *et al.*, (2018) à partir de deux champignons endophytes *Talaromyces cecidicola* URM 7826 et *Penicillium* sp. 4 URM 7827 avec des taux de 2.30 U/g et 1.28 U/g respectivement. Alberto *et al.*, (2016) ont testé la capacité de production d'enzymes extracellulaires de 42 isolats fongiques provenant de 4 plantes différentes *Luehea divaricata*, *Trichilia elegans*, *Sapindus saponaria* et *Saccharum* spp., et il s'es révélé que 62% de ces champignons produisaient de l'amylase, 93% de la cellulase, 50% de la pectinase et 64% de la protéase.

I.3.4. Applications dans la bioremediation de l'environnement

L'utilisation des champignons endophytes dans l'élimination des polluants ne cesse de prendre de l'ampleur, car ils peuvent accélérer le processus de phytoremédiation fait par leurs plantes hôtes, comme il a été démontré par Soleimani *et al.*, (2010) où les deux plantes *Festuca arundinacea* et *Festuca pratensis* inoculées avec les deux champignons endophytes *Neotyphodium coenophialum* et *Neotyphodium uncinatum* respectivement avaient une plus grande production de biomasse et une plus grande accumulation du cadmium dans leurs racines et pousses par rapport aux plantes non infectées.

Ils peuvent également dégrader ou accumuler eux-mêmes différents polluants toxiques tels que les hydrocarbures, les biphényles polychlorés, les hydrocarbures polyaromatiques, les radionucléides et les métaux lourds indépendamment de leurs plantes hôtes (Yan *et al.*, 2018). C'est le cas avec plusieurs isolats du genre *Pestalopsis* qui possèdent la capacité de dégrader efficacement le polyester polyuréthane un polymère synthétique. Cependant, seulement deux isolats de *Pestalotiopsis microspora* avaient la capacité de se développer sur ce polymère en

tant que seule source de carbone. Cette dégradation a été attribuée à la production d'une sérine hydrolase par ces deux isolats (Russell *et al.*, 2011). Le champignon endophyte *Lasiodiplodia* sp. MXSF31, isolé à partir des tiges de *Portulaca oleracea* poussant sur du sol contaminé par des métaux a montré une capacité de biosorption du cadmium, Plomb et zinc, ceci a été attribué aux groupes fonctionnels présents à la surface du champignon endophyte sur la paroi cellulaire incluant les radicaux hydroxyles, amino, carbonyle, sulfonate et benzène (Deng *et al.*, 2014).

I.4. Les plantes médicinales et leurs champignons endophytes

L'organisation mondiale de la santé, définit une plante médicinale comme étant toute plante qui, dans un ou plusieurs de ses organes, contient des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs utilisés dans la semi synthèse chimio pharmaceutique (Kaul *et al.*, 2012).

Les plantes médicinales ont été utilisées dans la médecine traditionnelle depuis des millénaires, et sont utilisées jusqu'à maintenant (Venieraki *et al.*, 2017). Selon Benarba (2016), 80% de la population africaine utilise la médecine traditionnelle et l'Algérie fait partie des pays arabes les plus riches en plantes médicinales avec 3164 espèces. Au sud-ouest de l'Algérie. Benarba (2016) ont recensé 83 espèces de plantes médicinales appartenant à 38 familles différentes qui étaient utilisées comme remèdes pour différents maux. A Tizi ouzou, 98 plantes vasculaires appartenant à 48 familles différentes sont utilisées pour traiter entre autres les problèmes digestifs, cutanés, circulatoires et respiratoires (Meddour et Meddour-Sahar, 2015). A Sétif, plus précisément au djebel Zdim, Chermat et Gharzouli, (2015) ont identifié 93 espèces médicinales appartenant à 32 familles.

Parmi les plantes médicinales utilisées en Algérie, il y a *Mentha pulegium* L., *Juniperus phoenicea* L., *Cedrus atlantica* Man. et *Taxus baccata*

I.4.1. *Mentha pulegium* L.

Mentha est l'un des genres de la famille des Lamiaceae, ordre des Lamiales, classe des Magnoliopsida, il contient entre 25 et 30 espèces dont l'une d'elle est *Mentha pulegium* L. plus communément appelée pennyroyal (Hajlaoui *et al.*, 2009) ou Fliou en arabe (figure 9). C'est une espèce native d'Amérique, d'Europe, d'Afrique du Nord, d'Asie mineure et du proche orient (Mahboubi et Haghi, 2008). Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle où on utilise ces huiles essentielles et ces parties sèches comme remède contre les intoxications alimentaires, les bronchites, les flatulences, les coliques intestinales et

comme diurétique; elle est également utilisée en cuisine, comme herbe culinaire, dans les cosmétiques et même en aromathérapies (Aires *et al.*, 2016; Hajlaoui *et al.*, 2009).

Les parties aériennes de cette plante contiennent une grande diversité de métabolites secondaires tels que les tanins, résines, pectines, principes amers et huiles essentielles, ces dernières sont riches en monoterpènes comme le menthone, isomenthone, piperitenone, et le carvone avec une prépondérance du pulegone et en sésquiterpènes (Zekri *et al.*, 2013; Zekri *et al.*, 2014).



Figure 9. Photographie de la plante *Mentha pulegium* L. (Stephenson et Churchill, 1836).

I.4.2. *Juniperus phoenicea* L.

Le genre *Juniperus* appartient à la famille des Cupressaceae, ordre des Pinales et classe des Pinopsida, il contient 67 espèces dont *Juniperus phoenicea* L. communément appelée en Algérie Arar (figure 10), c'est un petit arbre qui pousse à l'état sauvage autour du bassin méditerranéen, du Portugal à la Palestine, en passant par l'Afrique du Nord, les îles Canaries et l'île de Madère (Bekhechi *et al.*, 2012). Elle est utilisée en médecine traditionnelle, où les décoctions et les infusions de ses feuilles servent à traiter la diarrhée, les rhumatismes, les maladies broncho-pulmonaires, diurétiques, diabétiques et contre l'obésité, elles sont utilisées également dans le traitement de l'hépatotoxicité et de la néphrotoxicité (Ghouti *et al.*, 2018).

Des études photochimiques ont révélé que *Juniperus phoenicea* contient une grande variété de composés principalement des ditéropénoïdes, des biflavonoïdes, des lignans, du phényl-propanoïde glucosides, des dérivés de furanone glucosides et du bis-furanone, ainsi que des norterpène et sesquiterpène glucosides. La composition des huiles essentielles de ses feuilles est caractérisée par la présence de monotéropènes comme composants majoritaires (Bekhechi *et al.*, 2012).



Figure 10. Photographie de la plante *Juniperus phoenicea* L.

I.4.3. *Cedrus atlantica* Man.

Le cèdre d'Atlas (*Cedrus atlantica* Man.) (figure 11) est l'une des quatre espèces du genre *Cedrus* qui appartient à la famille des Pinacées, ordre des Pinales, c'est une espèce endémique des montagnes Nord-Africaines du Maroc et de l'Algérie (Fatouma *et al.*, 2017; Rhafouri *et al.*, 2014). Il est utilisé en aromathérapie traditionnelle pour ses avantages pour les systèmes génito-urinaires, musculo-squelettique et cutanés (Martins *et al.*, 2015).

Selon Fatouma *et al.*, (2017) l'analyse de la composition des huiles essentielles des feuilles et du bois du cèdre d'Atlas a révélé la présence des mêmes composants principaux dans les deux huiles, β -Himachalène, α -Himachalène, Longifolène et δ -Cadinène.



Figure 11. Photographie de la plante *Cedrus atlantica* Man.

I.4.4. *Taxus baccata*

L'espèce *Taxus baccata* (figure 12), appelé plus communément l'if commun appartient au genre *Taxus*, à la classe des Pinopsida, à l'ordre des taxales et à la famille des taxacées, c'est un arbre à feuilles persistantes (Kashani *et al.*, 2018). Originaire de la plupart des pays d'Europe, son aire de répartition se limite au sud des régions montagneuses du bassin méditerranéen (Arenas-Castro *et al.*, 2018).

L'if est utilisé en médecine ayurvédique pour le traitement du cancer, la diarrhée, l'asthme, l'hémoptysie, il est également, carminatif, expectorant. En médecine traditionnelle ses feuilles sont utilisées comme abortives, antipaludiques, antirhumatismales, et pour traiter les bronchites (Patel *et al.*, 2011). Il contient différents composés chimiques, dont le principe le plus important et toxique est un mélange d'alcaloïdes appelé taxine ou taxines (Tekol, 2007), le taxol ou paclitaxel, un alcaloïde diterpénique produit par l'if est reconnu comme l'agent anticancéreux naturel le plus important (Kashani *et al.*, 2018; Sarmadi *et al.*, 2018).

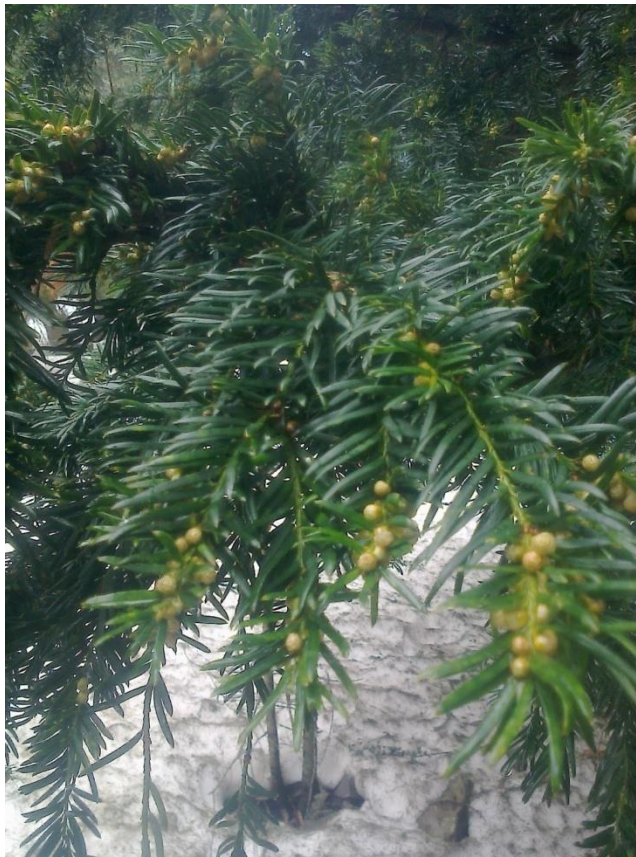


Figure 12. Photographie de la plante *Taxus baccata*.

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Produits chimiques

Les solvants organiques, Diméthylsulfoxyde (DMSO), L-asparagine, l'acide gallique, le Folin-Ciocalteu, la quercétine, l'acide ascorbique proviennent de chez Sigma Aldrich, alors que le DPPH, l'ABTS^{•+} et le 2,4,6- Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TBTZ) sont des produits Fischer scientifique. Concernant les produits utilisés lors de l'identification par spectrométrie de masse et l'identification moléculaire, ils proviennent de : Sigma-Aldrich, VWR chemicals, QiagenInc, Eurogentec, invitrogen, Bioline, Promega, Marcherey-Nagel, AppliedBiosystems, Millipore, GE Healthcare Life Sciences, 4titude.

Les milieux de culture Mueller Hinton Agar (MHA), Muller Hinton Broth (MHB), Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640) et Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) proviennent de chez Sigma-Aldrich et Fisher scientifique, les autres milieux ont été préparés au laboratoire (annexe 1).

Tous les autres produits chimiques utilisés dans la présente étude sont de grade analytique.

II.2. Matériel végétal

Les plantes *Mentha pulegium* L., *Juniperus phoenicea* L., *Cedrus atlantica* Man. et *Taxus baccata* ont été collectées en juin 2014 des deux montagnes de Megriss et Babour de la région de Sétif (Algérie). L'identification a été faite par le professeur Laouer Hocine, Laboratoire de Valorisation des ressources biologiques naturelles de l'université Ferhat Abbas Sétif 1.

II.3. Matériel microbien

Les souches bactériennes et fongiques utilisées au cours des tests antimicrobiens sont listées dans le tableau 1 :

II.4. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires cancéreuses, HepG2 (hépatocarcinome humain) A549 (adénocarcinome du poumon humain), U251 (lignée cellulaire de gliome), MDA-MB 231(lignée cellulaire épithéliale du cancer du sein humain), et saines, HaCaT (lignée cellulaire de kératinocytes humains) et C8-D1A (lignée cellulaire d'astrocytes) proviennent du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille.

Tableau 1. Les différentes souches bactériennes et fongiques pathogènes utilisées.

Microorganisme	Abréviation	Origine	Résistance
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>B. cereus</i>	LMA	/
<i>Micrococcus luteus</i> NRLL B-4375	<i>M. luteus</i>	LMY	/
<i>Microbacterium yannicii</i>	<i>M. yannicii</i>	LMR	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> 1	LMA	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	<i>S. aureus</i> 2	LMA	Méticilline
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> 3	LMR	Mupirocine
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> 4	LMR	Chlorhexidine-Mupirocine
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> 5	LMR	Chlorhexidine
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	<i>E. faecalis</i> 1	LMA	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> 2	LMR	Macrolide-Lincosamide-Streptogramine
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> 3	LMR	Macrolide-Lincosamide-Streptogramine
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> 4	LMR	Vancomycine
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E. faecium</i> 1	LMR	Vancomycine
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E. faecium</i> 2	LMR	Vancomycine
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>S. pyogenes</i>	LMR	Colistine
<i>Streptococcus australis</i>	<i>S. australis</i>	LMR	/
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	<i>C. freundii</i>	LMA	/
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	LMR	Carbapénèmes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> 1	LMA	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> 2	LMR	Carbapénèmes
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> 3	LMR	Carbapénèmes
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>	LMR	Carbapénèmes
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	<i>S. typhimurium</i>	LMA	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i> 1	LMA	/
<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i> 2	LMR	Colistine
<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i> 3	LMR	β-lactamines
<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i> 4	LMR	Carbapénèmes
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> 1	LMR	Carbapénèmes
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> 2	LMR	Carbapénèmes
<i>Candida albicans</i> ATCC 1024	<i>C. albicans</i>	LMA	/
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>E. floccosum</i>	LP	/
<i>Microsporium canis</i>	<i>M. canis</i>	LP	/
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	LP	/
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	LP	/

LMA: Laboratoire de microbiologie appliquée- université Ferhat Abbas Sétif 1- Algérie, **LMY:** Laboratoire de mycologie- Eskişehir- Turquie, **LMR:** Laboratoire de multi-résistance-Marseille-France, **LP:** Laboratoire de parasitologie-Marseille-France.

II.5. Echantillonnage

Selon Tiwari, (2017) le choix des plantes ayant une histoire ethnobotanique intéressante est l'un des critères de sélection des plantes hôtes de champignons endophytes ayant eux aussi un pouvoir biologique potentiel. Pour cela, notre choix s'est orienté vers ces quatre plantes médicinales.

Pendant l'échantillonnage, des plantes saines ont été choisies et leurs différentes parties collectées et mises dans des sacs stériles pour être utilisés dans les 24 heures suivant l'échantillonnage (Sharma *et al.*, 2016).

Les plantes sélectionnées, leurs organes collectés ainsi que leurs sites d'échantillonnage sont répertoriés dans le tableau 2 et figure 13.

Tableau 2. Les plantes ainsi que leurs organes utilisés lors de l'isolement.





Nom scientifique de la plante	Parties utilisées de la plante	Site d'échantillonnage	
<i>Mentha pulegium</i> L.	Feuilles, tiges et racines	Montagne de Megriss, Sétif, Algérie.	
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	Feuilles, tiges et racines	Montagne de Megriss, Sétif, Algérie.	
<i>Cedrus atlantica</i> Man.	Aiguilles, tiges et racines	Montagne de Babour, Sétif, Algérie.	
<i>Taxus baccata</i>	Feuilles, tiges et fruits	Montagne de Babour, Sétif, Algérie.	



Figure 13. Sites d'échantillonnage.

II.6. Isolement des champignons endophytes

Toutes les parties collectées de chaque plante ont été préalablement rincées à l'eau du robinet dans le but d'enlever les poussières et les impuretés puis coupées en petits fragments. Afin d'éliminer tous les microorganismes épiphytes, une stérilisation de surface a été faite selon le protocole de Meenatchi *et al.*, (2016) avec quelques modifications. Des immersions consécutives des fragments dans de l'éthanol à 70% pendant 1 minute, l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 4 minutes, et l'éthanol à 70% pendant 1 minute ont été réalisées. Les fragments ont ensuite été rincés trois fois à l'eau distillée stérile (1 minute chaque fois) et séchés sur du papier filtre stérile. Des petits fragments de 5 à 7 mm ont été découpés dans chaque partie et déposés à raison de cinq fragments par boîte de Pétri contenant du Potato Dextrose Agar (PDA) supplémentées de Gentamicine à 100 mg /L pour inhiber la croissance des bactéries endophytes.

Afin de s'assurer de l'efficacité de la stérilisation de surface, un test a été réalisé où la troisième eau distillée de rinçage des fragments a étéensemencée sur du PDA.

Toutes les boîtes ont été incubées à 28°C et contrôlées tous les jours. Chaque champignon immergeant des fragments a été réensemencé sur du PDA dépourvu de Gentamicine jusqu'à ce qu'il soit pur. Des boîtes sans croissance pour les boîtes de confirmation, démontre l'efficacité de la stérilisation de surface. Les fréquences de colonisation de chaque organe utilisé des quatre plantes ont été calculées en utilisant la formule suivante (John et Mathew, 2017) :

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

II.7. Conservation des champignons endophytes

Chaque champignon isolé et purifié a été conservé dans des tubes de PDA en pente, à une température de 4°C (Fouda *et al.*, 2015).

II.8. Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne

Afin de sélectionner les isolats fongiques les plus intéressants et les plus actifs, tous les champignons endophytes isolés ont subi un criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne par les méthodes des cylindres d'agar contre les bactéries et la levure et de la double culture contre le champignon filamenteux.

II.8.1. Préparation des microorganismes cibles

Quatre bactéries pathogènes *B. cereus*, *S. aureus* 1, *E. coli* 1, *P. aeruginosa* 1 et deux dermatophytes *C. albicans* et *M. canis* ont été utilisées pour ce test.

A partir des cultures fraîches (24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure), les inocula ont été ajustés à l'aide du spectrophotomètre (Jenway 7310 spectrophotometer) à 625 nm (densité optique= 0.08-0.1) pour les bactéries, ce qui correspond à 10⁸ UFC/mL et à 530 nm (densité optique= 0.12- 0.15) pour la levure, ce qui correspond à 5×10⁶ cellules/mL (Powthong *et al.*, 2013). D'un autre côté, la moisissure *M. canis* a été mise à croître sur du PDA pendant 5 jours (Bisht *et al.*, 2016).

II.8.2. Activité antibactérienne et antilevurienne

Le criblage préliminaire contre les bactéries et la levure cités ci-dessus a été fait selon le protocole de Sahani *et al.*, (2017) avec quelques modifications. A partir des cultures des champignons endophytes âgées de 14 jours, des disques de 6 mm de diamètre ont été découpés et déposés sur des boîtes de Pétri de MHA et de PDA préalablementensemencées avec les bactéries et la levure respectivement. Les boîtes ont ensuite été placées au réfrigérateur à 4°C pendant 6 heures afin de permettre la diffusion des molécules bioactives à partir des disques fongiques.

Après incubation à 37°C durant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure, les zones d'inhibition ont été mesurées.

II.8.3. Activité antifongique

Deux disques de 6 mm de diamètre ont été placés de part et d'autre d'une boîte de Pétri contenant du PDA. L'un issu d'une culture de champignon endophyte et l'autre de champignon pathogène âgées toutes les deux de 5 jours. Une boîte sans champignon endophyte a été utilisée comme contrôle. Après incubation à 28°C pendant 5 jours de toutes les boîtes, les pourcentages d'inhibition ont été calculés selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(A - B)/A] \times 100$$

A : Croissance radiale du champignon pathogène dans la boîte contrôle.

B : Croissance radiale du champignon pathogène dans la double culture (Bisht *et al.*, 2016).

II.9. Identification des champignons endophytes

II.9.1. Identification morphologique

Après isolement et criblage de l'activité antimicrobienne des isolats fongiques, sept isolats ont été sélectionnés. Afin de les identifier, un disque mycélien de 6 mm de diamètre de chaque isolat a été ensemencé sur deux milieux de culture le PDA, et le Malt Extract Agar (MEA). Après une incubation de 7 jours à 28°C, les caractéristiques macroscopiques telles que la forme, le diamètre, la couleur (dessus/revers) et la texture de la surface des colonies, ainsi que les caractéristiques microscopiques des hyphes, conidies et conidiophores observées au microscope optique et électronique par balayage, ont été notées et comparées aux clés d'identification afin de pouvoir identifier nos isolats fongiques (Qiu *et al.*, 2010; Jiaojiao *et al.*, 2016).

II.9.2. Identification par spectrométrie de masse au Maldi-Tof MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time of Flight Mass Spectrometry)

Le Maldi-Tof permet d'analyser la teneur en protéines d'un isolat par ionisation de ces dernières grâce à un laser. Les ions sont ensuite accélérés dans l'analyseur TOF, et séparés en fonction de leur temps de vol; la vitesse de chacune de ces particules dépend du rapport masse /charge; une fois les ions arrivés au détecteur, le signal est amplifié et traité pour être mis finalement sous forme de spectre.

II.9.2.1. Préparation de la matrice

Une matrice qui permet l'absorption des UV puis le transfert de l'énergie aux protéines a été préparée en mettant de la poudre d'Acide alpha-Cyano-4 Hydroxy-Cinnamique en excès dans un Eppendorf. 500 µL d'Acétonitrile à 100%, 250 µL de l'acide

trifluoroacétique à 10% et 250 μL d'eau distillée dépourvue de nucléases ont ensuite été ajoutés. Après agitation, l'Eppendorf est passé au sonicateur pendant 10 minutes et à la centrifugeuse pendant 2 minutes à 13000 rpm et le surnageant a été récupéré (Seng *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010).

II.9.2.2. Lyse et extraction des protéines fongiques

L'extraction des protéines fongiques a été faite selon le protocole de Bader *et al.*, (2010) avec quelques modifications, où à partir des cultures fongiques pures. Un petit fragment de 2 à 3 mm de diamètre a été raclé à l'aide d'un scalpel stérile et mis dans un Eppendorf contenant 900 μL d'éthanol et 300 μL d'eau ultrapure. Après une centrifugation de 10 minutes à 13000 rpm, le surnageant a été éliminé et le culot dissous dans 10 μL d'acide formique à 70%. Après 5 minutes de macération, 10 μL d'acétonitrile à 100% ont été ajoutés, avec un temps de macération de 5 minutes. L'Eppendorf a ensuite été centrifugé pendant 2 minutes à 13000 rpm.

II.9.2.3. Préparation de la plaque et lecture des résultats

Pour préparer la plaque de Maldi-Tof, 4 spots de 1 μL d'extrait protéique pour chaque champignon sont nécessaires. Après séchage, 1 μL de matrice est déposé sur tous les spots. Un témoin négatif (matrice) et un calibrant (*Candida krusei*) sont aussi spotés (Normand *et al.*, 2017).

Les spectres ont été obtenus en utilisant le microflex LT système, en mode ion-positif avec un laser nitrogène de 337 nm en utilisant les paramètres suivants :

- Délai de 170 ns
- Voltage de la première source d'ion : 20 kV
- Voltage de la deuxième source d'ion : 18.5 kV
- Gamme de masses : 3-20 kDa

Les données ont été acquises automatiquement par le logiciel FlexControl v2.4 (Bruker Daltonik GmbH) et exportées dans le logiciel Maldi Biotyper v2.1 (Bruker Daltonik GmbH) afin d'être automatiquement comparées aux spectres préalablement enregistrés dans la base de données. L'identification est prise en compte sauf si 3 des 4 spots ont des résultats concordants avec un score > 1.7 (Ranque *et al.*, 2014).

II.9.3. Identification moléculaire

Afin de confirmer l'identification morphologique de nos souches fongiques et l'approfondir, une identification moléculaire des espèces fongiques a été faite en amplifiant et en séquençant différentes régions de leur ADN.

II.9.3.1. Extraction et purification de l'ADN génomique

Une pré-lyse des cellules a été faite afin de permettre l'extraction de l'ADN suivant le protocole modifié de Hamad *et al.*, (2017) et en utilisant l'EZ1 Advanced DNA bacteria extraction. Des cultures pures de champignons endophytes ont été raclées et mises dans des Eppendorfs de 1,5 mL, contenant 210 µL de Buffer G2, 20 µL de protéinase K et 100 mg de billes de verre. Les tubes ont été agités pendant 1 à 2 minutes et incubés à 56°C pendant une nuit. Une deuxième agitation et une centrifugation à 13000 rpm pendant 2 minutes ont été faites. Les surnageants ont été finalement récupérés dans de nouveaux Eppendorfs. La purification de l'ADN a ensuite été réalisée en utilisant le protocole automatisé de l'IZ1 DNA bacteria.

II.9.3.2. Amplification de l'ADN

Cette étape permet l'amplification de certaines régions de l'ADN pour chacun des isolats en utilisant des amorces spécifiques à ces régions (tableau 3) ; pour cela un mélange réactionnel dans lequel 5 µL de chaque ADN ont été ajoutés à 45 µL d'une mixture composée de 25 µL de Quantitect Probe PCR Master Mix, 18 µL d'eau distillée dépourvue de nucléases et 1 µL de chaque amorce. Les PCR (polymerase chain reaction) ont été faites selon les programmes des cycles thermiques cités dans le tableau 4 en utilisant le thermocycleur ABI 2720 (Applied Biosystems). L'utilisation d'un témoin négatif (réactifs sans ADN) était nécessaire.

II.9.3.3. Révélation sur gel d'électrophorèse

Afin de s'assurer du bon déroulement de la PCR, un gel d'agarose 1.5% contenant 15 µL de syber safe a été préparé, et dans chaque puit, 5 µL du produit de PCR mélangés à 2 µL de bleu de charge ont été déposés, un témoin négatif (sans ADN) et un marqueur de taille ont également été utilisés. Une migration à 85 Volt pendant 20 minutes dans du TBE (x0.5) (Tris/Borate/EDTA) est nécessaire.

Tableau 3. Liste des régions d'ADN et leurs amorces utilisées lors de l'amplification et du séquençage pour chacun des isolats fongiques.

Région	ITS (Internal Transcribed Spacer)	β -tubuline	RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit)	LSU (Large-subunit)
	ITS1F	Bt2a	5F	LR0R
Amorces PCR (5' 3')	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	ACCCGCTGAACTTAAGC
	ITS4	Bt2b	7CReur	LR5
	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	CCCATRGCYTGYTTRCCCAT	TCCTGAGGGAAACTTCG
	ITS1F	Bt2a	5F	LR0R ACCCGCTGAACTTAAGC
Amorces séquençage (5' 3')	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	LR5 TCCTGAGGGAAACTTCG
	ITS4	Bt2b	7CReur	LR3 GGT CCG TGT TTC AAG AC
	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	CCCATRGCYTGYTTRCCCAT	LR3R GTC TTG AAA CAC GGA CC
Taille (paires de bases)	~ 450-800	~500	~1000	~800
Références	Raja <i>et al.</i> , 2017	Visagie <i>et al.</i> , 2014; Raja <i>et al.</i> , 2017	Visagie <i>et al.</i> , 2014	Demirel, 2016; Raja <i>et al.</i> , 2017
	MPR1	MPR1		JPF2/JPF3/JPF4
	JPF2/JPF3/JPF4	CAR11	TBT7	TBT7
Isolats fongiques	CAR11	TBT7	TBT10	TBT10
	TBT7	TBT10		
	TBT10			

Tableau 4. Les programmes des cycles thermiques de la PCR pour chaque région de l'ADN (Visagie *et al.*, 2014; Demirel, 2016).

Région	Dénaturation initiale	Nombre de cycle	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale
ITS	94°C / 5 min	35	94°C / 45 sec	55°C / 45 sec	72°C / 60 sec	72°C / 7 min
β-tubuline	94°C / 5 min	35	94°C / 45 sec	55°C / 45 sec	72°C / 60 sec	72°C / 7 min
	94°C / 5 min	5	94°C / 45 sec	50°C / 45 sec	72°C / 60 sec	/
	/	5	94°C / 45 sec	52°C / 45 sec	72°C / 60 sec	/
RPB2	/	30	94°C / 45 sec	55°C / 45 sec	72°C / 60 sec	72°C / 7 min
	/	30	94°C / 45 sec	55°C / 45 sec	72°C / 60 sec	72°C / 7 min
LSU	94 °C / 10 min	35	94 °C / 15 sec	48 °C / 30 sec	72°C / 90 sec	72°C / 7 min

II.9.3.4. Purification des produits de PCR

Une purification du produit de PCR a été faite, en utilisant Nucleo-Fast®96 PCR Kit, où 50 µL d'eau distillée dépourvue de nucléases ont été ajoutés à chaque produit de PCR. Ce mélange a été ensuite transvasé dans les puits de la plaque. Une aspiration sous vide de 15 minutes du contenu de la plaque a été faite. 50 µL d'eau distillée dépourvue de nucléases sont rajoutés suivie d'une agitation à une vitesse de 600 rpm pendant 15 minutes permettant la récupération de l'ADN purifié à la fin.

II.9.3.5. Réaction de séquence (BigDye)

Tous les produits de PCR ont été séquencés bi-directionnellement en utilisant le BigDye Terminator v 1.1 cycle sequencing kits. Une mixture a été préparée pour chaque amorce contenant 5 µL de l'ADN, 3 µL de tampon 5x sequencing Buffer, 2 µL de BigDye Terminator v1.1, 1 µL d'amorce et le volume a été complété à 20 µL avec 9 µL d'eau distillée dépourvue de nucléases.

Une amplification a été faite sur le thermocycleur Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler selon le programme suivant :

- ✓ **Dénaturation initiale** (96°C / 60 secondes),
- ✓ 25 cycles comprenant :
 - **Dénaturation** (96°C / 10 secondes)

- **Hybridation** (50°C / 5 secondes)
- **Elongation** (60°C / 3 minutes)

II.9.3.6. Purification de la réaction de séquence par sephadex et séquençage

Pour purifier notre ADN, une chromatographie d'exclusion a été réalisée en utilisant une plaque MAHVN45. Les puits de cette plaque ont été remplis de sephadex G-50, auquel ont été rajoutés 300 µL d'eau. Après 3 heures de repos, Une centrifugation à 2600 rpm pendant 6 minutes nous a permis de récupérer et d'éliminer l'eau de cette plaque dans une plaque de PCR placée en dessous. 20 µL des ADN issus de la réaction de séquence ont ensuite été mis dans les puits de la plaque sephadex et une nouvelle centrifugation à 2600 rpm pendant 5 minutes nous a permis cette fois-ci de récupérer notre ADN purifié dans une nouvelle plaque de PCR.

La plaque a ensuite été passée au séquenceur Genetic Analyzer ABI PRISM 3031 (AppliedBiosystems) afin d'obtenir les séquences de chaque gène ciblé. Les séquences ainsi obtenues ont été corrigées avec le logiciel CodonCode (6.0.2),

II.9.3.7. Analyses phylogénétiques

Les séquences des différentes régions d'ADN de chaque isolat, obtenues après séquençage ont été comparées aux séquences répertoriées sur National Center for Biotechnology Information (NCBI) par le BLASTn, et alignées avec celles des espèces morphologiquement et phylogénétiquement apparentées à l'aide de Muscle dans le logiciel MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). L'ensemble des séquences des différentes régions alignées ont ensuite été concaténées ensemble en utilisant le logiciel Mesquite 3.6 puis analysés en utilisant la méthode du «Maximum likelihood (ML)» basée sur le modèle « Tamura Nei» en utilisant MEGA7 (Tamura et Nei, 1993) avec 1000 réplifications bootstrap. Les lacunes et les données manquantes ont été éliminées.

II.10. Choix du milieu de culture optimum

Afin de choisir le milieu de culture optimum permettant une meilleure production des molécules actives, Les champignons endophytes ayant été sélectionnés lors du criblage préliminaire, ont été mis à croître sur plusieurs milieux de culture, PDA, Sabouraud's Dextrose Agar (SDA), Yeast Extract Agar (YEA), MEA, Yeast Malt Extract Agar (YMEA) pendant 14 jours à 28°C ; après cela, un test de l'activité antimicrobienne contre quatre bactéries à Gram positif *B. cereus*, *E. faecalis* 1, *S. aureus* 1, *S. aureus* 2, quatre bactéries à

Gram négatif, *C. freundii*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* 1, *E. coli* 1 et une levure *C. albicans* a été réalisé en utilisant la méthode des cylindres d'agar précédemment décrite dans le criblage préliminaire. Après incubation de 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure, les zones d'inhibition ont été mesurées (Devaraju et Satish, 2011; Samae *et al.*, 2019).

II.11. Choix du type de fermentation et du solvant d'extraction

Dans le but de déterminer le type de fermentation ainsi que le solvant donnant la meilleure activité pour chaque isolat fongique présélectionné, une fermentation à petit volume sur milieux liquide et solide, suivie d'une extraction par trois solvants de polarité différente ont été faites.

II.11.1. Fermentation sur milieu solide et liquide

La fermentation en milieu liquide et solide a été faite suivant le protocole de Son *et al.*, (2018) et Kim *et al.*, (2016) avec des petites modifications. Pour la culture solide, chaque isolat fongique a été ensemencé dans 05 boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre contenant 20 mL du milieu choisi précédemment. D'un autre côté, la culture liquide a été préparée en ensemençant un Erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL du milieu liquide adéquat. Toutes les cultures ont été incubées pendant 21 jours à 28°C avec une agitation de 200 tours / minute pour les cultures liquides. Les cultures solides ont ensuite été broyées, alors que le milieu liquide a été séparé du mycélium en utilisant le papier filtre whatman, puis centrifugé à 4000 rpm pendant 5 minutes.

II.11.2. Extraction des métabolites secondaires

Une extraction avec 3 solvants de polarité différente, n-Hexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle a été réalisée selon les protocoles de Son *et al.*, (2018) et Saraswaty *et al.*, (2013) avec quelques modifications. Pour la culture solide le résultat du broyage a été mis à macérer dans 100 mL de n-Hexane pendant 24 heures sous une agitation de 200 rpm, la phase organique a été ensuite récupérée. La même chose a été répétée pour les deux autres solvants (dichlorométhane et acétate d'éthyle).

D'un autre côté, les filtrats ont été mélangés au même volume de n-Hexane et mis sous agitation pendant 2 heures à 200 rpm. Après un repos de 1 heure permettant la séparation des deux phases (organique et filtrat), la phase organique a été récupérée et le filtrat a été ré-extrait avec les deux autres solvants successivement. Toutes les phases organiques récupérées (6 pour chaque champignon endophyte) ont été concentrées en utilisant l'évaporateur rotatif à

45°C (Rotavapor Germany, bÜchi461), dissoutes dans du DMSO, passées à travers des membranes filtrantes (0,2 µm) et conservées à 4°C.

II.11.3. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de nos extraits fongiques a été réalisée suivant la méthode des Puits sur gélose, en utilisant les microorganismes pathogènes suivants : *B. cereus*, *S. aureus* 1, *S. aureus* 2, *C. freundii*, *S. typhimurium*, *E. coli* 1, *C. albicans*. Des puits de 6 mm de diamètre ont été formés sur des géloses de MEA et du PDA préalablement ensemencés avec des cultures jeunes de bactéries (10^8 UFC/mL) et de la levure (5×10^6 cellules/mL) respectivement, ces puits ont été ensuite remplis avec 25 µL de chaque extrait.

Après une mise au réfrigérateur à 4°C pendant 6 heures, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure. Les zones d'inhibition ont ensuite été mesurées (Fatima *et al.*, 2016), ce qui nous a permis de sélectionner pour chaque isolat le type du milieu de culture et le solvant optimums.

II.12. Fermentation à grand volume

Après le choix du type de fermentation ainsi que le solvant adéquats pour chaque isolat, une fermentation à grand volume (2 litres) et une extraction sur le milieu et avec le solvant choisis respectivement ont été réalisées pour chaque isolat selon les protocoles décrits ci-dessus.

II.13. Activité antimicrobienne contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les dermatophytes

Après l'optimisation de tous les paramètres, l'extrait de chaque isolat fongique a été testé contre une large gamme de bactéries pathogènes et résistantes aux antibiotiques à Gram positif : *B. cereus*, *M. luteus*, *M. yannicii*, *S. aureus* 1, *S. aureus* 2, *S. aureus* 3, *S. aureus* 4, *S. aureus* 5, *E. faecalis* 1, *E. faecalis* 2, *E. faecalis* 3, *S. pyogenes* et à Gram négatif : *C. freundii*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* 1, *P. aeruginosa* 2, *P. aeruginosa* 3, *P. mirabilis*, *S. typhimurium*, *E. coli* 1, *E. coli* 2, *E. coli* 3, *E. coli* 4, *K. pneumoniae* 1, *K. pneumoniae* 2, ainsi que contre 5 dermatophytes : *C. albicans*, *E. floccosum*, *M. canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*. Pour cela des suspensions bactériennes (10^8 UFC/mL), de la levure (5×10^6 cellules/mL) ainsi que sporales ($0.4 - 5 \times 10^6$ UFC/mL) ont été préparées et le test réalisé par la méthode des puits précédemment décrite.

II.14. Détermination des CMI et des CMB

Les CMI et les CMB ont été déterminées pour chaque extrait fongique en utilisant la méthode de micro-dilution en milieu liquide suivant le protocole décrit par CLSI (2012; 2002) pour les bactéries et la levure respectivement (tableau 1) (figure 14).

Les inocula des bactéries et de la levure ont été préparés et leurs densités ajustées à 0.5 McFarland ce qui correspond à 10^8 UFC/mL pour les bactéries et 5×10^6 cellules/mL pour les levures. Une dilution de l'inoculum bactérien au 1:20 a été faite dans du MHB et deux dilutions de l'inoculum de levure au 1:50 et 1:20 ont été réalisées dans du RPMI 1640 pour arriver à des inocula finaux de 10^6 UFC/mL pour les bactéries et de 5×10^3 cellules/mL pour la levure.

Le test a ensuite été réalisé dans des microplaques de 96 puits, où des séries de dilutions des extraits fongiques ont été préparées dans le milieu de culture liquide MHB ou RPMI 1640 présent dans les puits des microplaques, chaque puits est ensuite inoculé de façon que les charges finales dans chaque puits soient de 2×10^5 UFC/mL pour les bactéries et de 2.5×10^3 cellule / mL pour la levure. La Gentamicine et l'imipénème, ainsi que le DMSO ont été utilisés comme témoin positif et négatif respectivement.

Après 24 heures et 48 heures d'incubation à 37°C pour les bactéries et la levure respectivement, 20 µL d'une solution aqueuse de chlorure de triphényltétrazolium a été ajoutés à tous les puits, et les plaques ont ensuite été ré-incubées à 37°C pendant 30 minutes. La plus faible concentration en extrait ne présentant pas de changement de couleur visuel et par conséquent pas de croissance, a été considérée comme la concentration minimale inhibitrice.

Pour les CMB, tous les puits ne présentant pas de croissance bactérienne ont été inoculé sur du MHA. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la plus faible concentration ne présentant aucune croissance visible était considérée comme étant la CMB.

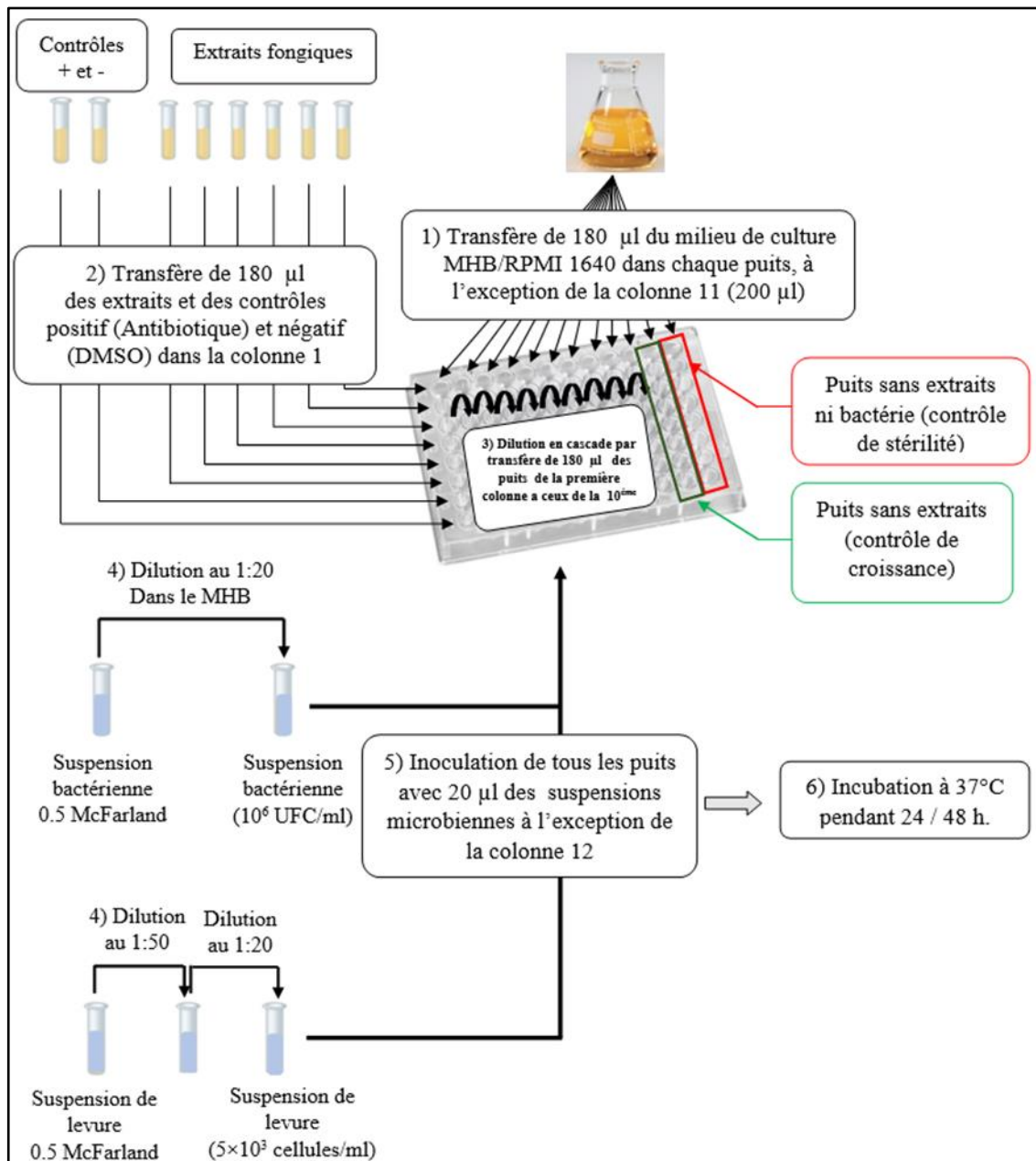


Figure 14. Les étapes de la micro-dilution en milieu liquide.

II.15. Détermination de la concentration minimale fongistatique (CMF)

La détermination de la concentration minimale fongistatique (CMF) a été réalisée selon le protocole de CLSI (2002b). L'inoculum a été préparé à partir de colonies fongiques âgées de 7 jours. Les colonies ont été inondées avec 1mL d'eau saline à 0.85% et raclées doucement avec l'embout de la micropipette. Le liquide contenant les spores, les sporangiospores et les hyphes fongiques a été transféré dans un tube stérile. Un temps de repos de 3 à 5 min a permis la séparation des particules lourdes de la suspension homogène, cette dernière a été transférée dans un autre tube. La densité de la suspension sporale a été

ajustée à l'aide du spectrophotomètre à 530 nm (densité optique = 0.09-0.11). Une dilution au 1 :50 de cette suspension a été réalisée dans le milieu RPMI 1640, ceci correspond à 2 fois la densité dont on a besoin de $0.4- 5 \times 10^4$ UFC/mL.

La préparation des extraits et du contrôle positif a été faite suivant le schéma ci-dessous :

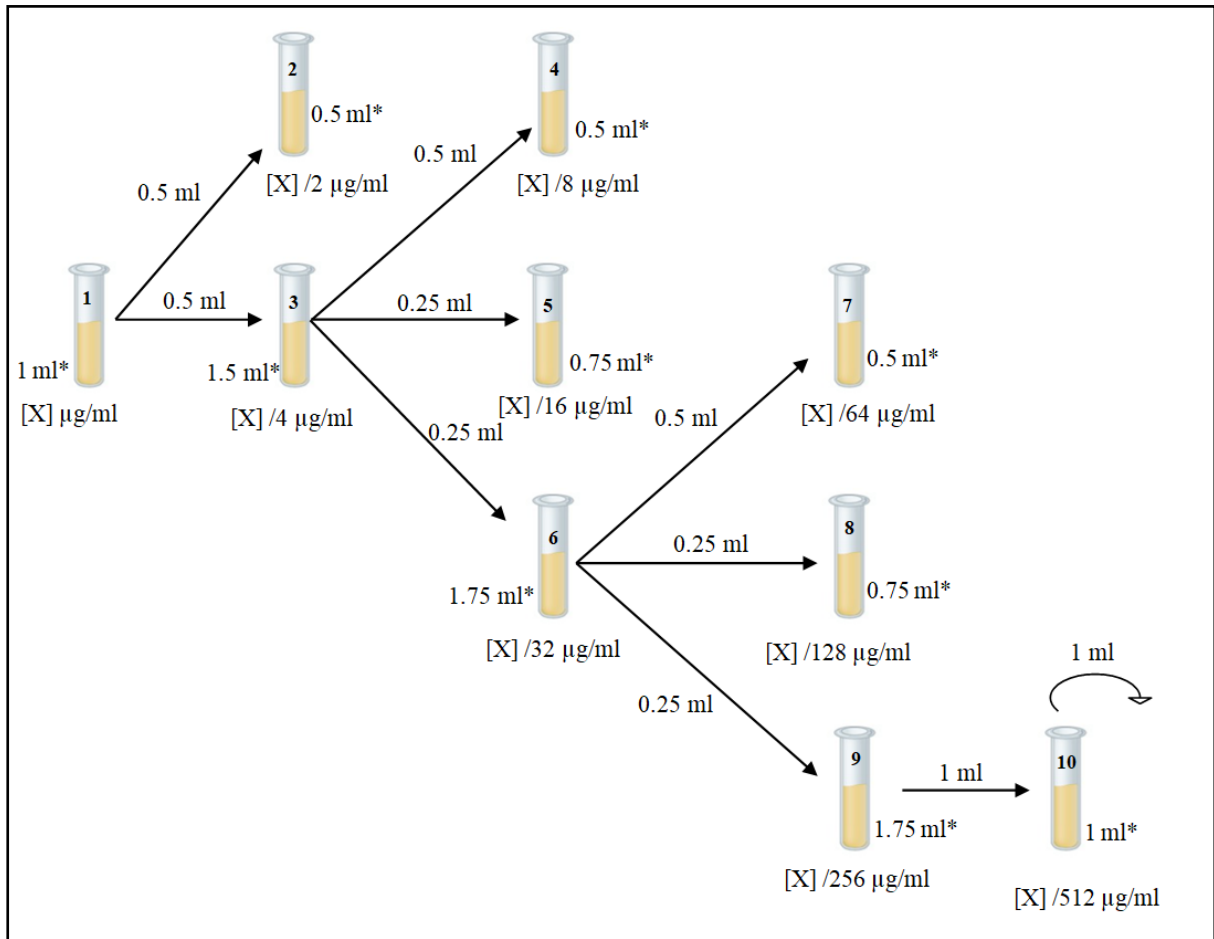


Figure 15. Schéma représentant la dilution des extraits des champignons endophytes, *Volume du RPMI 1640, [X] =15000 µg/mL (MPR1), [X] =20000 µg /mL (JPF2 / TBT7/ TBT10), [X] =160 µg /mL (Terbinafine).

Une dilution de toutes les concentrations des extraits (tube 1-10) au 1:5 a été faite en rajoutant à tous les tubes 4 mL de RPMI 1640. Après agitation, 100 µL de chaque tube ont été transférés dans les puits de la microplaque, suivi de 100 µL de suspension sporale. Les deux dernières lignes ont été réservées pour le contrôle positif (Terbinafine) et le contrôle négatif (DMSO à 1%). Les deux dernières colonnes ont servi de contrôle de croissance et de stérilité (Figure 16).

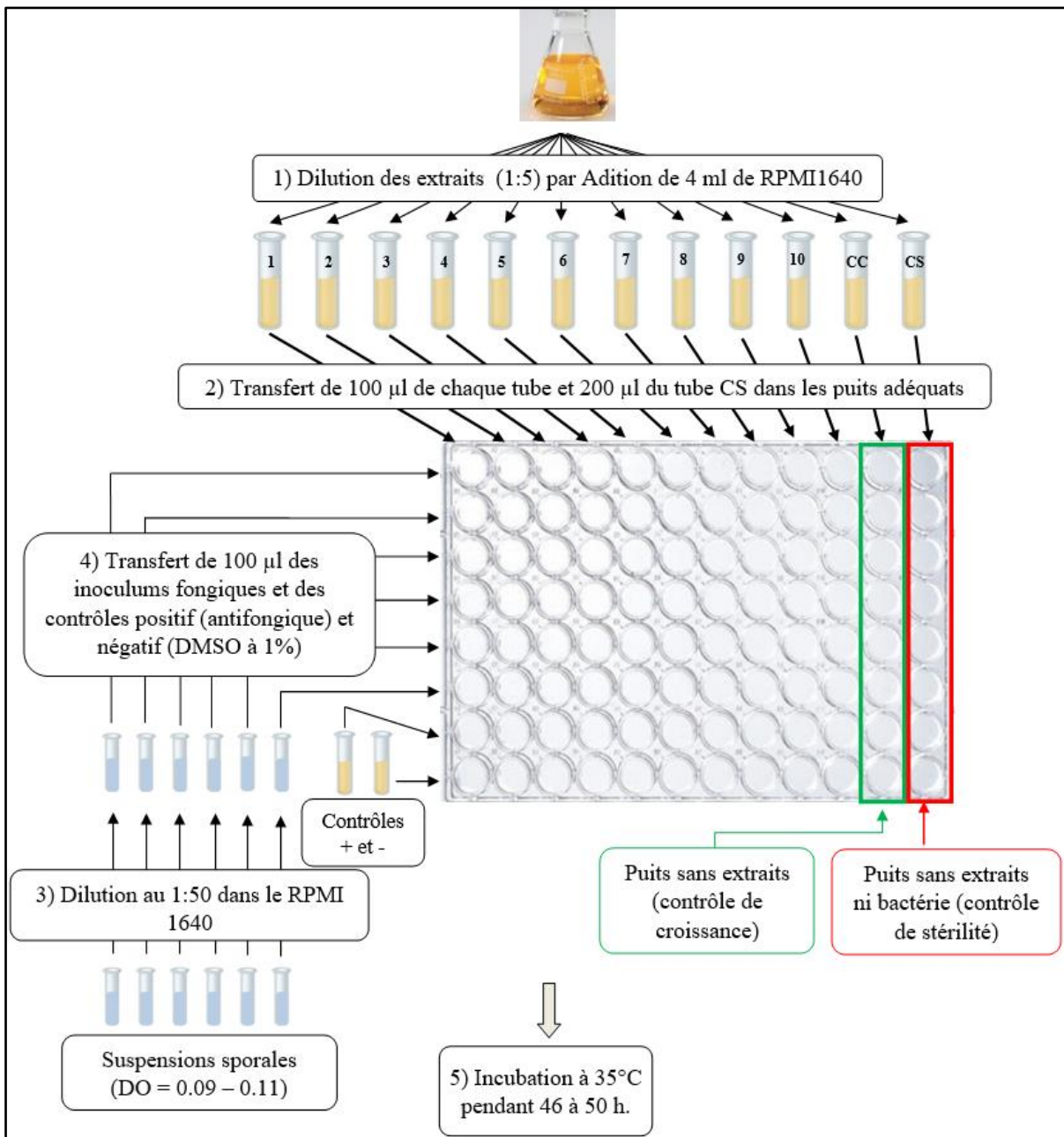


Figure 16. Préparation de la microplaque pour la détermination de la CMF.

Après incubation à 35°C pendant 46 à 50 h, la CMF est déterminée comme étant la plus faible concentration de l'extrait inhibant la croissance du champignon pathogène visuellement en comparants au puit du contrôle de croissance (sans extraits).

II.16. Cinétique de létalité

Pour déterminer l'effet bactéricide ou bactériostatique des différents extraits fongiques, une cinétique de létalité a été réalisée contre deux bactéries pour chaque extrait fongique selon le protocole de CLSI (1999) (figure 17), où trois différentes concentrations correspondant à la CMI, CMI×2 et CMI×4 pour les isolats MPR1, JPF2 et TBT10, et CMI/2,

CMI et CMIx2 pour l'isolat TBT7 ont été préparées dans trois tubes contenant du MHB. Une suspension bactérienne a été transférée dans tous les tubes afin d'obtenir un inoculum final de 5×10^5 UFC / mL. Un quatrième tube ne contenant pas d'extrait a été utilisé comme témoin de croissance. Des prélèvements de 100 μ L ont été faits à Temps 0, et après incubation de 1, 2, 3, 4, 6, 12 et 24 heures à 37°C, dilués et étalés sur du MHA. Les colonies poussant après 24 d'incubation à 37°C sur les boîtes ont été comptées.

Une courbe (\log_{10} UFC /mL par rapport au temps) a été établie pour chaque concentration d'extrait et le contrôle, un pourcentage de létalité a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de létalité} = [(V_0 - V_z)/V_0] \times 100$$

V_0 : Le nombre de cellules viables à T0.

V_z : Le nombre de cellules viables à Tz.

Les extraits sont considérés comme bactéricides, lorsque le pourcentage de létalité atteint 99.99% après 24 heures de contact.

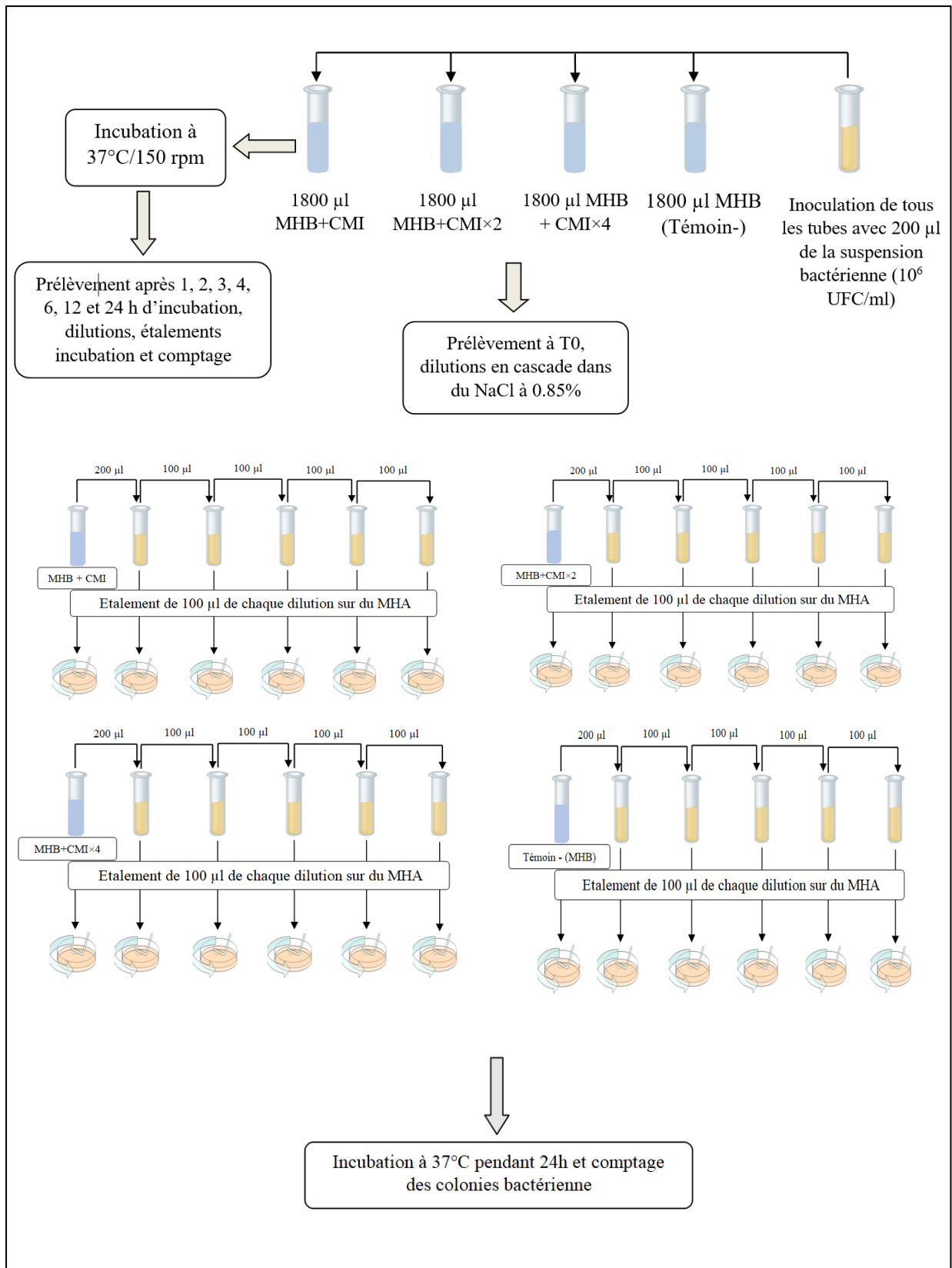


Figure 17. Les étapes de la cinétique de létalité.

II.17. Activité antioxydante

La détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes ainsi que l'activité antioxydante par différentes méthodes *in vitro* des extraits des isolats fongiques MPR1, JPF2, CAR11, TBT7 et TBT10 ont été réalisées.

II.17.1. Détermination de la teneur totale en composés phénoliques

La méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Tan *et al.*, (2017) a été utilisée en y apportant quelques modifications pour déterminer la teneur totale en composés phénoliques.

50 µL des extraits (1mg/mL), du contrôle positif (acide gallique) ou du témoin négatif (DMSO) ont été mélangés à 250 µL du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau ultra pure. Après 4 minutes, 250 µL d'une solution saturée de carbonate de sodium (75 g/L) (Na_2CO_3) ont été ajoutés. Les solutions ont été incubées à température ambiante dans l'obscurité pendant 2 heures et l'absorbance a été lue à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (annexe 2) établie avec l'acide gallique (0-160 µg/mL) et est exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG / mg d'extrait).

II.17.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des extraits fongiques ont été déterminées spectrophotométriquement selon la méthode de Danagoudar *et al.*, (2017), où 100 µL de chaque extrait (1mg/mL) ou du standard (quercétine (1mg/mL)) ont été ajoutés à 100 µL de chlorure d'aluminium (AlCl_3) (2% dans le méthanol); après 15 minutes de réaction, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage (annexe 2) établie avec la quercétine (0-40 µg/mL) et est exprimée en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

II.17.3. Activité de piégeage du radical DPPH

Le test de piégeage des radicaux DPPH a été réalisé selon le protocole de Marson Ascêncio *et al.*, (2014) avec quelques modifications, où 50 µL des différentes concentrations des extraits fongiques (1.5 à 3072 µg/mL) ainsi que le contrôle (méthanol), ont été mixées avec 100 µL d'une solution méthanolique de DPPH (0.004% ou 0.1 mM). Après une agitation

et une incubation à l'obscurité pendant 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. L'acide ascorbique a été utilisé en tant que standard.

Le pourcentage de l'activité antiradicalaire a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du contrôle

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'extrait fongique

Pour chaque extrait ainsi que pour l'acide ascorbique, La concentration ayant la capacité de piéger 50% du radical DPPH (IC_{50}) a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extraits ou d'acide ascorbique.

II.17.4. Capacité de piégeage du radical libre cationique ABTS^{•+}

L'activité antioxydante des différents extraits fongiques a été mesurée suivant le protocole de Banothu *et al.*, (2017). En premier lieu, le radical ABTS^{•+} est formé par arrachement d'un électron à l'ABTS en mélangeant 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2.45 mM d'une solution de persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), après une incubation de 12 à 16 heures à température ambiante, une dilution de cette solution a été faite dans un mélange d'eau et d'éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0.7 ± 0.02 à 734 nm.

En deuxième lieu, et en présence de l'antioxydant, qui vas donner un H et transformer l'ABTS^{•+} en ABTS, 50 μ L des extraits fongiques à différentes concentrations (1.5 à 3072 μ g/mL), du méthanol (contrôle) et de l'acide ascorbique (standard) ont été mélangés à 1 mL de la solution d'ABTS^{•+}. Après agitation, la mixture a été incubée à une température ambiante pendant 10 min, l'absorbance a été lue à 734 nm.

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical d'ABTS^{•+} en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du contrôle

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'extrait fongique

Les IC₅₀ ont été calculées par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'extraits ou d'acide ascorbique.

II.17.5. Activité antioxydante réductrice du fer (FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power)

Ce test a été réalisé en utilisant la méthode décrite par Govindappa *et al.*, (2011) avec quelques modifications. Un réactif de FRAP a été préparé en mélangeant 25 mL d'une solution de tampon d'acétate de sodium (300 mM, pH 3.6), 2.5 mL d'une solution de TPTZ (10 mM dans 40 Mm/L de HCl) et 2.5 mL d'une solution aqueuse de chlorure de fer (FeCl₃) (20 mM).

Un volume de 150 µL des extraits à différentes concentrations (1.5 à 3072 µg/mL) dissous dans le méthanol a été ajouté à (4.5 mL) du réactif de FRAP. L'absorbance a été lue après 30 min d'incubation à l'obscurité à 593 nm, en utilisant une solution fraîche du réactif de FRAP comme blanc.

Une courbe d'étalonnage du sulfate ferreux (FeSO₄) (100-1000µmol/L) a été utilisée (annexe 2) pour calculer les valeurs FRAP des extraits, exprimés en µmol Fe²⁺/mg d'extrait, celles-ci ont été comparées à celle de l'acide ascorbique.

II.18. Activité antiproliférative des extraits fongiques

L'évaluation de l'activité antiproliférative des extraits fongiques des isolats MPR1, JPF2, TBT7 et TBT10 sur les cellules HepG2 a été réalisée selon le protocole de Mosman, (1983).

100 µL du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL streptomycine, et contenant des cellules à une concentration de 5. 10⁴/mL sont transférés dans les puits des microplaques de 96 puits. Après une incubation à 37°C et 5% de CO₂ pendant 24 heures, 100 µL du milieu contenant les diverses concentrations des extraits et des contrôles appropriés (DMSO et doxorubicine) ont été ajoutés et les plaques incubées à 37°C et 5% de CO₂. Après 72 heures d'incubation, le milieu contenu dans les puits a été aspiré et remplacé par 100 µL d'une solution de 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) à 5 mg/mL. Après une incubation à 37°C et 5% de CO₂ pendant 2 heures, la solution de MTT a été remplacée par 100 µL de DMSO et l'absorbance mesurée à 570 nm. Le DMSO a été utilisé comme blanc.

Le pourcentage de survie est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de survie} = (A_{\text{échantillon}}/A_{\text{contrôle}}) \times 100$$

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'extrait fongique

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du contrôle

Les données générées ont été utilisées pour tracer une courbe de dose-réponse dont la concentration en extrait requise pour tuer 50% de la population cellulaire (CC_{50}) a été déterminée.

Selon les résultats obtenus dans ce test préliminaire, les extraits ayant eu des valeurs de CC_{50} basses, ont été testé contre d'autres lignées cellulaires cancéreuses A549, U251 et MDA-MB 231, contrairement aux extraits présentant des valeurs de CC_{50} relativement élevées ont été testé sur deux cellules saines HaCaT et C8-D1A pour évaluer leurs pouvoir cytotoxique suivant le même protocole décrits ci-dessus sauf que pour les lignées cellulaires U251 et HaCaT, le milieu Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) a été utilisé.

II.19. Criblage de la production du L-asparaginase par les champignons endophytes

Pour sélectionner les isolats fongiques produisant du L-asparaginase, les isolats MPR1, JPF2, CAR11, TBT7 et TBT10 ont subis un criblage préliminaire, pour cela le milieu Czapek Dox's agar modifié (McDox), supplémenté du L-asparagine (10mg/L) et 0.3 mL d'une solution de rouge de phénol à 2.5% préalablement stérilisés par filtration a été utilisé, un disque de 6 mm de chaque champignon endophyte a ensuite été inoculés sur ce milieu. Ses boîtes de Pétri ainsi que des boîtes non inoculées servant de contrôle ont été incubées à $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 5 jours. Les diamètres des colonies fongiques ainsi que ceux des zones de couleur rose autours des colonies ont été mesurés afin de calculer l'indice enzymatique (El-Gendy *et al.*, 2017).

$$\text{Index Enzymatique} = \frac{\text{Diamètre de la zone rose}}{\text{Diamètre de la colonie}}$$

II.20. Estimation de l'enzyme L-asparaginase chez les isolats producteurs

Les isolats ayant donné un résultat positif au test précédent, ont subi une fermentation dans le milieu liquide McDox pendant 5 jours à 28°C et sous une agitation de 120 rpm.

Dans un tube conique, on a mélangé 1 mL de l'extrait fongique (enzyme brute), 0.5 mL de Tris HCl (0.5 M, pH 8.2), 0.1 mL de l'asparagine (0.04 M) et 0.4 mL d'eau distillée stérile ; après une incubation à 37°C pendant 30 minutes, 0.5 mL de l'acide trichloroacétique (1.5 M) sont rajoutés afin de stopper la réaction enzymatique. 0.1 mL de cette mixture ont été prélevés et mis dans un autre tube contenant 3.7 mL d'eau distillée stérile, après cela, 0.2 mL du réactif de Nessler's ont été rajoutés. Après une incubation pendant 20 minutes, la densité optique a été lue à 450 nm.

Pour les blancs, l'enzyme a été ajouté après l'addition de l'acide trichloroacétique. L'ammoniac produit dans la réaction a été déterminé en utilisant une courbe d'étalonnage (annexe 2) obtenue avec le sulfate d'ammonium. Une unité internationale (UI) de L-asparaginase est exprimée comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à la formation de 1 µmol d'ammoniac par minute à 27 ± 2 °C et est calculée comme suit :

$$\text{Enzymes (unités/mL)} = [(\mu\text{mole de NH}_3 \text{ libérés}) \times (2.5)] / [(0.1) \times (30) \times (1)]$$

2.5 = Volume initial de la mixture d'enzyme en mL

0.1 = Volume de la mixture d'enzyme utilisé dans la réaction finale en mL

30 = Temps d'incubation en min

1 = Volume de l'enzyme utilisé en mL (Thirunavukkarasu *et al.*, 2011).

II.21. Analyses statistiques

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont été analysés statistiquement par le test de (One-way ANOVA) suivie de celui de Student-Newman-Keuls multip-rang test en utilisant le logiciel SAS/STAT® 9.2, alors que ceux des différents tests antioxydants et de l'activité asparaginase ont été analysés par One-way ANOVA, suivie du test de Dunnett multiple comparaisons pour les comparaisons avec les standards ou le test de Tukey's pour déterminer les différences significatives entre les groupes en utilisant le logiciel de Graph Pad Prism.V7.00.

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD. Les différences sont considérées statistiquement significatives lorsque $p \leq 0,05$ dans les tests antimicrobiens alors que pour les tests antioxydants, c'est lorsque $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, $p \leq 0.0001$, $p \leq 0.0004$, que les différences sont considérées comme telles.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Isolement et fréquences de colonisation

Un total de 115 isolats fongiques ont été isolés à partir de 360 segments utilisés des 4 plantes sélectionnées, 16 à partir de *Mentha pulegium* L., 26 à partir de *Juniperus phoenicea* L., 43 à partir de *Cedrus atlantica* Man. et 30 isolats à partir de *Taxus baccata*. Les fréquences de colonisation de chaque organe des plantes utilisées sont résumées dans la figure 18 :

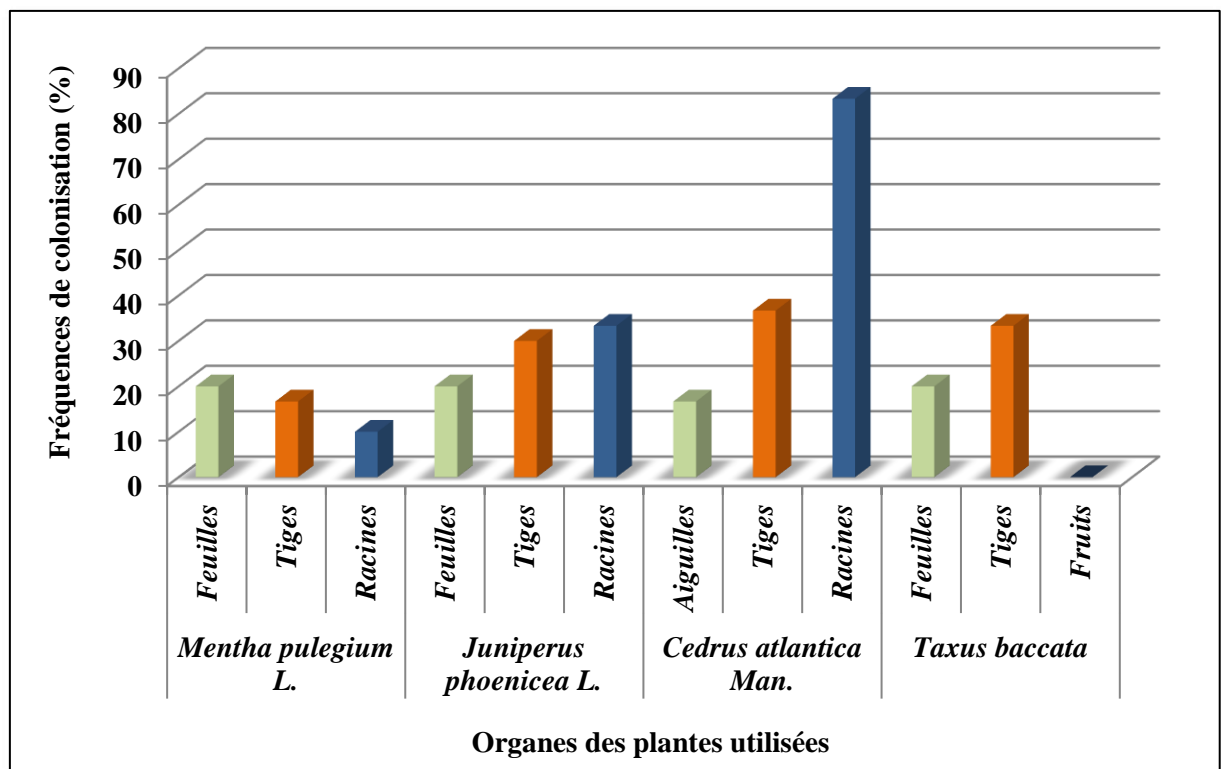


Figure 18. Fréquences de colonisation de chaque organe des différentes plantes utilisées.

Toutes les parties des 4 plantes utilisées pendant l'isolement étaient colonisées par les champignons endophytes sauf les fruits de *Taxus baccata* où seuls les feuilles et les tiges étaient colonisées avec des pourcentages de colonisation de 20 % et 33.33 % respectivement. Cette absence de champignons endophytes dans les fruits peut être due soit à l'insuffisance de nutriments par rapport aux autres compartiments ou à la présence d'inhibiteurs ne permettant pas la colonisation de cette partie par les endophytes (Tuppad et Shishupala, 2013).

Chez *Juniperus phoenicea* L. et *Cedrus atlantica* Man., les pourcentages de colonisation des racines (33.33% et 83.33 %) respectivement, étaient plus élevés par rapport à ceux observés pour les parties aériennes. Des résultats concordant avec ceux obtenus par

Wearn *et al.*, (2012) où les racines des trois plantes utilisées étaient plus colonisées que leurs feuilles, ainsi que ceux obtenus par Park *et al.*, (2017) qui ont également isolé plus de champignons endophytes à partir des racines de *Panax ginseng* Meyer que de ces tiges et feuilles et ont expliqué ceci par la diversité et la richesse du sol en champignons, ainsi que par l'abondance des nutriments que contiennent les racines par rapport aux autres organes.

Contrairement aux deux premières plantes (*Juniperus phoenicea* L. et *Cedrus atlantica* Man.), les feuilles de *Mentha pulegium* L. étaient plus colonisées avec un pourcentage de colonisation de 20 % que les tiges (16,67 %) et des racines (10 %). Ce dernier cas a été observé avec les champignons endophytes isolés à partir de *Tephrosia purpurea* par Luo *et al.*, (2015); où le taux de colonisation était plus élevé dans les feuilles (66,95%), suivie des tiges (37,50%) et des racines (26,92%), ainsi qu'avec les résultats de (Kharwar *et al.*, 2011) et (Wu *et al.*, 2019) qui expliquent ces résultats par la nature des tissus des feuilles, leur grande surface donnant une plus grande chance aux spores de s'adhérer ainsi que par la présence de stomates facilitant l'accès aux champignons endophytes.

La différence dans la distribution des champignons endophytes dans les différentes parties de plantes est déterminée par plusieurs facteurs, et peut être expliquée par : (1) la différence de structure et de la composition chimique des différents organes, ce qui reflète la spécificité du tissu des endophytes (Yu *et al.*, 2018). (2) par la capacité du champignon endophyte à produire certaines enzymes et à résister à certaines molécules chimiques de son hôte lui permettant de coloniser une partie de la plante et pas une autre (Sim *et al.*, 2010). (3) par les conditions environnementales telles que l'altitude, l'humidité, les précipitations, la température, la pollution, etc. (Li *et al.*, 2012). (4) Par l'âge de la plante; plus l'hôte est âgé, plus il est soumis à des infections répétées et plus son état physiologique ainsi que la structure de son écorce sont modifiés et plus l'invasion fongique est grande (Zheng *et al.*, 2016).

Selon (Sun et Guo, 2012 ; Strobel, 2018) tous les organes de toutes les plantes étudiées jusqu'à maintenant (fougères, herbes, arbustes, arbres à feuilles caduques et conifères, lichens, etc.) étaient colonisés par des champignons endophytes. Dans ce contexte, la plante *Mentha pulegium* L. n'a été étudiée qu'une seule fois par Debbab *et al.*, (2009) et Teiten *et al.*, (2013), et a permis l'isolement d'un champignon endophyte *Stemphylium globuliferum* ainsi que ses molécules anticancéreuses. En ce qui concerne *Juniperus phoenicea* L. aucune étude n'a été faite dans le but d'isoler les champignons endophytes. Cependant, d'autres espèces du genre *Juniperus* ont permis l'isolement de ces derniers, telles que *Juniperus procera* (Gherbawy et Elhariry, 2016), *Juniperus recurva* (Kour *et al.*, 2008) et

Juniperus communis L. (Kusari *et al.*, 2009). La diversité des champignons endophytes de *Cedrus atlantica* Man. n'a été étudié qu'une seule fois par Bensaci *et al.*, (2015) qui ont isolé et étudié la diversité des champignons endophytes de *Cedrus atlantica* dans le massif de Belezma en Algérie, alors que les champignons endophytes de *Taxus baccata* ont fait l'objet de plusieurs études tels que (Jam Ashkezari et Fotouhifar, 2017) en Iran, (Tayung et Jha, 2010) en Inde, au Mexique (Rivera-Orduña *et al.*, 2011), etc. Cependant en Algérie, cela n'a pas encore pas été étudié.

III.2. Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne

Un criblage préliminaire de tous les champignons endophytes isolés contre quatre bactéries pathogènes, une levure et un dermatophyte a été réalisé sur milieu solide afin de sélectionner les isolats fongiques potentiellement actifs. Ce criblage nous a permis de sélectionner à partir des 115 champignons endophytes testés, sept isolats ayant une importante activité antimicrobienne (tableau 5 et 6).

Tableau 5. Résultats du criblage préliminaire contre les bactéries pathogènes

Isolats fongiques	Zones d'inhibition (mm)			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i> 1	<i>E. coli</i> 1	<i>P. aeruginosa</i> 1
<i>Mentha pulegium</i> L.				
MPR1	33.5	31.5	47.5	16.5
<i>Juniperus phoenicea</i> L.				
JPF2	17	18	0	0
JPF3	19	19	0	0
JPF4	16	17	0	0
<i>Cedrus atlantica</i> Man.				
CAR11	18	11	17	0
<i>Taxus baccata</i>				
TBT7	10	17	0	0
TBT10	15.5	30	13.5	0

Tableau 6. Résultats du criblage préliminaire contre les dermatophytes.

Isolats fongiques	Zones d'inhibition (mm)		Pourcentages d'inhibition (%)	
	<i>C. albicans</i>		<i>M. canis</i>	
<i>Mentha pulegium L.</i>				
MPR1	11		79.46	
<i>Juniperus phoenicea L.</i>				
JPF2	0		40.21	
JPF3	0		32.50	
JPF4	0		42.00	
<i>Cedrus atlantica Man.</i>				
CAR11	0		0	
<i>Taxus baccata</i>				
TBT7	0		43.69	
TBT10	0		16.15	

Parmi ces champignons actifs, on trouve l'isolat MPR1 isolé à partir de *Mentha pulegium L.*, il présentait une activité contre tous les microorganismes pathogènes utilisés avec des zones d'inhibition atteignant les 47.5 mm contre *E. coli*, et des pourcentages d'inhibition des dermatophytes atteignant les 79.46 % observé contre *M. canis*. MPR1 est le seul isolat présentant une activité contre *C. albicans* (11 mm).

A partir de *Juniperus phoenicea L.*, 3 isolats ont été sélectionnés JPF2, JPF3 et JPF4, ils présentaient tous une activité uniquement contre les bactéries à Gram positif avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 19 mm obtenues par l'isolat JPF3. ils étaient également actifs contre *M. canis* avec des pourcentages d'inhibition atteignant les 42.00 % observés avec l'isolat JPF4.

Un seul isolat, CAR11 a été sélectionné à partir de *Cedrus atlantica Man.* il présentait une activité contre les bactéries à Gram positif, ainsi que contre *E. coli* (17 mm). Cet isolat n'a montré aucune activité antifongique.

A partir de la dernière plante *Taxus baccata*, deux isolats ont été sélectionnés, TBT7 et TBT10, les deux étaient actifs contre les bactéries à Gram positif ainsi que contre *M. canis*,

cependant TBT10 était également actif contre *E. coli* avec une zone d'inhibition de 13,5 mm de diamètre.

Quelques zones d'inhibition obtenues contre les bactéries pathogènes sont représentées dans la figure 19.

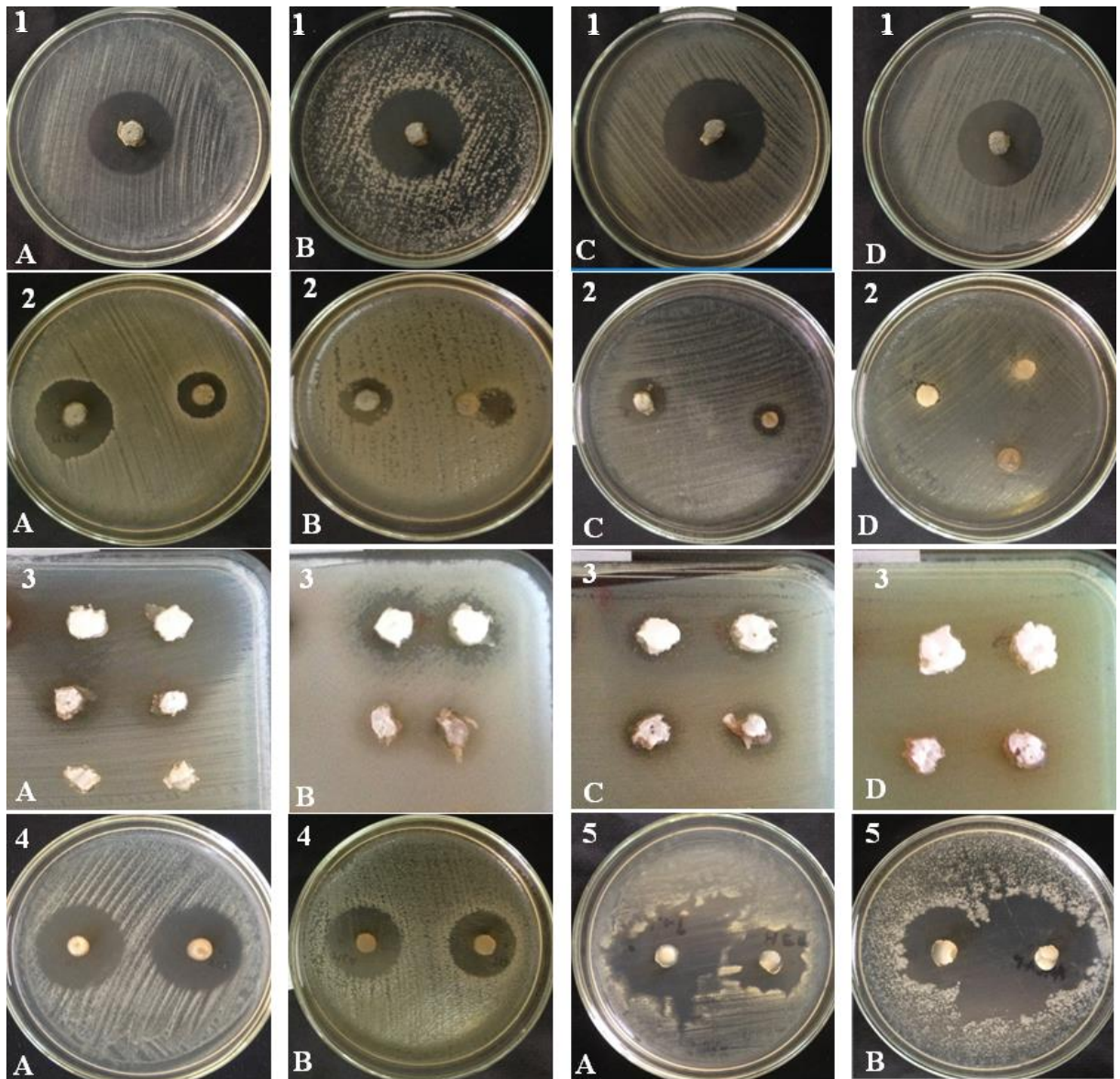


Figure 19. Zones d'inhibition obtenues lors du criblage préliminaire. (A): *S. aureus* 1, (B): *B. cereus*, (C): *E. coli* 1, (D): *P. aeruginosa* 1, (1): L'isolat MPR1, (2): L'isolat CAR11, (3): L'isolat TBT10, (4): L'isolat JPF2, (5): L'isolat TBT7.

Une des plus importantes propriétés des champignons endophytes est la production d'une grande variété de molécules bioactives inhibant une large gamme de microorganismes pathogènes. Ce criblage permet une sélection rapide et qualitative des champignons endophytes actifs (Santos *et al.*, 2015).

L'antagonisme contre les bactéries se traduit par une diffusion des molécules bioactives préalablement secrétées par les champignons endophytes et présentes dans les disques vers l'agarensemencés avec les bactéries tests, produisant ainsi des zones d'inhibition (Balouiri *et al.*, 2016). Contre les champignons, l'antagonisme se traduit soit par : (1) diffusion des molécules bioactives (antifongique, enzymes lytiques) (Talapatra *et al.*, 2017). (2) mycoparasitisme (interaction directe et une pénétration des hyphes de l'endophyte entre celles du pathogène), ou (3) compétition (La croissance rapide de l'endophyte au dépend de celle du champignon pathogène) (Aramsirujwet *et al.*, 2016).

Plusieurs études ont permis l'isolement de plusieurs champignons endophytes et la détermination de leurs activités antimicrobiennes sur milieu gélosé. (Chowdhary et Kaushik, 2018) ont montré l'activité antagoniste contre des champignons phytopathogènes de 12% des champignons endophytes isolés à partir de *Mentha piperita*. Douze champignons endophytes isolés à partir de l'écorce de *Cinnamomum mercadoi* étaient tous actifs contre au moins une des quatre bactéries pathogènes utilisées dans notre étude (Marcellano *et al.*, 2017).

III.3. Identification des champignons endophytes

Les champignons endophytes actifs sélectionnés précédemment après criblage préliminaire de leur activité antimicrobienne ont subi une identification au Maldi-Tof MS. Cependant, par manque de spectres de champignons environnementaux dans les bases de données utilisées aucune identification n'a été obtenue sauf pour l'isolat MPR1 qui a été identifié comme étant un *Penicillium griseofulvum*.

Les résultats obtenus après l'identification morphologique et moléculaire sont résumés ci-dessous :

III.3.1. Isolat MPR1

- Colonie à Thalle à croissance moyenne (31 mm sur PDA et 32.5 mm sur MEA après une incubation de 7 jours à 28°C).
- Sur PDA, les colonies sont poudreuses, fasciculées, formées d'une alternance de couleur beige et vert grisâtre, avec des marges blanches, des exsudats incolores, et un revers de couleur crème à beige.
- Sur MEA, les colonies sont brunes orangées avec des marges blanches, des exsudats orangés à marrons et un revers de couleur jaunâtre au centre et gris pâles aux marges.
- Conidiophore tetraverticillé divergent, des phialides et métules cylindriques et courts.
- Conidies elliptiques et lisses (figure 20).

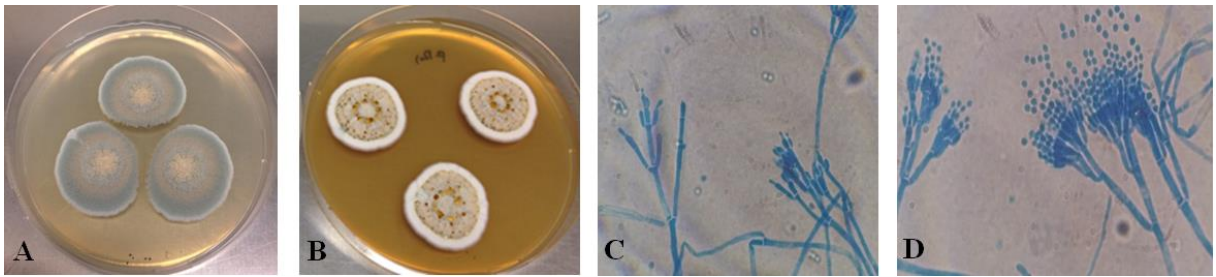


Figure 20. Morphologie de l'isolat MPR1. (A): Colonie sur PDA, (B): Colonie sur MEA, (C-D): Aspect microscopique au microscope optique (Grossissement x100).

Le séquençage des différentes régions de l'ADN (ITS et β -tubuline) de l'isolat MPR1 a confirmé l'appartenance de ce dernier au genre *Penicillium* et a permis d'approfondir l'identification jusqu'au niveau de l'espèce. Lors du blast de la séquence d'ITS, un pourcentage de similarité de 100% a été obtenu avec plusieurs espèces de *Penicillium* alors qu'en blastant la séquence de β -tubuline, l'espèce la plus proche était *Penicillium griseofulvum* NRRL 2300 avec un pourcentage de similarité de 98.84% (tableau 7). L'arbre concaténé (figure 21) a confirmé l'appartenance de l'isolat MPR1 à l'espèce *Penicillium griseofulvum*, où il a formé un seul clade avec cette espèce (bootstrap de 100%).

Plusieurs études ont déjà permis l'isolement de l'espèce *Penicillium griseofulvum* à partir de plusieurs plantes telles que *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* (Rui *et al.*, 2016), *Tephrosia purpurea* (Luo *et al.*, 2015), *Palicourea tetraphylla* Cham. & Schltdl (Rosa *et al.*, 2010) et 8 plantes médicinales des forêts de l'inde (D'Souza et Hiremath, 2015). Cependant, cette espèce n'a jamais été isolée à partir de *Mentha pulegium* L.

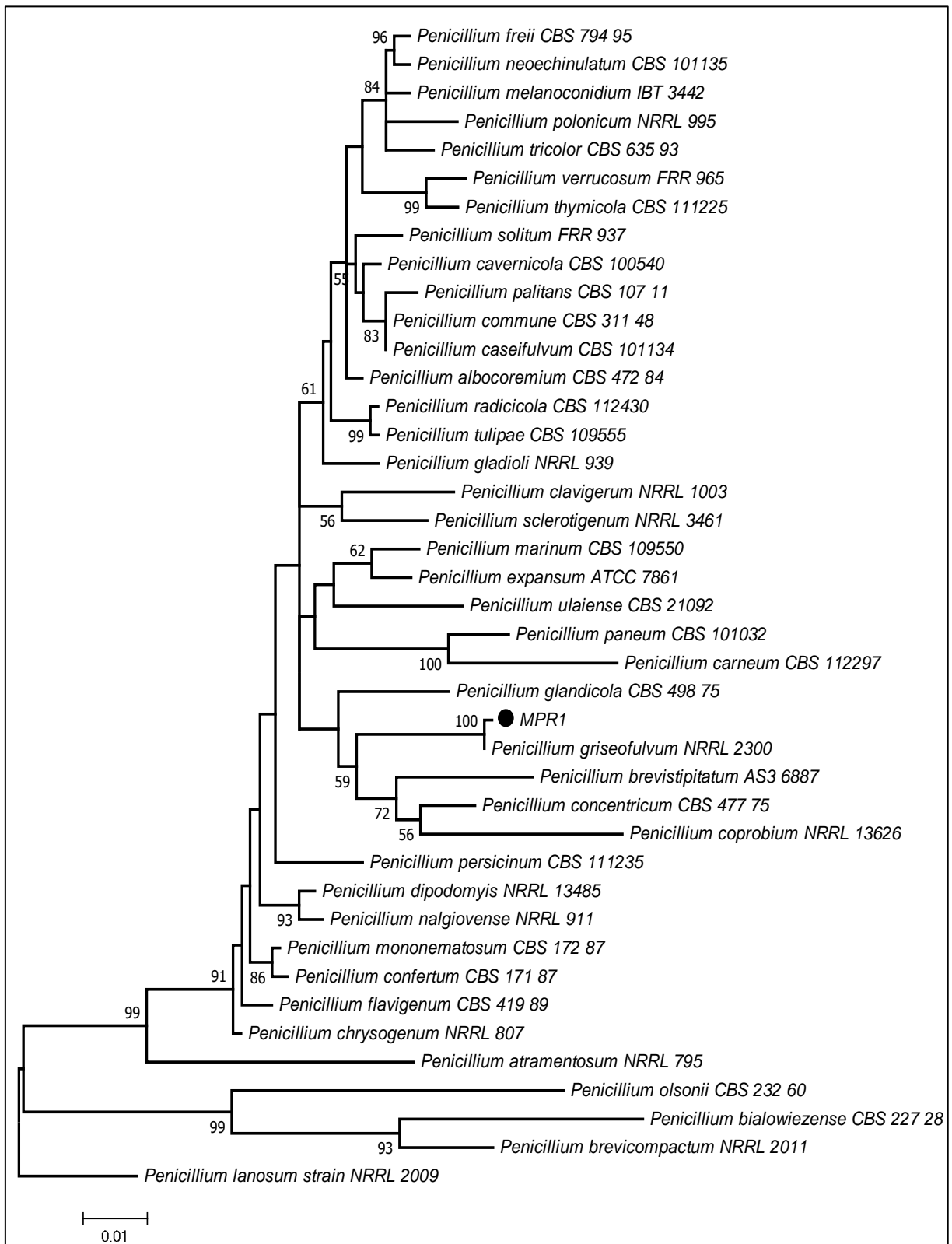


Figure 21. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l'analyse des séquences des régions ITS et β -tubuline produit par l'analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences de l'isolat MPR1 et celles des espèces les plus proches répertoriées sur NCBI. Les taux du « bootstrap » du ML (exprimés en pourcentage de 1000 répliquations), supérieur à 50% sont représentés au niveau des nœuds. L'arbre est enraciné avec *Penicillium lanosum* NRRL 2009.

III.3.2. Isolats JPF2, JPF3 et JPF4

- Colonies cotonneuses, avec un mycélium aérien.
- Sur PDA, leur couleur est blanche à brune avec un revers de couleur brun foncé au centre et beige aux marges. Leur croissance est lente avec 18 mm pour JPF2 et rapide avec 36 mm pour JPF3 et JPF4 après 7 jours d'incubation à 28°C.
- Les colonies sur MEA sont plus foncées avec un revers beige à marron clair et une croissance moins rapide (14 pour JPF2 et 25 pour JPF3 et JPF4) que sur PDA.
- Production de pigments marron diffusibles dans le milieu, se fonçant avec l'âge, pas de production d'exsudats.
- Mycélium cloisonné granulé, la région conidiogène simple ou à deux branches.
- Conidies solitaires ellipsoïdales et granuleuses (figure 22).

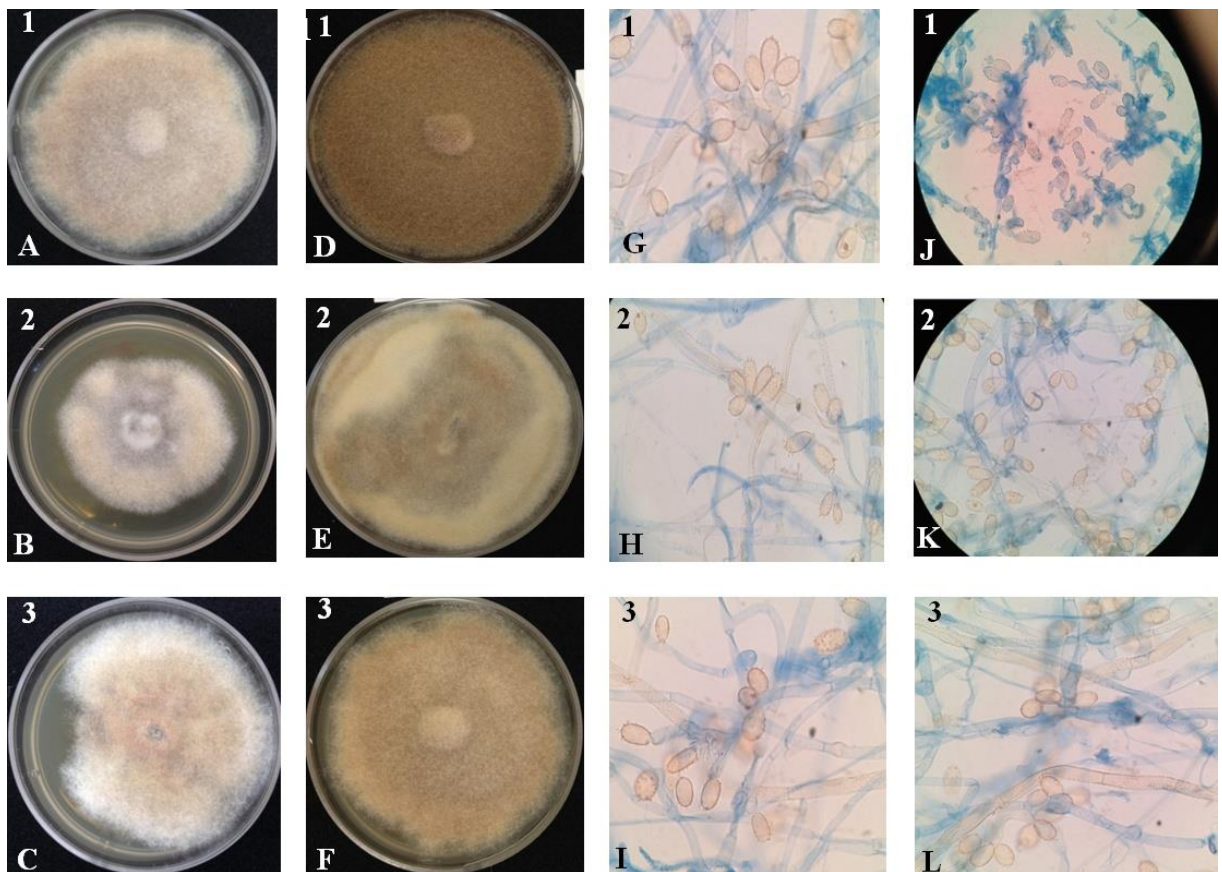


Figure 22. Morphologie des isolats JPF2(1), JPF3(2) et JPF4(3). (A-C): Colonies sur PDA, (D-F): Colonies sur MEA, (G-L): Aspect microscopique au microscope optique (Grossissement x100) respectivement.

Le blast sur NCBI des séquences obtenues après séquençage a montré une grande homologie avec l'espèce *Miconematobotrys verrucosus* E13-2151 avec des pourcentages de similarité de 99,77 (JPF3 et JPF4) et de 99,78 % (JPF2) pour la région ITS, et de 98.87%

(JPF3 et JPF4) et 99.18% (JPF2) pour la région LSU (tableau 7). L'arbre phylogénétique des séquences combinées (ITS, LSU) (figure 23) a confirmé l'appartenance des 3 isolats JPF2, JPF3 et JPF4 au genre *Micronematobotrys* qui formaient avec l'espèce *Micronematobotrys verrucosus* un clade séparé de celui du genre le plus proche *Smardaea australis* PSC3637 avec une valeur du bootstrap de 78%. Cependant, dans ce clade deux subclades se distinguaient séparant les isolats JPF2, JPF3 et JPF4 de celles de l'espèce *Micronematobotrys verrucosus* avec une valeur du bootstrap assez élevé de 70%. Cette analyse conforte la position de JPF2, JPF3 et JPF4 en tant que nouvelle espèce dans le genre *Micronematobotrys*, ce qui concorde avec les petites différences morphologiques observées entre nos isolats et celles de l'espèce *Micronematobotrys verrucosus*.

L'espèce *Micronematobotrys verrucosus* est une nouvelle espèce appartenant à un nouveau genre, elle a été décrite et isolée en tant que champignon endophyte à partir de *Quercus liaotungensis* et *Ulmus macrocarpa* pour la première fois en 2010 par (Sun et Guo, 2010). Notre étude est la deuxième à avoir isolé une nouvelle espèce appartenant à ce genre, et la première à l'avoir isolé partir de *Juniperus phoenicea* L.

Etant donné que les trois isolats JPF2, JPF3 et JPF4, appartiennent à la même espèce, on a poursuivi le reste des travaux sur un seul isolat qui est JPF2.

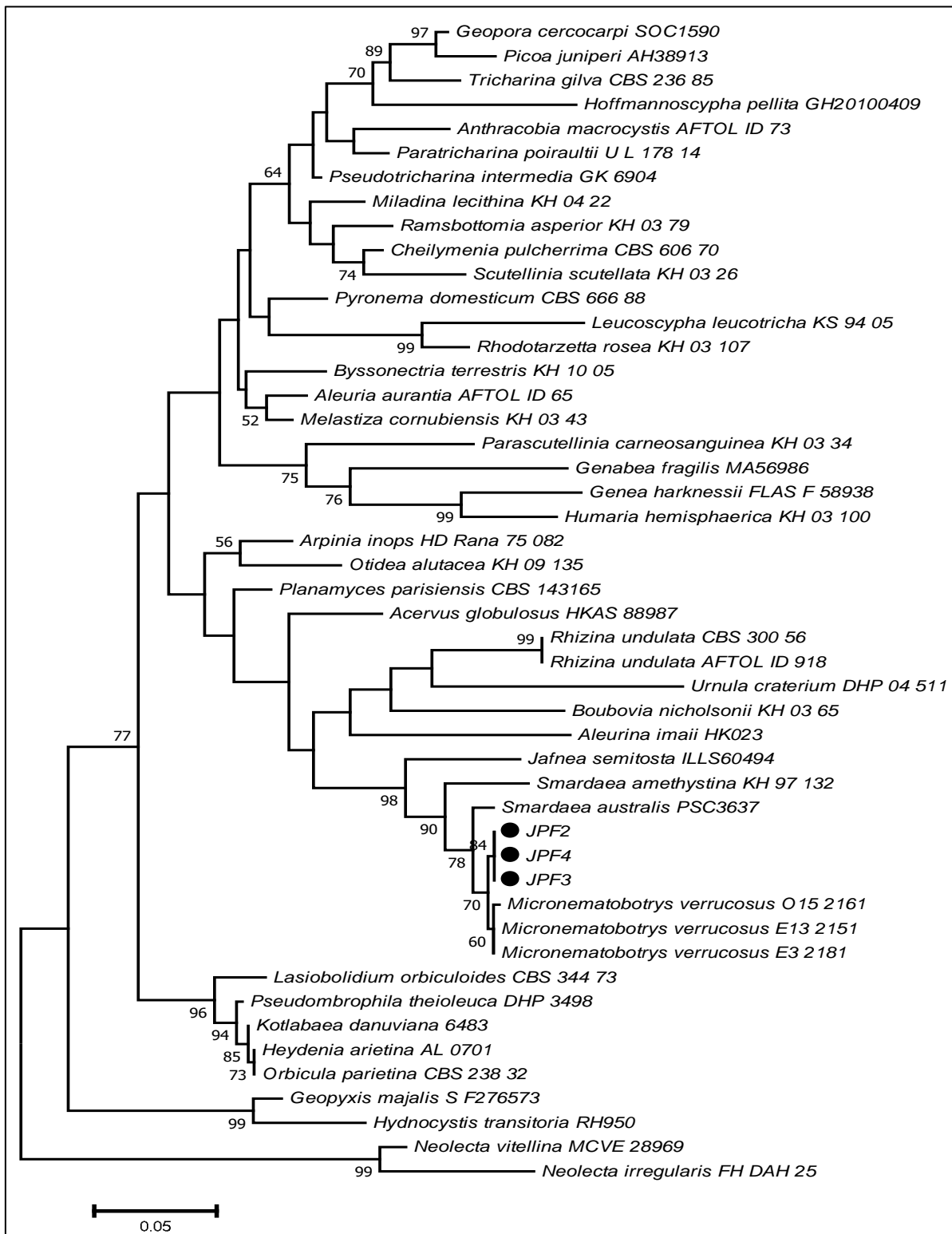


Figure 23. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l'analyse des séquences des régions ITS et LSU produit par l'analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences des isolats JPF2, JPF3 et JPF4 et celles des espèces les plus proches appartenant à la famille des Pyronemataceae répertoriées sur NCBI. Les taux du « bootstrap » du ML (exprimés en pourcentage de 1000 répliques), supérieur à 50% sont représentés au niveau des nœuds. L'arbre est enraciné avec *Neolectavitellina* MCVE 28969 et *Neolectairregularis* FH DAH 25.

III.3.3. Isolat CAR11

- Colonie veloutée, surélevée à thalle à croissance lente (26 mm sur PDA et 19 mm sur MEA après une incubation de 7 jours à 28°C).
- Sur PDA, le centre de la colonie est blanc avec des marges blanches, en vieillissant le centre devient vert et les marges blanches, exsudats incolores à beiges et une pigmentation marron du milieu avec un revers de couleur rougeâtre.
- Les colonies sont blanches, sans exsudats avec un revers jaunâtres au centre et des marges blanches sur le MEA.
- Conidiophore biverticillé, phialides et métules cylindriques.
- Conidies globuleuses et lisses (figure 24).

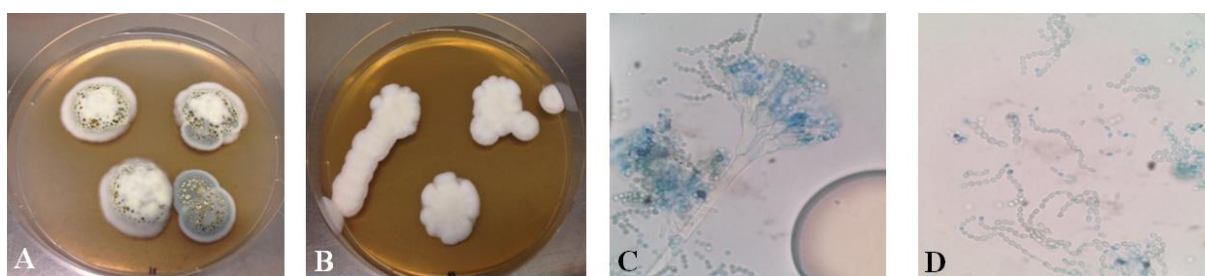


Figure 24. Morphologie de l'isolat CAR11. (A): Colonie sur PDA, (B): Colonie sur MEA, (C-D): Aspect microscopique au microscope optique (Grossissement x100).

Lors du blast de la séquence d'ITS, un pourcentage de similarité de 99.83% a été obtenu avec plusieurs espèces de *Penicillium* alors qu'en blastant la séquence de β -tubuline, l'espèce la plus proche était *Penicillium canescens* FMR 15028 avec un pourcentage de similarité de 100% (tableau 7). L'arbre concaténé (figure 25) a confirmé l'appartenance de cet isolat à l'espèce *Penicillium canescens*, où il a formé un seul clade avec cette espèce (bootstrap de 85%).

L'espèce *Penicillium canescens* a été précédemment isolée en tant qu'endophyte à partir de différentes plantes tels que *Salvadora oleoides* (Korejo *et al.*, 2014), et *Olea europaea* cv. Cobrançosa (Malhadas *et al.*, 2017).

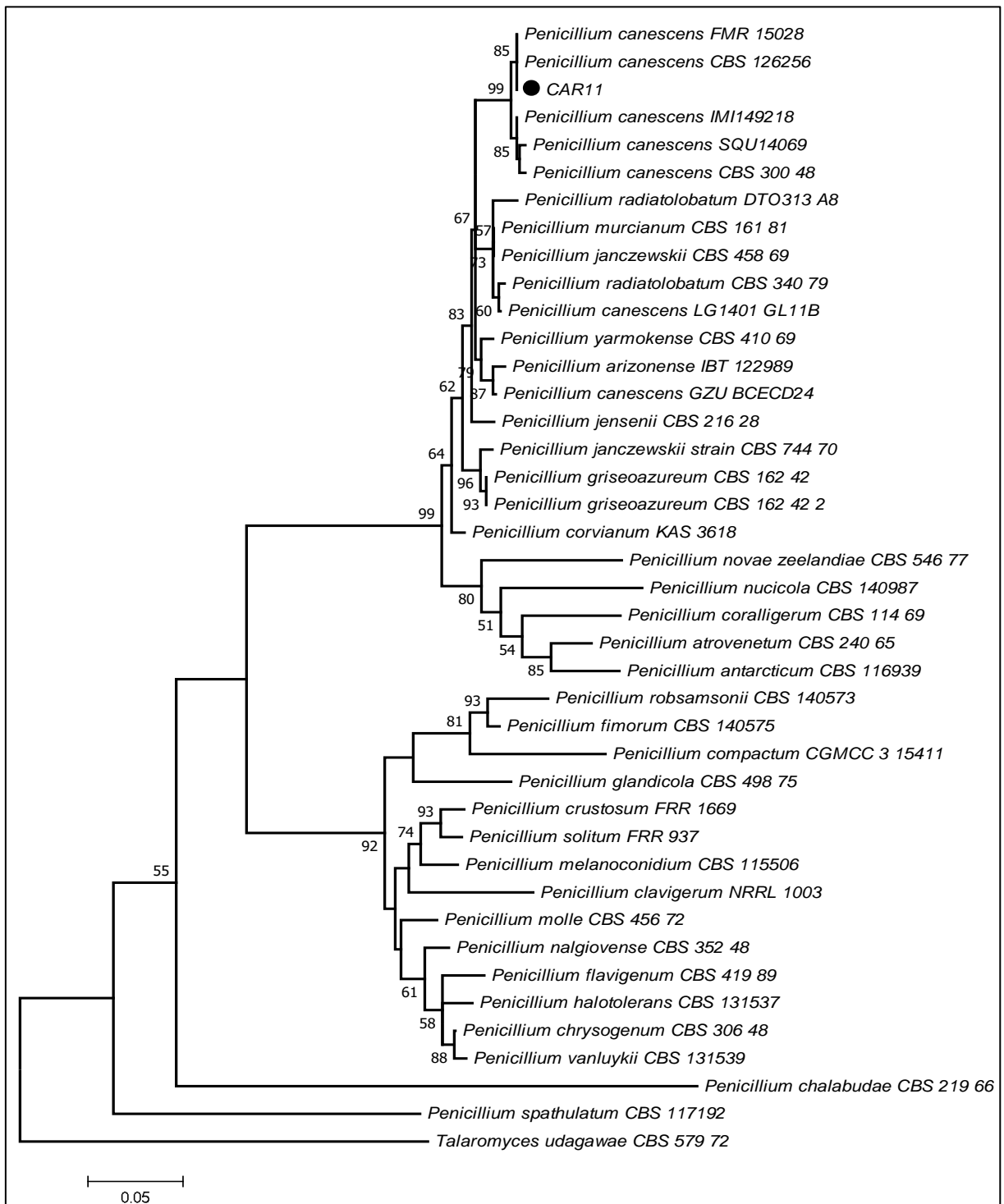


Figure 25. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l'analyse des séquences des régions ITS et β -tubuline produit par l'analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences de l'isolat CAR11 et celles des espèces les plus proches répertoriées sur NCBI. Les taux du « bootstrap » du ML (exprimés en pourcentage de 1000 réplifications), supérieur à 50% sont représentés au niveau des nœuds. L'arbre est enraciné avec *Talaromyces udagawae* CBS 57972.

III.3.4. Isolat TBT7

- Thalle à croissance très lente (31mm sur PDA et 21mm sur MEA après 21 jours d'incubation à 28°C)
- Colonies avec deux types de mycélium, un du substrat et un autre aérien très dense, compact et dur, difficilement prélevable.
- Sur PDA, le centre de la colonie est rose claire, le reste est crème avec des taches brunâtres et un revers de couleur beige.
- Sur MEA la colonie est marron avec une marge plus claire, le revers est marron à beige.
- Conidiophore hyaline, lisse et ramifié.
- Les conidies sont lisses et solitaires immergeant du conidiophore ou s'élevant latéralement à partir de cellules conidiogènes directement à partir du mycélium (figure26).

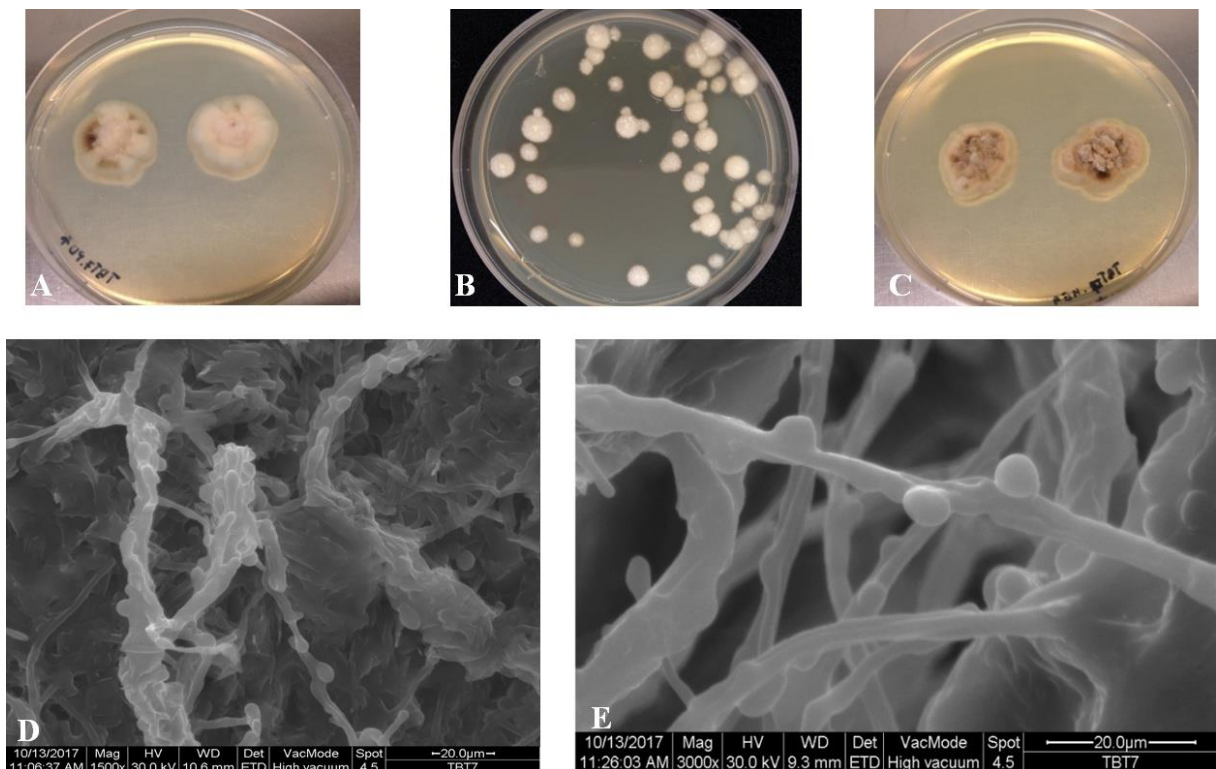


Figure 26. Morphologie de l'isolat TBT7 (Forme asexuelle). (A-B) : Colonie sur PDA, (C) : Colonie sur MEA, (D-E) : Aspect microscopique au microscope électronique à balayage (Grossissement x1500 et x3000).

Le blast des séquences des différentes régions a montré de faibles pourcentages de similarité de 93.24% (ITS), 86.59% (β -tubuline), 98.01% (LSU) et 88.10% (RPB2) avec *Pezicula corylina* CBS 249.97, *Coleophoma paracylindrospora* CBS 115328, *Dermea cerasi*

CBS 432.67 et *Dermea acerina* AFTOL-ID 941 respectivement (tableau 7). L'analyse de l'ensemble de données combinées (figure 27) confirme fortement nos précédentes observations morphologiques de cet isolat qui diffèrent de celles de toutes les autres espèces de *Dermea* déjà décrites et donc aussi la possibilité que cet isolat soit une nouvelle espèce. Dans l'arbre concaténé l'isolat TBT7 forme un clade séparé avec la plupart des espèces de *Dermea*, par rapport aux autres genres apparentés. Cependant, elle forme un subclade séparé de celui de l'espèce la plus proche qui est *Dermea cerasi* avec une valeur du bootstrap de 51%.

Le genre *Dermea* regroupe un nombre restreint d'espèces (16 espèces), seules deux espèces ont été isolées en tant qu'endophytes par Kowalski et Kehr, (1992), *Dermea piceina* qui a été isolé à partir de deux conifères *Larix decidua* et *Picea abies* et *Dermea tulasnei* à partir d'un arbre à feuilles caduques, le *Fraxinus excelsior*. Notre étude serait la deuxième à avoir isolé une espèce appartenant au genre *Dermea* en tant qu'endophyte.

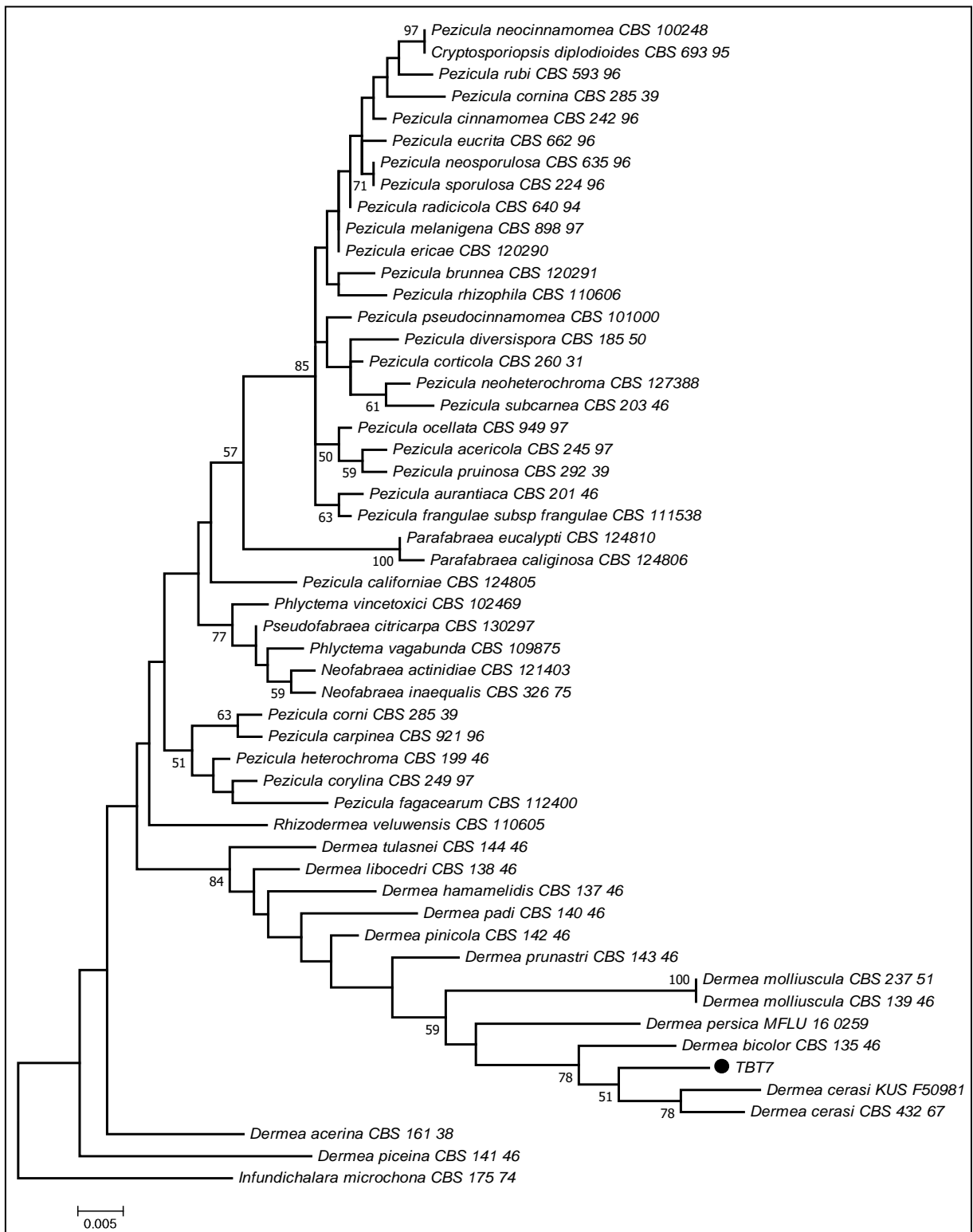


Figure 27. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l'analyse des séquences des régions ITS, β -tubuline, LSU, RPB2 et produit par l'analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences de l'isolat TBT7 et celles des espèces les plus proches répertoriées sur NCBI. Les taux du « bootstrap » du ML (exprimés en pourcentage de 1000 répliquions), supérieur à 50% sont représentés au niveau des nœuds. L'arbre est enraciné avec *Infundichalara microchona* CBS 17574.

III.3.5. Isolât TBT10

- Colonies circulaires cotonneuses, à croissance rapide avec 46 mm de diamètre sur PDA et 45 mm sur MEA après une incubation de 7 jours à 28°C.
- Sur PDA la colonie est de couleur blanche, et un revers blanc.
- Sur MEA également mais la colonie est plus dense.
- Le mycélium transparent, très dense, fin et stérile (figure 28).

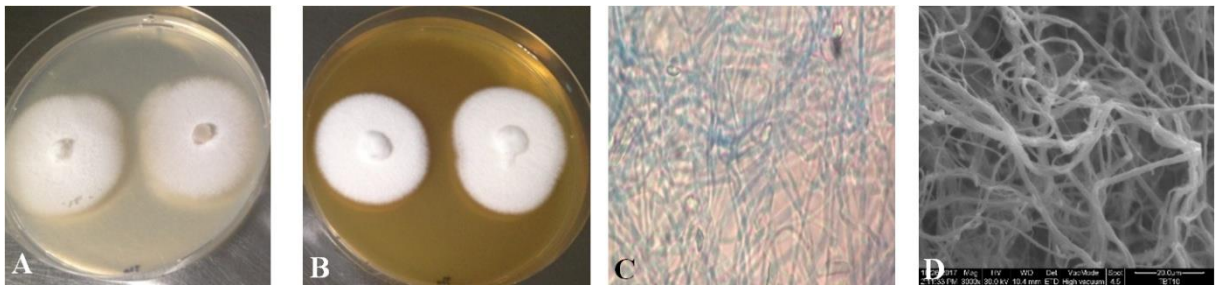


Figure 28. Morphologie de l'isolat TBT10. (A) : Colonie sur PDA, (B) : Colonie sur MEA, (C) : Aspect microscopique au microscope optique (Grossissement x100), (D) : Aspect microscopique au microscope électronique à balayage (Grossissement x 3000).

En ce qui concerne le blast des différentes séquences, une similarité de 96.22 et 99.33% avec *Anthostomelloides leucospermi* CBS 110126 a été obtenue avec les séquences des régions ITS et LSU, alors qu'avec les régions β -tubuline et RPB2, les espèces les plus proches étaient *Nemania serpens* CBS 679.86 et *Xylaria digitata* voucher 919 avec de faibles pourcentages de similarité (83.02% et 85.16%) respectivement (tableau 7). L'arbre concaténé (figure 29) a montré la position taxonomique proche de l'isolat TBT10 avec l'espèce *Anthostomelloides leucospermi*, avec laquelle elle a formé un seul clade (bootstrap de 77%).

Plusieurs études ont permis l'isolement de *Anthostomelloides leucospermi* en tant que champignon endophyte, on citera à titre d'exemple Osono et Masuya, (2012) qui ont isolé cette espèce fongique à partir des feuilles d'arbres caduques appartenant à la famille des Bétulacées au Japon, et Lapuz *et al.* (2018) qui l'ont isolé à partir des feuilles de *Oryza sativa* L.

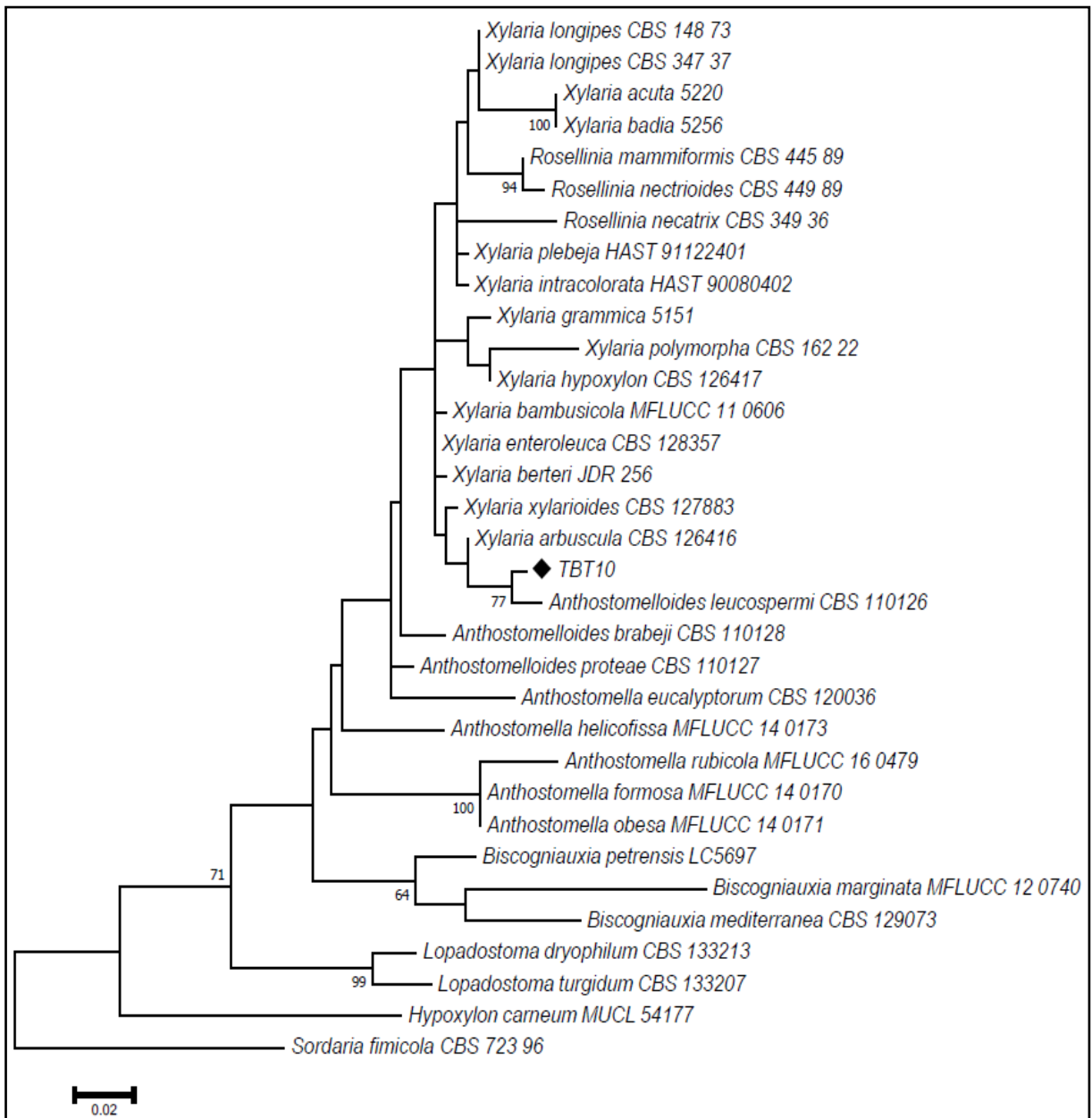


Figure 29. Arbre phylogénétique concaténé basé sur l’analyse des séquences des régions ITS, β -tubuline, LSU et RPB2 produit par l’analyse du Maximum likelihood (ML) montrant les relations des séquences de l’isolat TBT10 et celles des espèces les plus proches répertoriées sur NCBI. Les taux du « bootstrap » du ML (exprimés en pourcentage de 1000 répliques), supérieur à 50% sont représentés au niveau des nœuds. L’arbre est enraciné avec *Sordaria fimicola* CBS 72396.

Tableau 7. Résultats du blast des séquences des différentes régions utilisées pour chaque isolat avec les souches les plus proches.

Isolats	Régions	Les espèces les plus proches	Numéros d'accension	Pourcentages de similarité
MPR1	ITS	<i>Penicillium griseofulvum</i> NRRL 2300 (CBS:185.27)	AF033468	100%
		<i>Penicillium dipodomyicola</i> NRRL 35583	DQ339570	100%
		<i>Penicillium camemberti</i> FM 013	DQ681327	100%
	β -tubuline	<i>Penicillium griseofulvum</i> NRRL 2300	FJ004414	98.84%
JPF2	ITS	<i>Micronematobotrys verrucosus</i> E13-2151	FJ025220	98.78%
	LSU	<i>Micronematobotrys verrucosus</i> E13-2151	FJ025223	99.18%
JPF3	ITS	<i>Micronematobotrys verrucosus</i> E13-2151	FJ025220	98.77%
	LSU	<i>Micronematobotrys verrucosus</i> E13-2151	FJ025223	98.87%
JPF4	ITS	<i>Micronematobotrys verrucosus</i> E13-2151	FJ025220	98.77%
	LSU	<i>Micronematobotrys verrucosus</i> E13-2151	FJ025223	98.87%
CAR11	ITS	<i>Penicillium janczewskii</i> CBS 129799	MH865548	99.83%
		<i>Penicillium canescens</i> CBS 126256	MH863999	99.83%
		<i>Penicillium jensenii</i> CBS 216.28	MH854988	99.83%
	β -tubuline	<i>Penicillium canescens</i> FMR 15028	LT898237	100%
TBT7	ITS	<i>Pezizula corylina</i> CBS 249.97	KR859168	93.24%
	β -tubuline	<i>Coleophoma paracylindrospora</i> CBS 115328	KU728610	86.59%
	LSU	<i>Dermea cerasi</i> CBS 432.67	MH870721	98.01%
	RPB2	<i>Dermea acerina</i> AFTOL-ID 941	DQ247791	88.10%
TBT10	ITS	<i>Anthostomelloides leucospermi</i> CBS 110126	EU552100	96.22%
	β -tubuline	<i>Nemania serpens</i> CBS 679.86	KU684188	83.02%
	LSU	<i>Anthostomelloides leucospermi</i> CBS 110126	EU552100	99.33%
	RPB2	<i>Xylaria digitata</i> voucher 919	GQ848338	85.16%

III.4. Choix du milieu de culture optimum

Dans le but d'optimiser la production des molécules actives chez les différents isolats fongiques précédemment sélectionnés, des cultures de chaque isolat ont été préparées sur cinq différents milieux de culture. Le test de l'activité antimicrobienne nous a permis ensuite de choisir le milieu de culture donnant la meilleure activité et par conséquent permettant une meilleure production des métabolites secondaires par ces isolats fongiques.

Pour la souche MPR1, le MEA était le meilleur milieu de culture permettant la meilleure production des molécules bioactives suivi du PDA avec des moyennes des zones d'inhibition de 31.04 mm et 29.37 mm respectivement. YEA, SDA et YMEA viennent en deuxième position avec des moyennes des zones d'inhibition de 17.74 mm, 13.70 mm et 13.61 mm respectivement (figure 30).

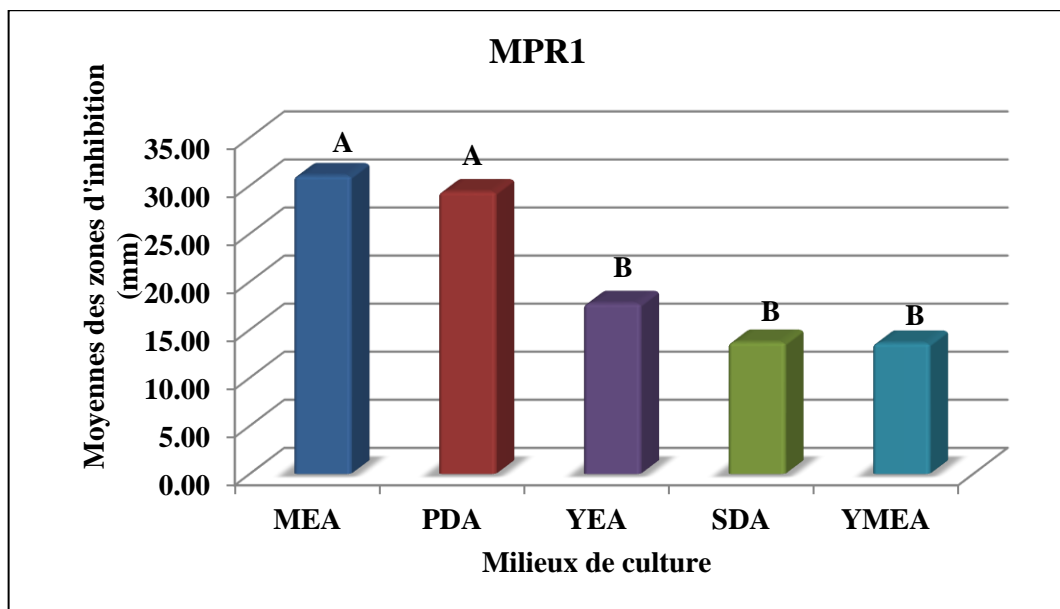


Figure 30. Activité antimicrobienne du champignon endophyte MPR1 après croissance sur différents milieux de culture. Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

La même chose a été observée avec JPF2, pour lequel le MEA et le PDA étaient en première position avec des moyennes des zones d'inhibition de 20.00 mm et 16.87 mm respectivement, en deuxième position on a observé une faible activité avec le SDA (8.60 mm). Pour les deux autres milieux, l'isolat n'a montré aucune activité contre les microorganismes pathogènes. Les résultats obtenus pour la souche JPF2 sont représentés dans la figure 31

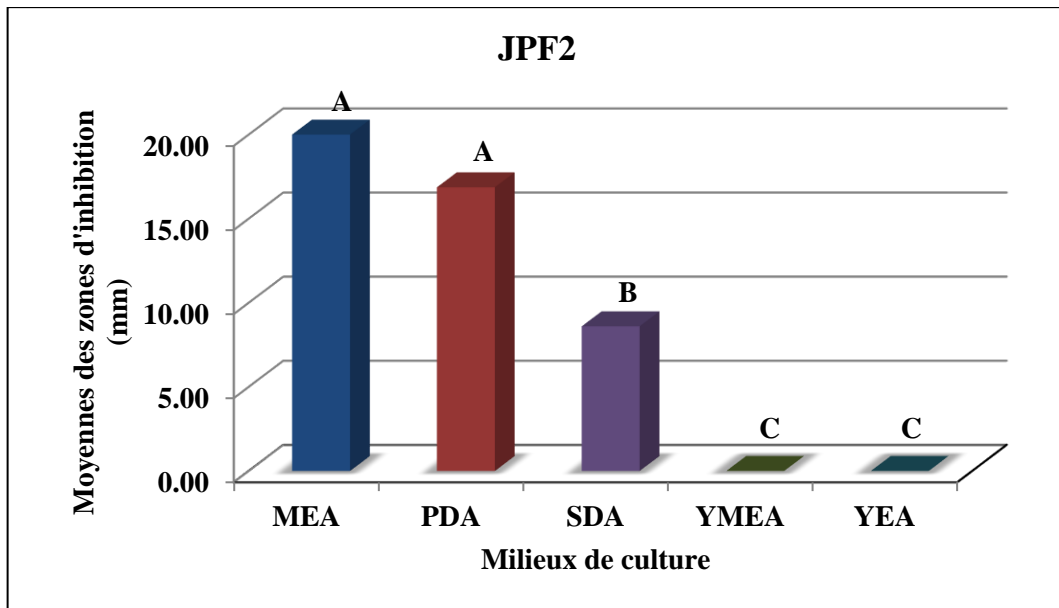


Figure 31. Activité antimicrobienne du champignon endophyte JPF2 après croissance sur différents milieux de culture. Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Pour CAR11, l'activité antimicrobienne était meilleure après croissance sur MEA (10.04 mm) suivi du PDA (5.63 mm), par contre elle était nulle pour les trois autres milieux. Ces résultats sont représentés dans la figure 32.

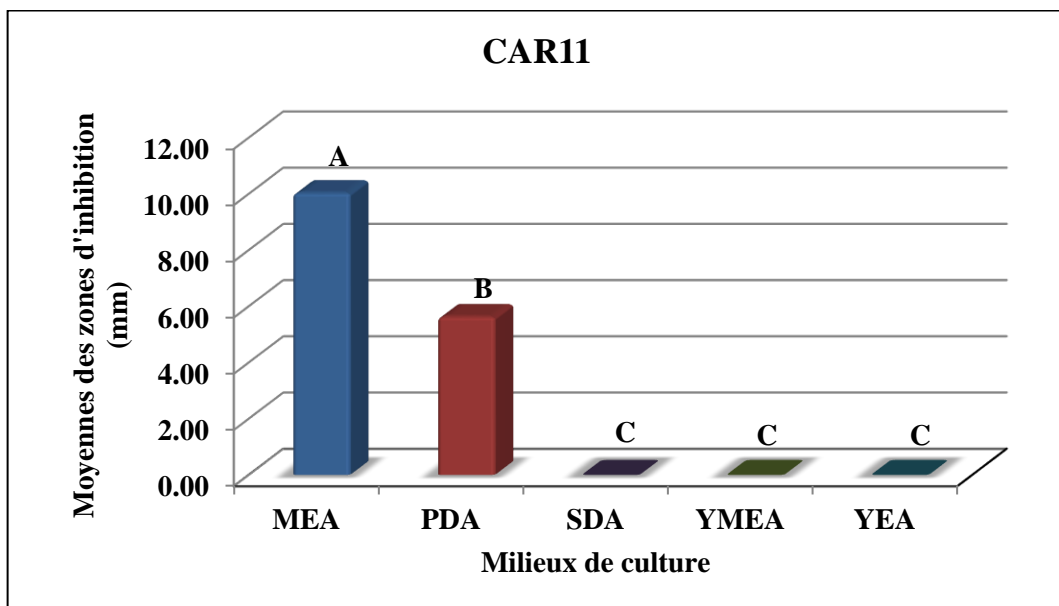


Figure 32. Activité antimicrobienne du champignon endophyte CAR11 après croissance sur différents milieux de culture. Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Pour TBT7, après croissance sur MEA l'activité était meilleure avec une moyenne des zones d'inhibition de 14.00 mm, ce milieu est suivi par les milieux YMEA, YEA, PDA avec des moyennes des zones d'inhibition de 11.40 mm, 9.00 mm et 8.00 mm respectivement. En dernière position, le milieu SDA a donné une moyenne des zones d'inhibition de 4.67 mm (figure 33).

Concernant l'isolat TBT10, les milieux de culture ont été divisés en trois groupes, le premier regroupait le PDA et le SDA avec des moyennes des zones d'inhibition de 23.25 mm et 22.50 mm respectivement, YMEA (14.25 mm) et YEA (14.00 mm) représentaient le deuxième groupe. Le MEA venait en troisième position sans activité (figure 34).

Selon (Devaraju et Satish, 2011) la production des molécules bioactives dépend non seulement de l'espèce du microorganisme, de sa génétique, mais aussi du milieu de culture, du type de nutriments disponibles et des conditions physicochimiques de son environnement ; ceci explique la différence trouvée entre les cinq champignons endophytes. Cependant, le MEA reste le milieu de culture donnant les meilleures zones d'inhibition pour la plupart de ces cinq champignons endophytes sauf pour TBT10, pour lequel c'est le PDA qui a donné la meilleure activité.

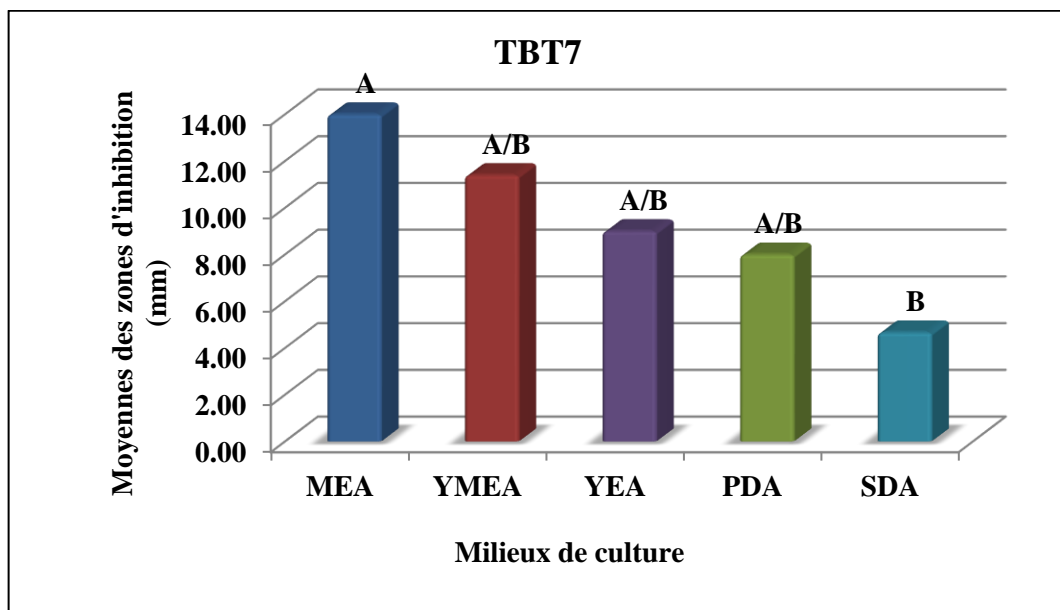


Figure 33. Activité antimicrobienne du champignon endophyte TBT7 après croissance sur différents milieux de culture. Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

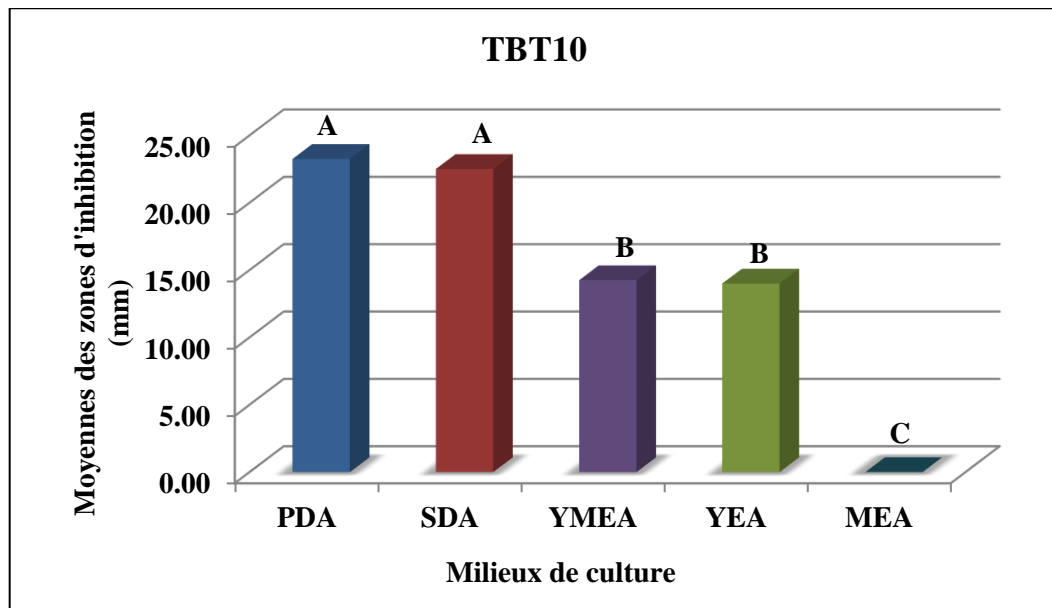


Figure 34. Activité antimicrobienne du champignon endophyte TBT10 après croissance sur différents milieux de culture. Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

III.5. Choix du type de fermentation et du solvant d'extraction

En plus de la sélection du milieu de culture permettant une meilleure production des molécules bioactives, la sélection du type de fermentation est aussi importante. Pour cela, des cultures fongiques solides et liquides sur les milieux sélectionnés précédemment ont été préparées et extraites avec trois solvants de différentes polarités. Un test de l'activité antimicrobienne de tous les extraits obtenus a ensuite été réalisé par la méthode des puits. Ainsi on a pu choisir en plus du type de fermentation, le solvant permettant la meilleure extraction des métabolites secondaires.

Les résultats obtenus pour le choix du type de fermentation sont représentés dans la figure 35.

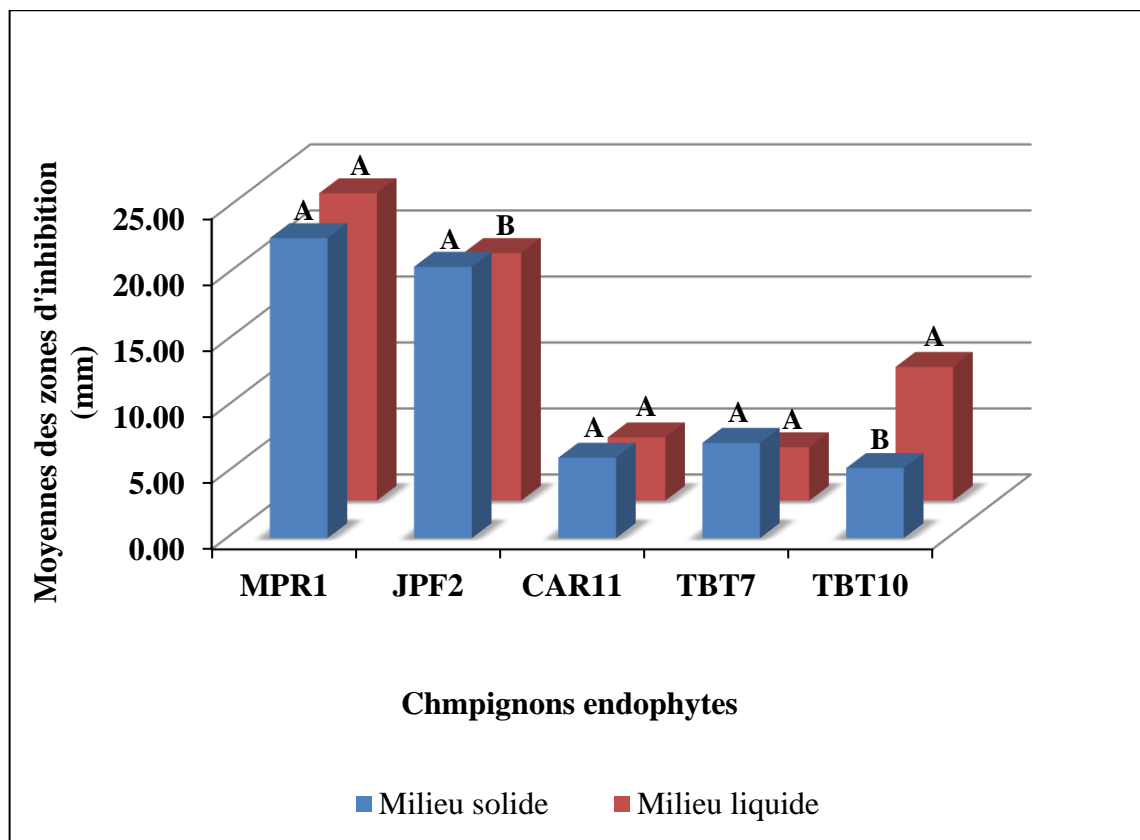


Figure 35. Activité antimicrobienne des différents extraits des champignons endophytes après fermentation sur milieu solide et liquide. Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Pour les isolats JPF2, CAR11 et TBT7, les extraits obtenus à partir des cultures solides étaient plus actifs sur les microorganismes pathogènes. L'extrait de JPF2 était cependant, le plus actif avec une moyenne des zones d'inhibition de 20.54 mm, suivie de TBT7 (7.21 mm) et CAR11 (6.08 mm).

MPR1 et TBT10, quant à eux, la culture sur milieu liquide a donné une meilleure activité que la culture sur milieu solide, et où l'extrait de MPR1 était le plus actif avec une moyenne des zones d'inhibition de 22.71 mm, suivie de TBT10 (10.13 mm)

Selon Son *et al.*, (2018), Les deux types de fermentation sur milieu solide ou bien liquide présentent des avantages. Sur milieu liquide, le processus permet une manipulation et un contrôle plus facile des paramètres, tels que le pH et l'aération, et convient aux bactéries nécessitant un taux d'humidité élevée. Par contre, la fermentation sur milieu solide convient plus aux champignons filamenteux et aux microorganismes se développant de préférence dans des conditions aérobies avec une faible activité de l'eau. La comparaison des résultats obtenus après les deux types de fermentation en milieu solide et liquide montre que le résultat obtenu

dépend plus du microorganisme utilisé que du processus de fermentation ; cependant, ces dernières années, on a trouvé que les antibiotiques produits après fermentation sur milieu solide étaient plus stables que ceux produits sur milieu liquide car il y a moins de production de composés intermédiaires (Subramaniyam, 2012). Nos résultats s'accordent parfaitement à ce qui a été dit ci-dessus, où selon l'isolat fongique, le type de fermentation donnant la meilleure activité diffère.

Son *et al.*, (2018) ont trouvé que l'extrait de *Aspergillus oryzae* obtenu après fermentation sur milieu solide donnait une plus grande activité que l'extrait obtenu après fermentation liquide. Selon Hamzah *et al.*, (2009) plusieurs isolats de *Penicillium* ont montré une activité antibactérienne après les deux types de fermentation (solide et liquide). Cependant, la fermentation sur milieu liquide avait donné une meilleure activité.

En ce qui concerne le solvant permettant d'extraire le maximum de molécules bioactives, l'acétate d'éthyle était celui qui se positionnait en premier pour les isolats MPR1, CAR11, TBT7 et TBT10 avec des moyennes des zones d'inhibition de 39.29 mm, 12.13 mm, 21.63 mm et 15.88 mm respectivement, alors que pour JPF2 l'extrait du dichlorométhane était celui qui avait donné la meilleure activité avec une moyenne des zones d'inhibition de 25.00 mm. Les extraits du n-hexane de tous les isolats étaient inactifs sauf celui de JPF2, où la moyenne des zones d'inhibition était de 13.63 mm (figure 36).

Le choix du solvant approprié permettant la meilleure extraction des métabolites secondaires dépend de la nature des composés bioactifs présents dans le milieu (Goutam *et al.*, 2016). Le n-hexane permet l'extraction des composés non polaires, contrairement au dichlorométhane et l'acétate d'éthyle qui permettent l'extraction des composés semi-polaires (Djamaan *et al.*, 2018).

Selon Sugijanto et Dorra, (2016), les champignons endophytes produisent généralement des molécules semi-polaires, ceci est en accord avec nos résultats où les extraits obtenus par extraction à l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane étaient les plus actifs. Des résultats qui correspondent à ceux obtenus par Musavi et Balakrishnan, (2014) où l'extrait de l'acétate d'éthyle du champignon endophyte *Fusarium oxysporum* NFX06 était le plus actif. Mu'azzam *et al.*, (2015) ont également trouvé que les deux champignons (TLBML-M1 et TLBML-PHP2) les plus actifs parmi ceux isolés à partir de *Ocimum citriodorum* Vis. présentaient une meilleure activité après extraction à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane.

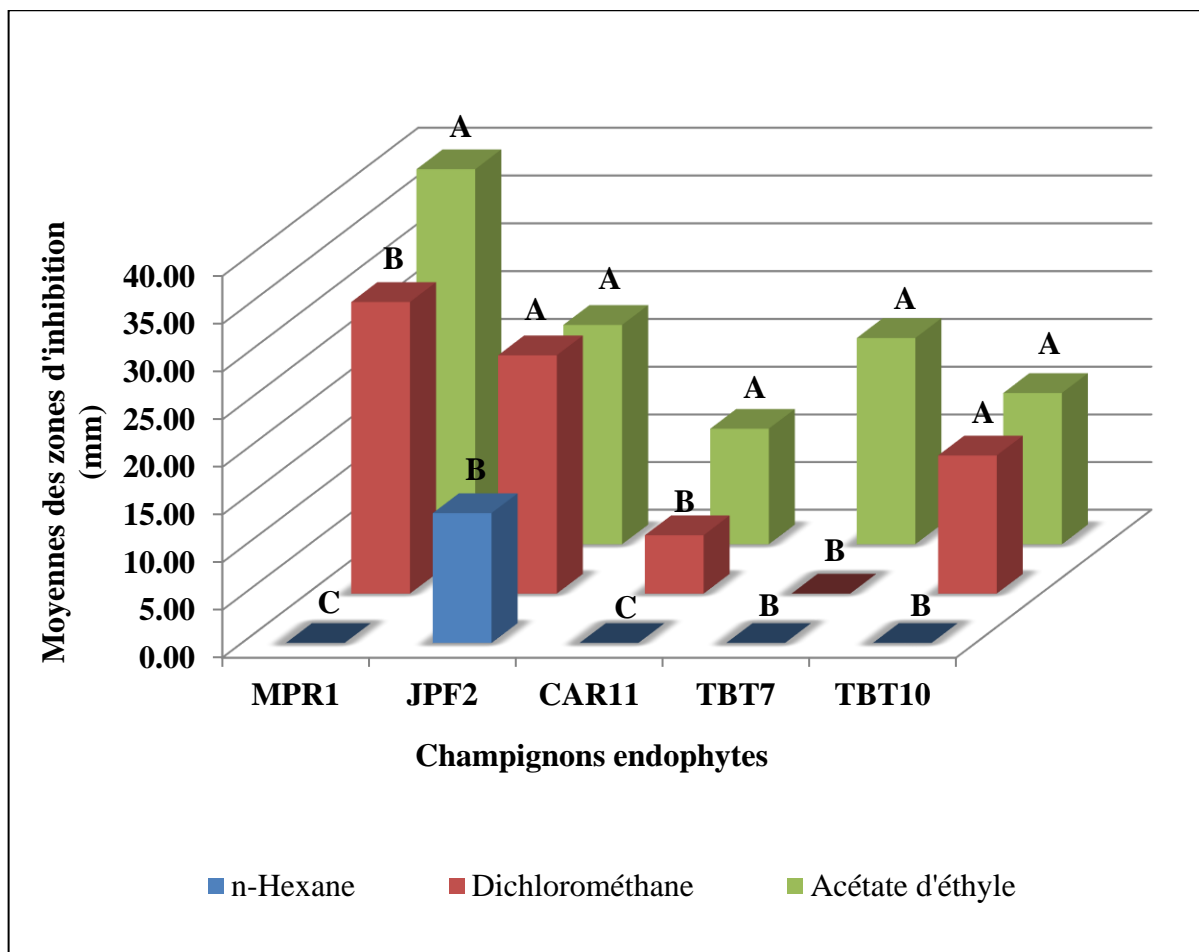


Figure 36. Activité antimicrobienne des différents extraits des champignons endophytes après extraction avec trois différents solvants. Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Selon ces résultats, l'acétate d'éthyle a été choisi pour les trois isolats MPR1, TBT7 et TBT10, le dichlorométhane pour JPF2 pour le reste des tests. Cependant, pour l'isolat CAR11 et vu la faible activité obtenue avec ses extraits, on a jugé préférable de rester à ce stade là et ne pas poursuivre les tests antimicrobiens suivants pour cet isolat.

III.6. Activité antimicrobienne contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les dermatophytes

Après une fermentation et une extraction à grand volume des quatre isolats sélectionnés en utilisant les paramètres choisis précédemment, tous les extraits ont été testés sur une large gamme de microorganismes incluant des bactéries multi-résistantes et des dermatophytes.

L'extrait de l'isolat MPR1 a été actif contre tous les microorganismes utilisés, aussi bien les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif et les dermatophytes.

Contre les bactéries à Gram positif (figure 37, 39) l'activité était forte contre *S. pyogenes*, *S. aureus* 1, 2, 3, 4 et 5, *M. luteus* et *B. cereus* avec la plus grande zone d'inhibition obtenue contre *S. aureus* 2 qui était de 41.5 mm, une moyenne activité a été observé contre *M. yannicii* et *E. faecalis* 1, 2 et 3.

En ce qui concerne les bactéries à Gram négatif (figure 38, 39), une forte activité a été observée contre *C. freundii*, *A. baumannii*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium*, *E. coli* 1, 2, 3 et *K. pneumoniae* 1 et 2. Parmi ces dernières *E. coli* 1 était la plus sensible vis-à-vis de cet extrait avec une zone d'inhibition de 45.5 mm. *P. aeruginosa* 1,2 et 3 et *E. coli* 4 étaient quant à elles moyennement inhibés.

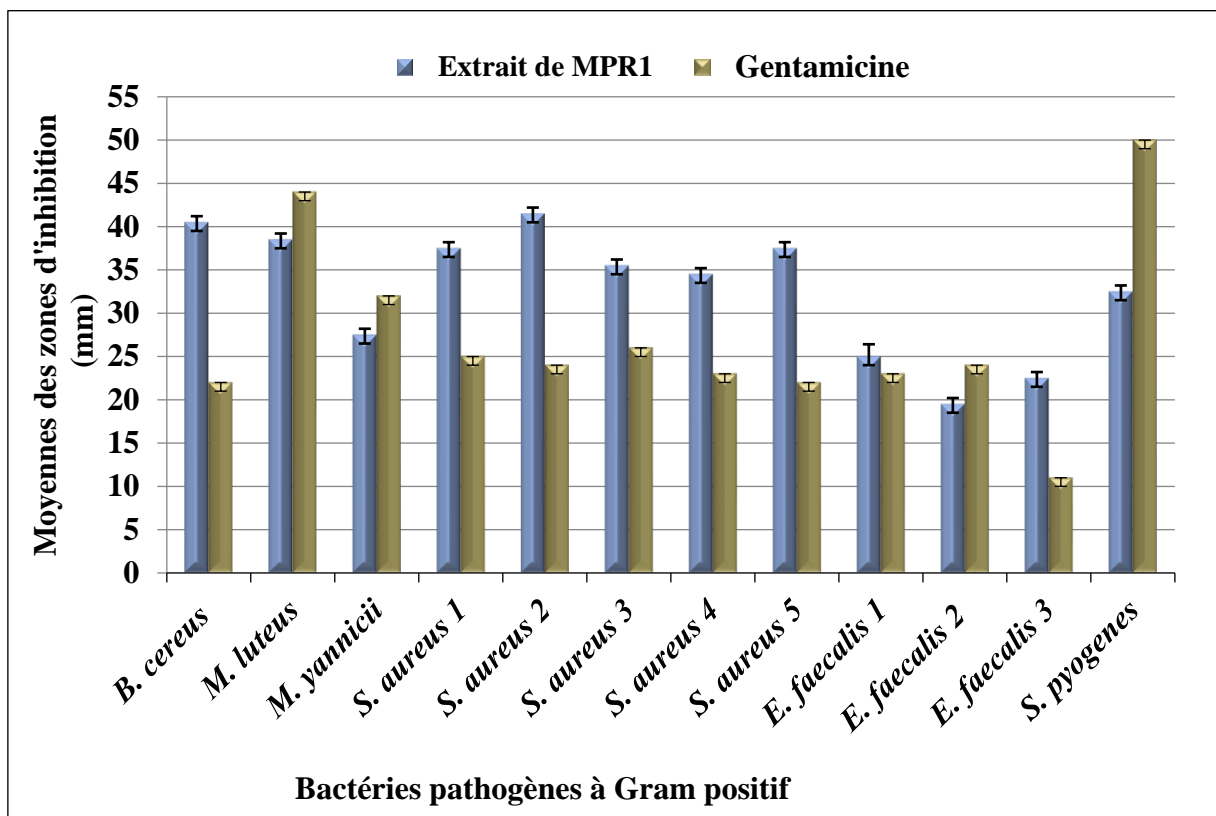


Figure 37. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de MPR1 contre les bactéries à Gram positif. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

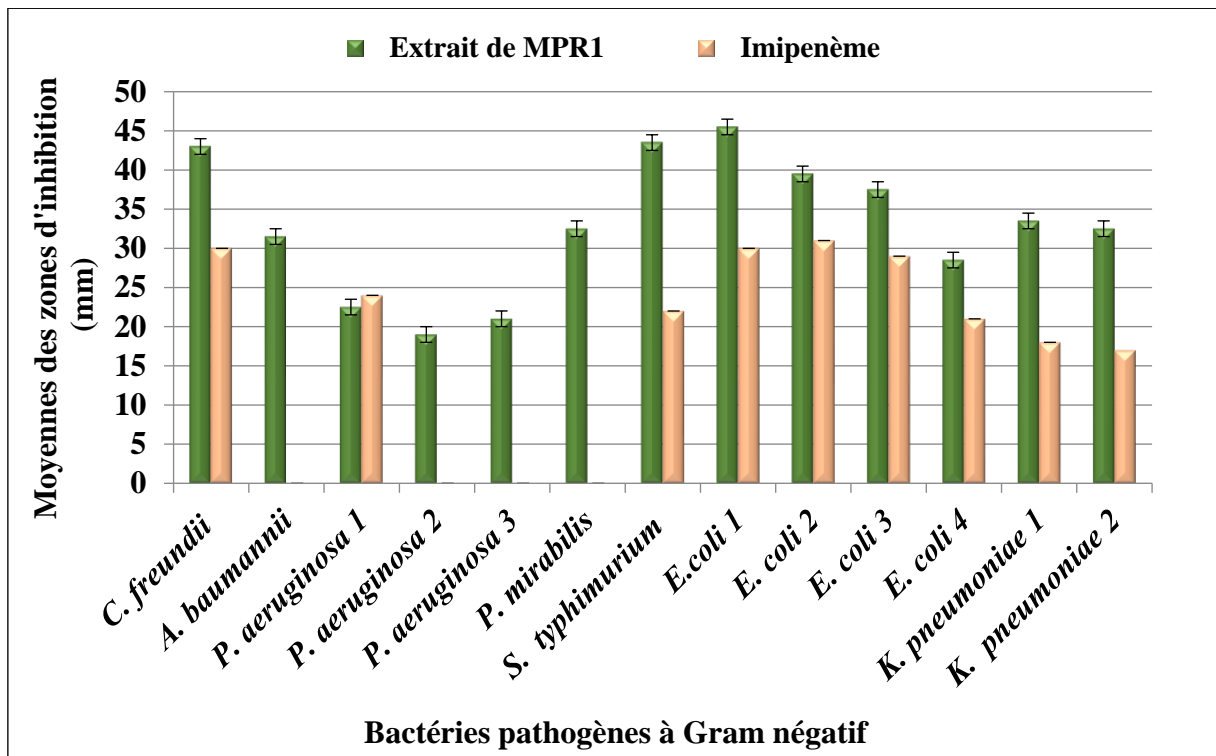


Figure 38. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de MPR1 contre les bactéries à Gram négatif. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

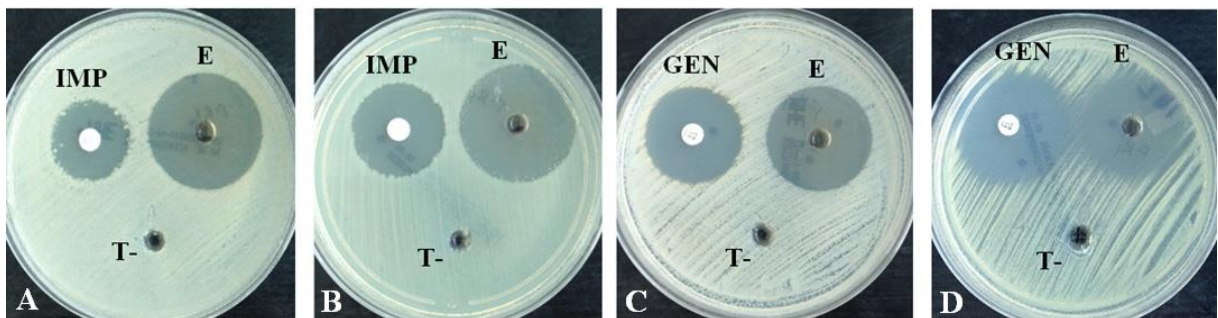


Figure 39. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat MPR1. (A): *K. pneumoniae 1*, (B): *E. coli 1*, (C): *S. aureus 2*, (D): *M. yannicii*. E : Extrait fongique, T- : Témoin négatif (DMSO), GEN : Gentamicine (500 μ g), IMP : imipénème (10 μ g).

L'extrait de l'isolat MPR1 présentait une très bonne activité antifongique (figure 40, 41) avec des zones d'inhibition allant de 23.5 mm obtenu contre *C. albicans* et atteignant les 90 mm contre *E. floccosum* (inhibition totale).

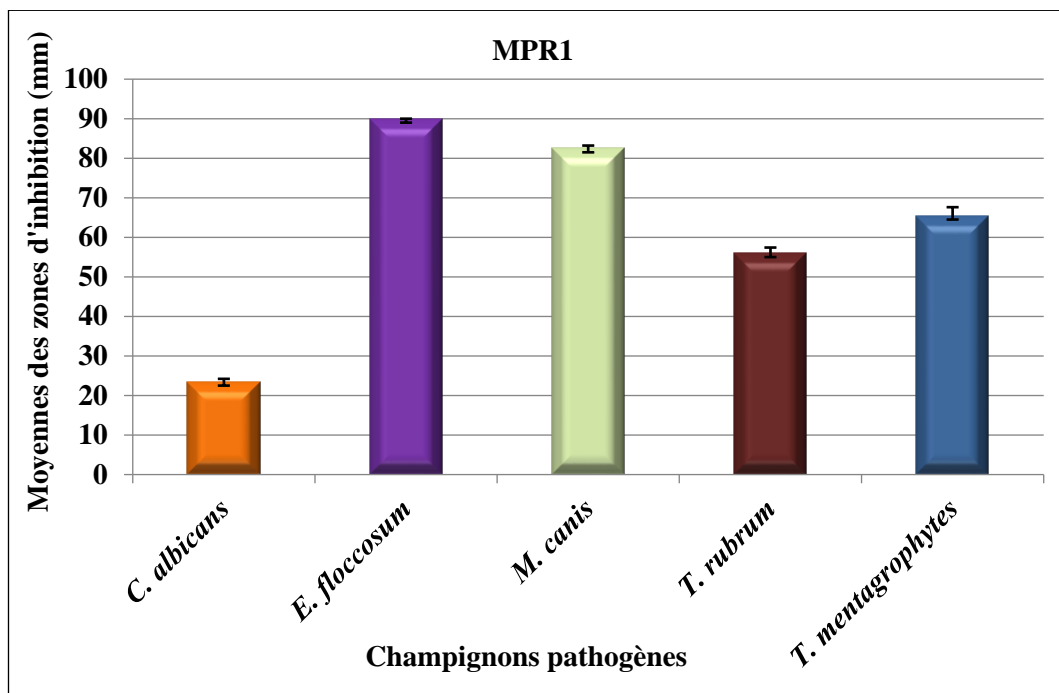


Figure 40. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de MPR1 contre les dermatophytes. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

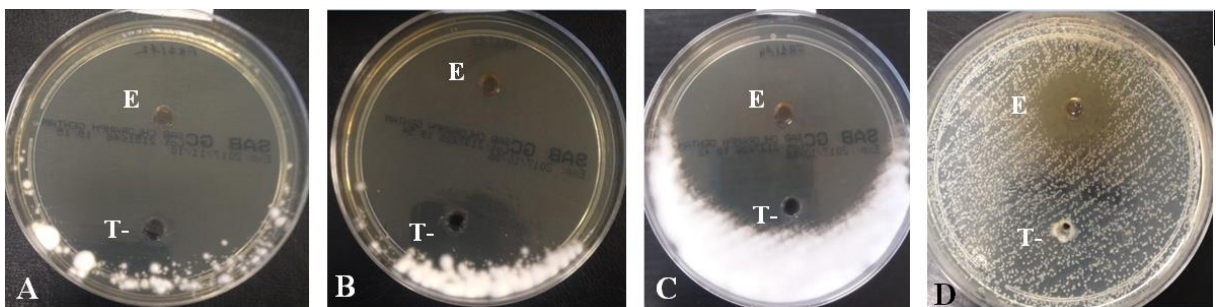


Figure 41. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat MPR1. (A). *M. canis*, (B). *T. rubrum*, (C). *T. mentagrophytes*, (D). *C. albicans*. E : Extrait fongique, T- : Témoin négatif (DMSO).

Tous les autres extraits fongiques n'avaient montré aucune activité contre les bactéries à Gram négatif.

L'extrait de JPF2 était fortement actif contre *M. yannicii* avec une zone d'inhibition de 36 mm, faiblement actif contre *E. faecalis* 1 avec une zone d'inhibition de 14 mm, le reste des bactéries étaient moyennement inhibées (figure 42, 43).

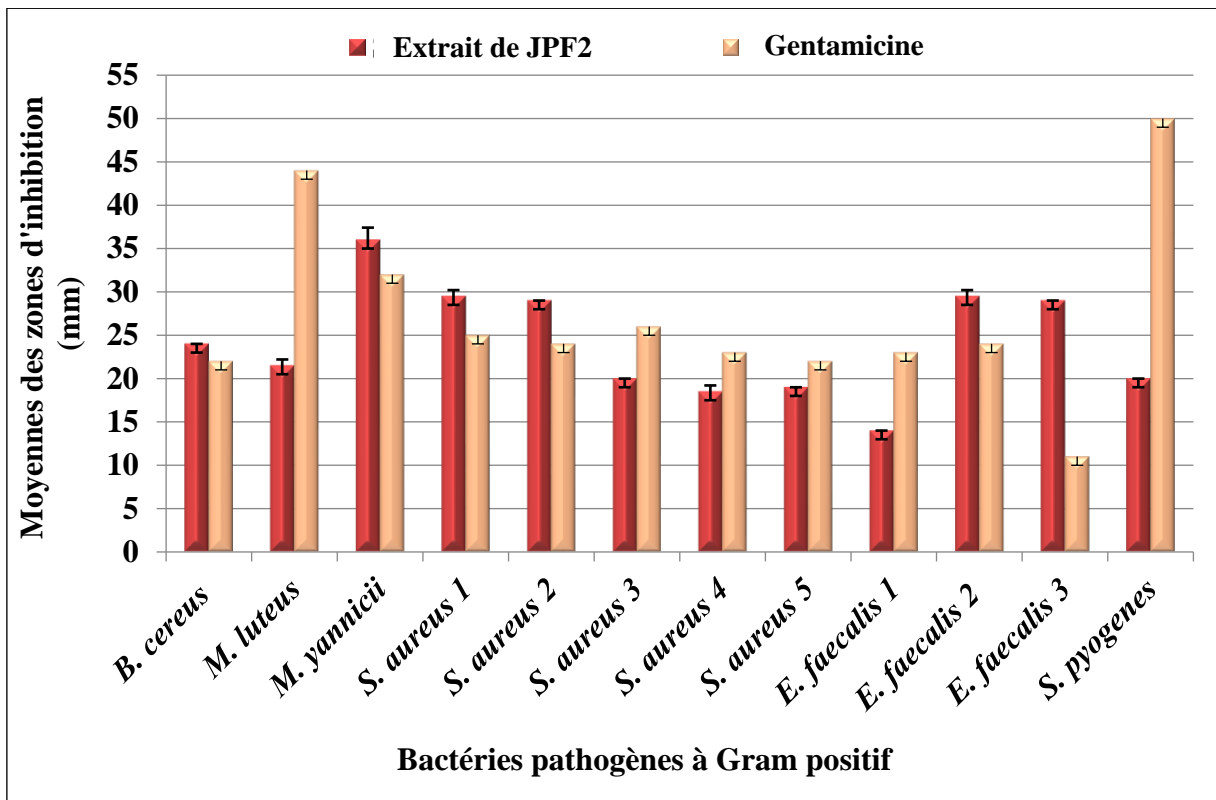


Figure 42. Activité de l'extrait de dichlorométhane de JPF2 contre les bactéries à Gram positif. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

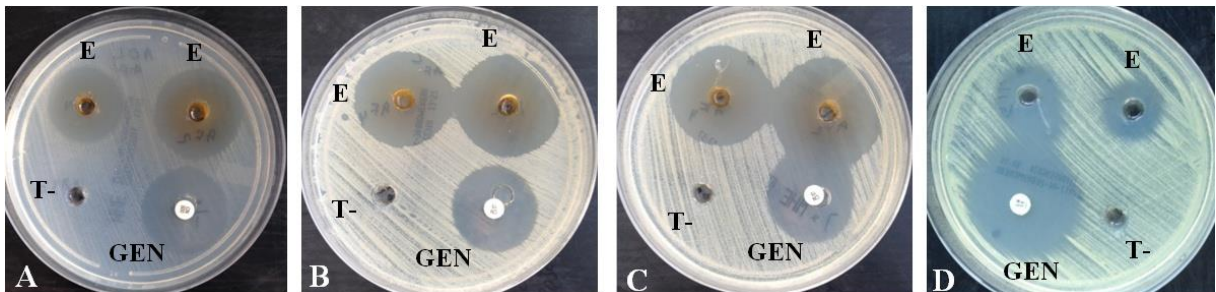


Figure 43. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait de dichlorométhane de l'isolat JPF2. (A): *E. faecalis 2*, (B): *S. aureus 2*, (C): *S. aureus 3*, (D): *M. yannicii*. E : Extrait fongique, T- : Témoin négatif (DMSO), GEN : Gentamicine (500 μ g).

En ce qui concerne les dermatophytes (figure 44, 45), l'extrait était actif sur tous les dermatophytes avec des zones d'inhibition allant de 19 mm à 46.5 mm obtenue contre *E. floccosum*.

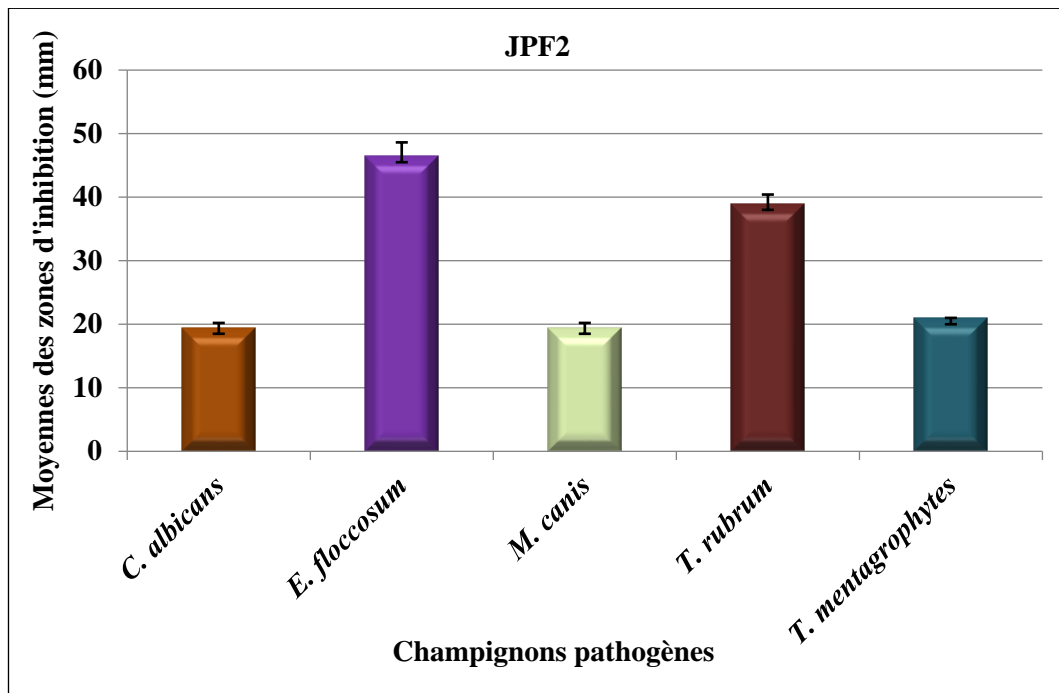


Figure 44. Activité de l'extrait de dichlorométhane de JPF2 contre les dermatophytes. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

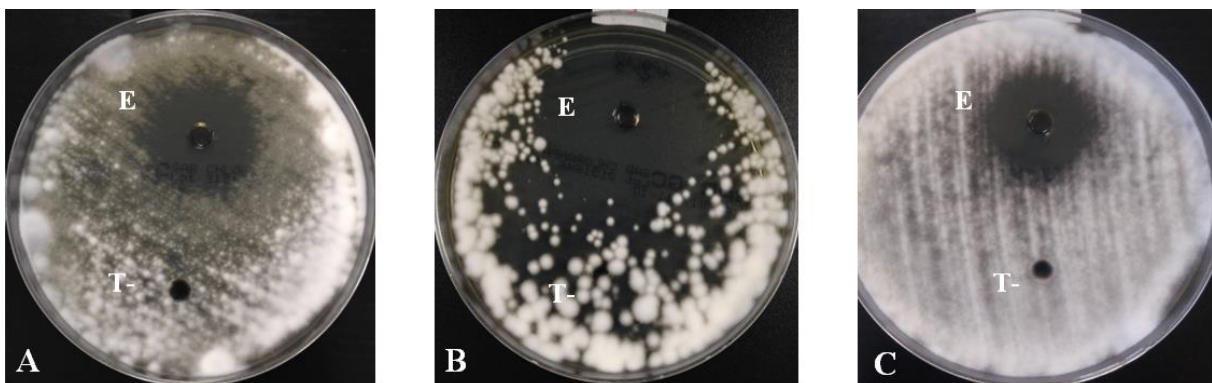


Figure 45. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait de dichlorométhane de l'isolat JPF2. (A): *M. canis*, (B): *T. rubrum*, (C): *T. mentagrophytes*. E: Extrait fongique, T-: Témoin négatif (DMSO).

Concernant l'extrait de l'isolat TBT7, une forte inhibition a été observée contre *M. yannicii* (31 mm) et *S. aureus* 1 et 2 (30.5 et 33 mm respectivement), le reste des bactéries à été moyennement inhibées (figure 46, 50). Pour son activité antifongique, l'extrait de TBT7 n'a montré aucune activité contre *C. albicans*, cependant il était actif contre les autres dermatophytes avec la meilleure activité obtenue contre *T. mentagrophytes* avec une zone d'inhibition de 23 mm (figure 47, 48).

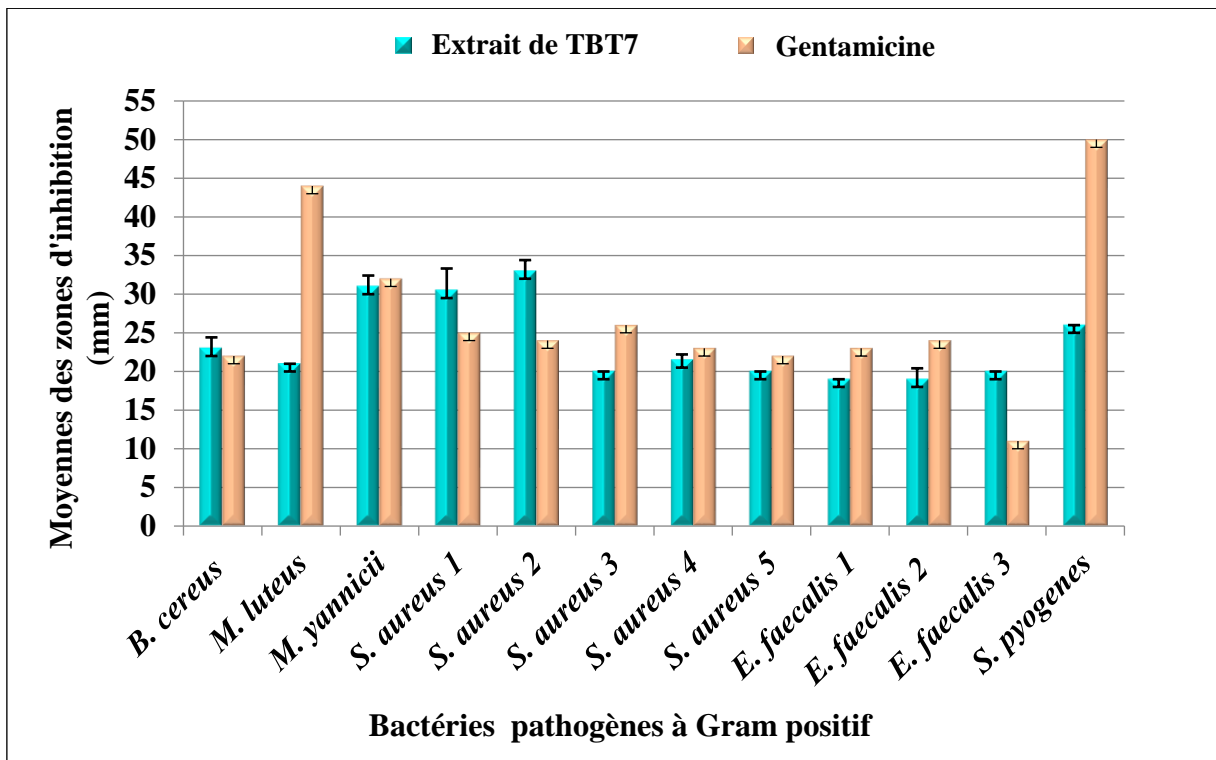


Figure 46. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de TBT7 contre les bactéries à Gram positif. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

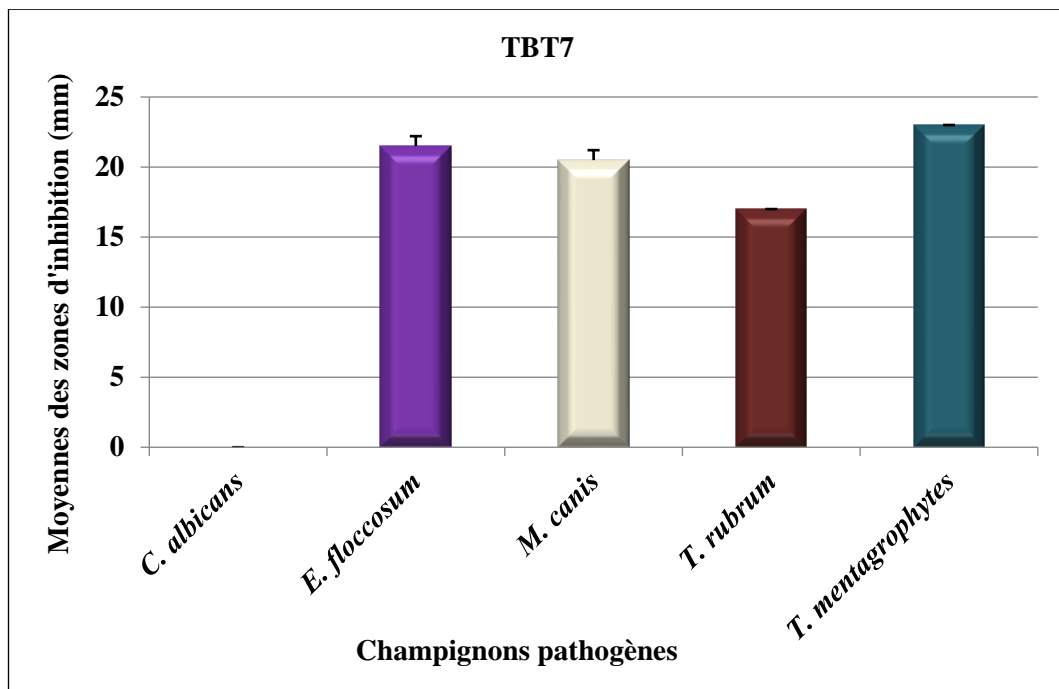


Figure 47. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de TBT7 contre les dermatophytes. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

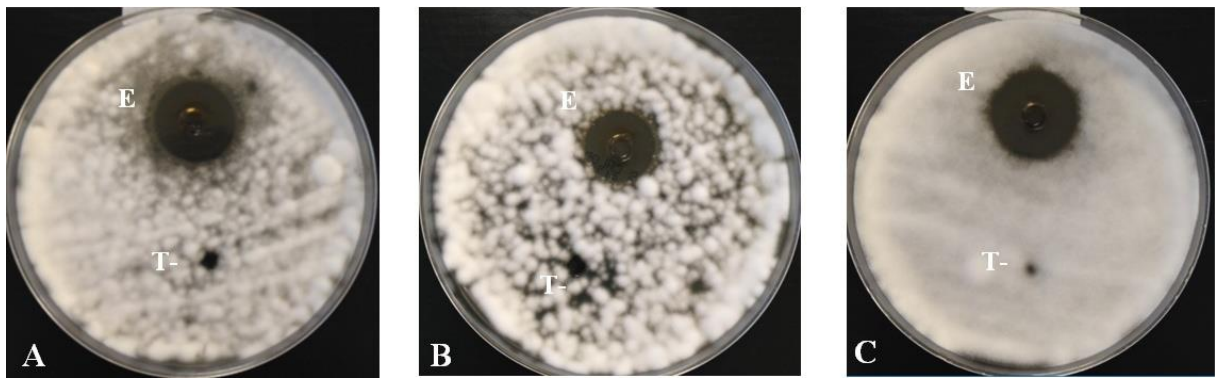


Figure 48. Zones d'inhibition obtenues avec l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat TBT7. (A): *M. canis*, (B) : *T. rubrum*, (C): *T. mentagrophytes*. E : Extrait fongique, T- : Témoin négatif (DMSO).

L'extrait de TBT10 était faiblement actif contre toutes les souches de *S. aureus* utilisés, une activité moyenne a été observée contre toutes les autres souches bactériennes, avec la plus grande zone d'inhibition de 28.5 mm obtenue contre *M. luteus* (figure 49, 50). Contre les dermatophytes (figure 51, 52), seule *C. albicans* était résistante à cet extrait contrairement à tous les autres dermatophytes dont la croissance a été inhibée avec la plus grande inhibition de 32 mm observée chez *E. floccosum*.

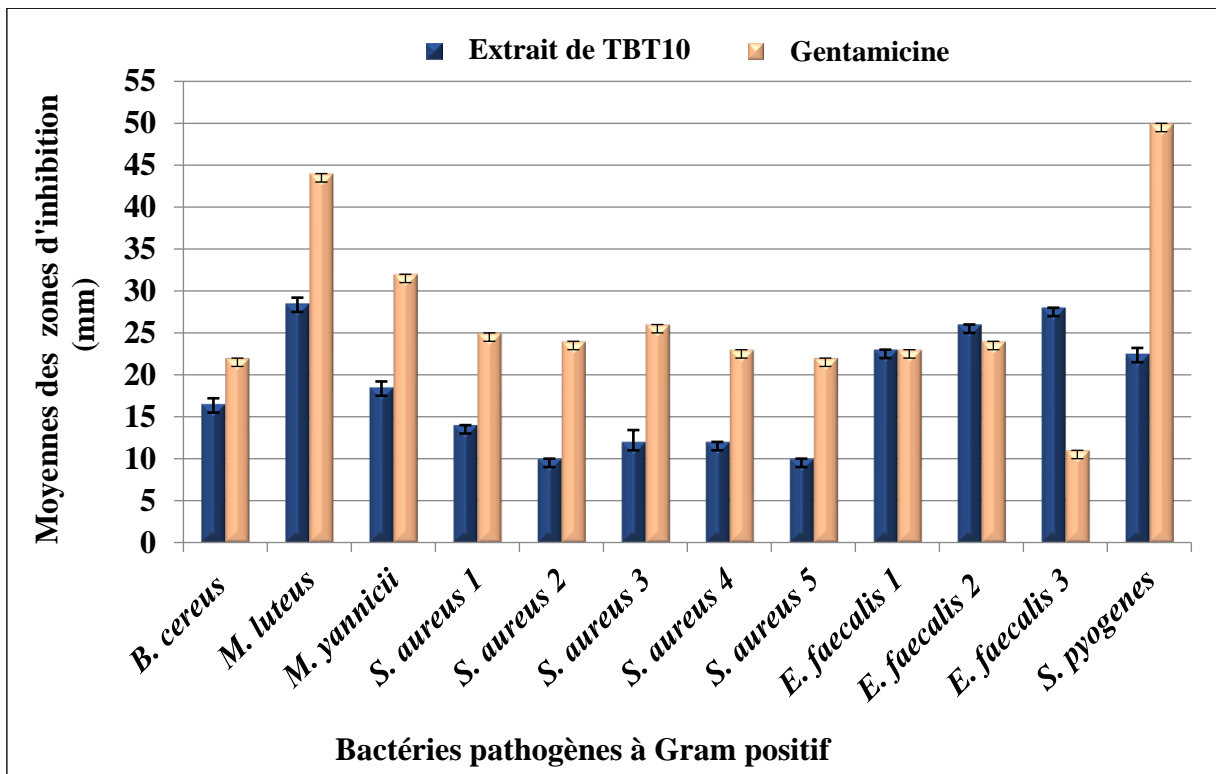


Figure 49. Activité de l'extrait d'acétate d'éthyle de TBT10 contre les bactéries à Gram positif. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

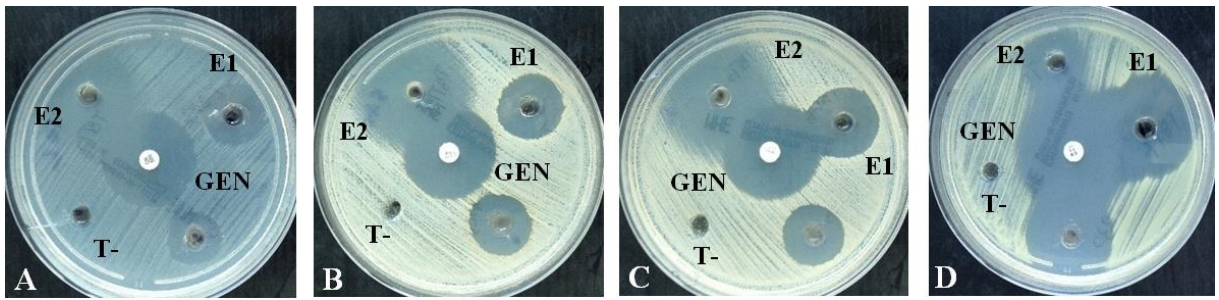


Figure 50. Zones d’inhibition obtenues avec les extraits d’acétate d’éthyle des isolats TBT7 (E1) et TBT10 (E2). (A): *E. faecalis* 2, (B): *S. aureus* 2, (C): *S. aureus* 3, (D): *M. yannicii*. T-: Témoin négatif (DMSO), GEN: Gentamicine (500 µg).

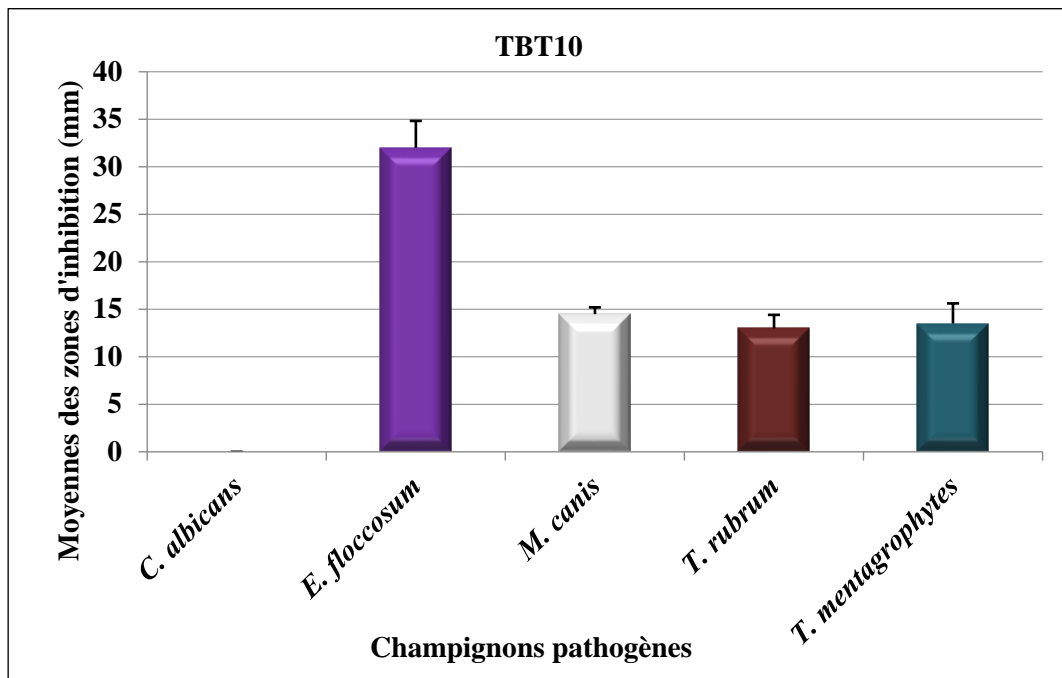


Figure 51. Activité de l’extract d’acétate d’éthyle de TBT10 contre les dermatophytes. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

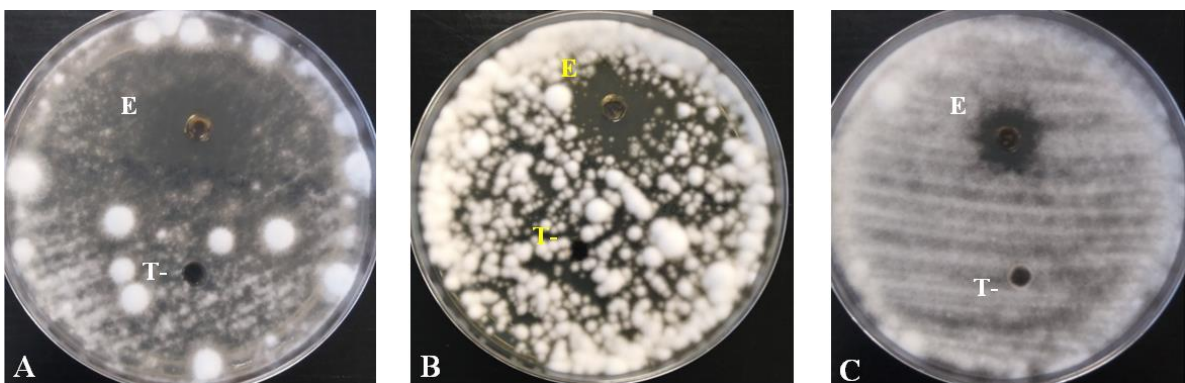


Figure 52. Zones d’inhibition obtenues avec l’extract d’acétate d’éthyle de l’isolat TBT10. (A) : *M. canis*, (B) : *T. rubrum*, (C): *T. mentagrophytes*. E : Extract fongique, T- : Témoin négatif (DMSO).

Plusieurs problèmes sont liés aux microorganismes pathogènes tels que : (1) le phénomène de résistance des bactéries aux antibiotiques qui ne fait qu'augmenter de jour en jour, causé principalement par l'utilisation excessive et inappropriée d'antibiotiques chez les humains et les animaux, les conditions d'hygiène médiocres, le tourisme médical et le déclin du développement de nouveaux antibiotiques (Mefteh *et al.*, 2017). (2) Les nombreux effets indésirables des médicaments antifongiques couramment utilisés tels que les antifongiques azolés qui peuvent endommager les reins et l'amphotricin B avec des effets secondaires graves et potentiellement mortels (Supaphon *et al.*, 2013), et le développement de plusieurs mécanismes de résistance à ces derniers (Vandeputte *et al.*, 2012). Tous ces problèmes représentent une sérieuse menace pour la santé publique rendent la recherche des nouvelles molécules bioactives nécessaire. Les champignons endophytes, pour différentes raisons, sont considérés comme une source potentielle pour la synthèse de ces molécules. En effet, les champignons endophytes isolés dans cette étude ont montré une bonne activité sur une large gamme incluant plusieurs bactéries résistantes aux antibiotiques, ainsi que différents champignons dermatophytes.

Tous nos extraits se sont révélés actifs contre toutes les bactéries à Gram positif. Cependant, les bactéries à Gram négatif étaient résistantes aux 3 extraits de JPF2, TBT7 et TBT10 ; ceci peut être expliqué aussi bien par la complexité de la bicouche lipidique de leur membrane externe ainsi que par les lipopolysaccharides qu'elle contient et qui sont fortement chargés négativement, ce qui empêche la fixation des molécules anioniques et neutres en raison de l'absence d'attraction de charges, empêchant ainsi leur pénétration et l'inactivation de ces bactéries (Tang *et al.*, 2007).

Au contraire, les bactéries à Gram positif ne possèdent qu'une couche de peptidoglycane relativement poreuse, et légèrement chargée négativement, ne représentant pas une barrière de perméabilité efficace, ce qui rend ces bactéries sensibles aussi bien aux molécules cationique, ainsi qu'anioniques et neutres (Tang *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2018).

Selon Frisvad *et al.*, (2004), plusieurs métabolites secondaires produites par *Penicillium griseofulvum* possèdent une activité antimicrobienne, tels que la griséofulvine, l'acide fulvique (antifongiques), mycélianamide, roquefortine C et D et Chanoclavine-I (antibactériens).

Une étude faite en 2016 consistant à séquencer le génome de *Penicillium griseofulvum* a montré que le génome de cette espèce fongique contenait un groupe de gènes complets codant pour la synthèse de la patuline, la griséofulvine et la roquefortine C, ainsi que des clusters de gènes potentiellement responsables de la synthèse de la pénicilline (antibactérien), du yanuthone D (antifongique), de l'acide cyclopiazonique (antibactérien), et de la chanoclavine I (Banani *et al.*, 2016). Cette diversité de molécules bioactives produites par *Penicillium griseofulvum* explique la grande activité antimicrobienne obtenue avec l'isolat MPR1 sur les dermatophytes ainsi que sur les bactéries pathogènes à Gram positif et négatif.

Selon Strobel, (2003) l'isolement de nouvelles espèces de champignons endophytes ou d'espèces rarement isolées offre de grandes possibilités de découvrir de nouvelles molécules bioactives, c'est le cas pour les extraits de JPF2 et TBT7 pour qui l'étude de leurs molécules est très intéressante. Concernant *Anthostomelloides leucospermi*, aucune étude n'a été faite sur ces métabolites secondaires ainsi que leur activité antimicrobienne.

III.7. Détermination de la CMI/ CMF et de la CMB

Pour l'extrait de MPR1 (tableau 8), les CMI obtenues contre les bactéries à Gram positif étaient de 25, 50, 100 et 200 µg/mL. Les bactéries les plus sensibles étaient *M. yannicii* et *S. pyogenes* (25 µg/mL), suivie de *S. australis* avec une CMI de 50 µg/mL. Trois des *E. faecalis* utilisés (*E. faecalis* 1, 2 et 3) ainsi que *E. faecium* 2 étaient les plus résistantes avec des CMI de 200 µg/mL.

Concernant les bactéries à Gram négatif, la CMI la plus faible était de 50 µg/mL et a été observée contre *C. freundii*, *P. mirabili*, *S. typhimurium* et *E. coli* 1, 2 et 3. Les CMI obtenues contre le reste des bactéries étaient comprises entre 100 et 200 µg/mL sauf pour *E. coli* 4 où la CMI était de 400 µg/mL.

On remarque aussi que pour cet extrait, les CMI obtenues contre *E. faecalis* 3 et *E. faecium* 1 (200 et 100 µg/mL) étaient plus basses que celles obtenues contre ces mêmes bactéries avec la gentamicine (témoin positif) (256 µg/mL) ; la même chose est observée pour deux des bactéries à Gram négatif où contre *A. baumannii* et *P. aeruginosa* 2, les CMI obtenues avec l'extrait de MPR1 (100 µg/mL) étaient inférieures à celles de l'imipénème (128 µg/mL).

Tableau 8. Les valeurs des CMI et des CMB ($\mu\text{g/mL}$) obtenues par l'extrait d'acétate d'éthyle de MPR1 contre les différentes bactéries pathogènes.

Bactéries à Gram positif	MPR1			GEN CMI	Bactéries à Gram négatif	MPR1			IPM CMI
	CMI	CMB	CMB/ CMI			CMI	CMB	CMB/ CMI	
<i>B. cereus</i>	100	100	1	0.25	<i>C. freundii</i>	50	200	4	0.25
<i>M. luteus</i>	100	100	1	0.063	<i>A. baumannii</i>	100	800	8	128
<i>M. yannicii</i>	25	25	1	0.5	<i>P. aeruginosa 1</i>	200	1600	8	4
<i>S. aureus 1</i>	100	100	1	0.5	<i>P. aeruginosa 2</i>	100	800	8	128
<i>S. aureus 2</i>	100	100	1	0.25	<i>P. aeruginosa 3</i>	200	800	4	128
<i>S. aureus 3</i>	100	400	4	0.25	<i>P. mirabilis</i>	50	100	2	2
<i>S. aureus 4</i>	100	400	4	0.5	<i>S. typhimurium</i>	50	50	1	1
<i>S. aureus 5</i>	100	100	1	0.25	<i>E.coli 1</i>	50	200	4	0.5
<i>E. faecalis 1</i>	200	200	1	8	<i>E. coli 2</i>	50	50	1	0.25
<i>E. faecalis 2</i>	200	200	1	4	<i>E. coli 3</i>	50	200	4	0.5
<i>E. faecalis 3</i>	200	200	1	256	<i>E. coli 4</i>	400	>1600	>4	2
<i>E. faecalis 4</i>	100	100	1	1	<i>K. pneumoniae 1</i>	100	800	8	1
<i>E. faecium 1</i>	100	100	1	256	<i>K. pneumoniae 2</i>	100	800	8	1
<i>E. faecium 2</i>	200	200	1	4					
<i>S. pyogenes</i>	25	25	1	1					
<i>S. australis</i>	50	100	2	0.063					

GEN : Gentamicine, IPM : Imipénème.

Les plus basses CMI obtenues avec l'extrait de JPF2 étaient de $6.25 \mu\text{g/mL}$ contre *S. pyogenes* et *S. australis*, suivie de $12.5 \mu\text{g/mL}$ contre *M. luteus* et *M. yannicii*, le reste des CMI allaient de 25 à $200 \mu\text{g/mL}$ (tableau 9).

L'extrait de TBT7 quant à lui a montré une activité antibactérienne très forte contre toutes les bactéries utilisées, les CMI ne dépassaient pas les $23.4 \mu\text{g/mL}$, obtenue contre *E. faecalis 3* et 4, les plus fortes activités étaient observées contre *M. yannicii* et *S. pyogenes* avec les plus basses CMI de 1.5 et $0.73 \mu\text{g/mL}$ respectivement (tableau 9).

Ces deux extraits ont montré des CMI plus basses (100 et $25 \mu\text{g/mL}$ avec l'extrait de JPF2 et 23.4 et $2.9 \mu\text{g/mL}$ avec l'extrait de TBT7) que celles de la gentamicine ($256 \mu\text{g/mL}$) concernant les bactéries *E. faecalis 3* et *E. faecium 1*. En plus de ces deux bactéries, l'extrait de TBT7 a été plus actif contre *E. faecalis 1* ($5.9 \mu\text{g/mL}$) et *S. pyogenes* ($0.73 \mu\text{g/mL}$) par rapport à la gentamicine (8 et $1 \mu\text{g/mL}$ respectivement)

L'activité de l'extrait de TBT10 était faible avec des CMI allant de 562.5 µg/mL obtenue contre la bactérie *S. pyogenes*, jusqu'à des CMI de 4500 µg/mL avec *S. aureus* 5 et *M. luteus* (tableau 9).

Tableau 9. Les valeurs des CMI et des CMB (µg/mL) obtenues par l'extrait de dichlorométhane de JPF2, et ceux d'acétate d'éthyle de TBT7 et TBT10 contre les différentes bactéries pathogènes.

Bactéries à Gram positif	JPF2			TBT7			TBT10			GEN
	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI	CMB	CMB/CMI	CMI
<i>B. cereus</i>	25	25	1	5.9	5,9	1	2250	2250	1	0.25
<i>M. luteus</i>	12.5	50	4	5.9	5.9	1	4500	4500	1	0.063
<i>M. yannicii</i>	12.5	12.5	1	1.5	1.5	1	2250	2250	1	0.5
<i>S. aureus</i> 1	50	100	2	5.9	11.7	1.98	2250	4500	2	0.5
<i>S. aureus</i> 2	25	50	2	2.9	5.9	2.03	2250	4500	2	0.25
<i>S. aureus</i> 3	50	100	2	5.9	11.7	1.98	2250	4500	2	0.25
<i>S. aureus</i> 4	50	100	2	5.9	11.7	1.98	2250	4500	2	0.5
<i>S. aureus</i> 5	50	200	4	11.7	46.8	4	4500	>4500	Nd	0.25
<i>E. faecalis</i> 1	100	200	2	5.9	5.9	1	1125	4500	4	8
<i>E. faecalis</i> 2	200	400	2	11.7	11.7	1	1125	4500	4	4
<i>E. faecalis</i> 3	100	100	1	23.4	23.4	1	1125	1125	1	256
<i>E. faecalis</i> 4	50	50	1	23.4	23.4	1	1125	>4500	>4	1
<i>E. faecium</i> 1	25	25	1	2.9	2.9	1	1125	>4500	>4	256
<i>E. faecium</i> 2	50	200	4	5.9	5.9	1	1125	1125	1	4
<i>S. pyogenes</i>	6.25	6.25	1	0.73	0.73	1	562.5	562.5	1	1
<i>S. australis</i>	6.25	6.25	1	2.9	2.9	1	2250	2250	1	0.063

Nd : Non déterminé, GEN : Gentamicine.

Selon Appiah *et al.*, (2017) lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4, l'extrait est dit bactéricide, et à l'inverse, s'il est supérieur à 4, on parle d'extrait bactériostatique. Dans cette étude, en calculant les rapports CMB/CMI, tous les extraits s'avèrent être bactéricides par rapport aux bactéries à Gram positifs, sauf pour l'extrait de TBT10 qui pour les souches *E. faecalis* 4 et *E. faecium* 1 l'effet a été bactériostatique. Pour les bactéries à Gram négatif, l'extrait de MPR1 était bactériostatique pour *A. baumannii*, *P. aeruginosa* 1et 2, *E. coli* 4 et les deux *K. pneumoniae* 1 et 2 et bactéricide pour le reste des souches bactériennes.

En comparant les activités obtenues par les différents extraits contre les bactéries à Gram positif, on peut conclure que l'extrait le plus actif était celui de TBT7, suivi de ceux de JPF2, MPR1 et de TBT10.

Les résultats obtenus contre les dermatophytes (tableau 10) montrent que les extraits de JPF2 et MPR1 étaient les plus actifs, et où des CMI ont atteints les valeurs de 31.25 µg/mL contre les 4 dermatophytes filamenteux avec l'extrait de JPF2, et des valeurs de 11.72 µg/mL contre *E. floccosum*, *M. canis* et *T. mentagrophytes* avec l'extrait de MPR1. L'extrait de TBT7 était plus actif contre *E. floccosum* avec une CMI de 31.25 µg/mL, alors que l'extrait de TBT10 n'était pas très actif avec des CMI égales ou supérieures à 4000 µg/mL.

Tableau 10. Les valeurs des CMF (µg/mL) obtenues par les extraits des champignons endophytes contre les différents dermatophytes.

	Concentration minimal inhibitrice (µg/mL)				
	MPR1	JPF2	TBT7	TBT10	Terbinafine
<i>C. albicans</i>	750	500	>2000	>4000	>16
<i>E. floccosum</i>	11.72	31.25	31.25	4000	0.25
<i>M. canis</i>	11.72	31.25	250	>4000	1
<i>T. rubrum</i>	46.88	31.25	250	4000	1
<i>T. mentagrophytes</i>	11.72	31.25	125	>4000	0.25

Selon les résultats, il existe différents niveaux de sensibilité des microorganismes pathogènes aux extraits fongiques. Cette variation de susceptibilité dépend aussi bien de la différence de composition des extraits bruts, que de la différence entre les microorganismes pathogènes utilisés et leur sensibilité aux composés bioactifs présents dans ces extraits (Yenn *et al.*, 2017).

En 2016, Wang *et al.*, ont isolé et identifié six molécules ayant une activité inhibitrice contre *Mycobacterium tuberculosis* à partir de *Penicillium griseofulvum* CPCC-400528. Parmi ces dernières, deux molécules précurseurs de la patuline (isopatulin et (+)-epiepopoformine) ont montré une bonne activité contre une large gamme de bactéries pathogènes et résistantes aux antibiotiques, où les CMI obtenues contre *E. faecalis* résistante à la vancomycine et *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes, étaient de 128 µg/mL pour les deux molécules précurseurs de la patuline, alors que pour l'extrait de MPR1, les CMI étaient de 100 µg/mL. À partir de ce même champignon *Penicillium griseofulvum* CPCC-400528 (Zhang *et al.*, 2017) ont isolé 4 nouvelles molécules et 5 molécules connues possédant une activité antibactériennes avec des CMI allant de 0.125 à 256 µg/mL.

De Amorim *et al.*, (2016) ont déterminé les CMI de quatre molécules produites par *Anthostomelloides brabeji* (anciennement appelée *Anthostomella brabeji*), une autre espèce

du genre *Anthostomelloides* isolé en tant qu'endophyte à partir de *Paepalanthus planifolius*, contre *E. coli*, *S. aureus*, *S. setubal* et *C. albicans*. La meilleure activité a été observée avec les deux molécules siccayne et eutypinol, où la première avait une CMI de 62.5 µg/mL contre *S. aureus* et *C. albicans*, alors que la deuxième a montré une CMI de 31.25 µg/mL contre *S. aureus* et *S. setubal*. Pour les deux autres molécules les CMI allaient de 250 µg/mL jusqu'à des valeurs supérieures à 1000 µg/mL.

III.8. Cinétique de létalité

L'activité bactéricide vis-à-vis de deux bactéries, une à Gram positif et l'autre à Gram négatif pour MPR1 et deux à Gram positif pour le reste des isolats a été confirmée par le test de la cinétique de létalité (time kill).

La cinétique de létalité obtenue avec l'extrait de MPR1 a montré un pourcentage de létalité de 100% des deux bactéries, avec les concentrations CMIx2 (400 µg/mL) et CMIx4 (800 µg/mL), après 2 heures et 1 heures de contact respectivement avec *P. aeruginosa* 3, contrairement à *S. aureus* 2 où l'effet bactéricide n'a été observé qu'après 24 heures pour les deux concentrations (CMIx2 = 200 µg/mL et CMIx4 = 400 µg/mL) (figure 53).

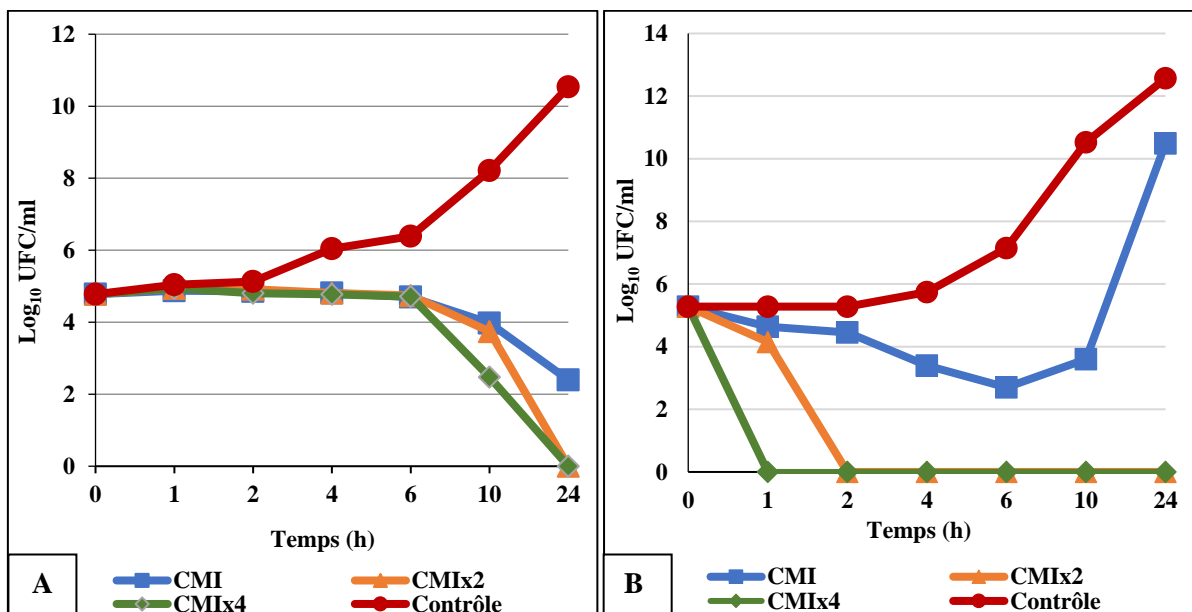


Figure 53. La cinétique de létalité de l'extrait de MPR1. (A): *S. aureus* 2, (B): *P. aeruginosa* 3.

L'effet bactéricide de l'extrait de JPF2 n'a été observé qu'après 12 heures de contact avec les deux bactéries, sauf que pour *S. aureus* 2, la concentration bactéricide était la CMIx4

(100 µg/mL), par contre pour *E. faecium* 2, l'effet bactéricide a été obtenu aussi bien avec la CMIx4 (200 µg/mL) qu'avec la CMIx2 (100 µg/mL) (figure 54).

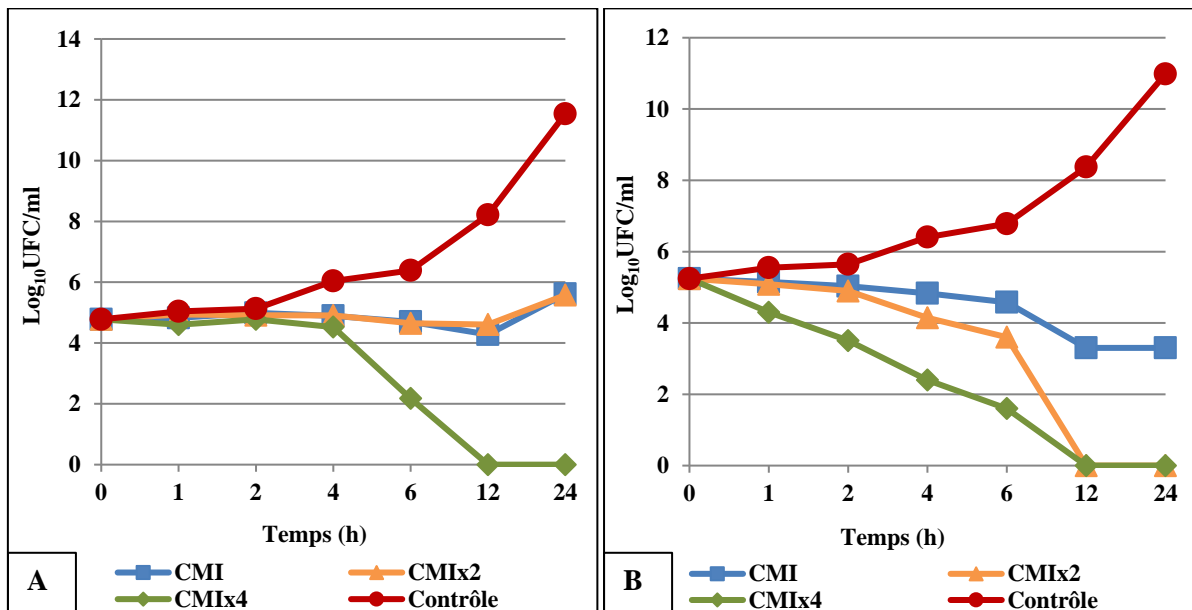


Figure 54. La cinétique de létalité de l'extrait de JPF2. (A): *S. aureus* 2, (B): *E. faecium* 2.

L'extrait de TBT7 a été bactéricide à des concentrations égales à la CMI et la CMIx2, pour les deux bactéries utilisées *S. aureus* 2 (2.9 µg/mL et 5.8 µg/mL) et *E. faecium* 2 (5.9 µg/mL et 11.8 µg/mL) et ceci après 24 heures de contact avec la première, et 1 heures (CMIx2) et 2 heures (CMI) pour la deuxième bactérie (figure 55).

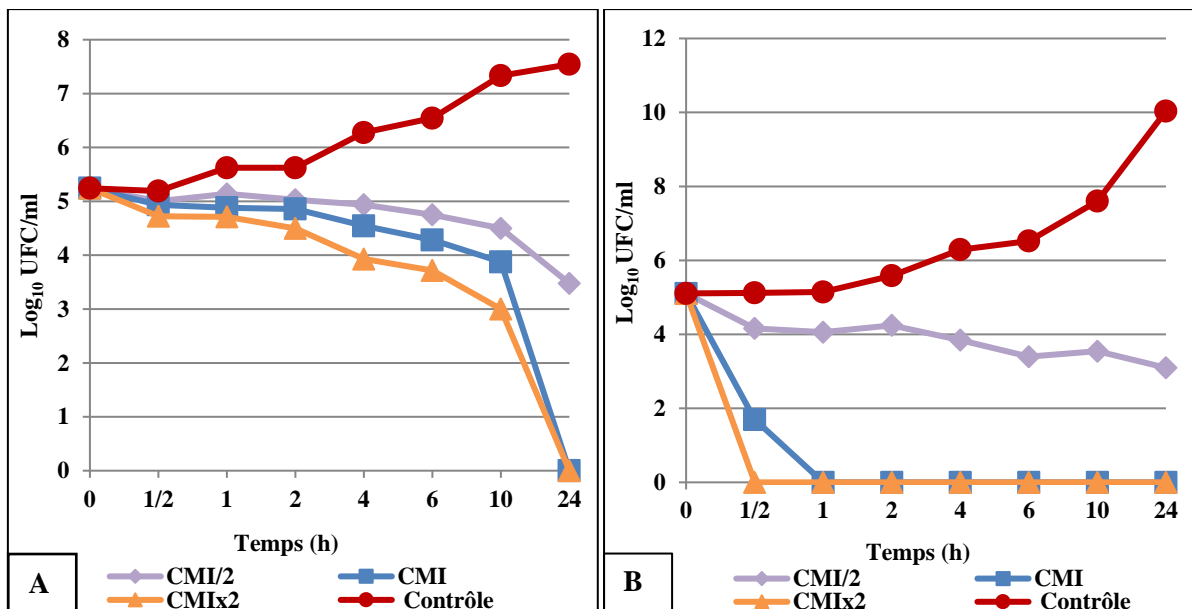


Figure 55. La cinétique de létalité de l'extrait de TBT7. (A): *S. aureus* 2, (B): *E. faecium* 2.

L'effet bactéricide de l'extrait de TBT10 contre *E. faecium* 2 a été observé après 1 et 24 heures avec les concentrations CMIx4 (4500 µg/mL) et CMIx2 (2250 µg/mL) respectivement ; par contre, pour *S. pyogenes* toutes les concentrations utilisées (CMI= 562.5 µg/mL, CMIx2= 1125 µg/mL et CMIx4= 2250 µg/mL) avaient une activité bactéricide après 12, 4 et 1h de contact respectivement (figure 56).

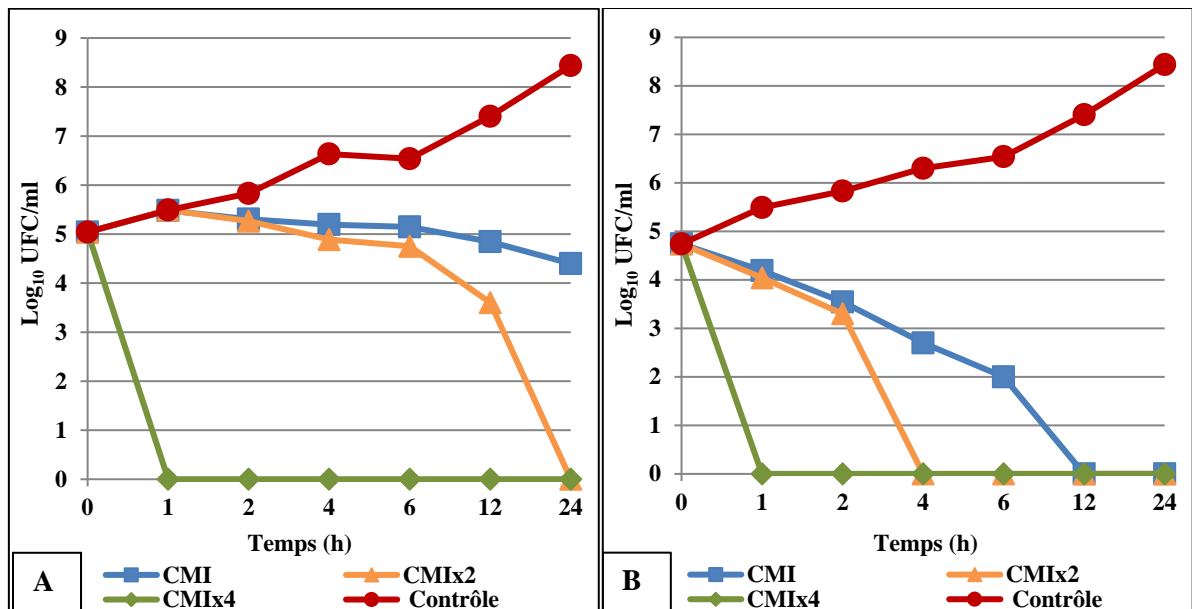


Figure 56. La cinétique de létalité de l'extrait de TBT10. (A): *E. faecium* 2, (B): *S. pyogenes*.

La cinétique de létalité (time kill) est une approche qui permet de fournir des informations plus dynamiques concernant la relation entre la concentration et la durée de contact avec l'agent antimicrobien, elle permet de comparer l'effet antimicrobien de différentes concentrations d'extraits à différents moments d'incubation (Taufiq et Darah, 2018).

Plusieurs études ont montré l'effet bactéricide des extraits de champignons endophytes contre *S. aureus* résistant à la pénicilline. L'extrait d'acétate d'éthyle de *Lasiodiopodia pseudotheobromae* IBRL OS-64, a été bactéricide à une concentration correspondante à la CMI (125 µg/mL) (Taufiq et Darah, 2018), une concentration de 3125 µg/mL a été nécessaire pour tuer 99.9% de *S. aureus* résistant à la pénicilline après 24 h de contact avec l'extrait de *Polycephalomyces nipponicus* Cod-MK1201 (Thammawat *et al.*, 2017).

Ibrahim *et al.*, (2015) a étudié la cinétique de létalité de *S. aureus* et *K. pneumoniae* soumises à des différentes concentrations de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Nigrospora sphaerica*, ainsi que l'évolution morphologique de leurs cellules lors du traitement par

microscope électronique à balayage. Une concentration de 2 fois la CMI (0.4 mg /mL pour SARM et 1.6 mg /mL pour *K. pneumoniae*) était nécessaire afin d'exercer l'effet inhibiteur sur ces deux bactéries.

III.9. Activité antioxydante

III.9.1. Détermination de la teneur totale en composés phénoliques et en flavonoïdes

Les résultats du dosage des polyphénols (tableau 11) montrent que les extraits de MPR1, JPF2 et CAR11 contiennent les plus grandes quantités de polyphénols de l'ordre de 72.51 ± 3.07 , 71 ± 1.20 et 61.52 ± 0.63 $\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait respectivement, suivie de l'extrait de TBT7 (61.2 ± 9.33 $\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) et celui de TBT10 (25.22 ± 0.19 $\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait). En ce qui concerne les flavonoïdes (tableau 11), tous les extraits fongiques contiennent de faibles quantités de flavonoïdes allant de 0.55 ± 0.08 à 1.71 ± 0.03 $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait obtenues avec les extraits de TBT10 et JPF2 respectivement.

Selon Hameed *et al.*, (2017), les polyphénols et les flavonoïdes sont des molécules qui offrent aux champignons une protection contre les radicaux libres, plusieurs études ont rapporté la capacité des champignons endophytes à produire ces molécules, on citera à titre d'exemple celle de Danagoudar *et al.*, (2017) et (Govindappa *et al.*, 2011). Cependant, plusieurs facteurs tels que la polarité et la concentration du solvant d'extraction, ainsi que les différentes conditions d'extraction telles que la température, la durée de l'extraction, la vitesse d'agitation peuvent influencer sur ces résultats, c'est pour cette raison qu'il est difficile de faire une comparaison (Muhamad *et al.*, 2014; Hameed *et al.*, 2017).

Tableau 11. Teneurs des extraits fongiques en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

Extrait fongique	Composés phénoliques ($\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait)
MPR1	72.51 ± 3.07	1.061 ± 0.02
JPF2	71 ± 1.20	1.71 ± 0.03
CAR11	61.52 ± 0.63	1.21 ± 0.16
TBT7	61.2 ± 9.33	0.84 ± 0.19
TBT10	25.22 ± 0.19	0.55 ± 0.08

Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

III.9.2. Activité antiradicalaire (DPPH et ABTS^{•+})

Les profils de l'activité de piégeage du radical DPPH (figure 57) des 5 isolats fongiques, montrent que leurs activités antiradicalaires sont dépendantes de la concentration. Les meilleurs pourcentages d'inhibition obtenus étaient de 80.91% à une concentration de 768 µg/mL pour l'extrait de l'isolat MPR1, de 82.74% et 82.00% à une concentration de 384 µg/mL pour les extraits de JPF2 et CAR11 respectivement et de 59.54% et 38.89% à une concentration de 3072 µg/mL pour les extraits de TBT7 et de TBT10 respectivement.

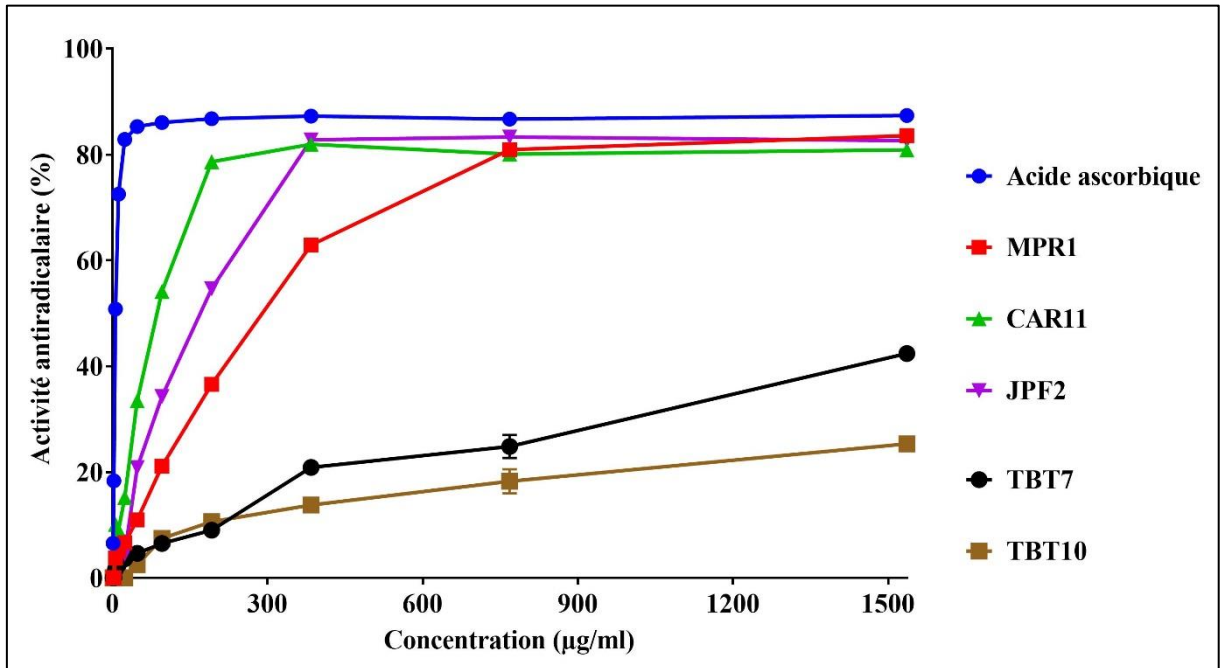


Figure 57. Activité antiradicalaire des extraits fongiques et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD.

Une comparaison de l'activité antiradicalaire des extraits fongiques avec un antioxydant de référence qui est l'acide ascorbique a été faite en calculant l'IC₅₀ pour chacun des extraits et de l'acide ascorbique, la plus petite valeur d'IC₅₀ correspond à la plus grande activité antiradicalaire (figure 58). L'extrait de CAR11 a montré l'activité antiradicalaire la plus forte avec l'IC₅₀ la plus faible de 84.82 \pm 0.18 µg/mL suivie de l'extrait de JPF2 (165.6 \pm 0.052 µg/mL), celui de MPR1 (258.1 \pm 0.11 µg/mL), TBT7 (977.3 \pm 9.546 µg/mL) et finalement l'extrait de TBT10 avec une IC₅₀ de 3657 \pm 16.15 µg/mL. D'un autre côté l'acide ascorbique a montré une très forte activité antiradicalaire avec une IC₅₀ de 10.15 \pm 0.1359 µg/mL.

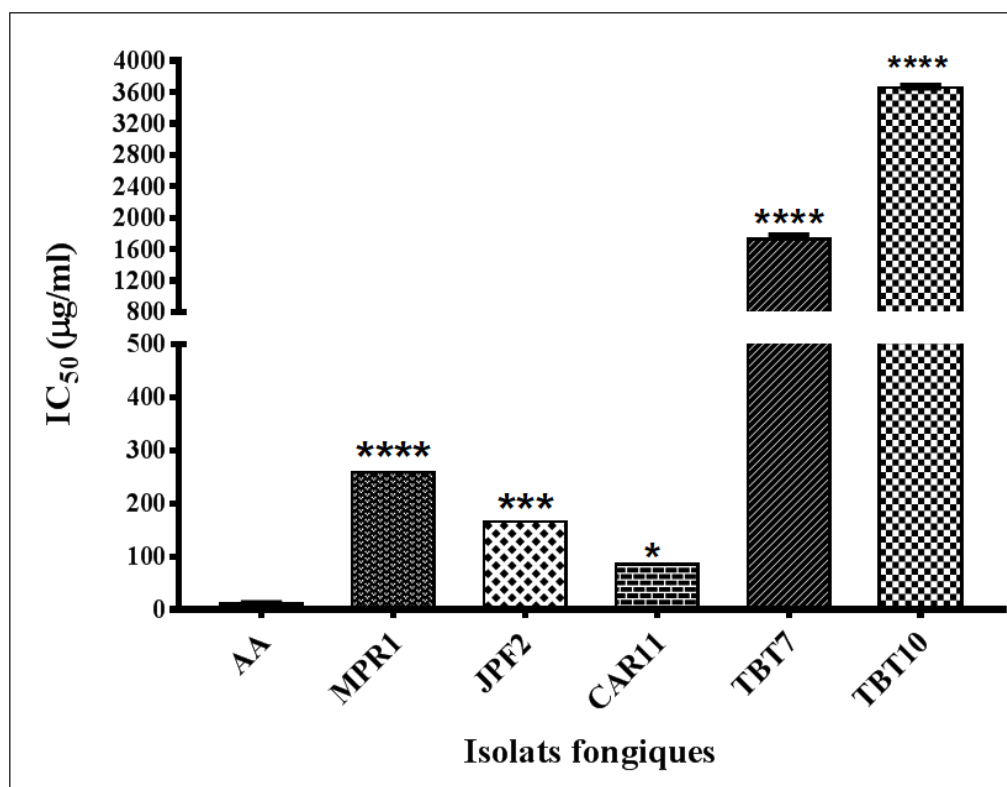


Figure 58. Valeurs des IC₅₀ des différents extraits fongiques et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH. Les valeurs représentent la moyenne de deux essais \pm SD. La comparaison est réalisée par rapport à l'acide ascorbique, *: $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.0004$, **** : $p \leq 0.0001$, AA : Acide ascorbique.

Le test DPPH est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres des extraits fongiques, elle est basée sur la réduction d'une solution méthanolique de DPPH (couleur pourpre) en présence d'un antioxydant qui lui donne un hydrogène ou un électron, produisant ainsi la forme non radicalaire 2,2-diphényl-1-hydrazine (couleur jaune), l'activité antioxydante dans cette étude se mesure donc en mesurant cette décoloration (Prihantini et Tachibana, 2017). Différentes études ont montré l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH des champignons endophytes. Par exemple, 14 extraits de différents champignons endophytes isolés à partir de 5 espèces de plantes appartenant au genre *Garcinia* ont montré une activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH avec des IC₅₀ allant de 30 à 250 µg/mL (Phongpaichit *et al.*, 2007). Une autre étude a permis la détermination de l'activité antiradicalaire de 13 isolats fongiques isolés à partir de *Costus spiralis* avec des IC₅₀ variant de 378.01 ± 0.87 à 1802.26 ± 1.23 µg/mL (Marson Ascêncio *et al.*, 2014).

La capacité antiradicalaire des extraits étudiés a été confirmée par le test ABTS. Les résultats exprimés en pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} représentés dans la figure

59) montrent que les pourcentages d'inhibition augmentent avec l'augmentation des concentrations des extraits fongiques, où les meilleurs pourcentages d'inhibition atteints étaient de 82.59%, 93.32%, 93.45%, 91.43% et 52.50% en utilisant les concentrations de 1536 µg/mL (MPR1 et JPF2), de 768 µg/mL (CAR11) et de 3072 µg/mL (TBT7 et TBT10) respectivement.

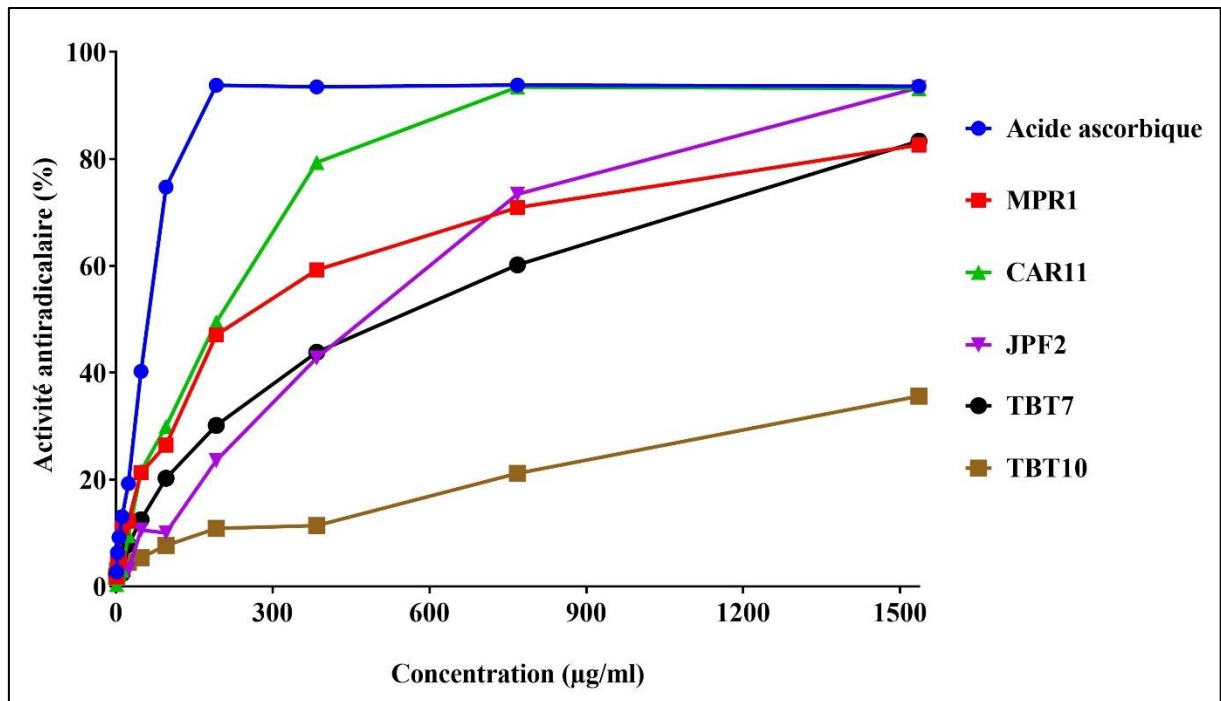


Figure 59. Activité antiradicalaire des extraits fongiques et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical ABTS^{•+}. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais ± SD.

Les résultats sont également exprimés en IC₅₀ (figure 60), où la meilleure activité antiradicalaire a été obtenue avec l'extrait de CAR11, suivie de MPR1, TBT7, JPF2 et TBT10 avec des IC₅₀ de (219.8±0.024 µg/mL), (248.9±0.88 µg/mL), (405.8±0.55 µg/mL), (445±0.32 µg/mL) et (2704±0.02 µg/mL) respectivement, toutes inférieures de celle obtenue avec l'acide ascorbique (62.5±0.02 µg/mL).

Le test ABTS est un test basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleue-verte en ABTS incolore, par le transfert d'un électron à partir d'un antioxydant. Plusieurs extraits de champignons endophytes isolés à partir de quatre plantes médicinales ont montré également la capacité de piéger ce radical avec des IC₅₀ variant de 3.34 jusqu'à 915 µg/mL (Uzma et Chowdappa, 2017).

Selon Huang *et al.*, (2007) et Loganayaki *et al.*, (2013), l'activité de piégeage des radicaux libres est liée aux polyphénols connus par leur activité antioxydante.

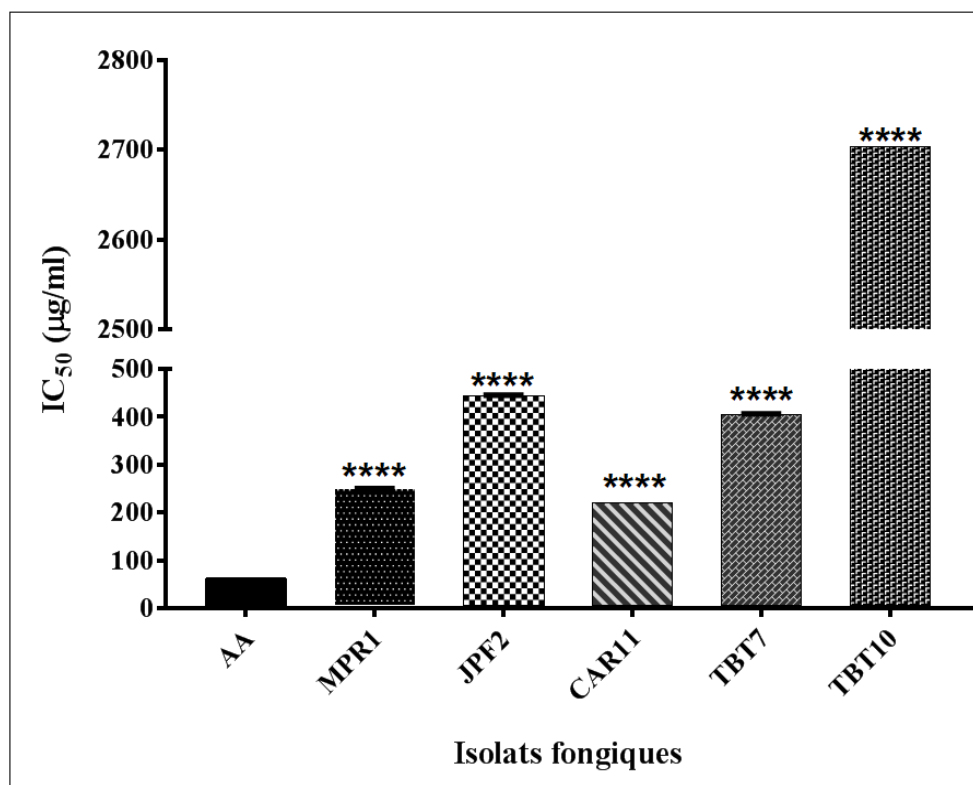


Figure 60. Valeurs des IC₅₀ des différents extraits fongiques et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical ABTS^{•+}. Les valeurs représentent la moyenne de deux essais ± SD. La comparaison est réalisée par rapport à l'acide ascorbique, **** : $p \leq 0.0001$, AA : Acide ascorbique.

III.9.3. Activité antioxydante réductrice du fer

A côté de leur pouvoir antioxydant par le piégeage des radicaux libres, la capacité des extraits de champignons endophytes à réduire le Fe³⁺ (fer ferrique) en Fe²⁺ (fer ferreux), a été testé.

Comme il a été montré dans les deux tests précédents (DPPH et ABTS), l'extrait de CAR11 montre le pouvoir réducteur le plus élevé qui est de l'ordre de 1746 ± 2.59 µmol Fe²⁺/mg d'extrait, suivie de l'extrait de JPF2 (1218 ± 0.00 µmol Fe²⁺/mg d'extrait), de celui de MPR1 (748.5 ± 0.24 µmol Fe²⁺/mg d'extrait), TBT7 (450.5 ± 0.47 µmol Fe²⁺/mg d'extrait) et TBT10 (264.2 ± 0.24 µmol Fe²⁺/mg d'extrait) (figure 61).

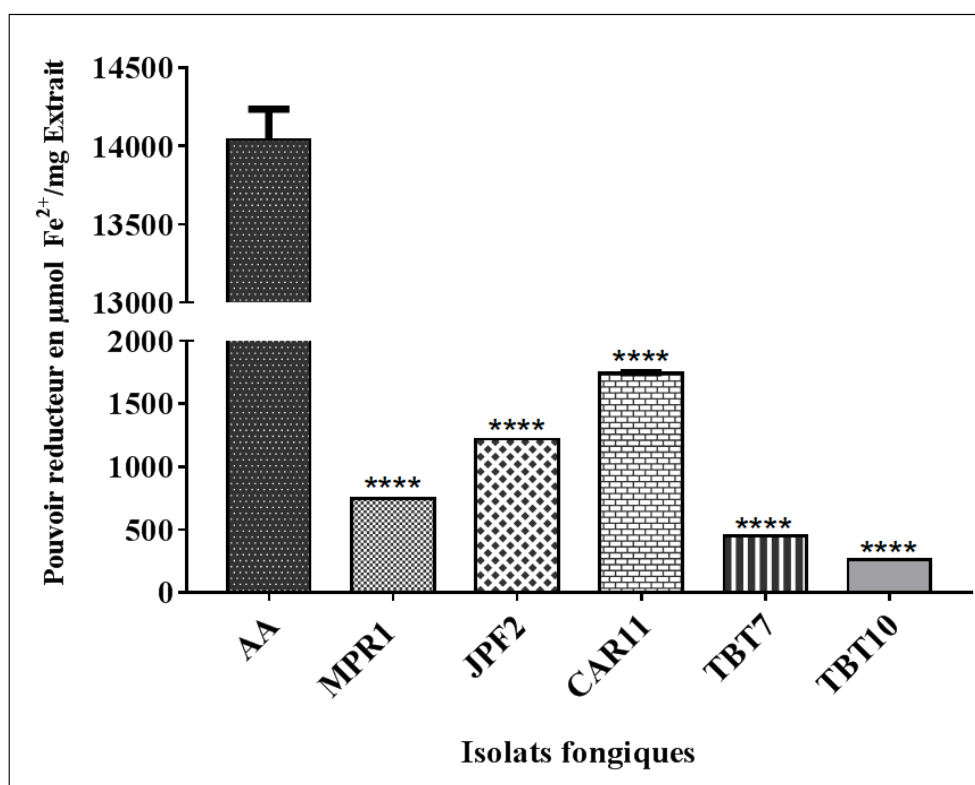


Figure 61. Le pouvoir réducteur des différents extraits fongiques et de l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne de deux essais \pm SD. La comparaison est réalisée par rapport à l'acide ascorbique, **** : $p \leq 0.0001$, AA : Acide ascorbique.

Le pouvoir de la réduction du fer se base sur la capacité de l'antioxydant à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} en présence de TBTZ, formant un complexe de couleur bleue (Fe^{2+} -TBTZ), avec une augmentation de l'absorbance à 593 nm.

Plusieurs études ont montré la capacité des champignons endophytes à réduire le complexe TPTZ- Fe^{3+} en TPTZ- Fe^{2+} , on citera à titre d'exemple, Umashankar *et al.*, (2014) qui ont testé les extraits de 5 isolats fongiques et ont montré leur activité réductrice qui était comprise entre 491.96 et 1338.46 $\mu\text{mol } Fe^{2+}/\text{mg}$ d'extrait. Une autre étude faite sur les champignons endophytes isolés à partir de *Crotalaria pallida* a montré que les extraits de ces champignons possédaient un pouvoir réducteur allant de 448.26 ± 0.06 à 1266.14 ± 0.06 $\mu\text{mol } Fe^{2+}/\text{mg}$ d'extrait (Govindappa *et al.*, 2011). Cette réduction du fer ferrique en fer ferreux est probablement due à la présence de molécules ayant la capacité de donner des électrons, arrêtant ainsi la réaction en chaîne déclenchée par les radicaux libres (Hulikere *et al.*, 2016; Gunasekaran *et al.*, 2017).

Habituellement, l'activité antioxydante est corrélée positivement avec les taux des polyphénols comme c'est le cas avec les travaux de Govindappa, (2013) et Gunasekaran *et al.*, (2017). Cependant, et selon Saraswaty *et al.*, (2013), l'activité antioxydante n'est pas uniquement lié aux taux de ces molécules mais également à leur structure, la position et le nombre des groupes hydroxyles joueraient un rôle dans l'activité antioxydante. Par exemple, le deuxième groupe hydroxyle en position méta entrainera une activité antioxydante inférieure à celle en position ortho et para. Le nombre plus élevé des groupes hydroxyles augmentera également l'activité antioxydante.

III.10. Activité antiproliférative

Selon les résultats obtenus après le premier test sur la lignée cellulaire (HepG2) (tableau 12), on a observé que les extraits des isolats MPR1, JPF2 et TBT10 avaient un effet antiprolifératif assez élevé avec des valeurs de CC₅₀ très basses de 0.2, 2.4 et 3.5 µg/mL respectivement et très proches de celle du témoin positif (0.11 µg/mL). Cependant, l'extrait de TBT7 a montré une CC₅₀ supérieur à 50 µg/mL.

Tableau 12. Les valeurs de CC₅₀ des extraits de MPR1, JPF2, TBT7 et TBT10 vis-à-vis de la lignée cellulaire HepG2.

Extraits fongiques	CC₅₀ (µg/mL) (HepG2)
MPR1	0.2
JPF2	2.4
TBT7	> 50
TBT10	3.5
Doxorubicine	0.11

Ces résultats nous ont permis de diviser nos extraits en deux groupes. Le premier regroupait les extraits de MPR1, JPF2 et TBT10. Ces extraits ont été testés sur 3 autres lignées cellulaires cancéreuses (A549, U251 et MDA-MB 231) pour confirmer leur pouvoir antiproliférative, alors que l'extrait de TBT7 formait le groupe 2 et a été testé sur deux lignées cellulaires saines (HaCaT et C8-D1A).

En observant la courbe des pourcentages de survie des cellules A549 après traitement avec différentes concentrations des extraits fongiques (figure 62), on remarque qu'avec toutes les concentrations utilisées, l'extrait de MPR1 présente une meilleure activité antiproliférative vis-à-vis de cette lignée cellulaire, suivie de l'extrait de TBT10 et de JPF2 avec des CC₅₀ de 1.72, 5.58 et 6.14 µg/mL respectivement (tableau 13).

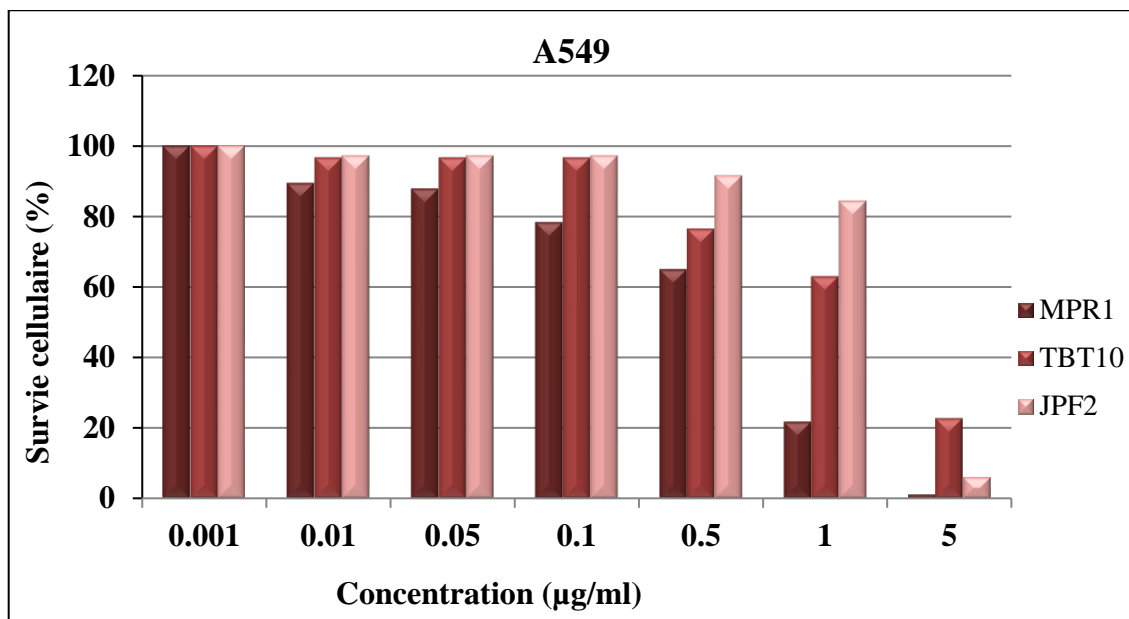


Figure 62. Effet des extraits de MPR1, TBT10 et JPF2 vis-à-vis de la lignée cellulaire A549.

Concernant la deuxième lignée cellulaire U251 (figure 63), l'extrait de TBT10 a montré une meilleure activité antiproliférative à toutes les concentrations utilisées, suivie de l'extrait de MPR1, alors que pour l'extrait de JPF2, le pourcentage des cellules vivantes n'a commencé à diminuer qu'à la concentration de 0.5 µg/mL. Les CC₅₀ obtenus vis-à-vis de cette lignée cellulaire étaient de 1.94, 2.97 et 7.79 µg/mL respectivement (tableau 13).

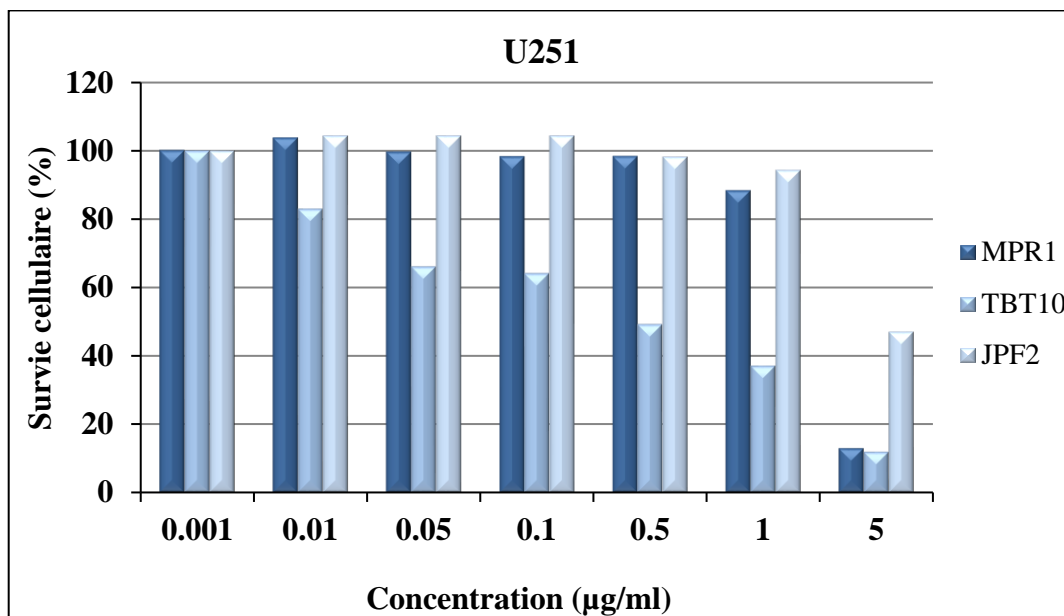


Figure 63. Effet des extraits de MPR1, TBT10 et JPF2 vis-à-vis la lignée cellulaire U251.

Pour la dernière lignée cellulaire cancéreuse MDA-MB 231 (figure 64), l'activité antiproliférative des trois extraits était proche. Cependant et à partir de la concentration 0.5 µg/mL, l'extrait de MPR1 a commencé à se détacher des deux autres avec le pourcentage de

survie le plus bas suivie de TBT10 et finalement JPF2. Les CC₅₀ obtenus contre cette lignée étaient de 2.19, 6.45 et 10.49 µg/mL respectivement (tableau 13).

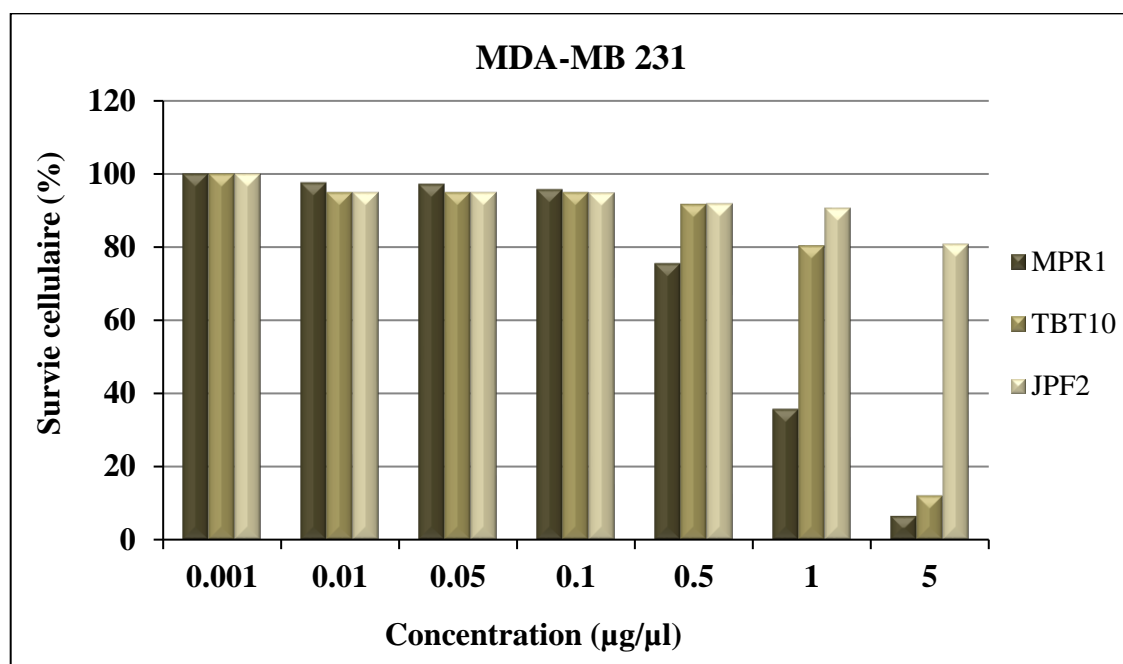


Figure 64. Effet des extraits de MPR1, TBT10 et JPF2 vis-à-vis de la lignée cellulaire MDA-MB 231.

Tableau 13. Les valeurs de CC₅₀ des extraits de fongiques vis-à-vis des différentes lignées cellulaires.

Extraits fongiques	A549	U251	MDA-MB 231	HaCaT	Astrocytes C8-D1A
MPR1	1.72	2.97	2.19	/	/
JPF2	6.14	7.79	10.49	/	/
TBT7	/	/	/	>40	>40
TBT10	5.58	1.94	6.45	/	/

Pour l'extrait de TBT7 (figures 65 et 66), et avec toutes les concentrations utilisées sur les deux lignées cellulaires saines aucune inhibition n'a été observée, et dans ce cas, la CC₅₀ doit être supérieur aux concentrations utilisées dans ce test (> 40 µg/mL).

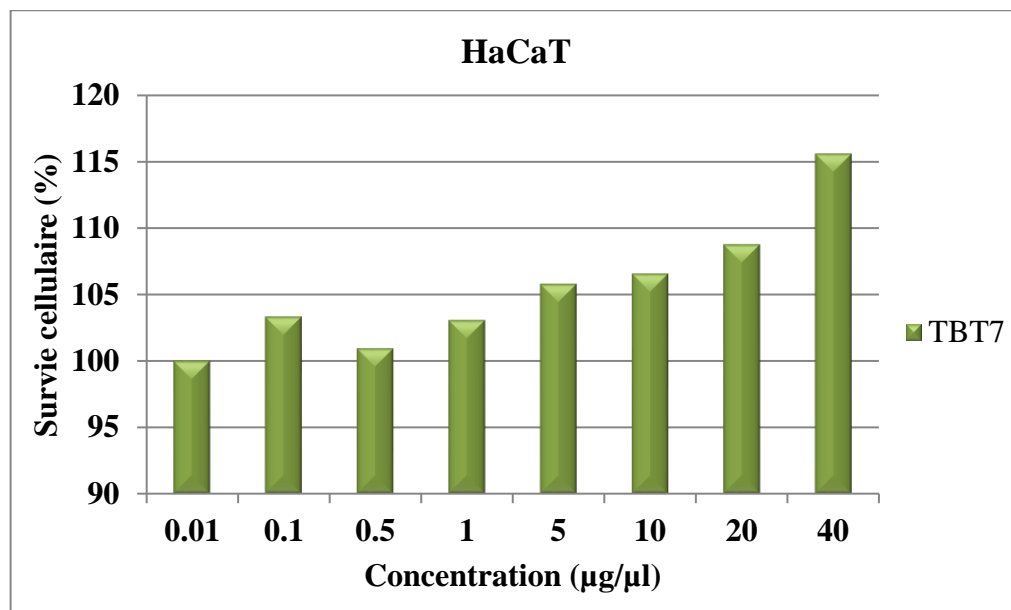


Figure 65. Effet de l'extrait de TBT7 vis-à-vis de la lignée cellulaire saine HaCaT.

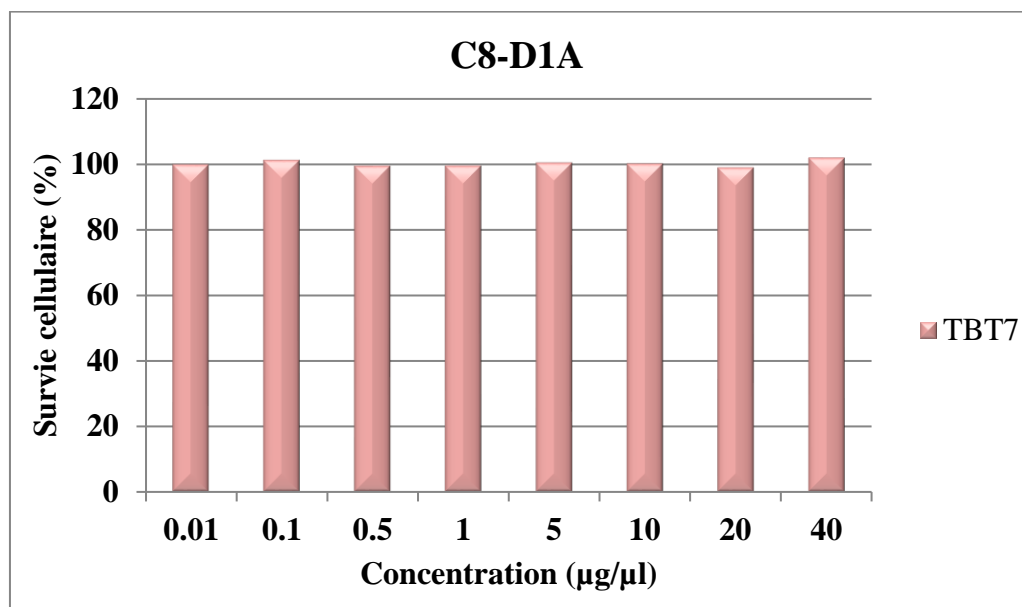


Figure 66. Effet de l'extrait de TBT7 vis-à-vis de la lignée cellulaire saine C8-D1A.

Le test colorimétrique au MTT est largement utilisé pour tester l'activité antiproliférative *in vitro*. Son principe repose sur la mesure de l'activité de la déshydrogénase mitochondriale dans la conversion du MTT en formazan. La concentration de formazan qui a une couleur violette, peut être déterminée par spectrophotométrie et sa corrélation avec le nombre de cellules vivantes est positive. Plus la DO est élevée, plus le sel de formazan est formé et plus il y a de cellules vivantes (Minarni *et al.*, 2017). Plusieurs études ont été faites sur l'activité anticancéreuse des extraits de champignons endophytes. Kuriakose *et al.*, (2018) ont montré l'activité de l'extrait du champignon endophyte *Penicillium sclerotiorum* isolé à

partir de *Cassia fistuca* L. contre les lignées A549 et U251, où les valeurs des IC₅₀ étaient de 10 et 32 µg/mL respectivement. En 2018, Xu et ses collaborateurs ont isolé 5 dérivés de la verrucosidine, dont deux nouvelles molécules à partir de l'extrait de *Penicillium* sp. XL-01. 3. Ces molécules avaient démontré une bonne activité antiproliférative vis-à-vis de HeLa, DAMB231, MCF7, MGC803 et A549 avec des IC₅₀ variant de 1.91 à 3.91 µM.

Récemment l'activité antiproliférative de la griséofulvine a été montrée contre les cellules HeLa avec une valeur du IC₅₀ de 20 µM, et elle a même amélioré l'effet du nocodazole lors d'un traitement combiné chez les souris infectées par des tumeurs COLO 205 (Bladt *et al.*, 2013). Selon De Amorim *et al.*, (2016), la siccayne, une molécule produite par le champignon endophyte *Anthostomelloides brabeji* (anciennement appelée *Anthostomella brabeji*), possède une activité antiproliférative contre deux lignées cellulaires cancéreuses HeLa et HT29.

Selon les directives du National Cancer Institute (NCI), tout extrait brut présentant des valeurs de CC₅₀ inférieures à 30 µg/mL est considéré comme une substance anticancéreuse prometteuse (Danagoudar *et al.*, 2018) ceci donne une très grande importance à nos trois extraits de champignons endophytes MPR1, TBT10 et JPF2 comme une importante source de molécules anticancéreuses. D'un autre côté, la non toxicité de l'extrait de l'isolat TBT7 ne fait que confirmer et valoriser son activité antimicrobienne.

III.11. Criblage et estimation de la production de L-asparaginase

Le criblage préliminaire (figure 67) nous a permis de sélectionner les isolats fongiques producteurs de L-asparaginase à savoir MPR1, CAR11 et TBT10, qui provoquent le virage de la couleur du milieu du jaune au rose causé par la dégradation de la liaison amide du L-asparagine et la libération de l'ammoniac qui provoque une modification du pH du milieu. Les indices enzymatiques des isolats sélectionnés sont résumés dans le tableau 14.

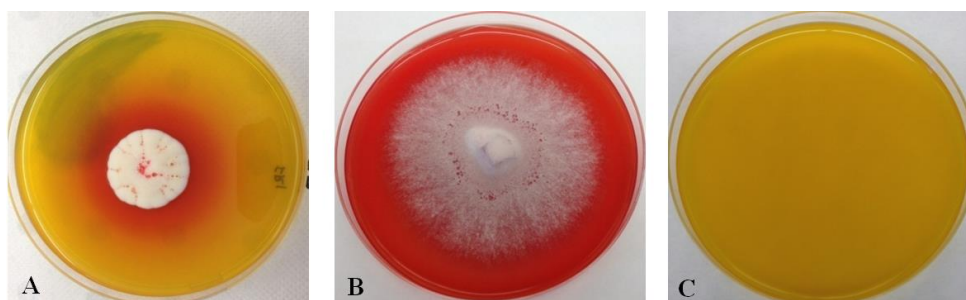


Figure 67. Production de L-asparaginase par certains isolats fongiques en milieu solide. (A): MPR1, (B): TBT10, (C): Témoin négatif.

Tableau 14. Indices enzymatiques des isolats fongiques producteurs de L-asparaginase.

Plantes hôtes	Champignons endophytes	Indices (moyenne ± SD)
<i>Mentha pulegium</i> L.	MPR1	1,6 ± 0,1
<i>Juniperus phoenicea</i> L.	JPF2	00± 0.0
<i>Cedrus atlantica</i> Man.	CAR11	1,0 ± 0.0
<i>Taxus baccata</i>	TBT7	00± 0.0
	TBT10	2,3 ± 0.7

Les valeurs représentent la moyenne de deux essais ± SD.

Pour les isolats sélectionnés et après une fermentation, une quantification de la production de l'enzyme a été faite par Nesslerization; les résultats exprimés en U/mL d'asparaginase sont représentés dans la figure 68. L'extrait de MPR1 a montré la meilleure production de l'enzyme avec 142.5±3.126 UI/mL de l'asparaginase, suivie de CAR11 et TBT10 avec 42.19±6.69 et 24±4.27 UI/mL respectivement.

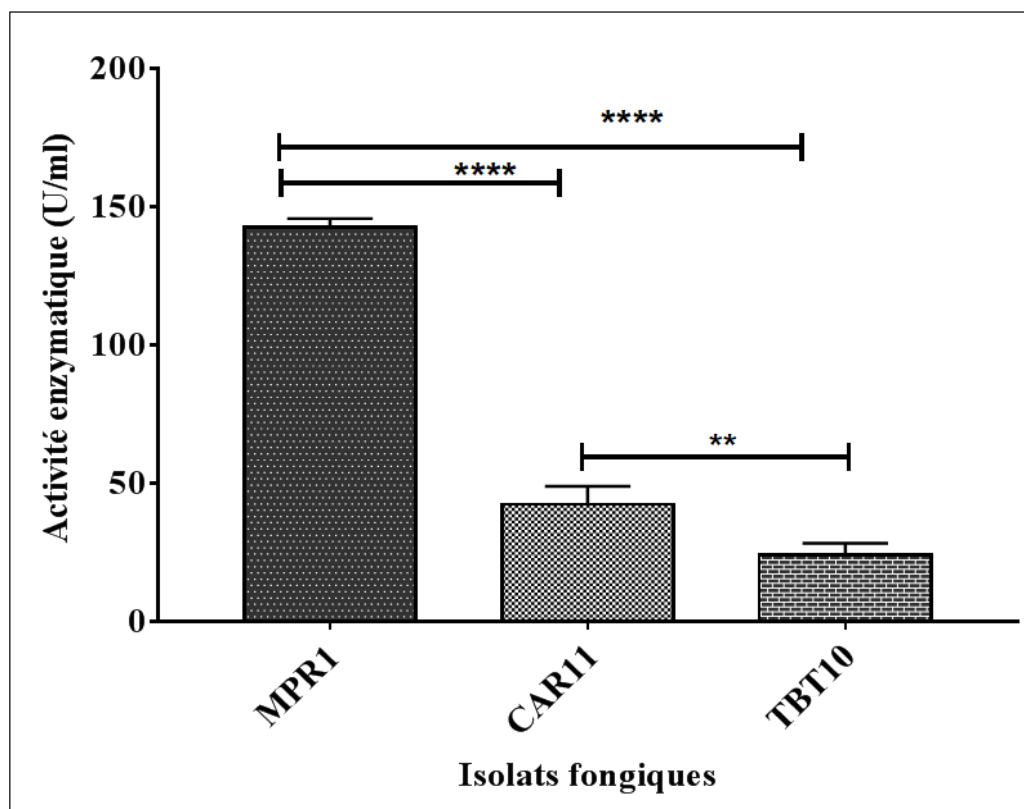


Figure 68. Activité asparaginase des isolats fongiques. Les valeurs représentent la moyenne de deux essais ± SD, ** : $p \leq 0.001$, **** : $p \leq 0.0001$.

L-asparaginase est l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'asparagine en ammoniac et acide aspartique, elle est utilisée comme médicament pour traiter plusieurs types de

cancers, tels que la leucémie lymphoblastique aiguë (Thirunavukkarasu *et al.*, 2011), elle agirait en privant les cellules cancéreuses de l'asparagine extracellulaire qui sont incapables de produire, inhibant ainsi la synthèse des protéines, et induisant l'apoptose des cellules néoplasique. Elle est utilisée également en industrie alimentaire pour diminuer le niveau d'asparagine libre dans les aliments, éliminant ainsi l'un des composés essentiels à la formation de l'acrylamide, un agent cancérigène trouvé dans un grand nombre d'aliments et de boissons préparés et traités thermiquement (Silva *et al.*, 2018).

Plusieurs microorganismes, quelques plantes et animaux ont la capacité de produire cette enzyme, par contre, seule l'enzyme produite et purifiée à partir de *Escherichia coli* et des espèces du genre *Eerwinia* est utilisée dans le traitement du la leucémie lymphoblastique ; cependant, elle s'est avérée être toxique et a de nombreux effets secondaires, et c'est pour ces raisons que ces dernières années, on s'est orienté vers les champignons comme une source alternative de L-asparaginase qui serait moins toxique (Chow et Ting 2015; Krishnapura et Belur, 2016).

Les résultats obtenus avec nos isolats fongiques sont relativement plus élevés par rapport à la plupart des champignons endophytes rapportés, à savoir les champignons isolés à partir des feuilles de *Sueada monoica* où la meilleure activité de l'asparaginase a été observée avec l'extrait du champignon *Aspergillus terreus* (35.28 UI/mL) (Kalyanasundaram *et al.*, 2015), les champignons endophytes isolés à partir d'algues marines avec la meilleure production observée chez l'isolat *Fusarium* sp. 3 (\approx 67 UI/mL) (Thirunavukkarasu *et al.*, 2011). Ces résultats montrent que nos isolats fongiques peuvent représenter une bonne source de L-asparaginase.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Vu les différents problèmes de santé, leur gravité ainsi que leur évolution dramatique ces dernières années, la recherche de nouvelles molécules naturelles bioactives a eu un énorme essor afin de lutter contre ces problèmes. C'est dans ce sens que s'inscrit notre travail, où on a exploré une source qui jusqu'à maintenant n'a pas été très exploré mais qui s'est révélée être une source inépuisable de métabolites secondaires bioactifs qui est les champignons endophytes. Pour cela, 4 plantes médicinales *Mentha pulegium* L., *Juniperus phoenicea* L., *Cedrus atlantica* Man. et *Taxus baccata*. ont été choisies sur la base de leur histoire ethnobotanique intéressante

A partir de ces 4 plantes et après une stérilisation de la surface, un total de 115 isolats fongiques ont été isolés. 16 à partir de *Mentha pulegium* L., 26 de *Juniperus phoenicea* L., *Cedrus atlantica* Man. et *Taxus baccata* ont permis l'isolement de 43 et 30 isolats respectivement. Parmi ces isolats, sept se sont montrés actifs contre plusieurs bactéries et champignons pathogènes lors du criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne.

Dans le but de les identifier, une identification morphologique par observation macroscopique et microscopique des sept isolats fongiques présélectionnés a été réalisé en premier et a permis de rattacher 2 des isolats présélectionnés (MPR1 et CAR11) au genre *Penicillium* et de regrouper JPF2, JPF3 et JPF4 en un seul morphotype. En deuxième lieu, une identification par spectrométrie de masse a été faite et n'a abouti à aucune identification sauf pour l'isolat MPR1 qui a été identifié comme étant un *Penicillium griseofulvum*. Finalement, une identification moléculaire par séquençage de différentes régions de l'ADN, nous a permis de confirmer le rattachement des isolats MPR1 et CAR11 au genre *Penicillium* et plus précisément aux espèces *Penicillium griseofulvum* et *Penicillium canescens* respectivement ainsi que celui de l'isolat TBT10 à l'espèce *Anthostomelloides leucospermi*. Le groupe JPF2, JPF3, JPF4 a été identifié comme appartenant à une nouvelle espèce, du genre *Micronematobotrys*. Notre étude est la deuxième à avoir isolé une nouvelle espèce appartenant à ce genre, et la première à l'avoir isolé à partir de *Juniperus phoenicea* L.. Concernant TBT7, sa morphologie ainsi que sa position dans l'arbre phylogénétique construit avec les espèces les plus proches ont montré que c'est une nouvelle espèce appartenant au genre *Dermea*.

Dans le but d'optimiser la production des molécules bioactives, le choix du milieu de culture, du type de fermentation (en milieu liquide ou solide) ainsi que du solvant donnants la

meilleure activité antimicrobienne a été fait. Pour tous les isolats, le milieu MEA était celui qui a donné une meilleure activité antimicrobienne sauf pour l'isolat TBT10, pour lequel c'est le milieu PDA qui a été choisi. Pour le type de fermentation, les extraits obtenus à partir des cultures solides de JPF2, CAR11 et TBT7 étaient plus actifs sur les microorganismes pathogènes que ceux obtenus à partir des cultures liquides. Pour les autres isolats MPR1 et TBT10, la culture en milieu liquide a été choisie. Concernant le solvant d'extraction, l'acétate d'éthyle était celui qui extrait le mieux les molécules bioactives pour tous les isolats, alors que c'est le dichlorométhane pour JPF2.

L'activité antimicrobienne des extraits des 4 isolats contre une large gamme de bactéries pathogènes, multi-résistantes et des dermatophytes a été testée. L'extrait de MPR1 a été actif contre tous les microorganismes pathogènes utilisés (bactéries à Gram positif, négatif et dermatophytes) et le plus actif parmi les 4 autres extraits, qui ont été actifs quant à eux, seulement contre les bactéries à Gram positif et les dermatophytes.

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que des concentrations minimales bactéricides (CMB) les plus basses ont été obtenues avec les extraits de TBT7 et de JPF2, suivies de celles de MPR1 et de TBT10. L'effet bactéricide des extraits vis-à-vis de deux bactéries a été confirmé par le test de la cinétique de létalité, où l'extrait de TBT7 a montré l'effet bactéricide le plus efficace.

L'évaluation quantitative du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes a révélé la présence de ces molécules dans tous les extraits fongiques testés, ce qui pourrait expliquer leur pouvoir de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS⁺ ainsi que leur pouvoir réducteur du fer (FRAP).

Un criblage préliminaire nous a permis de sélectionner les isolats MPR1, CAR11 et TBT10 comme producteurs de L-asparaginase, ces derniers ont subi une fermentation sur milieu McDox, et une quantification de l'enzyme produite. Selon les résultats obtenus, les trois isolats fongiques se sont révélés être une bonne source de l'enzyme.

Le test de l'activité antiproliférative a montré que les extraits des isolats MPR1, JPF2 et TBT10 possèdent une bonne activité antiproliférative contre différentes lignées cellulaires cancéreuses, alors que pour l'extrait de TBT7, aucune activité antiproliférative contre les lignées cellulaires saines n'a été observée.

Les perspectives de ce présent travail sont multiples et les principales peuvent être résumées comme suit :

- L'étude des paramètres physico-chimiques afin d'améliorer la production des métabolites secondaires
- L'isolement, la purification et l'identification des molécules actives produites par les différents isolats fongiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdel-Rahim IR, Abo-Elyousr KAM. 2018. *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. *Microbiol Res.* 212–213:1–9.
- Adnan M, Alshammari E, Ashraf SA, Patel K, Lad K, Patel M. 2018. Physiological and molecular characterization of biosurfactant producing endophytic fungi *Xylaria regalis* from the cones of *Thuja plicata* as a potent plant growth promoter with its potential application . *Biomed Res Int.* 2018:1–11.
- Aires A, Marrinhas E, Carvalho R, Dias C, Saavedra MJ. 2016. Phytochemical composition and antibacterial activity of hydroalcoholic extracts of *Pterospartum tridentatum* and *Mentha pulegium* against *Staphylococcus aureus* isolates. *Biomed Res Int.* 2016:1–11.
- Alberto RN, Costa AT, Polonio JC, Santos MS, Rhoden SA, Azevedo JL, Pamphile JA. 2016. Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. *Genet Mol Res.* 15.
- Alurappa R, Chowdappa S, Narayanaswamy R, Sinniah UR, Mohanty SK, Swamy MK. 2018. endophytic fungi and bioactive metabolites production: An update. In: Patra J, Das G, Shin HS. (eds) *Microbial Biotechnology*. Springer, Singapore.
- Appiah T, Boakye YD, Agyare C. 2017. Antimicrobial activities and time-kill kinetics of extracts of selected Ghanaian mushrooms. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* 1–15.
- Aramsirirujivet Y, Gumlangmak C, Kitpreechavanich V. 2016. Studies on antagonistic effect against plant pathogenic fungi from endophytic fungi isolated from *Hottuynia cordata* Thunb. and screening for siderophore and Indole-3-acetic acid production. *KKU Res J.* 21:55–66.
- Arenas-Castro S, Gonçalves J, Alves P, Alcaraz-Segura D, Honrado JP. 2018. Assessing the multi-scale predictive ability of ecosystem functional attributes for species distribution modelling. *PLoS ONE* 13: e0199292.
- Arora D, Sharma N, Singamaneni V, Sharma V, Kushwaha M, Abrol V, Guru S, Sharma S, Gupta AP, Bhushan S, *et al.* 2016. Isolation and characterization of bioactive metabolites from *Xylaria psidii*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Aegle marmelos* and their role in mitochondrial dependent apoptosis against pancreatic cancer cells. *Phytomedicine.* 23:1312–1320.
- Baba Ahmed-Kazi Tani Z, Arlet G. 2014. News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Pathol Biol.* 62:169–178.
- Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Groß U, Kuhns M. 2010. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect.* 17:1359-1365.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 6: 71–79.
- Banani H, Marcet-Houben M, Ballester AR, Abbruscato P, González-Candelas L, Gabaldón T, Spadaro D. 2016. Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. *BMC Genomics.* 17:1–14.

- Banothu V, Neelagiri C, Adepally U, Lingam J, Bommareddy K. 2017. Phytochemical screening and evaluation of in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the indigenous medicinal plant *Albizia odoratissima*. **Pharm Biol.** 55:1155–1161.
- Bartholdy BA, Berreck M, Haselwandter K. 2001. Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. **BioMetals.** 14: 33–42.
- Bekhechi C, Atik Bekkara F, Consiglio D, Bighelli A, Tomi F. 2012. Chemical variability of the essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. **Chem Biodivers.** 9: 2742–2753.
- Benarba B. 2016. Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: an ethnobotanical study. **J Intercult Ethnopharmacol.** 5:320–330.
- Bensaci OA, Harzallah D, Gouaref K. 2015. Endophytic mycoflora of *Cedrus atlantica*: diversity patterns and determinism of the phytosanitary situation of Atlas cedar forests in Belezma massif (Algeria). **Forest Sci Technol.** 11: 36–43.
- Bisht R, Sharma D, Agrawal PK. 2016. Antagonistic and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from needle of *Cupressus Torulosa* D. Don. **Asian J Pharm Clin Res.** 9: 282–288.
- Bladt TT, Frisvad JC, Knudsen PB, Larsen TO. 2013. Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. **Molecules.** 18: 11338–11376.
- Blackwell M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. **Am J Bot.** 98:426–438.
- Brissow ER, da Silva IP, de Siqueira KA, Senabio JA, Pimenta LP, Januário AH, Magalhães LG, Furtado RA, Tavares DC, Sales Junior PA, *et al.* 2017. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum*-92C, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. **Parasitol Res.** 116:1823–1830.
- Carvalho CR de, Ferreira-D’Silva A, Wedge DE, Cantrell CL, Rosa LH. 2018. Antifungal activities of cytochalasins produced by *Diaporthe miriciae*, an endophytic fungus associated with tropical medicinal plants. **Can J Microbiol.** 64:835–843.
- Carroll GC 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials, pp. 205–222 in Fokkema NJ, van den Heuvel J. (eds). *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Chada N, Prasad R, Varma A. 2015. Plant promoting activities of fungal endophytes associated with tomato roots from central Himalaya, India and their interaction with *Piriformospora indica*. **Int J Pharm Bio Sci.** 6: 33–343.
- Chapla VM, Zeraik ML, Leptokarydis IH, Silva GH, Bolzani VS, Young MCM, Pfenning LH, Araújo AR. 2014. Antifungal compounds produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus from *Michelia champaca*. **Molecules.** 19:19243–19252.
- Chen S, Ding M, Liu W, Huang X, Liu Z, Lu Y, Liu H, She Z. 2018. Anti-inflammatory meroterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* YX1. **Phytochemistry.** 146: 8–15.
- Chow Y, Ting ASY. 2015. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. **J Adv Res.** 6: 869–876.

- Chowdhary K, Kaushik N. 2018. Biodiversity study and potential of fungal endophytes of peppermint and effect of their extract on chickpea rot pathogens. *Arch Phytopathol Plant Prot.* 51:139–155.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 1999. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline M26-A. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Methods For Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition M07A8. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).2002b. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard M38-A. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2002a. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard- Second Edition M27-A2. Wayne, PA, USA.
- Dai CC, Yu BY, Li X. 2008. Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*. *African J Biotechnol.* 7: 3505–3510.
- Danagoudar A, Joshi CG, Ravi SK, Kumar HGR, Ramesh BN. 2018. Antioxidant and cytotoxic potential of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Tragia involucrata* L. *Phcog Res.*10:188–94.
- Danagoudar A, Joshi CG, Sunil Kumar R, Poyya J, Nivya T, Hulikere MM, Anu Appaiah K. 2017. Molecular profiling and antioxidant as well as anti-bacterial potential of polyphenol producing endophytic fungus-*Aspergillus austroafricanus* CGJ-B3. *Mycology.* 8: 28–38.
- De Amorim MR, Somensi A, Araujo AR, Bonifácio B V, Bauab TM, dos Santos LC. 2016. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae). *J Braz Chem Soc.* 27:1048–1054.
- De Bary A. 1866. Morphologie und Physiologie Pilze, Flechten, und myxomyceten. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany. Vol. 2. Leipzig.
- Debbab A, Aly AH, Edrada-Ebel RA, Wray V, Müller WEG, Totzke F, Zirrgiebel U, Schächtele C, Kubbutat MHG, Wen HL, *et al.* 2009. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. *J Nat Prod.* 72: 626–631.
- Demirel R. 2016. Comparison of rDNA regions (ITS, LSU, and SSU) of some *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* spp. *Turk J Botany.* 40: 576–583.
- Deng Z, Zhang R, Shi Y, Hu L, Tan H, Cao L. 2014. Characterization of Cd-, Pb-, Zn-resistant endophytic *Lasiodiplodia* sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res.* 21: 2346–2357.
- Devaraju R, Satish S. 2011. Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Ass J Exp Biol Sci.* 2: 75–79.
- Djamaan A, Agustien A, Zam SI, Jannah M, Lalfari RS, Aldi Y, Dewi AP, Suci RP. 2018.

- Characterization of biopesticide compounds from *Bacillus Subtilis* AAF2 UAAC 20701 fermentation products. *Int Res J Pharm.* 9: 47–52.
- D'Souza M, Hiremath KG. 2015. Isolation and bioassay screening of medicinal plant endophytes from Western Ghats forests, Goa, India. *Int J Adv Res Biol Sci.* 2: 176–190.
- Dzoyem JP, Melong R, Tsamo AT, Maffo T, Kapche DGWF, Ngadjui BT, McGaw LJ, Eloff JN. 2017. Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. *Brazilian J Pharmacogn.* 27:251–253.
- El-Gendy MMAA, Al-Zahrani SHM, El-Bondkly AMA. 2017. Construction of potent recombinant strain through intergeneric protoplast fusion in endophytic fungi for anticancerous enzymes production using rice straw. *Appl Biochem Biotechnol.* 183: 30–50.
- Elkhayat ES, Ibrahim SRM, Mohamed GA, Ross SA. 2016. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Nat Prod Res.* 30: 814–820.
- Fatima N, Mukhtar U, Ihsan-Ul-Haq, Qazi MA, Jadoon M, Ahmed S. 2016. Biological evaluation of endophytic fungus *Chaetomium* sp. NF15 of *Justicia adhatoda* l.: A potential candidate for drug discovery. *Jundishapur J Microbiol.* 9:e29978.
- Fatouma B, Fella HC, Said HM, Fairouz S, Essentielles H. 2017. Chemical composition and antimicrobial properties of Algerian *Cedrus Atlantica* M . essential oils composition chimique et propriétés. *Agrobiologia.* 7: 355–362.
- Fouda AH, Hassan SED, Eid AM, Ewais EED. 2015. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Ann Agric Sci.* 60:95–104.
- Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud Mycol.* 2004: 201–241.
- Gao FK, Dai CC, Liu XZ. 2010. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African J Microbiol Res.* 4:1346–1351.
- Gao FK, Yong YH, Dai CC. 2011. Effects of endophytic fungal elicitor on two kinds of terpenoids production and physiological indexes in *Euphorbia pekinensis* suspension cells. *J Med Plants Res.* 5: 4418–4425.
- Gherbawy YA, Elhariry HM. 2016. Endophytic fungi associated with high-altitude *Juniperus* trees and their antimicrobial activities. *Plant Biosyst.* 150:131–140.
- Ghosh R, Barman S, Jgs PK, Mandal NC. 2018. Biological activities of *Alternaria* sp. RL4 – a potent endophytic fungus associated with *Rauvolfia Serpentina* L. Benth. *Asian J Pharm Clin Res.* 11: 178–182.
- Ghouti D, Rached W, Abdallah M, Pires TCSP, Calhelha RC, Alves MJ, Abderrahmane LH, Barros L, Ferreira ICFR. 2018. Phenolic profile and in vitro bioactive potential of Saharan *Juniperus phoenicea* L. and *Cotula cinerea* (Del) growing in Algeria. *Food Funct.* 9:4664–4672.
- Gouda S, Das G, Sen SK, Shin H-S, Patra JK. 2016. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Front Microbiol.* 7:1538.

- Goutam J, Sharma G, Tiwari VK, Mishra A, Kharwar RN, Ramaraj V, Koch B. 2017. Isolation and characterization of “Terrein” an antimicrobial and antitumor compound from endophytic fungus *Aspergillus terreus* (JAS-2) associated from *Achyranthus aspera* Varanasi, India. **Front Microbiol.** 8:1334.
- Goutam J, Singh S, Kharwar RN, Ramaraj V. 2016. In vitro potential of endophytic fungus *Aspergillus terreus* (JAS-2) associated with *Achyranthus aspera* and study on its culture conditions. **Biol Med.** 8: 349.
- Govindappa M, Bharath N, Shruthi HB, Santoyo G. 2011. In vitro antioxidant activity and phytochemical screening of endophytic extracts of *Crotalaria pallida*. **Free Rad Antiox.** 1: 79–86.
- Govindappa M, Channabasava R, Kumar KRS, Pushpalatha KC. 2013. Antioxidant activity and phytochemical screening of crude endophytes extracts of *Tabebuia argentea* Bur . &. K. Sch. **AJPS.** 4:1641–1652.
- Govindasamy V., George P., Raina S.K., Kumar M., Rane J., Annapurna K. (2018) Plant-Associated Microbial Interactions in the Soil Environment: Role of Endophytes in Imparting Abiotic Stress Tolerance to Crops. In: Bal S, Mukherjee J, Choudhury B, Dhawan A. (eds) *Advances in Crop Environment Interaction*. Springer, Singapore
- Gul Jan F, Hamayun M, Hussain A, Jan G, Iqbal A, Khan A, Lee I-J. 2019. An endophytic isolate of the fungus *Yarrowia lipolytica* produces metabolites that ameliorate the negative impact of salt stress on the physiology of maize. **BMC Microbiol.** 19: 1–10.
- Gunasekaran S, Sathiavelu M, Arunachalam S. 2017. In vitro antioxidant and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from *Mussaenda luteola*. **J Appl Pharm Sci.** 7: 234–238.
- Hajlaoui H, Trabelsi N, Noumi E, Snoussi M, Fallah H, Ksouri R, Bakhrouf A. 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. **World J Microbiol Biotechnol.** 25: 2227–2238.
- Hamad I, Ranque S, Azhar EI, Yasir M, Jiman-Fatani AA, Tissot-Dupont H, Raoult D, Bittar F. 2017. Culturomics and amplicon-based metagenomic approaches for the study of fungal population in human gut microbiota. **Sci Rep.** 7:1–8.
- Hameed A, Hussain SA, Yang J, Ijaz MU, Liu Q, Suleria HAR, Song Y. 2017. Antioxidants potential of the filamentous fungi (*Mucor circinelloides*). **Nutrients.** 9: 1–20.
- Hamzah HM, Ali AHL, Hassan HG. 2009. Physiological regulation of protease and antibiotics in *Penicillium* sp. using submerged and solid state fermentation techniques. **J Eng Sci Technol.** 4: 81–89.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiol Mol Biol Rev.** 79: 293–320.
- Hemtasin C, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Hahnvajjanawong C, Soyong K, Prabpai S, Kongsaree P. 2011. Cytotoxic pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*. **J Nat Prod.** 74:609–613.

- Huang H, Feng X, Xiao Z, Liu L, Li H, Ma L, Lu Y, Ju J, She Z, Lin Y. 2011. Azaphilones and *p*-Terphenyls from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2) isolated from the South China sea. *J Nat Prod*. 74: 997-1002.
- Huang WY, Cai YZ, Hyde KD, Corke H, Sun M. 2007. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): Main constituents and antioxidant activity. *World J Microbiol Biotechnol*. 23:1253–1263.
- Huang XZ, Zhu Y, Guan XL, Tian K, Guo JM, Wang H Bin, Fu GM. 2012. A novel antioxidant isobenzofuranone derivative from fungus *Cephalosporium* sp.AL031. *Molecules*. 17: 4219–4224.
- Hulikere MM, Joshi CG, Ananda D, Poyya J, Nivya T. 2016. Antiangiogenic, wound healing and antioxidant activity of *Cladosporium cladosporioides* (Endophytic Fungus) isolated from seaweed (*Sargassum wightii*). *Mycology*. 7: 203–211.
- Ibrahim D, Chai Lee C, Yenn TW, Zakaria L, Sheh-Hong L. 2015. Effect of the extract of endophytic fungus, *Nigrospora sphaerica* CL-OP 30, against the growth of ethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Klebsiella pneumonia* cells. *Trop J Pharm Res*. 14: 2091–2097.
- Ibrahim SRM, Asfour HZ. 2018. Bioactive γ -butyrolactones from endophytic fungus *Aspergillus versicolor*. *Int J Pharmacol*. 14: 437–443.
- Kuriakose GC, Divya Lakshmanan M, Arathi BP, Hari Kumar RS, Anantha Krishna TH, Ananthaswamy K, Jayabhaskaran C. 2018. Extract of *Penicillium sclerotiorum* an endophytic fungus isolated from *Cassia fistula* L. induces cell cycle arrest leading to apoptosis through mitochondrial membrane depolarization in human cervical cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 105: 1062–1071.
- Minarni, Artika M, Julistiono H, Bremawie N, Riyanti EI, Hasim, Hasan AEZ. 2017. Anticancer activity test of ethyl acetate extract of endophytic fungi isolated from soursop leaf (*Annona muricata* L.). *Asian Pac J Trop Med*. 10:566–571.
- Mu'azzam KAAR, Taufiq MMJ, Darah I. 2015. Isolation and screening of antibacterial activity of endophytic fungi isolates from *Ocimum citriodorum* Vis . Leaves. *AJBAS*. 9:155–161.
- Ismail, Hamayun M, Hussain A, Iqbal A, Khan SA, Lee I-J. 2018. Endophytic fungus *Aspergillus japonicus* mediates host plant growth under normal and heat stress conditions. *Biomed Res Int*. 2018:1–11.
- Jam Ashkezari S, Fotouhifar KB. 2017. Diversity of endophytic fungi of common yew (*Taxus baccata* L.) in Iran. *Mycol Prog*. 16: 247–256.
- Jiaojiao S, Wattanachai P, Kasem S. 2016. Isolation and identification of endophytic fungi from 10 species palm trees. *J Agric Technol*. 12:349 –363.
- John R, Mathew L. 2017. Endophytic fungal assemblage in *Achyranthes aspera* Linn. revealed by internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal RNA genes. *3 Biotech*. 7:1–6.
- Ju ZR, Qin X, Lin XP, Wang JF, Kaliyaperumal K, Tian YQ, Liu J, Liu F, Tu Z, Xu SH, Liu Y. 2016. New phenyl derivatives from endophytic fungus *Botryosphaeria* sp. SCSIO KcF6 derived of mangrove plant *Kandelia candel*. *Nat Prod Res*. 30:192–198.

- Junaidi AR, Bolhassan MH. 2017. Screening of Indole-3-Acetic Acid (IAA) productions by endophytic *Fusarium oxysporum* Isolated from *Phyllanthus niruri*. **Borneo J Resour Sci Technol.** 7: 56–59.
- Kajula M, Tejesvi M V., Kolehmainen S, Mäkinen A, Hokkanen J, Mattila S, Pirttilä AM. 2010. The siderophore ferricrocin produced by specific foliar endophytic fungi in vitro. **Fungal Biol.** 114: 248–254.
- Kalyanasundaram I, Nagamuthu J, Srinivasan B, Pachayappan A, Muthukumarasamy S. 2015. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from salt marsh fungal endophytes. **World J Pharm Pharm Sci.** 4: 663–677.
- Kamel RA, Abdel-Razek AS, Hamed A, Ibrahim RR, Stammer HG, Frese M, Sewald N, Shaaban M. 2019. Isoshamixanthone: a new pyrano xanthone from endophytic *Aspergillus* sp. ASCLA and absolute configuration of epiisoshamixanthone. **Nat Prod Res.** 19:1–11.
- Kashani K, Jalali Javaran M, Sabet MS, Moieni A. 2018. Identification of rate-limiting enzymes involved in paclitaxel biosynthesis pathway affected by coronatine and methyl- β -cyclodextrin in *Taxus baccata* L. cell suspension cultures. **DARUJ Pharm Sci.** 26:129–142.
- Kaul S, Gupta S, Ahmed M, Dhar MK. 2012. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochem Rev.** 11:487–505.
- Khan A, Hamayun M, Kang S-M, Kim Y-H, Jung H-Y, Lee J-H, Lee I-J. 2012. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiol.** 12:3.
- Khan AR, Ullah I, Waqas M, Shahzad R, Hong SJ, Park GS, Jung BK, Lee IJ, Shin JH. 2015. Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. **World J Microbiol Biotechnol.** 31:1461–1466.
- Khare E, Mishra J, Arora NK. 2018. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. **Front Microbiol.** 9:1–12.
- Kharwar RN, Mishra A, Gond SK, Stierle A, Stierle D. 2011. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Nat Prod Rep.** 28:1208–1228.
- Kharwar RN, Verma SK, Mishra A, Gond SK, Sharma VK, Afreen T, Kumar A. 2011. Assessment of diversity, distribution and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from a medicinal plant *Adenocalymma alliaceum* Miers. **Symbiosis.** 55: 39–46.
- Kim HY, Heo DY, Park HM, Singh D, Lee CH. 2016. Metabolomic and transcriptomic comparison of solid-state and submerged fermentation of *Penicillium expansum* KACC 40815. **PLoS One.** 11:1–14.
- Chaesung L, Kim J, Choi JN, Ponnusamy K, Jeon Y, Kim S, Kim JG, Lee CH. 2010. Identification, fermentation, and bioactivity against *Xanthomonas oryzae* of antimicrobial metabolites isolated from phomopsis longicolla S1B4. **J Microbiol Biotechnol.** 20:494–500.
- Korejo F, Ali SA, Shafique HA, Sultana V, Ara J, Ehteshamul-Haque S. 2014. Antifungal and antibacterial activity of endophytic *Penicillium* species isolated from *Salvadora* species. **Pakistan J Bot.** 46: 2313–2318.

- Kour A, Shawl AS, Rehman S, Sultan P, Qazi PH, Suden P, Khajuria RK, Verma V. 2008. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World J Microbiol Biotechnol.** 24:1115–1121.
- Kowalski T, Kehr RD. 1992. Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. **Sydowia.** 44:137–168.
- Krishnapura PR, Belur PD. 2016. Isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some Zingiberaceae plants for L-asparaginase production. **Prep Biochem Biotechnol.** 46: 281–287.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol Biol Evol.** 33:1870–1874.
- Kusari S, Lamshöft M, Spiteller M. 2009. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. **J Appl Microbiol.** 107:1019–1030.
- Lahlali R, McGregor L, Song T, Gossen BD, Narisawa K, Peng G. 2014. *Heteroconium chaetospora* induces resistance to clubroot via upregulation of host genes involved in jasmonic acid, ethylene, and auxin biosynthesis. **PLoS One.** 9:1–9.
- Lapuz RR, Undan JQ, Cajucom EB, Undan JR. 2018. Molecular Identification of endophytic fungi from rice (*Oryza sativa* L.) and its antagonistic effect against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **IJSBAR.** 41:213–219.
- Latz MAC, Jensen B, Collinge DB, Jørgensen HJL. 2018. Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. **Plant Ecol Divers.**:1–13.
- Lee MS, Wang SW, Wang GJ, Pang KL, Lee CK, Kuo YH, Cha HJ, Lin RK, Lee TH. 2016. Angiogenesis inhibitors and anti-inflammatory agents from *Phoma* sp. NTOU4195. **J Nat Prod.** 79: 2983–2990.
- Leitão AL, Enguita FJ. 2016. Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. **Microbiol Res.** 183: 8–18.
- Lenta BN, Ngatchou J, Frese M, Ladoh-Yemeda F, Voundi S, Nardella F, Michalek C, Wibberg D, Ngouela S, Tsamo E, *et al.* 2016. Purpureone, an antileishmanial ergochrome from the endophytic fungus *Purpureocillium lilacinum*. **Zeitschrift fur Naturforsch B.** 71:1159–1167.
- Li HY, Li DW, He CM, Zhou ZP, Mei T, Xu HM. 2012. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. **Fungal Ecol.** 5: 309–315.
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin Interv Aging.** 13:757–772.
- Lin T, Wang G, Shan W, Zeng D, Ding R, Jiang X, Zhu D, Liu X, Yang S, Chen H. 2014. Myrotheciumones: Bicyclic cytotoxic lactones isolated from an endophytic fungus of *Ajuga decumbens*. **Bioorganic Med Chem Lett.** 24: 2504–2507.
- Liu Y, Xia G, Li H, Ma L, Ding B, Lu Y, He L, Xia X, She Z. 2014. Vermistatin derivatives with α -glucosidase inhibitory activity from the mangrove endophytic fungus *Penicillium* sp. HN29-3B1.

- Planta Med.* 80: 912–917.
- Loganayaki N, Siddhuraju P, Manian S. 2013. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity of phenolic extracts from *Helicteres isora* L. and *Ceiba pentandra* L. **J Food Sci Technol.** 50: 687–695.
- Luo ZP, Lin HY, Ding WB, He HL, Li YZ. 2015. Phylogenetic diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Tephrosia purpurea*. **Mycobiology.** 43:435–443.
- Toufiq MMJ, Darah I. 2018. Anti-MRSA of the ethyl acetate crude extract from *Lasiodiplodia Pseudotheobromae* IBRL OS-64, an endophytic fungus isolated from leaf of *Ocimum Sanctum* Linn. **Int J Pharm Pharm Sci.**10: 50–55.
- Mahboubi M, Haghi G. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **J Ethnopharmacol.** 119: 325–327.
- Malhadas C, Malheiro R, Pereira JA, Guedes de Pinho P, Baptista P. 2017. Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. **World J Microbiol Biotechnol.** 33:46.
- Mandyam K, Jumpponen A. 2005. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. **Stud Mycol.** 53:173–189.
- Mane RS, Paarakh PM, Vedamurthy AB. 2018. Brief Review on Fungal Endophytes. **Int J Second Metab.** 5: 288–303.
- Marcellano JP, Collanto AS, Fuentes RG. 2017. Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from the bark of *Cinnamomum mercadoi*. **Pharmacogn J.** 9: 405–409.
- Marson Ascêncio PG, Ascêncio SD, Aguiar AA, Fiorini A, Pimenta RS. 2014. Chemical assessment and antimicrobial and antioxidant activities of endophytic fungi extracts isolated from *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae). **Evidence-Based Complement Altern Med.** 2014: 1–10.
- Martínez-Luis S, Cherigo L, Arnold E, Spadafora C, Gerwick WH, Cubilla-Rios L. 2012b. Antiparasitic and anticancer constituents of the endophytic fungus *Aspergillus* sp. strain F1544. **Nat Prod Commun.** 7: 165–168.
- Martínez-luis S, Cherigo L, Higginbotham S, Arnold E, Spadafora C, Ibañez A, Gerwick WH, Cubilla-rios L. 2012a. activities of Panamanian endophytic fungi. **Int Micobiol.** 14:95–102.
- Martin DF, Emer AA, Batisti AP, Donatello N, Carlesso MG, Mazzardo-Martins L, Venzke D, Micke GA, Pizzolatti MG, Piovezan AP, dos Santos ARS. 2015. Inhalation of *Cedrus atlantica* essential oil alleviates pain behavior through activation of descending pain modulation pathways in a mouse model of postoperative pain. **J Ethnopharmacol.** 175: 30–38.
- Meddour R, Meddour-Sahar O. 2015. Medicinal plants and their traditional uses in Kabylia (Tizi Ouzou, Algeria). **AJMAP.** 137-151.
- Meenatchi A, Ramesh V, Bagyalakshmi, Kuralarasi R, Shanmugaiah V, Rajendran A. 2016. Diversity of endophytic fungi from the ornamental plant-*Adenium obesum*. **Studies in fungi.** 4: 54–71.
- Mefteh FB, Daoud A, Bouket AC, Alenezi FN, Luptakova L, Rateb ME, Kadri A, Gharsallah N, Belbahri L. 2017. Fungal root microbiome from healthy and brittle leaf diseased date palm trees

- (*Phoenix dactylifera* L.) reveals a hidden untapped arsenal of antibacterial and broad spectrum antifungal secondary metabolites. **Front Microbiol.** 8: 1–18.
- Mishra M, Prasad R, Varma A. 2015. Endophytic fungi: biodiversity and functions. **Int J Pharm Bio Sci.** 6: 18–36.
- Mishra PD, Verekar SA, Kulkarni-Almeida A, Roy SK, Jain S, Balakrishnan A, Vishwakarma R, Deshmukh SK. 2013. Anti-inflammatory and anti-diabetic naphtha-quinones from an endophytic fungus *Dendryphion nanum* (Nees) S. Hughes. **Indian J Chem.** 52:565–567.
- Mishra Y, Singh A, Batra A, Sharma MM. 2014. Understanding the biodiversity and biological applications of endophytic fungi: a review. **J Microb Biochem Technol.** S8:004.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity Assays. **J Immunol Methods.** 65: 55-63.
- Musavi SF, Balakrishnan RM. 2014. A Study on the antimicrobial potentials of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. **J Med Bioeng.** 3:162–166.
- Netala V, Bethu MS, Pushpalatha B, Baki VB, Aishwarya S, Rao JV, Tartte V. 2016. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. **Int J Nanomedicine.** 11: 5683–5696.
- Nguyen HT, Kim S, Yu NH, Park AR, Yoon H, Bae C-H, Yeo JH, Kim IS, Kim J-C. 2019. Antimicrobial activities of an oxygenated cyclohexanone derivative isolated from *Amphirosellinia nigrospora* JS-1675 against various plant pathogenic bacteria and fungi. **J Appl Microbiol.** 126: 894–904.
- Muhamad N, Muhmed SA, Yusoff MM, Gimbin J. 2014. Influence of solvent polarity and conditions on extraction of antioxidant, flavonoids and phenolic content from *Averrhoa bilimbi*. **J Food Sci Eng.** 4: 255–260.
- Normand AC, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, Piarroux R. 2017. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. **BMC Microbiol.** 17:1–17.
- Oliveira CM, Regasini LO, Silva GH, Pfenning LH, Young MCM, Berlinck RGS, Bolzani VS, Araujo AR. 2011. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. **Phytochem Lett.** 4:93–96.
- Osono T, Masuya H. 2012. Endophytic fungi associated with leaves of Betulaceae in Japan. **Can J Microbiol.** 58: 507–515.
- Ouyang J, Mao Z, Guo H, Xie Y, Cui Z, Sun J, Wu H, Wen X, Wang J, Shan T. 2018. Mollicellins O–R, four new depsidones isolated from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. Eef-10. **Molecules.** 23:3218.
- Park YH, Kim Y, Mishra RC, Bae H. 2017. Fungal endophytes inhabiting mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng* Meyer): Diversity and biocontrol activity against ginseng pathogens. **Sci Rep.** 7: 1–10.
- Passari AK, Mishra VK, Gupta VK, Yadav MK, Saikia R, Singh BP. 2015. In vitro and in vivo plant

- growth promoting activities and dna fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. *PLoS One* 10:1–18.
- Patel PK, Patel KV, Gandhi TR. 2011. Evaluation of effect of *Taxus baccata* leaves extract on bronchoconstriction and bronchial hyperreactivity in experimental animals. *J Young Pharm.* 3: 41–47.
- Patil RH, Patil MP, Maheshwari VL. 2016. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi: a review of biotechnological production and their potential applications. *Stud Nat Prod Chem.* 49:189–205.
- Patle PN, Navnage NP, Ramteke PR. 2018. Endophytes in plant system: Roles in growth promotion, mechanism and their potentiality in achieving agriculture sustainability. *Int J Chem Stud.* 6: 270–274.
- Paudel B, Bhattarai K, Bhattarai HD. 2018. Antimicrobial and antioxidant activities of two polyketides from lichen-endophytic fungus *Preussia* sp. *Zeitschrift fur Naturforsch C.* 73:161–163.
- Pereira CB, De Oliveira DM, Hughes AFS, Kohlhoff M, La Vieira M, Martins Vaz AB, Ferreira MC, Carvalho CR, Rosa LH, Rosa CA, *et al.* 2015. Endophytic fungal compounds active against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *J Antibiot.* 68: 436–444.
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Fokkema NJ, van den Heuvel J.(eds) Microbial ecology of the leaves. Cambridge University Press, Cambridge: 185–187.
- Phongpaichit S, Nikom J, Rungjindamai N, Sakayaroj J, Hutadilok-Towatana N, Rukachaisirikul V, Kirtikara K. 2007. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia plants*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51: 517–525.
- Pinheiro EAA, Carvalho JM, dos Santos DCP, Feitosa A de O, Marinho PSB, Guilhon GMSP, de Souza ADL, da Silva FMA, Marinho AM do R. 2012. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Nat Prod Res.* 27:1633–1638.
- Powthong P, Jantrapanukorn B, Thongmee A, Suntornthiticharoen P. 2013. Screening of antimicrobial activities of the endophytic fungi isolated from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *J Agric Sci Technol.* 15:1513–1522.
- Prathyusha P, Rajitha Sri AB, Ashokvardhan T, Satya Prasad K. 2015. Antimicrobial and siderophore activity of the endophytic fungus *Acremonium sclerotigenum* inhabiting *Terminalia bellerica* Roxb. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 30: 84–87.
- Prihantini AI, Tachibana S. 2017. Antioxidant compounds produced by *Pseudocercospora* sp. ESL 02, an endophytic fungus isolated from *Elaeocarpus sylvestris*. *Asian Pac J Trop Biomed.* 7:110–115.
- Qian Y, Yu H, He D, Yang H, Wang W, Wan X, Wang L. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. *Bioprocess Biosyst Eng.* 36:1613–1619.
- Qiu M, Xie R, Shi Y, Chen H, Wen Y, Gao Y, Hu X. 2010. Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. *World J Microbiol Biotechnol.* 26:

- 993–998.
- Rahman S, Rahman L, Khalil AT, Ali N, Zia D, Ali M, Shinwari ZK. 2019. Endophyte-mediated synthesis of silver nanoparticles and their biological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 103: 2551–2569.
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *J Nat Prod.* 80: 756–770.
- Rajamanikyam M, Vadlapudi V, Amanchy R, Upadhyayula SM. 2017. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. *Braz Arch Biol Technol.* 60: e17160542
- Ranque S, Normand AC, Cassagne C, Murat JB, Bourgeois N, Dalle F, Gari-Toussaint M, Fourquet P, Hendrickx M, Piarroux R. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses.* 57:135–140.
- Ratnaweera PB, de Silva ED, Williams DE, Andersen RJ. 2015. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. *BMC Complement Altern Med.* 15:1–7.
- Rhafouri R, Strani B, Zair T, Ghanmi M, Aafi A, El Omari M, Bentayeb A. 2014. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the *Cedrus atlantica* (Endl.) Manettiex Carrière seeds essential oil. *Mediterr J Chem.* 3:1027–1036.
- Rinu K, Sati P, Pandey A. 2014. *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): A newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strain. *J Basic Microbiol.* 54: 408–417.
- Rivera-Chávez J, Figueroa M, González MDC, Glenn AE, Mata R. 2015. α -Glucosidase Inhibitors from a *Xylaria feejeensis* Associated with *Hintonia latiflora*. *J Nat Prod.* 78:730–735.
- Rivera-Orduña FN, Suarez-Sanchez RA, Flores-Bustamante ZR, Gracida-Rodriguez JN, Flores-Cotera LB. 2011. Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Divers.* 47: 65–74.
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182: 314–30.
- Rosa LH, Gonçalves VN, Caligiorne RB, Alves TMA, Rabello A, Sales PA, Romanha AJ, Sobral MEG, Rosa CA, Zani CL. 2010. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. *Brazilian J Microbiol.* 41: 420–430.
- Rui L, Zhang H, Hui L, Zhipeng A, Feng Z. 2016. Isolation of secondary metabolites of endophytic fungus *Penicillium griseofulvum* from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and identification of strain. *J Global.* 22: 25–29.
- Russell JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantzler KW, Hickman D, Jee J, Kimovec FM, Koppstein D, *et al.* 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiol.* 77: 6076–6084.
- Chermat S, Gharzouli R. 2015. Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria - an empirical knowledge in djebel Zdim (Setif). *J Mater Sci Eng A.* 5: 50–59.

- Sahani K, Thakur D, Hemalatha KPJ, Ganguly A. 2017. Antibacterial activity of endophytes from selected medicinal plants. *Int J Adv Res.* 5: 2076–2086.
- Samae A, Hiranrat A, O-thong S, Supaphon P, Intrasukkha N. 2019. Isolation and identification of endophytic fungi from seaweeds in Southern Thailand and their antibacterial activities against some antibiotic resistance bacteria. *Res J Biotech.* 14: 56–62.
- Santos C, Paterson RRM, Venâncio A, Lima N. 2010. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol.* 108: 375–385.
- Santos IP, Silva LCN, Silva MV, Araújo JM, Cavalcanti MS, Lima VLM. 2015. Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). *Front Microbiol.* 6:1–7.
- Saraswaty V, Srikandace Y, Simbiyani NA, Jasmansyah, Setiyanto H, Udin Z. 2013. Antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungus *Fennellia nivea* NRRL 5504. *Pakistan J Biol Sci.* 16:1574–8.
- Sarmadi M, Karimi N, Palazón J, Ghassempour A, Mirjalili MH. 2018. The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. *Plant Physiol Biochem.* 132:271–280.
- Schmeda-Hirschmann G, Hormazabal E, Rodriguez JA, Theoduloz C. 2008. Cycloaspeptide A and pseurotin A from the endophytic fungus *Penicillium. Janczewskii.* *Zeitschrift fur Naturforsch C.* 63: 383–388.
- Selim KA, Elkhateeb WA, Tawila AM, El-Beih AA, Abdel-Rahman TM, El-Diwany AI, Ahmed EE. 2018. Antiviral and antioxidant potential of fungal endophytes of Egyptian medicinal plants. *Fermentation.* 4:49.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 49:543–551.
- Shaaban M, Nasr H, Hassan AZ, Asker MS. 2013. Bioactive secondary metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus*: structural elucidation and bioactivity studies. *Rev Latinoamer Quim.* 41:50–60.
- Sharma D, Pramanik A, Agrawal PK. 2016. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D.Don. *3 Biotech.* 6:1–14.
- Sharma N, Kushwaha M, Arora D, Jain S, Singamaneni V, Sharma S, Shankar R, Bhushan S, Gupta P, Jaglan S. 2018. New cytochalasin from *Rosellinia sanctae-cruciana*, an endophytic fungus of *Albizia lebbbeck.* *J Appl Microbiol.* 125:111–120.
- Sharma N., Sharma V., Abrol V., Panghal A., Jaglan S. (2019) An update on bioactive natural products from endophytic fungi of medicinal plants. In: Arora D, Sharma C, Jaglan S, Lichtfouse E. (eds) Pharmaceuticals from Microbes. Environmental Chemistry for a Sustainable World, vol 28. Springer, Cham.

- Shaw JJ, Spakowicz DJ, Dalal RS, Davis JH, Lehr NA, Dunican BF, Orellana EA, Narváez-Trujillo A, Strobel SA. 2015. Biosynthesis and genomic analysis of medium-chain hydrocarbon production by the endophytic fungal isolate *Nigrograna mackinnonii* E5202H. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:3715–28.
- Shrivastava G, Ownley BH, Augé RM, Toler H, Dee M, Vu A, Köllner TG, Chen F. 2015. Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. *Symbiosis.* 65: 65–74.
- Siddaiah CN, Satyanarayana NR, Mudili V, Kumar Gupta V, Gurunathan S, Rangappa S, Huntrike SS, Srivastava RK. 2017. Elicitation of resistance and associated defense responses in *Trichoderma hamatum* induced protection against pearl millet downy mildew pathogen. *Sci Rep.* 7:1–18.
- Silva LF, Freire KTLS, Araújo-Magalhães GR, Agamez-Montalvo GS, Sousa MA, Costa-Silva TA, Paiva LM, Pessoa-Junior A, Bezerra JDP, Souza-Motta CM. 2018. *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. *World J Microbiol Biotechnol.* 34:162.
- Sim JH, Khoo CH, Lee LH, Cheah YK. 2010. Molecular diversity of fungal endophytes isolated from *Garcinia mangostana* and *Garcinia parvifolia*. *J Microbiol Biotechnol.* 20: 651–658.
- Singh D, Rathod V, Ninganaouda S, Herimath J, Kulkarni P. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticle by endophytic fungi *Penicillium* sp. isolated from *Curcuma longa* (turmeric) and its antibacterial activity against pathogenic gram negative bacteria. *J Pharm Res.* 7: 448–453.
- Soleimani M, Hajabbasi MA, Afyuni M, Mirlohi A, Borggaard OK, Holm PE. 2010. Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. *Int J Phytoremediation.* 12: 535–549.
- Son SY, Lee S, Singh D, Lee NR, Lee DY, Lee CH. 2018. Comprehensive secondary metabolite profiling toward delineating the solid and submerged-state fermentation of *Aspergillus oryzae* KCCM 12698. *Front Microbiol.* 9:1–12.
- Stephenson J, CHURCHILL JM. Medical Botany; or, Illustrations and Descriptions of the Medicinal Plants or the London, Edinburgh, and Dublin Pharmacopoeias New Edition. Edited by Gilbert T. Burnett. London: For John Churchill, 1834-1836
- Strobel G. 2018. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. *J Fungi.* 4:1–19.
- Strobel GA. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* 5: 535–544.
- Subban K, Subramani R, Johnpaula M. 2013. A novel antibacterial and antifungal phenolic compound from the endophytic fungus *Pestalotiopsis mangiferae*. *Nat Prod Res.* 27:1445–1449.
- Subramaniam R, Vimala R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances : a comparative study. *Int J Sci Nat.* 3: 480–486.
- Sugijanto NE, Dorra BL. 2016. Antimicrobial Activity of *Cladosporium oxysporum* endophytic fungus extract isolated from *Aglaia odorata* Lour. *Indones J Med.* 1:108–115.
- Sun X, Guo LD. 2010. *Micronematobotrys*, a new genus and its phylogenetic placement based on

- rDNA sequence analyses. *Mycol Prog.* 9: 567–574.
- Sun X, Guo LD. 2012. Endophytic fungal diversity: Review of traditional and molecular techniques. *Mycology.* 3: 65–76.
- Supaphon P, Phongpaichit S, Rukachaisirikul V, Sakayaroj J. 2013. Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrass species: *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*. *PLoS One.* 8: 1–9.
- Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Gopalan V. 2012. Fungal endophytes: An untapped source of biocatalysts. *Fungal Divers.* 54:19–30.
- Talapatra K, Das AR, Saha AK, Das P. 2017. In vitro antagonistic activity of a root endophytic fungus towards plant pathogenic fungi. *J Appl Biol Biotechnol.* 5: 68–71.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10: 512–26.
- Tan LTH, Chan KG, Khan TM, Bukhari SI, Saokaew S, Duangjai A, Pusparajah P, Lee LH, Goh BH. 2017. *Streptomyces* sp. MUM212 as a source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. *Front Pharmacol.* 8:1–18.
- Tan QW, Gao FL, Wang FR, Chen QJ. 2015. Anti-TMV activity of malformin A1, a cyclic pentapeptide produced by an endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* FJBJ11. *Int J Mol Sci.* 16: 5750–5761.
- Tang HM, Hamblin MR, Yow CMN. 2007. A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *J Infect Chemother.* 13: 87–91.
- Taufiq MMJ, Darah I. 2018. Anti-MRSA of the ethyl acetate crude extract from *Lsiodiopodia pseudotheobromae* IBRL OS-64, an endophytic fungus isolated from leaf of *Ocimum sanctum* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci.* 8: 50–55.
- Tayung K, Jha DK. 2010. Antimicrobial endophytic fungal assemblages inhabiting bark of *Taxus baccata* L. of Indo-Burma mega biodiversity hotspot. *Indian J Microbiol.* 50: 74–81.
- Teiten MH, MacK F, Debbab A, Aly AH, Dicato M, Proksch P, Diederich M. 2013. Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF-κB activity. *Bioorganic Med Chem.* 21:3850–3858.
- Tekol Y. 2007. The medieval physician Avicenna used an herbal calcium channel blocker, *Taxus baccata* L. *Phyther Res.* 21:701–702.
- Thammawat S, Sangdee K, Sangdee A. 2017. Time-kill profiles and cell-surface morphological effects of crude *Polycephalomyces nipponicus* Cod-MK1201 mycelial extract against antibiotic-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus*. *Trop J Pharm Res.* 16: 407–412.
- Thirunavukkarasu N, Suryanarayanan TS, Murali TS, Ravishankar JP, Gummadi SN. 2011. L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. *Mycosphere.* 2: 147–155.
- Tiwari K. 2017. Assessment of endophytic fungal flora responsible for plant growth promotion and

- survival in Sanganer region of Rajasthan. *Annals of Ecology and Environmental Science*. 1: 64–68.
- Tuppad DS, Shishupala S. 2013. Endophytic mycobiota of medicinal plant *Butea monosperma*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2: 615–627.
- Umashankar T, Govindappa M, Ramachandra YL. 2014. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of partially purified coumarins from fungal endophytes of *Crotalaria pallida*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 3: 58–72.
- Uzma F, Chowdappa S. 2017. Antimicrobial and antioxidant potential of endophytic fungi isolated from ethnomedicinal plants of Western Ghats, Karnataka. *J Pure Appl Microbiol*. 11: 1009–1025.
- Uzor PF, Odimegwu DC, Ebrahim W, Osadebe PO, Nwodo NJ, Okoye FBC, Liu Z, Proksch P. 2016. Anti-respiratory syncytial virus compounds from two endophytic fungi isolated from Nigerian medicinal plants. *Drug Res*. 66: 527–531.
- Uzor PF, Osadebe PO, Nwodo NJ. 2017. Antidiabetic activity of extract and compounds from an endophytic fungus *Nigrospora oryzae*. *Drug Res*. 67: 308–311.
- Vadassery J, Ritter C, Venus Y, Camehl I, Varma A, Shahollari B, Novák O, Strnad M, Ludwig-Müller J, Oelmüller R. 2008. The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 21:1371–1383.
- van Duin D, Paterson DL. 2016. Multidrug-resistant bacteria in the community. *Infect Dis Clin North Am*. 30:377–390.
- Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. 2012. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *Int J Microbiol*. 2012: 1–26.
- Venieraki A, Dimou M, Katinakis P. 2017. Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. *Hell Plant Prot J*. 10: 51–66.
- Verma VC, Lobkovsky E, Gange AC, Singh SK, Prakash S. 2011. Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp. isolated from *Piper longum* L. *J Antibiot*. 64:427–431.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud Mycol*. 78: 343–371.
- Wang FW. 2012. Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. *Chin J Nat Med*. 10:72–76.
- Wang J, Ding W, Wang R, Du Y, Liu H, Kong X, Li C. 2015. Identification and bioactivity of compounds from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. *Mar Drugs*. 13: 4492–4504.
- Wang L-N, Di W-J, Zhang Z-M, Zhao L, Zhang T, Deng Y-R, Yu L-Y. 2016. Small-molecule inhibitors of the tuberculosis target, phenylalanyl-tRNA synthetase from *Penicillium griseofulvum* CPCC-400528. *Cogent Chem*. 2:1–9.
- Waqas M, Khan AL, Kang SM, Kim YH, Lee IJ. 2014. Phytohormone-producing fungal endophytes

- and hardwood-derived biochar interact to ameliorate heavy metal stress in soybeans. *Biol Fertil Soils*. 50:1155–1167.
- Waqas M, Khana AL, Hamayuna M, Shahzad R, Kang SM, Kim JG, Lee IJ. 2015. Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: An example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *J Plant Interact*. 10: 280–287.
- Wearn JA, Sutton BC, Morley NJ, Gange AC. 2012. Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *J Ecol*. 100:1085–1092.
- Wu F, Yang D, Zhang L, Chen Y, Hu X, Li L, Liang J. 2019. Diversity estimation and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers. in China. *Forests*. 10: 1–12.
- Wu W, Davis RW, Tran-Gyamfi MB, Kuo A, LaButti K, Mihaltcheva S, Hundley H, Chovatia M, Lindquist E, Barry K, *et al.* 2017. Characterization of four endophytic fungi as potential consolidated bioprocessing hosts for conversion of lignocellulose into advanced biofuels. *Appl Microbiol Biotechnol*. 101: 2603–2618.
- Wu Y, Chen Y, Huang X, Pan Y, Liu Z, Yan T, Cao W, She Z. 2018. α -Glucosidase inhibitors: diphenyl ethers and phenolic bisabolane sesquiterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus flavus* QQSG-3. *Mar Drugs*. 16:307.
- Xie J, Wu YY, Zhang TY, Zhang MY, Zhu WW, Gullen EA, Wang ZJ, Cheng YC, Zhang YX. 2017. New and bioactive natural products from an endophyte of *Panax notoginseng*. *RSC Adv*. 7: 38100–38109.
- Xu L, Wang A, Wang J, Wei Q, Zhang W. 2017. *Piriformospora indica* confers drought tolerance on *Zea mays* L. through enhancement of antioxidant activity and expression of drought-related genes. *Crop J*. 5:251–258.
- Xu Y, Zhang M, Liu QA, Hu LD, Li W, Zhu HJ, Liu L, Cao F. 2018. New verrucosidin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. XL-01. *Nat Prod Commun*. 13: 1329–1332.
- Yadav A, Yadav K. 2017. Exploring the Potential of Endophytes in Agriculture: A Minireview. *Adv Plants Agric Res*. 6: 102–106.
- Yan L, Zhao H, Zhao X, Xu X, Di Y, Jiang C, Shi J, Shao D, Huang Q, Yang H, Jin M. 2018. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102: 6279–6298.
- Yan L, Zhu J, Zhao X, Shi J, Jiang C, Shao D. 2019. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 103: 3327–3340.
- Ye YQ, Xia CF, Yang JX, Qin Y, Zhou M, Gao XM, Du G, Yang HY, Li XM, Hu QF. 2014. Isocoumarins from the fermentation products of an endophytic fungus of *Aspergillus versicolor*. *Phytochem Lett*. 10:215–218.
- Yenn TW, Ibrahim D, Chang LK, Rashid SA, Ring LC, Nee TW, Izham M. 2017. Antimicrobial efficacy of endophytic *Penicillium purpurogenum* ED76 against clinical pathogens and its possible mode of action. *Korean J Microbiol*. 53:193–199.

- You YH, Kwak TW, Kang SM, Lee MC, Kim JG. 2015. *Aspergillus clavatus* Y2H0002 as a new endophytic fungal strain producing gibberellins isolated from *Nymphoides peltata* in fresh water. *Mycobiology*. 43: 87–91.
- Yu J, Wu Y, He Z, Li M, Zhu K, Gao B. 2018. Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Camellia oleifera*. *Mycobiology*. 46: 85–91.
- Zekri N, Amalich S, Boughdad A, Alaoui El Belghiti M, Zair T. 2013. Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*. *Mediterr J Chem*. 2: 607–619.
- Zekri N, Amalich S, Elbelghiti MA, Zair T. 2014. Phytochemical screening and chemical composition of essential oils and hydrosols of *Mentha* species from Morocco. *Adv Environ Biol*. 8:10–18.
- Zhang D, Tao X, Chen R, Liu J, Li L, Fang X, Yu L, Dai J. 2015. Pericoannosin A, a polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase hybrid metabolite with new carbon skeleton from the endophytic fungus *Periconia* sp. *Org Lett*. 17: 4304–4307.
- Zhang D, Zhao L, Wang L, Fang X, Zhao J, Wang X, Li L, Liu H, Wei Y, You X, *et al.* 2017. Griseofulvin derivative and indole alkaloids from *Penicillium griseofulvum* CPCC 400528. *J Nat Prod*. 80:371–376.
- Zhang G, Sun S, Zhu T, Lin Z, Gu J, Li D, Gu Q. 2011. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*. 72:1436–1442.
- Zheng YK, Qiao XG, Miao CP, Liu K, Chen YW, Xu LH, Zhao LX. 2016. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol*. 66: 529–542.

Annexes

Annexe 1. Composition des milieux

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre	200g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1L
pH: 5.1 ± 0.2	

Sabouraud's Dextrose Agar (SDA)

Dextrose	40g
Peptone	10g
Agar	15g
Eau distillée	1L
pH 5.6 ± 0.2	

Yeast Extract Agar (YEA)

Extrait de levure	3 g
Peptone	5g
Agar	15 g
Eau distillée	1L
pH 7.2 ± 0.2	

Malt Extract Agar (MEA)

Extrait de malt	20 g
Dextrose	20 g
Peptone	6 g
Agar	15 g
Eau distillée	1L
pH 5.4 ± 0.2	

Yeast Malt Extract Agar (YMEA)

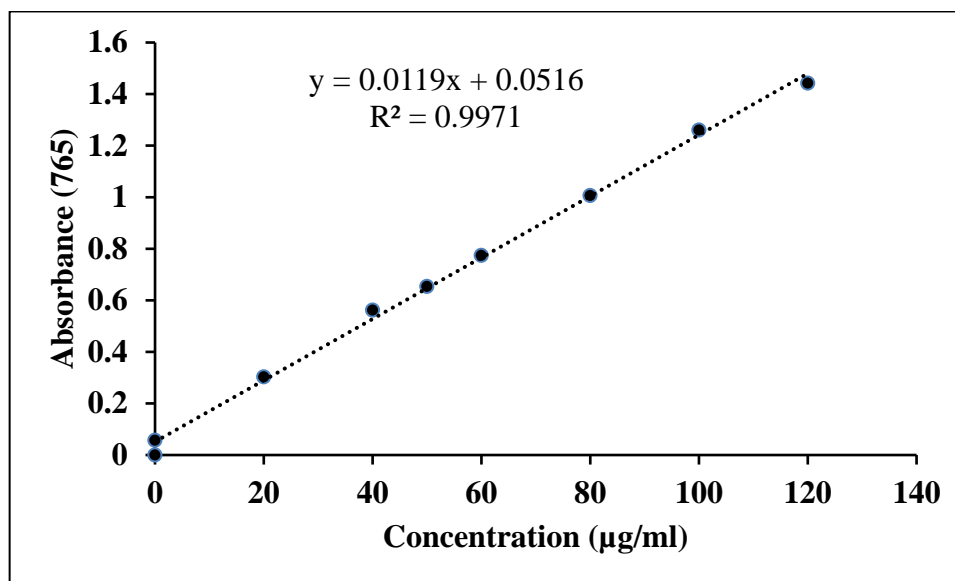
Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
Dextrose	10 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1L
pH 6.2 ± 0.2	

Modified Czapek Dox's agar (McDox)

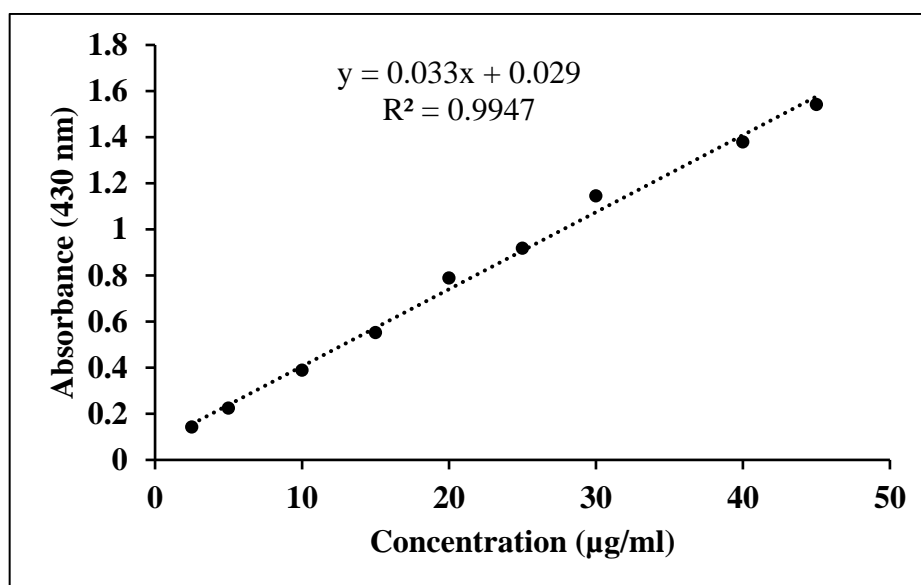
Glucose	2 g
L-asparagine	10 g
KH ₂ PO ₄	1.52 g
KCl	0.52 g

MgSO ₄ 7H ₂ O	0.52 g
CuNO ₃ 3H ₂ O	0.001 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0.001 g
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0.001 g
Agar	20 g
Rouge de phénol (2.5%)	0.3 mL
Eau distillée	1L
pH 6.2	

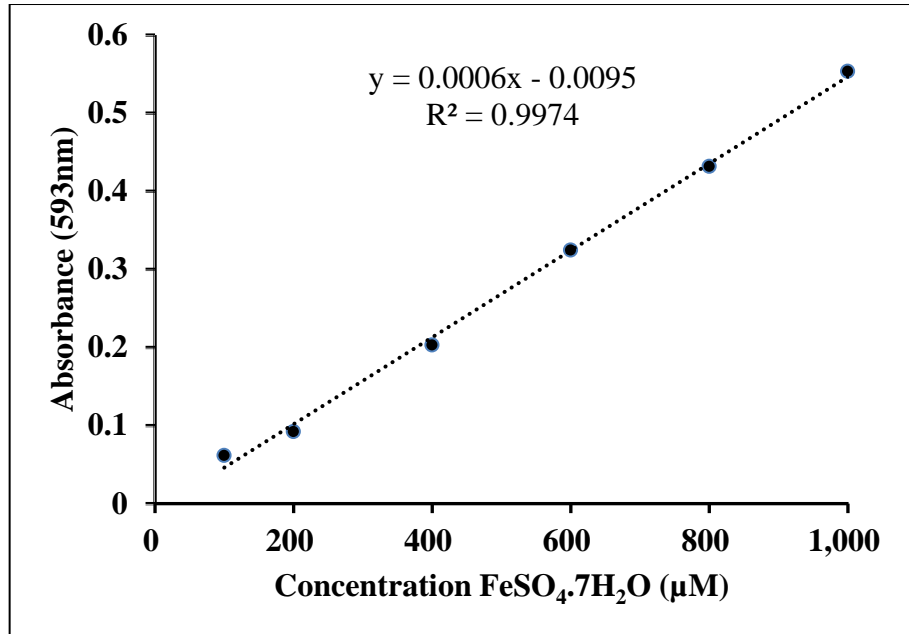
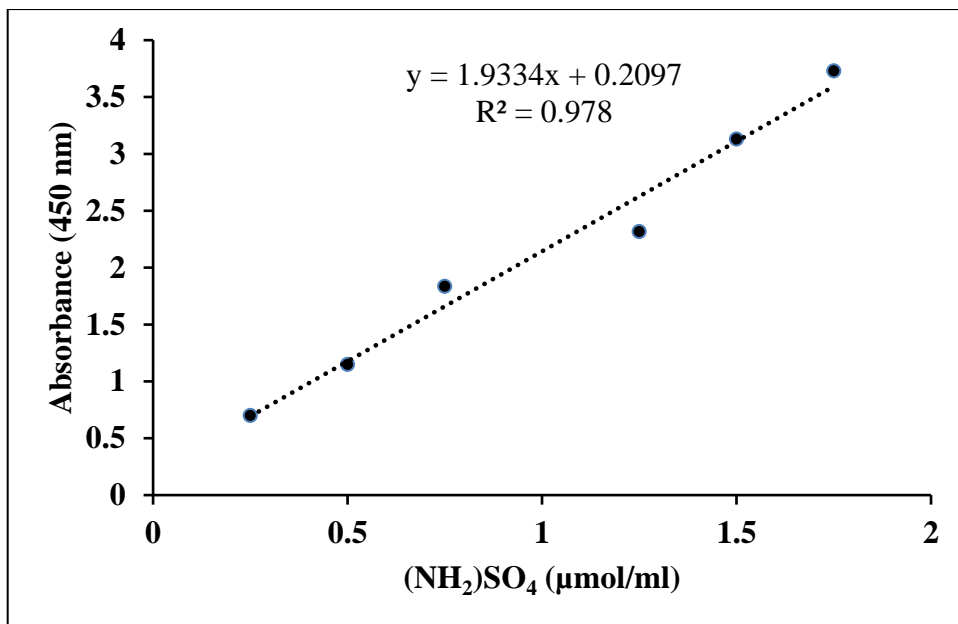
Annexe 2. Courbes d'étalonnage



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Courbe d'étalonnage de la quercetine

Courbe d'étalonnage de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (μM)

Courbe d'étalonnage du sulfate d'ammonium



Antimicrobial activity of *Anthostomelloides leucospermi* TBT10, an endophytic fungus isolated from *Taxus baccata* stems against human pathogens

Zerroug A^{1,2}, Sadrati N^{1,2}, Demirel R³, Bakli S¹ and Harzallah D¹

¹Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas Sétif 1, 19000, Sétif, Algeria

²Department of Biology, Faculty of Nature and Life and Earth Sciences and the Universes, University Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj BouArreridj, 34000, Algeria

³Department of Biology, Faculty of Sciences, Eskişehir Technical University, Eskişehir, Turkey

Zerroug A, Sadrati N, Demirel R, Bakli S, Harzallah D 2020 – Antimicrobial activity of *Anthostomelloides leucospermi* TBT10, an endophytic fungus isolated from *Taxus baccata* stems against human pathogens. Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology) 10(1), 274–289, Doi 10.5943/cream/10/1/26

Abstract

The objective of this study is to identify and evaluate the antimicrobial activity of the endophytic fungus TBT10 isolate from *Taxus baccata* stems. Morphological and molecular identification allowed us to identify this isolate as belonging to the *Anthostomelloides leucospermi* species. After preliminary screening by agar diffusion method which showed the inhibitory potential of TBT10 against the test bacteria, an optimization of the culture medium, the type of fermentation as well as the extraction solvent was carried out. The Potato Dextrose Agar was the best medium giving the highest production of secondary metabolites with average inhibition zones of 23.25 mm; the liquid culture was the one that gave the best activity (10.13 mm). Regarding the solvent, ethyl acetate extract was the solvent allowing the best extraction of the active molecules with average inhibition zones of 15.88 mm. Ethyl acetate extract was active against all used Gram positive bacteria and the largest inhibition was obtained against *Micrococcus luteus* (28.5 mm), but Gram negative bacteria were all resistant. MICs were ranged from 0.5625 to 4.50 mg/mL, while the MBCs were between 0.5625 to >4.50 mg/mL and the effect of extract was bactericidal against all bacteria except against *Enterococcus faecalis* 4 and *Enterococcus faecium* 1 where it was bacteriostatic. Time kill kinetic of ethyl acetate extract was bactericidal against *Enterococcus faecium* 2 after 1 and 24 hours for the MIC×4 (4.50 mg/mL) and MIC×2 (2.25 mg/mL) concentrations respectively. Whereas against *Streptococcus pyogenes*; the bactericidal effect was observed after 1, 4 and 12 hours of contact with MIC×4 (2.25 mg/mL), MIC×2 (1.125 mg/mL) and MIC (0.5625 mg/mL) respectively. TBT10 ethyl acetate extract can be a promising source for production of biologically active molecules.

Key words – Biological activities – endophytes – medicinal plant – secondary metabolites – time kill

Introduction

The word endophyte refers to any microorganisms living at least for a portion of their lives asymptotically within plant tissues (Liu et al. 2019), (Kaul et al. 2012). Endophytic fungi are

ubiquitous and have been found in all the plants studied so far (Liu et al. 2019). This unique habitat allows them to produce different types of natural products with significant bioactivity such as antimicrobial, antitumor, cytotoxic, anti-inflammatory, antiparasitic, anti-oxidant and neuroprotective activities (Liu et al. 2019). These natural products are very highly coveted, especially in recent years where resistance to antibiotics is increasing (Baba Ahmed-Kazi Tani & Arlet 2014).

Algeria is one of the richest Arab countries in medicinal plants with 3164 species (Benarba 2016); among them *Taxus baccata* a tree belonging to the class of Pinopsida, order of taxaes and to the family of Taxaceae, used in traditional medicine as abortive, antimalarials, antirheumatic, as well as to treat bronchitis (Patel et al. 2011, Kashani et al. 2018). The yew produces a diterpenic alkaloid, taxol or paclitaxel, it is recognized as the most important natural anti-cancer agent.

For the first time in this study, *Taxus baccata* growing in the mountains of Babors in Algeria was used to isolate and evaluate the antimicrobial activity of their endophytic fungi.

Materials & Methods

Collection of plant sample

Healthy leaves; stems and fruits of medicinal plant *Taxus baccata* were collected from the Babors mountains, Setif, Algeria in June 2014; The plant has been identified by botanists of the faculty, and all parts were brought to the laboratory in pre-sterilized bags and processed within 24 hours after the sampling.

Isolation of endophytic fungi

Endophytic fungus TBT10 was isolated using a modified method described by Pimentel et al.(2006). First, the samples were rinsed under running tap water to remove the dust, and then cut into small pieces. Surface sterilization was then done by soaking in 70% ethanol for 1 minute, followed by sodium hypochlorite 3% for 4 minutes and in 70% ethanol for 1 minute. Finally, the samples were rinsed using sterile distilled water three times separately and drying on sterile filter paper. The surface sterilized segments were aseptically cut into 5 mm pieces and placed into Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA) amended with 100 mg/mL of Gentamicin. The dishes were incubated at 28°C and monitored every day. The fungi that grown out from the samples were isolated, purified and conserved on PDA slants at 4°C till further use.

Identification of the endophytic fungus

Morphological and multi-locus gene identification

The endophytic fungus was initially identified phenotypically based on microscopic and macroscopic characteristics (Qiu et al. 2010, Jiaojiao et al. 2016). For molecular identification, the genomic DNA was extracted from the pure culture using a microbial DNA isolation kit (Ultraclean Microbial DNA isolation Kit, Mobio Laboratories, Inc., USA) following the manufacturer's instructions.

The internal transcribed spacer (ITS) region (ITS1F, CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A; ITS4, TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC), large subunit (LSU) region (LR0R, ACC CGC TGA ACT TAA GC; LR5, TCC TGA GGG AAA CTT CG) (Demirel 2016), β -tubulin (*BenA*) (Bt2a, GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC; Bt2b, ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC) (Raja et al. 2017) and RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) (5F, GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG; 7CReur, CCC ATR GCY TGY TTR CCC AT) (Visagie et al. 2014) were amplified by the polymerase chain reaction (PCR). PCR was conducted in 25 μ L final reaction volume, where each tube contained: 1 μ L of genomic DNA, 2.5 μ L of 2.5 μ M forward and reverse primers, 2.5 μ L of 10 \times Taq buffer+ KCl-MgCl₂, 2.5 μ L of 25 mM MgCl₂, 2 μ L of 2.5 mM dNTP mix, 0.25 μ L of 5 U: μ L Taq DNA polymerase and 11.75 μ L of sterile deionized water (Kadaifciler & Demirel 2017).

For ITS, LSU and *BenA*, the amplification conditions consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min (ITS and *BenA*)/10 min (LSU), followed by 35 cycles at 94°C for 45 s (ITS and *BenA*)/ 15s (LSU), 55°C for 45s (ITS and *BenA*)/ 48°C for 30s (LSU), 72°C for 60s (ITS and *BenA*)/90s (LSU) and final extension at 72°C for 7 min (Visagie et al. 2014, Demirel 2016). For RPB2, the initial denaturation was at 94°C for 5 min was followed by 5 cycles (94°C for 45s, 50°C for 45s, 72°C for 60s), 5 cycles (94°C for 45s, 52°C for 45s, 72°C for 60s) and 30 cycles (94°C for 45s, 55°C for 45s, 72°C for 60s) (Visagie et al. 2014). PCR products were separated by agarose gel electrophoresis (1% w/v in 1×TAE), cleaned using EXOSAP-IT (Affimetrix) and sequenced with the CEQ 8000 Genetic Analysis System using the same primers used during the amplification for ITS, *BenA* and RPB2. For LSU, two additional primers (LR3, GGT CCG TGT TTC AAG AC; LR3R, GTC TTG AAA CAC GGA CC) were used (Visagie et al. 2014, Raja et al. 2017).

Phylogenetic analyses

The sequences of the different DNA regions obtained after sequencing were compared with sequences recorded on National Center for Biotechnology Information (NCBI) and aligned with those morphologically and phylogenetically related species (Table 1) by Muscle in MEGA7 software (Kumar et al. 2016). The set of sequences of the different aligned regions were then concatenated using the Mesquite 3.6 software, then analyzed by Maximum likelihood (ML) based on the “Tamura Nei” model (Tamura & Nei 1993) using MEGA7 with 1000 Bootstrap replicates. *Sordaria fimicola* CBS 72396 was used as out group.

Table 1 Sequences of the species used in phylogenetic analysis. TBT10 isolate of this study is in bold.

Species	Strain number	GenBank Accession Number			
		ITS	LSU	<i>BenA</i>	RPB2
<i>Anthostomelloides leucospermi</i>	TBT10	MN611120	MN611121	MN630033	MN630032
<i>Xylaria longipes</i>	CBS 148.73	KU683768	KX533452	KU684204	KX789491
<i>Xylaria longipes</i>	CBS 347.37	MH855925	MH867427	-	-
<i>Xylaria acuta</i>	5220	JQ862676	JQ862637	JX868537	-
<i>Xylaria badia</i>	5256	JQ862687	JQ862643	JX868543	-
<i>Xylaria plebeja</i>	HAST 91122401	GU324740	-	GQ502689	GQ848353
<i>Xylaria intracolorata</i>	HAST 90080402	GU324741	-	GQ502690	GQ848354
<i>Xylaria grammica</i>	5151	JQ862665	JQ862626	JX868535	-
<i>Xylaria polymorpha</i>	CBS 162.22	MH854735	MH866242	-	-
<i>Xylaria hypoxylon</i>	CBS 126417	MH864103	MH875562	-	-
<i>Xylaria bambusicola</i>	MFLUCC 11-0606	KU940160	KU863148	-	KU940183
<i>Xylaria enteroleuca</i>	CBS 128357	MH864898	MH876349	-	-
<i>Xylaria berteri</i>	JDR 256	GU324750	-	GQ502698	GQ848363
<i>Xylaria xylarioides</i>	CBS 127883	MH864741	MH876177	-	-
<i>Xylaria arbuscula</i>	CBS 126416	MH864102	MH875561	-	-
<i>Anthostomelloides leucospermi</i>	CBS 110126	EU552100	EU552100	-	-
<i>Anthostomelloides brabeji</i>	CBS 110128	EU552098	EU552098	-	-
<i>Anthostomelloides proteae</i>	CBS 110127	EU552101	EU552101	-	-
<i>Anthostomella eucalyptorum</i>	CBS 120036	DQ890026	DQ890026	-	-
<i>Anthostomella helicofissa</i>	MFLUCC 14-0173	KP297406	KP297406	KP406617	KP340534
<i>Anthostomella rubicola</i>	MFLUCC 16-0479	KX533455	KX533456	KX789494	KX789493

Table 1 Continued.

Species	Strain number	GenBank Accession Number			
		ITS	LSU	<i>BenA</i>	RPB2
<i>Anthostomella Formosa</i>	MFLUCC 14-0170	KP297403	KP340544	-	KP340531
<i>Anthostomella obesa</i>	MFLUCC 14-0171	KP297405	KP340546	-	KP340533
<i>Biscogniauxia petrensis</i>	LC5697	KU746669	KU746715	KU746761	-
<i>Biscogniauxia marginata</i>	MFLUCC 12-0740	KJ958407	KJ958408	KJ958406	KJ958409
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	CBS 129073	MH865188	MH876625	-	-
<i>Rosellinia mammiformis</i>	CBS 445.89	KF719200	KF719212	-	-
<i>Rosellinia nectrioides</i>	CBS 449.89	FJ175181	KF719213	-	-
<i>Rosellinia necatrix</i>	CBS 349.36	AY909001	KF719204	KY624310	KY624275
<i>Lopadostoma dryophilum</i>	CBS 133213	KC774570	KC774570	MF489023	KC774526
<i>Lopadostoma turgidum</i>	CBS 133207	KC774618	KC774618	MF489024	KC774563
<i>Hypoxyton carneum</i>	MUCL 54177	KY610400	KY610480	KX271270	KY624297
<i>Sordaria fimicola</i>	CBS 723.96	MH862606	MH874231	DQ368618	DQ368647

Screening of antimicrobial activity

The preliminary screening of antimicrobial activity of endophytic fungus was carried out by the agar diffusion method against four pathogenic bacteria, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 and one yeast, *Candida albicans* ATCC 1024. Agar plugs (6 mm) were cut from the PDA plate of actively growing endophytic fungus and inoculated on the surface of Muller-Hinton Agar (MHA) and PDA Petri dishes previously spread with 100 μ L of bacteria and yeast suspensions respectively. Plates were kept in a refrigerator at 4°C for 6 hours for diffusion of metabolites from the fungal disks. After incubation at 37°C for 24 hours for bacteria and 48 hours for yeast, the zones of inhibition were measured (Powthong et al. 2013, Sahani et al. 2017).

Choice of the best culture medium for fermentation

Different culture media such as PDA, Sabouraud's Dextrose Agar (SDA), Yeast Extract Agar (YEA), Malt Extract Agar (MEA) and Yeast Malt Extract Agar (YMEA) were used to choose the one that allows the best production of bioactive molecules by TBT10 isolate. After culturing the endophytic fungus on the culture media for 14 days at 28°C, the agar diffusion method described above was performed against four Gram positive bacteria *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and four Gram positive bacteria *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and one yeast, *Candida albicans* ATCC 1024.

All Petri dishes were incubated for 24 hours at 37°C for bacteria and 48 hours for yeast. The antimicrobial activity of the endophytic fungus TBT10 isolate was detected by the appearance of the inhibition zones around the agar plugs.

Cultivation of endophytic fungus for metabolites production

Liquid and solid cultures of the endophytic fungus TBT10 were prepared following the modified protocol of Kim et al. (2016) and Son et al. (2018).

For liquid cultures; 100 mL of Potato Dextrose Broth (PDB) medium selected in the previous step in Erlenmeyer flasks was inoculated by the endophytic fungus. For solid cultures; the isolate

was inoculated into five 9 cm diameter Petri dishes containing 20 mL of PDA medium. After incubation of 21 days at 28°C with agitation at 200 rpm, the liquid medium was separated from the mycelium using Whatman filter paper and then centrifuged at 4000 rpm for 5 min, while the solid cultures were removed from the Petri dishes and then ground.

Extraction of metabolites from endophytic fungus cultures

In order to choose the best solvent for the maximum extraction of the secondary metabolites, extraction with three solvents was carried out following the method of Saraswaty et al. (2013) and Son et al. (2018) with some modifications. To the filtrate, equal volume of n-Hexane was added, mixed for 2 hours at 200 rpm and allowed to stand for 1 hour, the upper layer of solvent containing the extracted compounds was collected and the filtrate was re-extracted with the other two solvents dichloromethane and ethyl acetate successively. On the other hand, the metabolites of solid cultures were extracted by adding 100 mL of n-Hexane to the crushed medium followed by agitation for 24 hours at 200 rpm, the layer of n-Hexane was then collected and the same steps were repeated for the other two solvents.

All recovered organic layers were evaporated under vacuum using a rotary evaporator (BÜCHI), the crude extracts were then dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and kept at 4°C.

Determination of antimicrobial activity of fungal extracts

Antimicrobial activity of the various extracts of TBT10 was performed using the agar well diffusion method against *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922 and the yeast *Candida albicans* ATCC 1024.

After inoculation of the MHA and PDA agar plates with 100 µL of the bacterial (10^8 CFU/mL) and yeast (5×10^6 cells/mL) suspensions respectively, wells of 6 mm diameter were formed and filled with 25 µL of each extract, DMSO was used as negative control. Refrigeration for 6 hours at 4°C is necessary to allow the diffusion of bioactive molecules followed by incubation at 37°C for 24 hours for bacteria and 48 hours for yeast. The diameters of the inhibition zones were measured in millimeters (Fatima et al. 2016).

Antibacterial activity of ethyl acetate extract against multi-drug resistant bacteria

Since the ethyl acetate extract is the one that gave the best activity against the bacteria tests, it was chosen to test its activity against a wide range of pathogenic and multi-drug resistant bacteria (Fig. 6) following the method previously described.

Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs)

MICs and MBCs of ethyl acetate extract of TBT10 against Gram positive bacteria listed in the table 3 were determined using microdilution technique according to the standard reference method M07A8 from Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). The assay was carried out in 96-well microplates containing 180 µL of Muller-Hinton Broth (MHB). Initially, the ethyl acetate extract was dissolved in DMSO, and then, its dilutions were prepared in wells of microplates to get final concentrations ranging from 0.0044 to 4.5 mg/mL. After this step, each well received 20 µL of bacterial suspension (10^6 CFU/mL). DMSO and the Gentamicin were used as negative and positive control respectively. Plates were then incubated at 37°C for 24 hours. The MICs of the extract were detected after addition 20 µL of 2, 3-5 Triphenyltetrazolium chloride aqueous solution and incubation at 37°C for 30 min. the lowest concentration of extract showing no visual color change and therefore no growth was considered as MIC.

Using the results of the MIC assay, the concentrations showing a complete absence of visual growth of bacteria were identified and subcultured onto agar plates and incubated at 37°C for 24 hours. The complete absence of growth on the agar surface at the lowest sample concentration was

defined as MBC.

Time-kill kinetics assay

Time-kill assay was conducted against *Enterococcus faecium* 2 and *Streptococcus pyogenes* as described by CLSI (1999). This involved the monitoring of the decrease of bacteria cell growth, due to the effect of a definite extract concentration over time. Concentrations equal to 1xMIC, 2xMIC and 4xMIC of the ethyl acetate extract were prepared, and then the bacterial suspension was transferred to all the tubes in order to obtain a final inoculum of 5×10^5 CFU/mL. For the negative control, the extract was not added and has been replaced by the broth. The cultures were then inoculated in a shaker at 37°C and aliquots of 100 µL were withdrawn from the different tubes at different time intervals (0, 1, 2, 3, 4, 6, 12 and 24 hours), diluted and spread on the surface of MHA. Colony count was performed after 24 hours incubation at 37°C. A graph of the log CFU/mL was then plotted against time. The percentage of lethality was calculated according to the following equation:

$$\text{Reduction (\%)} = V_0 - V_z / V_0 \times 100$$

Where, V_0 is the initial viable cell count at $T=0$, V_z is the viable cell count at time Z .

The extract is considered bactericidal when the percentage of lethality reached 99.99% after 24 hours of contact.

Statistical analysis

All experiments were performed in duplicates and statistical analysis was carried out using SAS/STAT® 9.2 software. Comparison of groups was performed using the one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multip-rang test. Results are represented as mean \pm standard deviation (SD) and significant effects of treatments were determined by F values ($P \leq 0.05$).

Results & Discussion

Isolation and identification of endophytic fungus

The fungus TBT10 isolated as endophyte from healthy stems of *Taxus baccata* grew as cottony circular colonies, fast growing with 46 mm diameter on the PDA and 45 mm on MEA after 7 days of incubation at 28°C. On PDA as well as on MEA, the colony is white with a white lapel; however, on MEA the colony is denser. The mycelium is transparent, very dense, fine and sterile (Fig. 1). For the molecular identification, phylogenetic tree (Fig. 2) was conducted using combined ITS, LSU, *BenA* and RPB2 sequences of TBT10 isolate and those downloaded from GenBank, of which *Sordaria fimicola* CBS 72396 was used as an out-group. The analyses showed that TBT10 was closely related to the *Anthostomelloides leucospermi* CBS110126 species previously named *Anthostomella leucospermi* (Daranagama et al. 2016), with which it formed a single clade (bootstrap of 77%). The sequences of the different regions ITS, LSU, *BenA* and RPB2 were deposited in GenBank database under accession numbers MN611120, MN611121, MN630033 and MN630032 respectively.

Several studies in different regions of the world such as those of Jam Ashkezari & Fotouhifar (2017) in Iran, Tayung & Jha (2010) in India and Rivera-Orduña et al. (2011) in Mexico were isolated of endophytic fungi from *Taxus baccata*. However, none have been worked on *Taxus baccata* growing in Algeria and none of them have been isolated of *Anthostomelloides leucospermi*. This species has been isolated from other plants such as deciduous leaves belonging to the Betulaceae family in Japan (Osono & Masuya 2012) and from leaves of *Oryza sativa* (Lapuz et al. 2018).

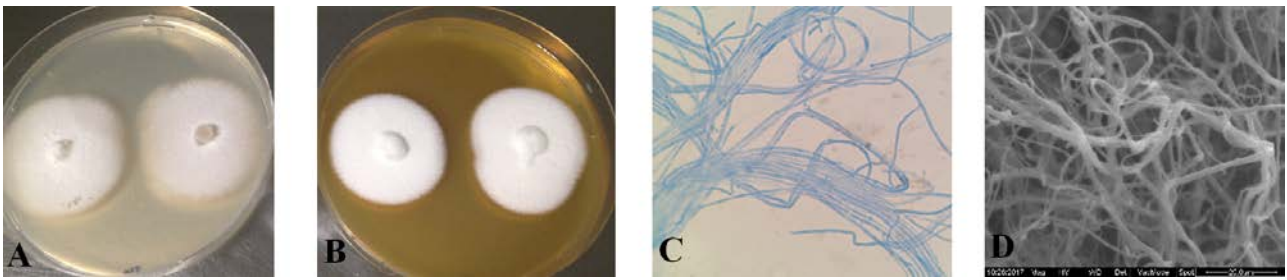


Fig. 1 – Morphological characteristics of TBT10 isolate. A Colony on PDA. B Colony on MEA. C, D Microscopic appearance under optical and electronic microscope respectively.

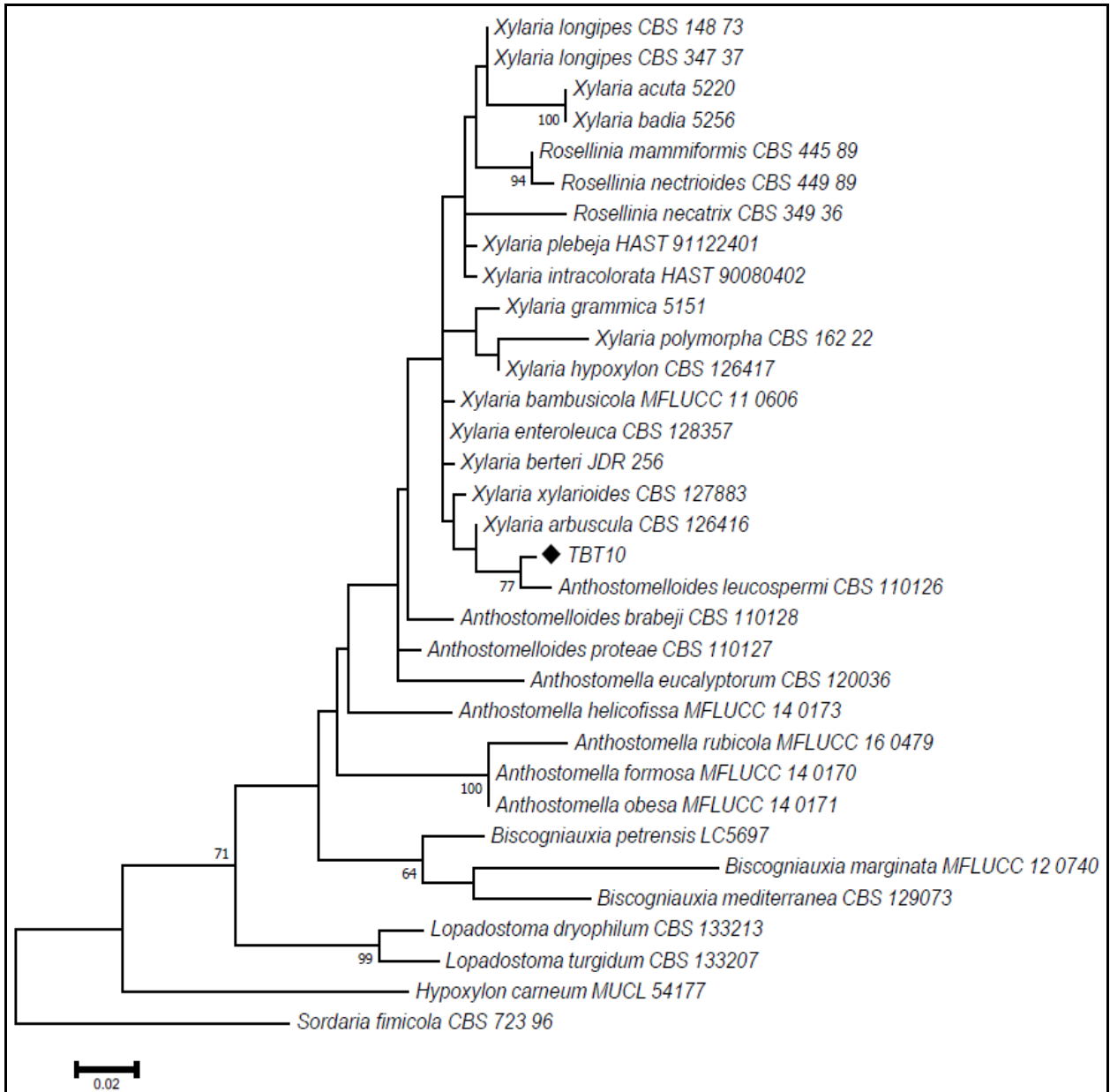


Fig. 2 – Phylogenetic tree generated by Maximum Likelihood (ML) analysis based on the Tamura-Nei model calculated using MEGA7 based on the combined alignment of ITS, LSU, *BenA* and RPB2 sequences, showing the relationships of the TBT10 sequences with previously known taxa in the NCBI GenBank. The ML bootstrap rates (expressed as a percentage of 1000 replications), greater than 50% are represented at the node level. The tree is rooted with *Sordaria fimicola* CBS 72396.

Screening of antimicrobial activity

TBT10 isolate was submitted to an antimicrobial screening on solid medium. The isolate showed a good activity against three pathogenic bacteria with a maximum activity of 30 mm observed against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; whereas against *Candida albicans* 1024 no activity was observed (Table 2).

Table 2 Results of preliminary screening obtained against pathogenic microorganisms.

	Inhibition zones (mm)				
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 1024
TBT10	15.5	30	13.5	00	00

One of the most important properties of endophytic fungi is the production of a wide variety of bioactive molecules that inhibit a wide range of pathogenic microorganisms. The agar diffusion method allows the diffusion of these bioactive molecules previously secreted by the endophytic fungi to the agar seeded with the test bacteria, thus producing zones of inhibition (Balouiri et al. 2016). This allows rapid and qualitative selection of active endophytic fungi (Santos et al. 2015). Several studies have allowed the isolation of several endophytic fungi as well as the determination of their antimicrobial activities on agar medium. Twelve endophytic fungi isolated from *Cinnamomum mercadoi* bark were all active against at least one of the four pathogenic bacteria used in our study (Marcellano et al. 2017). From 65 endophytic fungi isolated from the leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller, 18 showed antagonistic activities against at least two pathogenic bacteria (Santos et al. 2015).

Choice of the best culture medium for fermentation

In order to optimize the fermentation conditions, the choice of the culture medium allowing the best production of the active molecules is an important step. For this, TBT10 isolate was grown on five different culture media, and the agar diffusion method was used to estimate the antimicrobial activity. The results presented in figure 3 shows that PDA and SDA were in first position with means of inhibition zones of 23.25 and 22.50 mm respectively, followed by YMEA (14.25 mm), YEA (14.00 mm). On the other hand, and for the MEA no activity has been obtained with this medium.

According Devaraju & Satish (2011), the production of the secondary metabolites is not only influenced by the species and genetic base of the microorganism, the physicochemical conditions of her environment but also depends on specific media and kinds of nutrients available. Consequently, the culture medium can affect the presence or absence of secondary metabolites and/or their level of production by endophytic fungi (Paterson & Bridge 1994). Several studies such as that of Devaraju & Satish (2011), Deka & Jha (2018) and Samae et al. (2019) who found that after growth on the PDA, endophytic fungi showed greater antimicrobial activity. However, Zerroug et al. (2018) and Chatterjee et al. (2019) found that the culture medium which gave the best activity was the MEA.

Determination of antimicrobial activity of fungal extracts

After selection of the optimum culture medium, the choice of the type of fermentation and solvent permitting the highest production as well as the maximal extraction of the secondary metabolites was carried out using the agar well diffusion method. The average of the inhibition zones was 10.13 mm for liquid medium, whereas on the solid medium, the average was of 5.30 mm (Fig. 4).

Regarding the extraction solvents, ethyl acetate was the best solvent for extraction with an average of inhibition zones of 15.88 mm, followed by dichloromethane extract (14.50 mm). However, the n-Hexane extract was not active (Figs 5, 6).

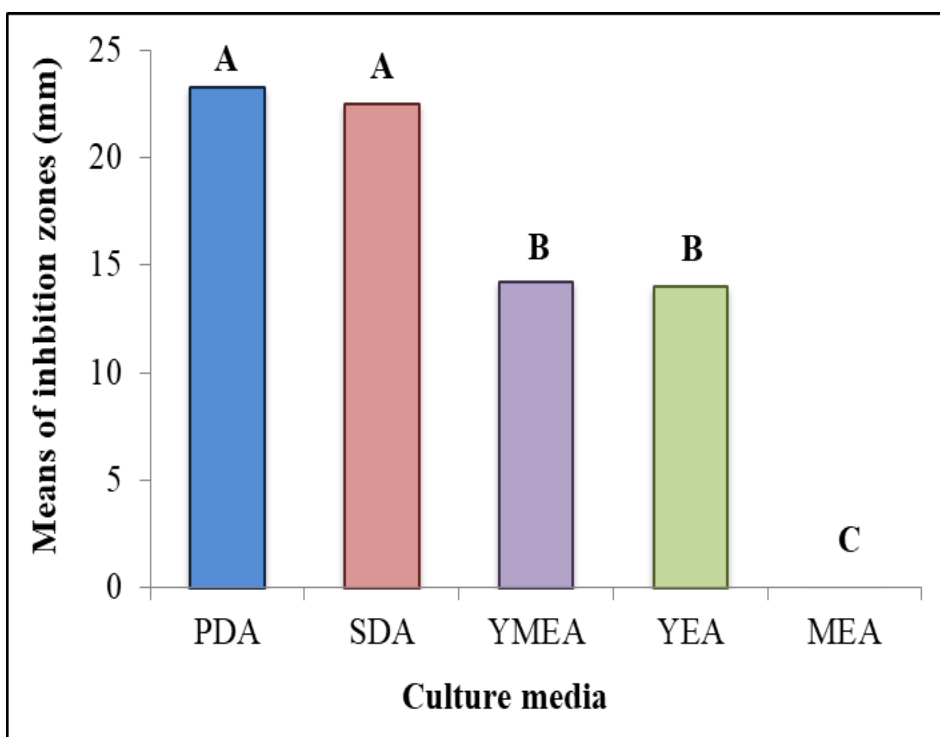


Fig. 3 – Antimicrobial activity of TBT10 isolate after growth on different culture media. Means with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

According to Son et al. (2018), the two types of fermentation on solid or liquid medium have advantages. However, according to Subramaniam (2012), the fermentation on solid and liquid medium shows that the obtained results depends more on the microorganisms used than on the fermentation process. Due to this reason, it is important to test both types of fermentation for each isolate. The study realized by Hamzah et al. (2019) showed that several *Penicillium* isolates have antibacterial activity after fermentation on both of solid and liquid media, but the fermentation on liquid medium gave the best activity. Whereas, another study done on *Aspergillus oryzae* showed that the extract from solid medium gave the greater activity than the extract from liquid fermentation (Son et al. 2018).

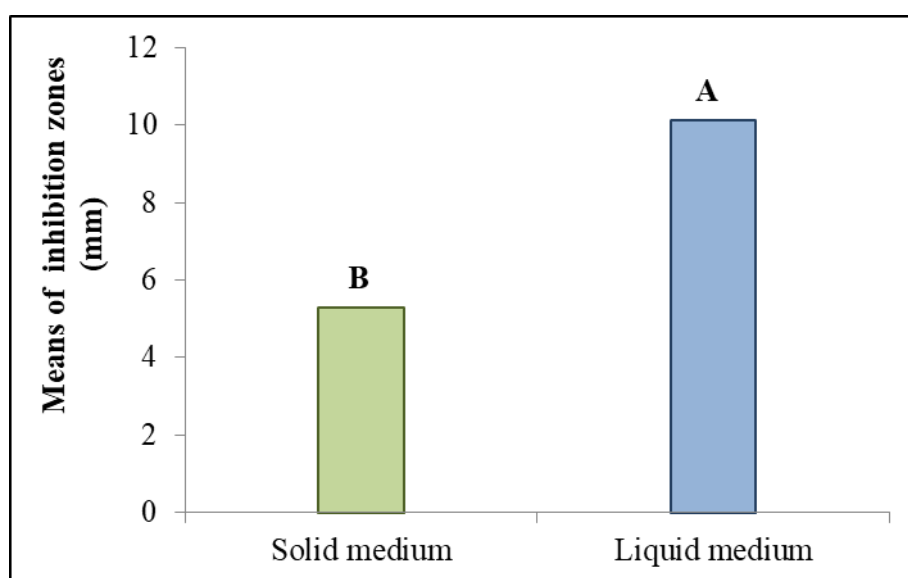


Fig. 4 – Effect of fermentation type on antimicrobial activity of TBT10 isolate against all pathogenic microorganisms. Means with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

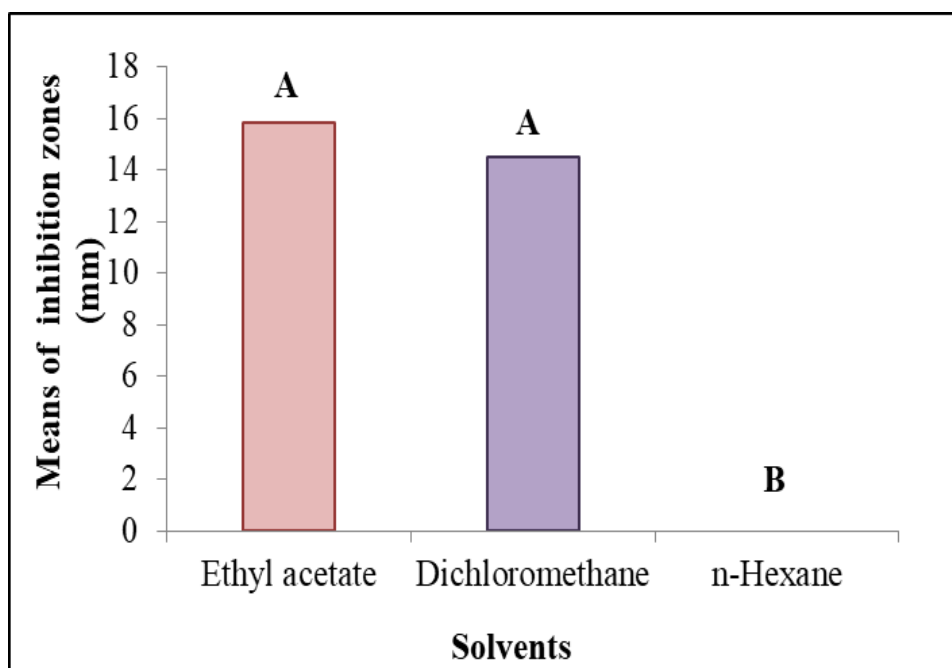


Fig. 5 – Effect of different solvents on antimicrobial activity of TBT10 isolate against all pathogenic microorganisms. Means with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

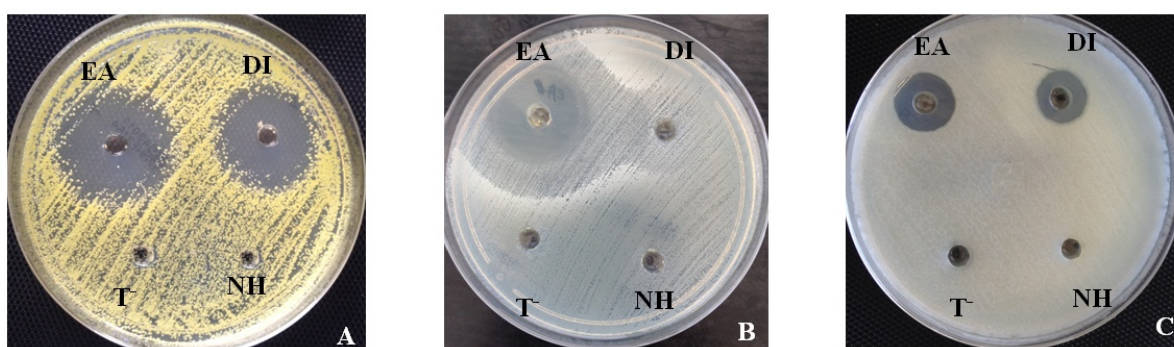


Fig. 6 – Antibacterial activity of TBT10 extracts against pathogenic bacteria. A *Micrococcus luteus* NRLL B-4375. B *Bacillus cereus* ATCC. C *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, EA Ethyl acetate extract, DI Dichloromethane extract, NH n-Hexane extract, T: Negative control.

The choice of the appropriate solvent for the maximal extraction of secondary metabolites depends on the nature of the bioactive compounds present in the medium after fermentation (Goutam et al. 2016). Since endophytic fungi generally produce semi-polar molecules (Sugijanto & Dorra 2016), and dichloromethane and ethyl acetate allow the extraction of semi-polar compounds (Djamaan et al. 2018), the obtained results are explained. The results of this study are similar to those found by Musavi & Balakrishnan (2014) where the ethyl acetate extract of the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* NFX06 was the most active. The same for those of Mu'azzam et al. (2015) which also found that the two most active fungi (TLBML-M1 and TLBML-PHP2) among those isolated from *Ocimum citriodorum* Vis. showed the better activity after extraction with ethyl acetate and dichloromethane.

Antibacterial activity of ethyl acetate extract against multi-drug resistant bacteria

The ethyl acetate extract of TBT10 has been tested on a wide range of pathogenic and multi-drug resistant bacteria; the latter has been active only on Gram positive bacteria. Of these, all strains of *Staphylococcus aureus* were weakly inhibited with means of inhibition zones ranging

from 10 mm to 14 mm, the other strains were moderately inhibited with means of inhibition zones reaching 28.5 mm obtained against *Micrococcus luteus* (Fig. 7).

The resistance of Gram negative bacteria is due either to the complexity of the liquid bilayer of their outer membrane, or to the highly negatively charged lipopolysaccharides that it contains, which prevents the attachment of anionic and neutral molecules due to the absence of attraction of charges, thus preventing their penetration and inactivation of these bacteria (Tang et al. 2007, Sadrati et al. 2013).

The Infectious Disease Society of America recognizes that antibiotic resistance is one of the greatest threats to human health in the world (Van Duin & Paterson 2016). In the face of this growing bacterial resistance observed in the world and recently in Algeria (Baba Ahmed-Kazi Tani & Arlet 2014), natural bioactive molecules are more in demand. Several studies have shown that endophytic fungi are a good reservoir for these molecules; for example, the ethyl acetate extract of *Chaetomium* sp. NF15, an endophytic fungus isolated from *Justicia adhatoda* L., inhibited the growth of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacteria (Fatima et al. 2016). Another endophytic fungus, *Aspergillus rhizopodus* isolated from seaweeds, showed an inhibitory effect against multi-drug resistant bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella weltevreden* and *Escherichia coli* (Samae et al. 2019).

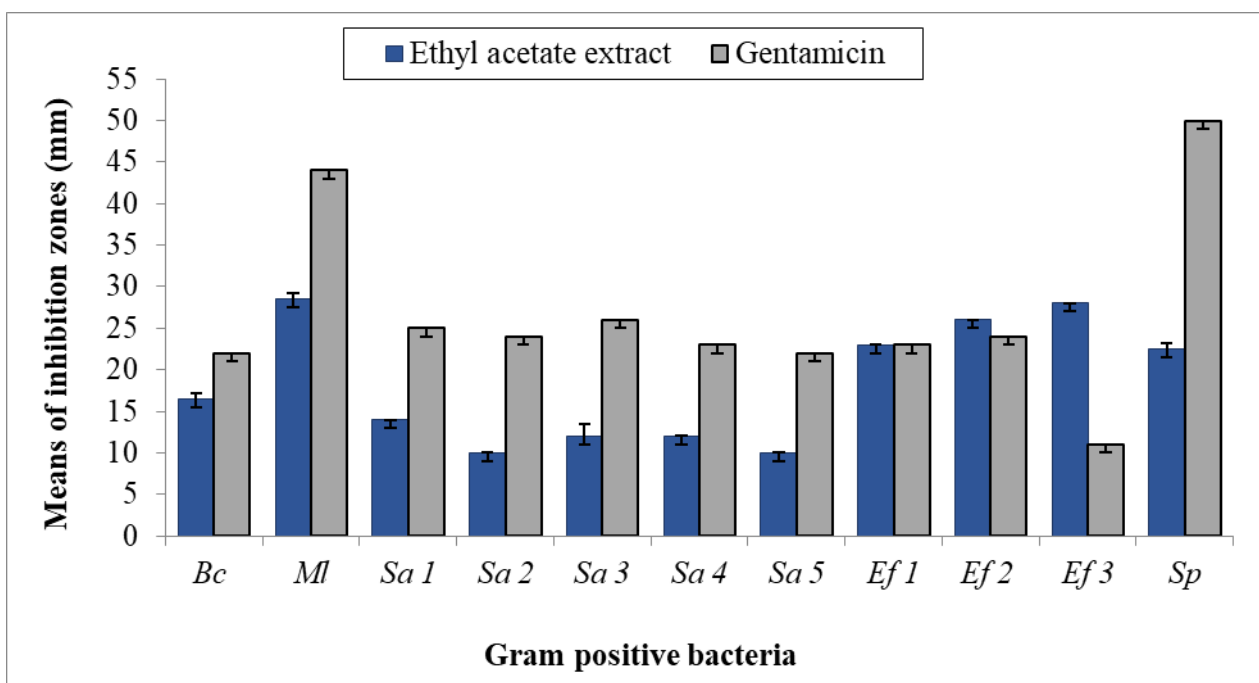


Fig. 7 – Antibacterial activity of TBT10 ethyl acetate extract obtained against Gram positive bacteria.– Data were presented as mean± SD (n=2). Bc *Bacillus cereus*, MI *Micrococcus luteus*, Sa 1 *Staphylococcus aureus* 1, Sa 2 *Staphylococcus aureus* 2, Sa 3 *Staphylococcus aureus* 3, Sa 4 *Staphylococcus aureus* 4, Sa 5 *Staphylococcus aureus* 5, Ef 1 *Enterococcus faecalis* 1, Ef 2 *Enterococcus faecalis* 2, Ef 3 *Enterococcus faecalis* 3, Sp *Streptococcus pyogenes*.

Determination of MICs and MBCs of ethyl acetate extract

TBT10 ethyl acetate extract has antimicrobial activity against Gram positive bacteria with MICs ranging from 0.5625 to 4.5 mg/mL. While, the MBCs were between 0.5625 to > 4.5 mg/mL, the most sensitive bacteria were *Streptococcus pyogenes* (Table 3).

According to Appiah et al. (2017), when the MBC/MIC ratio is less than or equal to 4, the extract is bactericidal, and conversely, if it is greater than 4, the extract is bacteriostatic. After calculating this ratio for the TBT10 extract (Table 3), the latter is considered bactericidal against all bacteria except against *Enterococcus faecalis* 4 and *Enterococcus faecium* 1 where it was bacteriostatic.

No studies have been made on the antibacterial activity of the species *Anthostomelloides leucospermi*. However, another study done by De amorim et al. (2016), has tested the bioactive molecules produced by another species *Anthostomelloides brabeji* formerly named *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius*. Two of the four molecules produced by this fungus were the most active; the sicayne was active against *Staphylococcus aureus* with MIC of 62.5µg/mL, whereas the eutypinol was active against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella setubal* with MIC of 31.25 µg/mL; The other two molecules showed the lowest activity with MICs ranging from 250 µg/mL to values above 1000 µg/mL.

Table 3 MICs and MBCs values (µg/mL) obtained by TBT10 ethyl acetate extract against the Gram positive bacteria.

Pathogenic bacteria	Ethyl acetate extract			Gentamicin
	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC
<i>Bacillus cereus</i>	2.25	2.25	1	0.00025
<i>Micrococcus luteus</i>	4.50	4.50	1	0.000063
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	2.25	4.50	2	0.0005
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	2.25	4.50	2	0.00025
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	2.25	4.50	2	0.00025
<i>Staphylococcus aureus</i> 4	2.25	4.50	2	0.0005
<i>Staphylococcus aureus</i> 5	4.50	>4.50	Nd	0.00025
<i>Enterococcus faecalis</i> 1	1.125	4.50	4	0.008
<i>Enterococcus faecalis</i> 2	1.125	4.50	4	0.004
<i>Enterococcus faecalis</i> 3	1.125	1.125	1	0.256
<i>Enterococcus faecalis</i> 4	1.125	>4.50	>4	0.001
<i>Enterococcus faecium</i> 1	1.125	>4.50	>4	0.256
<i>Enterococcus faecium</i> 2	1.125	1.125	1	0.004
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.5625	0.5625	1	0.001
<i>Streptococcus australis</i>	2.25	2.25	1	0.000063

Nd: Not determined

Time-kill kinetics assay

The killing growth profile of TBT10 ethyl acetate extract against *Enterococcus faecium* 2 (Fig. 8) and *Streptococcus pyogenes* (Fig. 9) show that for *Enterococcus faecium* 2, the bactericidal effect was observed after 1 and 24 hours for the concentrations MIC×4 (4.50 mg/mL) and MIC×2 (2.25 mg/mL) respectively. Whereas for *Streptococcus pyogenes*, all the concentrations used (MIC= 0.5625 mg/mL, MIC×2=1.125 mg/mL and MIC×4=2.25 mg/mL) had a bactericidal activity after 12, 4 and 1 hours of contact respectively. These results confirm what was obtained in table 3, where the effect of the TBT10 ethyl acetate extract was bactericidal against most bacteria including *Enterococcus faecium* 2 and *Streptococcus pyogenes*.

It is also observed that the time of complete elimination of the two bacteria tested decrease by increasing the concentration of the ethyl acetate extract, which indicates that bactericidal activity is concentration dependent.

The time kill test is used in microbiology to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of an agent in relation to time, and it is the most appropriate method for determining the bactericidal effect (Taufiq & Darah 2018). Similarly, and with results very close to those obtained in this study, the bactericidal effect has been observed with several endophytic fungal extracts, such as the extract of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* IBRL OS-64 isolated from *Ocimum sanctum* LINN leaves which demonstrated a bactericidal activity after 20-24 hours of contact at MIC (0.125 mg/mL) and 16-20 hours at 2×MIC (0.25 mg/mL) against both bacteria, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Taufiq and Darah 2018) and *Streptococcus mutans* (Taufiq and Darah 2019). A concentration of 3.125 mg/mL of *Polycephalomyces nipponicus* Cod-MK1201 extract was required to kill 99.9% of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* after 24 hours of contact (Thammawat et al. 2017).

According to the obtained results in this study, the bioactive secondary metabolites produced by the endophytic fungus TBT10 appear to be of great importance in the pharmaceutical field as well as in the fight against pathogenic bacteria, this is encouraging carrying out other in-depth studies.

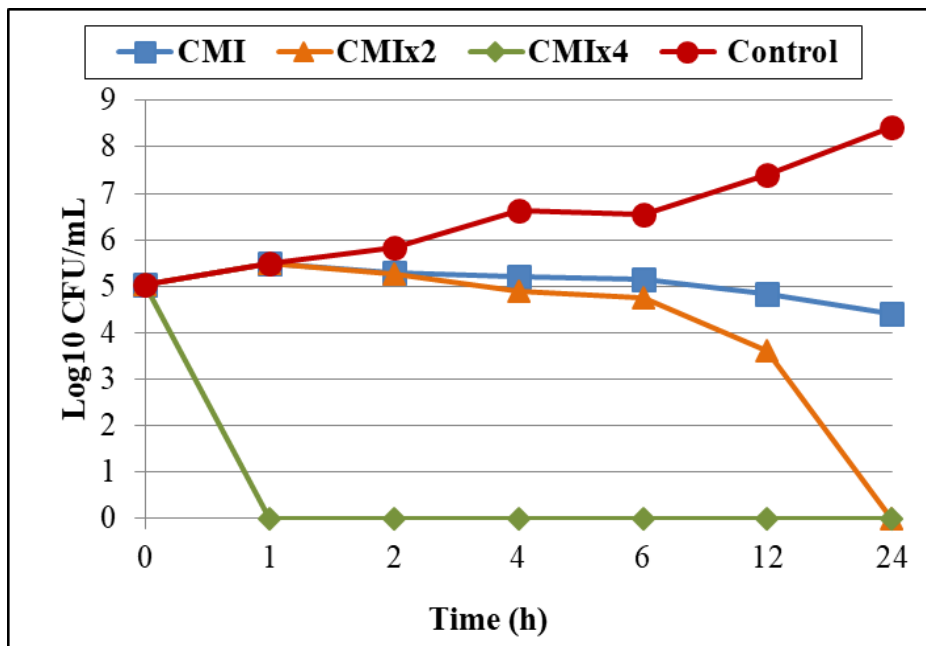


Fig. 8 – Time kill curve of TBT10 ethyl acetate extract against *Enterococcus faecium* 2.

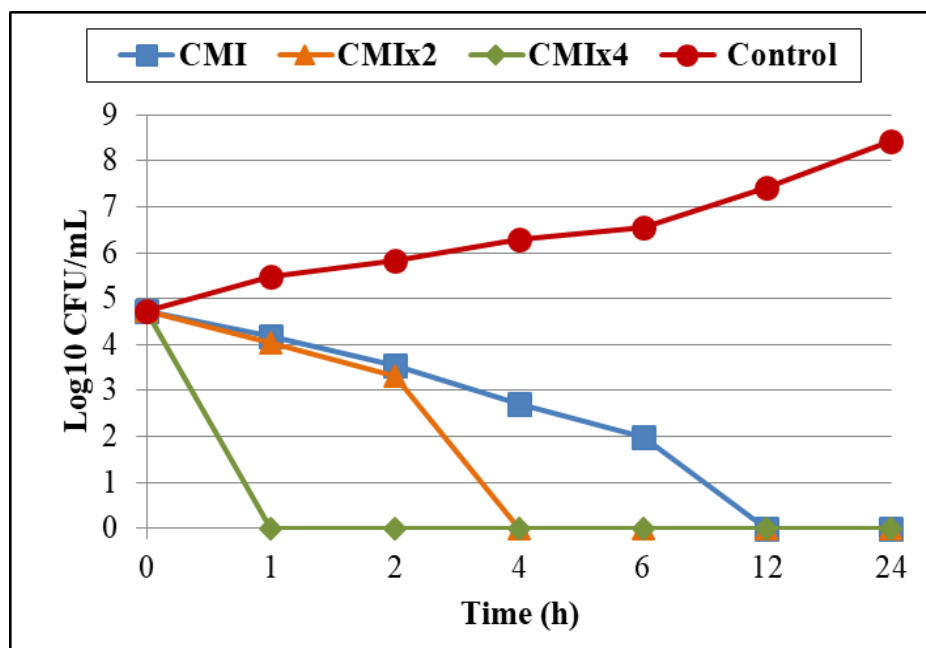


Fig. 9 – Time kill curve of TBT10 ethyl acetate extract against *Streptococcus pyogenes*.

Acknowledgements

The authors Amina Zerroug and Nouari Sadrti are thankful to Dr. Rasime Demirel from the Department of Biology, Faculty of Science, Technical University, Eskişehir, Turkey for providing facilities to carry out part of this the research and his assistance in the laboratory work.

This work was funded by the Directorate General for Scientific Research and Technological Development (Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria).

References

- Appiah T, Boakye YD, Agyare C. 2017 – Antimicrobial activities and time-kill kinetics of extracts of selected Ghanaian mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1–15.
- Baba Ahmed-KaziTani Z, Arlet G. 2014 – News of antibiotic resistance among Gram-negative bacilli in Algeria. *Pathologie Biology* 62, 169–178.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016 – Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71–79.
- Benarba B. 2016 – Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: An ethnobotanical study. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 5, 320–330.
- Chatterjee S, Ghosh R, Mandal NC. 2019 – Production of bioactive compounds with bactericidal and antioxidant potential by endophytic fungus *Alternaria alternata* AE1 isolated from *Azadirachta indica* A. Juss. *PLoS ONE* 14:e0214744.
- CLSI. 1999 – (Clinical and Laboratory Standards Institute) Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline M26-A. Wayne, PA, USA.
- CLSI. 2012 – (Clinical and Laboratory Standards Institute) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Ninth Edition M07A8. Wayne, PA, USA.
- Daranagama DA, Camporesi E, Jeewon R, Liu X et al. 2016 – Taxonomic rearrangement of *Anthostomella* (Xylariaceae) based on a multigene phylogeny and morphology. *Cryptogamie, Mycologie* 37, 509–538.
- De Amorim MR, Somensi A, Araujo AR, Bonifácio BV et al. 2016 – Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27, 1048–1054.
- Deka D, Jha DK. 2018 – Optimization of culture parameters for improved production of bioactive metabolite by endophytic *Geosmithia pallida* (KU693285) isolated from *Bruceamollis* Wall ex. Kurz, an endangered medicinal plant. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 12, 1205–1213.
- Demirel R. 2016 – Comparison of rDNA regions (ITS, LSU, and SSU) of some *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* spp. *Turkish Journal of Botany* 40, 576–583.
- Devaraju R, Satish S. 2011 – Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences* 2, 75–79.
- Djamaan A, Agustien A, Zam SI, Jannah M et al. 2018 – Characterization of biopesticide compounds from *Bacillus subtilis* AAF2 UAAC 20701 fermentation products. *International Research Journal of Pharmacy* 9, 47–52
- Fatima N, Mukhtar U, Ul-Haq I, Ahmed Qazi M et al. 2016 – Biological evaluation of endophytic fungus *Chaetomium* sp. NF15 of *Justicia adhatoda* L.: A potential candidate for drug discovery. *Jundishapur Journal of Microbiology* 9, e29978.
- Goutam J, Singh S, Kharwar RN, Ramarai V. 2016 – In vitro potential of endophytic fungus *Aspergillus terreus* (JAS-2) associated with *Achyranthus aspera* and study on its culture conditions. *Biology and Medicine* 8, 1–7.
- Hamzah HM, Ali AHL, Hassan HG. 2009 – Physiological regulation of protease and antibiotics in *Penicillium* sp. using submerged and solid state fermentation techniques. *Journal of Engineering Science and Technology* 4, 81–89.
- Jam Ashkezari S, Fotouhifar KB. 2017 – Diversity of endophytic fungi of common yew (*Taxus baccata* L.) in Iran. *Mycological Progress* 16, 247–256.
- Jiaojiao S, Wattanachai P, Kasem S. 2016 – Isolation and identification of endophytic fungi from 10 species palm trees. *Journal of Agricultural Technology* 12, 349–363.
- Kadaifciler DG, Demirel R. 2017 – Fungal biodiversity and mycotoxigenic fungi in cooling-tower water systems in Istanbul, Turkey. *Journal of Water and Health* 15, 308–320.

- Kashani K, JalaliJavaran M, Sabet MS, Moieni A. 2018 – Identification of rate-limiting enzymes involved in paclitaxel biosynthesis pathway affected by coronatine and methyl- β -cyclodextrin in *Taxus baccata* L. cell suspension cultures. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 26, 129–142.
- Kaul S, Gupta S, Ahmed M, Dhar MK. 2012 – Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Review* 11, 487–505.
- Kim HY, Heo DY, Park HM, Singh D, Lee CH. 2016 – Metabolomic and transcriptomic comparison of solid-state and submerged fermentation of *Penicillium expansum* KACC 40815. *PLoS One* 11, 1–14.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016 – MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874.
- Lapuz RR, Undan JQ, Cajucom EB, Undan JR. 2018 – Molecular Identification of endophytic fungi from rice (*Oryza sativa* L.) and its antagonistic effect against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* 41, 213–219.
- Liu J, Zhao J, Wang G, Chen J. 2019 – Host identity and phylogeny shape the foliar endophytic fungal assemblages of *Ficus*. *Ecology and Evolution* 9, 10472–10482.
- Marcellano JP, Collanto AS, Fuentes RG. 2017 – Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from the bark of *Cinnamomum mercadoi*. *Pharmacognosy Journal* 9, 405–409.
- Mu'azzam KAAR, Taufiq MMJ, Darah I. 2015 – Isolation and screening of antibacterial activity of endophytic fungi isolates from *Ocimum citriodorum* Vis. Leaves. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 9, 155–161.
- Musavi SF, Balakrishnan RM. 2014 – A study on the antimicrobial potentials of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. *Journal of Medical and Bioengineering* 3, 162–166.
- Osono T, Masuya H. 2012 – Endophytic fungi associated with leaves of Betulaceae in Japan. *Canadian Journal of Microbiology* 58, 507–515.
- Patel PK, Patel KV, Gandhi TR. 2011 – Evaluation of effect of *Taxus baccata* leaves extract on bronchoconstriction and bronchial hyperreactivity in experimental animals. *Journal of Young Pharmacists* 3, 41–47.
- Paterson RRM, Bridge PD. 1994 – *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. pp, 5–7.
- Pimentel IC, Glienke-Blanco C, Gabardo J, Stuart RM, Azevedo JL. 2006 – Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49, 705–711.
- Powthong P, Jantrapanukorn B, Thongmee A, Suntornthicharoen P. 2013 – Screening of antimicrobial activities of the endophytic fungi isolated from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15, 1513–1522.
- Qiu M, Xie R, Shi Y, Chen H et al. 2010 – Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 993–998.
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. 2017 – Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products* 80, 756–770.
- Rivera-Orduña FN, Suarez-Sanchez RA, Flores-Bustamante ZR, Gracida-Rodriguez JN, Flores-Cotera LB. 2011 – Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity* 47, 65–74.
- Sadrati N, Harzallah D, Zerroug A, Dahamna S, Bouharati S. 2013 – Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). *Journal of Plant Protection Research* 53, 128–136.
- Sahani K, Thakur D, Hemalatha KPJ, Ganguly A. 2017 – Antibacterial activity of endophytes from selected medicinal plants. *International Journal of Advanced Research* 5, 2076–2086.

- Samae A, Hiranrat A, O-thong S, Supaphon P, Intrasungkha N. 2019 – Isolation and identification of endophytic fungi from seaweeds in Southern Thailand and their antibacterial activities against some antibiotic resistance bacteria. *Research Journal of Biotechnology* 14, 56–62.
- Santos IP, Silva LCN, Silva MV, Araújo JM et al. 2015 – Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). *Frontiers in Microbiology* 6, 1–7.
- Saraswaty V, Srikandace Y, Simbiyani NA, Jasmansyah et al. 2013 – Antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungus *Fennellia nivea* NRRL 5504. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 16, 1574–8.
- Son SY, Lee S, Singh D, Lee NR et al. 2018 – Comprehensive secondary metabolite profiling toward delineating the solid and submerged-state fermentation of *Aspergillus oryzae* KCCM 12698. *Frontiers in Microbiology* 9, 1–12.
- Subramaniyam R, Vimala R. 2012 – Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *International Journal of Science and Nature* 3, 480–486.
- Sugijanto NE, Dorra BL. 2016 – Antimicrobial Activity of *Cladosporium oxysporum* endophytic fungus extract isolated from *Aglaia odorata* Lour. *Indonesian Journal of Medicine* 1, 108–115.
- Tamura K, Nei M. 1993 – Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10, 512–26.
- Tang HM, Hamblin MR, Yow CMN. 2007 – A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *Journal of Infection and Chemotherapy* 13, 87–91.
- Taufiq MMJ, Darah I. 2018 – Anti-MRSA of the ethyl acetate crude extract from *Lasiodiplodia pseudo theobromae* IBRL OS-64, an endophytic fungus isolated from leaf of *Ocimum sanctum* linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 10, 50–55.
- Taufiq MMJ, Darah I. 2019 – Effect of ethyl acetate crude extract of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* IBRL OS-64 against oral cavity bacteria with emphasis on *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 9, 078–085.
- Tayung K, Jha DK. 2010 – Antimicrobial endophytic fungal assemblages inhabiting bark of *Taxus baccata* L. of Indo-Burma mega biodiversity hotspot. *Indian Journal of Microbiology* 50, 74–81.
- Thammawat S, Sangdee K, Sangdee A. 2017 – Time-kill profiles and cell-surface morphological effects of crude *Polycephalomyces nipponicus* Cod-MK1201 mycelial extract against antibiotic-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 16, 407–412.
- Van Duin D, Paterson DL. 2016 – Multidrug-resistant bacteria in the community. *Infectious Disease Clinics of North America* 30, 377–390.
- Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB et al. 2014 – Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78, 343–371.
- Zerroug A, Sadrati N, Demirel R, Bakli S, Harzallah D. 2018 – Antibacterial activity of endophytic fungus, *Penicillium griseofulvum* MPR1 isolated from medicinal plant, *Mentha pulegium* L. *African Journal of Microbiology Research* 12, 1056–1066.

المخلص

يهدف هذا العمل إلى عزل بعض الفطريات الداخلية لأربعة نباتات طبية: *Mentha pulegium* L., *Juniperus phoenicea* L., *Cedrus atlantica* Man. و *Taxus baccata*، تحديد هويتها، وكذلك تقييم بعض الأنشطة البيولوجية لمستخلصاته. بعد تعقيم سطح الأجزاء المختلفة من النباتات، تم عزل 115 عزلة فطرية وبعد الاختبارات الأولية لنشاطيتها المضادة للميكروبات، تم اختيار سبعة منها. بناء على الخصائص المورفولوجية والبيولوجية الجزئية، حددت هوية كل من العزلات MPR1، CAR11 و TBT10 على أنها تنتمي إلى الأنواع *Penicillium griseofulvum*، *Penicillium canescens* و *Anthostomelloides leucospermi* على التوالي، في حين كل من العزلات الثلاثة JPF2، JPF3، JPF4 و العزلة TBT7 تم اقتراحهم على أساس أنواع جديدة تنتمي إلى الأجناس *Micronematobotrys* و *Dermea* على التوالي. اختبارات اختيار وسط الزرع المناسب، نوع التخمر والمذيب العضوي الأنسب لإستخلاص أمثل للجزينات النشطة بيولوجيا، مكن من اختيار الوسط MEA لجميع العزلات ما عدا العزلة TBT10 كان الـ PDA هو وسط الزرع الأمثل. أعطى التخمر في الوسط السائل مستخلصات أكثر نشاطاً لكل من العزلات MPR1 و TBT10، بينما كان أكثر فعالية منه في الوسط الصلب بالنسبة لكل من العزلات JPF2 و CAR11 و TBT7. بالنسبة للمذيب، تم اختيار الأسيتات إيثيل لجميع العزلات باستثناء العزلة JPF2، كان ثنائي كلورو ميثان هو المذيب الأنسب. النشاطية المضادة للميكروبات للمستخلصات الفطرية تم تقييمها ضد مجموعة مكونة من 12 بكتيريا إيجابية الجرام و 13 سلبية الجرام، بعضها مقاوم أو متعدد المقاومة للمضادات الحيوية بالإضافة إلى خمسة أنواع فطرية مرضية للجلد. جميع العزلات كان لها نشاط مثبط لجميع البكتيريا الموجبة الجرام، في حين تم تثبيط البكتيريا سالبة الجرام فقط بواسطة مستخلص العزلة MPR1. بالنسبة للفطريات الجلدية، *Candida albicans* كانت مقاومة لمستخلص كل من العزلات TBT1 و TBT7، بينما تم تثبيط جميع الفطريات الجلدية الأخرى بواسطة جميع المستخلصات. مستخلص TBT7 كان هو المستخلص الأكثر نشاطاً ضد البكتيريا الموجبة للجرام بقيم MICs تتراوح من 0.73-23 ميكروغرام / مل، يليه مستخلص العزلة JPF2 من 6.25-200 ميكروغرام / مل، MPR1 من 25-200 ميكروغرام / مل و أخيراً TBT10 من 562.5 إلى 4500 ميكروغرام / مل. فيما يتعلق بالفطريات الجلدية، كانت مستخلصات MPR1 و JPF2 هي الأكثر نشاطاً. من خلال حساب نسبة CMB / MIC، كانت مستخلصات جميع العزلات لها اثر قاتل لمعظم البكتيريا المسببة للأمراض، وهذا ما أكدته اختبار حركية القتل مقارنة بالزمن و التركيز. فيما يتعلق بالنشاط المضادات للأوكسدة، تحتوي جميع المستخلصات على نسب معتبرة من متعددات الفينولات ونسب اقل من الفلافونويدات. أظهر مستخلص العزلة CAR11 التأثير الإزاحي الأكبر لجذور DPPH و ABTS⁺⁺ حيث كانت قيم IC₅₀ بين 0.18 ± 84.82 ميكروغرام / مل و 0.024 ± 219.8 ميكروغرام / مل على التوالي، بالإضافة إلى إظهاره لقدرة إرجاعية أكبر 2.59 ± 1746 ميكرومول Fe²⁺/ملغ من المستخلص. تم الحصول على نشاط جيد للعلاية مضاد لتكاثر الخلايا السرطانية لكل من مستخلصات MPR1، JPF2 و TBT10 مع CC₅₀ تتراوح من 0.2 إلى 10.49 ميكروغرام / مل، في حين أن مستخلص TBT7 لم يظهر أي نشاط مضاد لهذه الاخيرة. التقدير الكمي للإنتاج العزلات L-asparaginase، أثبت أن العزلة MPR1 لها القدرة على إنتاج نسب جد مرتفعة (142.5 ± 3126 وحدة دولية / مل)، يليه CAR11 (42.19 ± 6.69 وحدة دولية / مل) ثم TBT10 (4.2 ± 24 وحدة دولية / مل)

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية، النشاط المضاد للميكروبات، مضادات الأوكسدة، المضادة للسرطان، متعدد المقاومة.

Résumé

L'objectif de ce travail est l'isolement des champignons endophytes à partir de 4 plantes médicinales *Mentha pulegium* L., *Juniperus phoenicea* L., *Cedrus atlantica* Man. et *Taxus baccata*, leur identification ainsi que l'évaluation des activités biologiques de leurs extraits. Après stérilisation de la surface des différentes parties de plantes, 115 isolats fongiques ont été isolés. L'activité antimicrobienne de ces isolats a été criblée et sept d'entre eux ont été sélectionnés. L'identification de ces isolats a été faite sur la base des caractéristiques morphologiques et de la biologie moléculaire. Les résultats ont permis d'identifier les isolats MPR1, CAR11 et TBT10 comme étant *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium canescens* et *Anthostomelloides leucospermi*, les isolats JPF2, JPF3, JPF4 et l'isolat TBT7 ont été proposé comme étant des nouvelles espèces appartenant aux genres *Micronematobotrys* et *Dermea* respectivement. Le choix du milieu de culture, du type de fermentation ainsi que le solvant permettant la meilleure production et extraction des molécules bioactives, ont permis de sélectionner le MEA pour tous les isolats sauf pour TBT10 pour lequel c'est le milieu PDA qui a été choisi. La fermentation en milieu liquide est celle qui a donné les extraits les plus actifs pour les isolats MPR1 et TBT10, alors que pour JPF2, CAR11 et TBT7 c'était la fermentation en milieu solide. Pour le solvant, l'acétate d'éthyle a été choisi pour tous les isolats sauf pour JPF2, pour lequel c'était le dichlorométhane. L'activité antimicrobienne des extraits fongiques a été évaluée contre une gamme de 12 bactéries à Gram positif, 13 à Gram négatif dont certaines étaient des bactéries résistantes ou multi-résistantes aux antibiotiques et 5 dermatophytes. Toutes les bactéries à Gram positif ont été inhibées par tous les extraits fongiques, contrairement aux bactéries à Gram négatif qui n'ont été inhibées que par l'extrait de l'isolat MPR1. Pour les dermatophytes, seule *Candida albicans* a résisté aux extraits des isolats TBT7 et TBT10, alors que tous les autres dermatophytes ont été inhibés par tous les extraits. L'extrait de TBT7 a été le plus actif des extraits contre les bactéries à Gram positif avec les CMI les plus basses (0.73 à 23.4 µg/mL), suivie de JPF2 (6.25 à 200 µg/mL), MPR1 (25 à 200 µg/mL) et TBT10 (562.5 à 4500 µg/mL). Concernant les dermatophytes, les extraits de MPR1 et JPF2 étaient les plus actifs. En calculant le rapport CMB/CMI, tous les extraits étaient bactéricides pour la plupart des bactéries pathogènes, ceci a été confirmé par le test de la cinétique de létalité. Concernant l'activité antioxydante, tous les extraits contenaient des polyphénols et des flavonoïdes. L'extrait de l'isolat CAR11 a montré l'activité antiradicalaire la plus grande dans le test du DPPH (IC₅₀=84.82±0.18 µg/mL) et le test ABTS⁺⁺ (IC₅₀=219.8±0.024 µg/mL) ainsi que le meilleur pouvoir réducteur du fer (1746±2.59 µmol Fe²⁺/mg d'extrait). Une importante activité antiproliférative a été obtenue avec les extraits de MPR1, JPF2 et TBT10 avec des CC₅₀ allant de 0.2 à 10.49 µg/mL, alors que l'extrait de TBT7 n'a montré aucune activité antiproliférative. Après la sélection par un criblage préliminaire des isolats producteurs de L-asparaginase, une quantification de cette production a révélé la grande production obtenue avec l'extrait de MPR1 (142.5±3.126 UI/mL) suivi de CAR11 (42.19±6.69 UI/mL) et de TBT10 (24±4.27 UI/mL).

Mots Clés : Champignons endophytes, activité antimicrobienne, Antioxydante, Anticancéreuse, multi-résistance.