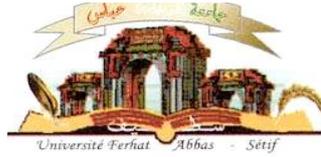


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2021

THÈSE

Présentée par

**SADRATI Nouari**

Pour l'obtention du diplôme de

**Doctorat en Sciences**

**Filière : Biologie**

**Spécialité : MICROBIOLOGIE**

THÈME

**Isolement, identification et culture des champignons endophytes  
isolés à partir des plantes médicinales algériennes pour la  
production des métabolites secondaires biologiquement actifs**

Soutenue publiquement le 07/04/2021

DEVANT LE JURY

|                    |                  |  |
|--------------------|------------------|--|
| Président          | ROUAG Noureddine | Pr. Université Ferhat Abbas - Sétif 1          |
| Directeur de thèse | HARZALLAH Daoud  | Pr. Université Ferhat Abbas - Sétif 1          |
| Examineurs         | DEHIMAT Laid     | Pr. Université Frères Mentouri - Constantine 1 |
|                    | GHADBANE Mouloud | Pr. Université Mohamed Boudiaf - M'sila        |
|                    | MEDJEKAL Samir   | MCA. Université Mohamed Boudiaf - M'sila       |

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée*

## *Remerciements*

*Avant toute chose, je remercie DIEU, le tout puissant, pour m'avoir donné le courage et la patience d'achever ce travail.*

*Je remercie vivement mon encadrant le professeur **HARZALLAH Daoud** pour les orientations et les conseils qu'il n'a pas manqués de me prodiguer durant la réalisation de ce travail, pour sa patience et sa compréhension. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon respect.*

*Ma vive reconnaissance va au Pr **ROUAG Nouredine**, professeur à l'Université Ferhat Abbas Sétif 1 d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. J'adresse mes remerciements au Pr **DEHIMAT Laid**, professeur à l'Université des frères mentouri Constantine 1, Pr **GHADBANE Mouloud**, et Pr **MEDJEKAL Samir**, de l'Université Mohamed BOUDIAF - M'Sila, d'avoir accepté de juger ce travail. Je présente ici le témoignage de ma sincère gratitude pour leur aide.*

*Je ne remercierai jamais assez **Pr DEMIREL Rasime**, pour son amitié et son accueil, votre aide m'a été très précieuse, Merci.*

*Je voudrais également adresser mes remerciements au **Pr. ROLAIN Jean Marc** et son équipe, surtout pour leur accueil chaleureux, ils m'ont beaucoup aidé pour compléter mon travail de recherche.*

*Un grand merci à mon beau père, **BENDAOU El-Amine** de m'avoir corrigé la thèse.*

*A toutes les personnes qui, de près comme de loin, m'ont encouragée aux moments opportuns.*

## *Dédicaces*

*A mes très chers parents, sans eux je n'aurai pu être ce que je suis, en reconnaissance de leurs efforts, leurs amours et leurs encouragements durant toutes mes études et mes recherches.*

*A ma petite famille surtout, ma femme Amina et ma petite fille Nour El-Imène Sakina.*

## Sommaire

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

### *I. Revue bibliographique*

|  |    |
|--|----|
| I. Revue bibliographique .....   | 4  |
| I.1. Généralités sur les champignons endophytes.....                                 | 4  |
| I.1.1. Définition des endophytes.....  | 4  |
| I.1.2. Diversité et classification des champignons endophytes .....                  | 4  |
| I.1.3. Critères de sélection des plantes et d'isolement efficace des endophytes..... | 5  |
| I.1.3.1. Choix des plantes hôtes et du site d'échantillonnage.....                   | 5  |
| I.1.3.2. La taille et l'âge des échantillons.....                                    | 6  |
| I.1.3.3. Influence des saisons.....  | 6  |
| I.1.4. Mode de transmission des champignons endophytes .....                         | 7  |
| I.1.5. Interaction endophyte-hôte .....  | 7  |
| I.2. Molécules bioactives des champignons endophytes .....                           | 8  |
| I.2.1. Molécules antibactériennes .....  | 9  |
| I.2.2. Molécules antifongiques .....   | 10 |
| I.2.2.1. Molécules contre les dermatophytes .....                                    | 10 |
| I.2.2.1. Molécules contre les phytopathogènes .....                                  | 11 |
| I.2.3. Molécules anticancéreuses .....   | 13 |
| I.2.4. Molécules antioxydantes.....  | 14 |
| I.2.5. Molécules antivirales .....   | 16 |
| I.2.6. Molécules antiparasitaires.....   | 18 |
| I.2.7. Molécules antidiabétiques.....  | 19 |
| I.2.8. Molécules antiinflammatoires.....   | 21 |
| I. 3. Plantes médicinales étudiées.....  | 22 |
| I. 3.1. <i>Juniperus oxycedrus</i> L. ....   | 22 |
| I. 3.2. <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....  | 24 |

### *II. Matériel et Méthodes*

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| II. Matériel et Méthodes .....   | 25 |
| II.1. Matériel biologique.....   | 25 |
| II.1.1. Matériel microbien ..... | 25 |

|  |    |
|--|----|
| II.1.2. Matériel végétal .....   | 26 |
| II.1.3. Lignées cellulaires .....  | 26 |
| II.1.4. Produits chimiques .....   | 26 |
| II.2. Échantillonnage .....  | 26 |
| II.3. Isolement et purification des champignons endophytes .....   | 27 |
| II.4. Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne .....   | 28 |
| II.4.1. Criblage de l'activité antibactérienne et antilevurienne .....   | 28 |
| II.4.2. Criblage de l'activité antifongique .....  | 28 |
| II.5. Identification des champignons endophytes sélectionnés .....   | 29 |
| II.5.1. Identification morphologique .....   | 29 |
| II.5.2. Identification moléculaire des champignons .....   | 30 |
| II.5.2.1. Extraction de l'AND total et purification .....  | 30 |
| II.5.2.2. Amplification par PCR, visualisation et purification des amplicons .....   | 30 |
| II.5.2.3. Réaction de séquence (BigDye) et séquençage .....  | 31 |
| II.5.2.4. Analyse phylogénétique .....   | 31 |
| II.6. Sélection du milieu de culture optimum .....   | 32 |
| II.7. Choix du meilleur solvant d'extraction et du type de fermentation .....  | 32 |
| II.7.1. Fermentation et extraction .....   | 32 |
| II.7.2. Activité antimicrobienne .....   | 35 |
| II.8. Fermentation à grand volume .....  | 36 |
| II.9. Activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle contre les bactéries multirésistantes et les champignons pathogènes ..... | 36 |
| II.9.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) .....  | 36 |
| II.9.2. Détermination de la concentration minimale fongistatique (CMF) .....   | 37 |
| II.9.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....   | 38 |
| II.9.4. Détermination de l'indice CMB/CMI .....  | 38 |
| II.9.5. Etude de la cinétique de létalité (Time kill) .....  | 38 |
| II.10. Activité antioxydante .....   | 39 |
| II.10.1. Détermination de la teneur phénolique totale .....  | 39 |
| II.10.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes .....  | 39 |
| II.10.3. Evaluation de l'activité antioxydante .....   | 40 |
| II.10.3.1. Test du pouvoir piégeur du radical DPPH .....   | 40 |
| II.10.3.2. Test du pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power) TBTZ ....   | 41 |
| II.10.3.3. Test du pouvoir réducteur (PR) du fer .....   | 41 |
| II.11. Détermination de la production du L-asparaginase par les champignons endophytes .....   | 41 |
| II.11.1. Criblage qualitative de la production du L-asparaginase sur gélose .....  | 41 |
| II.11.2. Production de L-asparaginase par fermentation submergée et extraction .....   | 42 |
| II.11.3. Evaluation quantitative de la production du L-asparaginase .....  | 43 |
| II.12. Évaluation de l'effet cytotoxique et antiprolifératif sur les cellules tumorales <i>in vitro</i> .....                            | 44 |

|   |    |
|---|----|
| II.12.1. Culture des lignées cellulaires .....                              | 44 |
| II.12.2. Test de l'MTT.....   | 44 |
| II.13. Détection de la griséofulvine par MALDI-TOF MS (Autoflex-speed)..... | 45 |
| II.13.1. Principe de la méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF.....    | 45 |
| II.13.2. Préparation des échantillons pour MALDI-TOF MS .....               | 46 |
| II.13.3. Analyse des échantillons par MALDI-TOF MS.....                     | 46 |
| II.14. Analyses statistiques.....   | 47 |

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

|   |            |
|---|------------|
| III. Résultats et discussion.....   | 48         |
| III.1. Isolement et purification des champignons endophytes.....                  | 48         |
| III.2. Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne.....                  | 49         |
| III.3. Identification des champignons endophytes sélectionnés .....               | 54         |
| III.4. Optimisation des conditions de la production des molécules bioactives..... | 78         |
| III.4.1. Sélection du milieu de culture optimum.....                              | 78         |
| III.4.2. Choix du meilleur solvant d'extraction et du type de fermentation.....   | 81         |
| III.5. Activité antimicrobienne des extraits d'acétate d'éthyle.....              | 87         |
| III.5.1. Activité contre les bactéries multirésistantes .....                     | 87         |
| III.5.2. Activité contre les champignons filamenteux et levure .....              | 92         |
| III.5.3. Détermination des CMI et CMB .....                                       | 103        |
| III.5.4. Etude de la cinétique de létalité ( <i>Time kill</i> ).....              | 107        |
| III.6. Activité antioxydante .....  | 115        |
| III.6.1. Détermination de la teneur phénolique totale et de flavonoïdes .....     | 115        |
| III.6.2. Activité antioxydante : DPPH, FRAP (TBTZ) et PR ( $K_3Fe(CN)_6$ ).....   | 116        |
| III.7. Evaluation de la production du L-asparaginase .....                        | 121        |
| III.8. Évaluation de l'effet cytotoxique et antiprolifératif.....                 | 124        |
| III.9. Détection de la griséofulvine par MALDI-TOF MS (Autoflex-speed).....       | 130        |
| <b>Conclusion et perspectives.....</b>  | <b>132</b> |
| <b>Références bibliographiques .....</b>  | <b>135</b> |

## الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتعريف الفطريات الداخلية لنوعين نباتيتين *Juniperus oxycedrus* L. و *Pistacia lentiscus* L. لتقييم نشاطها البيولوجي. بعد الاختبار الأولي ووفقاً لشدة التثبيط، طيف النشاط والمظهر المورفولوجي للعزلات، تم اختيار 6 عزلات لمواصلة هذه الدراسة. العزلات PLR9، JOR22 و PLT7 تم تعريفها على أنها تنتمي إلى الأنواع *Aspergillus neobridgeri* و *Penicillium griseofulvum* و *Micronematobotrys verrucosus* على التوالي. كما تم اقتراح كل من السلالات PLT8 و PLF5 كنوع جديد ينتمي إلى جنس *Neocucurbitaria*، في حين تم اقتراح العزلة JOR26 كعائلة جديدة من رتبة Diaporthales. أظهر تحسين ظروف التخمر لرفع الإنتاج والاستخلاص الأمثل للمركبات النشطة بيولوجياً أن الوسط MEA أعطي أفضل إنتاج لكل من العزلات PLR9، JOR22، PLT8 و PLF5، الوسط PDA للعزلة PLT7 و YMEA للعزلة JOR26. المذيب العضوي Éthyle acétate كان هو أفضل مذيب الذي اعطي أحسن استخلاص للمركبات النشطة بيولوجياً لجميع العزلات. كما كان إنتاج الجزيئات النشطة بيولوجياً على الوسط السائل أكثر كفاءة منه على الوسط الصلب للعزلات JOR26، JOR22، PLT7 و PLR9، بينما كان الإنتاج أفضل للعزلات PLT8 و PLF5 بعد التخمير على الوسط الصلب. مستخلصات العزلات PLT8، PLF5 و JOR26 كانت فعالة ضد البكتيريا موجبة الجرام فقط، وعلى العكس، مستخلصات العزلات JOR22 و PLR9 كانت نشطة ضد كل من البكتيريا سالبة وموجبة الغرام. بالنسبة للنشاط المضاد للفطريات، مستخلصات العزلات JOR22 و JOR26 هي فقط التي كانت نشطة. بناءً على قيم CMI، مستخلصات العزلات JOR26 و PLT8 كانت هي الأكثر فعالية، تليها مستخلصات PLT7 و PLF5 وأخيراً مستخلصات JOR22 و PLR9. أظهرت دراسة الحركة المميتة للعزلات أن مستخلصات العزلات JOR26 و PLT7 و JOR22 كان لها تأثير قاتل للجراثيم، مستخلصات العزلات PLT8 و PLF5 كان لها تأثير مثبت، بينما تأثير مستخلص PLR9 كان قاتل ضد *E. faecium* 1 و مثبت ضد *A. baumannii*. بالنسبة للنشاط المضاد للأوكسدة، وُجد أن المستخلصات الثلاثة لكل من PLT8 و JOR22 و PLT7 هي الأكثر فعالية في إظهار النشاط المضاد لأوكسدة مخبرياً باستعمال مختلف الطرق المختبرة. بينما أظهرت المستخلصات المتبقية لكل من JOR26، PLF5 و PLR9 نشاطاً أقل فعالية. أظهرت نتائج الاختبارات المضادة لتكاثر مختلف أنواع الخلايا السرطانية، أن المستخلص الأكثر فعالية ضد جميع أنواع الخلايا كان مستخلص العزلة JOR22، يليه مستخلص العزلة PLT7 وأخيراً مستخلص العزلة PLR9. بينما كان التأثير المضاد للتكاثر ضد HepG2 والتأثير السمي ضد سلالات الخلايا السليمة لكل من مستخلصات العزلات JOR26 و PLT8 ضعيفاً جداً. العزلتان JOR22 و PLR9 كانتا من أفضل منتجي انزيم L-asparaginase، يليهما العزلة PLT8 وأخيراً العزلة PLT5 التي أظهرت نشاطاً أقل. مكننا تحليل مستخلص العزلة JOR22 باستخدام تقنية MALDI-TOF MS من إكتشاف إنتاج جزيئة Griséofulvine من طرف هذه الأخيرة.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات الداخلية للنبات، الأنشطة البيولوجية، البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة، *Aspergillus neobridgeri*، *Penicillium griseofulvum*، *Micronematobotrys verrucosus*.

## Résumé

Le but de cette étude est d'isoler et d'identifier les champignons endophytes de deux espèces végétales *Juniperus oxycedrus* L. et *Pistacia lentiscus* L. afin d'évaluer leurs activités biologiques. Après le screening préliminaire et selon l'intensité d'inhibition, le spectre d'activité, et le morphotype des isolats, 6 isolats ont été sélectionnés pour poursuivre cette étude. Les isolats PLR9, JOR22 et PLT7 ont été identifiés comme étant appartenir aux espèces, *Aspergillus neobridgeri*, *Penicillium griseofulvum* et *Micronematobotrys verrucosus* respectivement. Les souches PLT8 et PLF5 ont été proposées comme étant une nouvelle espèce appartenant au genre *Neocucurbitaria*, alors que l'isolat JOR26 a été proposé comme une nouvelle famille de l'ordre des Diaporthales. L'optimisation de certaines conditions culturales pour améliorer la production et l'extraction maximale des composés bioactifs, a montré que le MEA était le meilleur milieu donnant la meilleure production pour les isolats PLR9, JOR22, PLT8 et PLF5, le PDA pour l'isolat PLT7 et le YMEA pour l'isolat JOR26. L'acétate d'éthyle était le meilleur solvant organique permettant une extraction maximale des composés bioactifs pour tous les isolats. La production des molécules bioactives sur milieu liquide était plus efficace que celle en milieu solide pour les isolats JOR26, JOR22, PLT7 et PLR9, alors que pour les souches PLT8 et PLF5, la production était meilleure après fermentation sur milieu solide. Les extraits des isolats PLT8, PLF5, PLT7 et JOR26 étaient actifs uniquement contre les bactéries à Gram positif, contrairement aux extraits des isolats PLR9 et JOR22 qui étaient actifs contre les deux groupes de bactéries. Pour l'activité antifongique, uniquement les extraits des isolats PLT7, JOR22 et JOR26 étaient actifs. En se basant sur les valeurs des CMI, les extraits des isolats JOR26 et PLT8 étaient les plus efficaces, suivis par les extraits de PLT7 et PLF5 et enfin les extraits de JOR22 et PLR9. L'étude de la cinétique de létalité des extraits a montré que les extraits des isolats JOR26, PLT7 et JOR22 avaient un effet bactéricide, ceux des souches PLT8 et PLF5 avaient un effet bactériostatique, alors que l'effet de l'extrait de PLR9 était bactéricide contre *E. faecium* 1 et bactériostatique contre *A. baumannii*. Pour l'activité antioxydante, Les trois extraits PLT7, PLT8 et JOR22 se sont avérés être les plus efficaces en présentant une activité antioxydante *in vitro* dans les diverses méthodes utilisées. Cependant, les extraits restants des JOR26, PLF5 et PLR9 ont montré les activités les moins efficaces. Les résultats des tests antiprolifératifs contre les lignées tumorales ont montré que l'extrait ayant l'activité la plus élevée contre toutes les lignées était celui de JOR22, suivi par l'extrait de PLT7 et enfin, l'extrait de l'isolat PLR9. Cependant, l'effet antiprolifératif contre HepG2 et cytotoxique contre les lignées saines des extraits des isolats JOR26 et PLT8, était très faible. Les endophytes JOR22 et PLR9 étaient les meilleurs producteurs de L-asparaginase, suivi par l'isolat PLT8 et en fin l'isolat PLT5 qui a montrait l'activité la plus faible. L'utilisation du MALDI-TOF MS nous a permis de détecter la production de la griséofulvine par l'isolat JOR22.

**Mots clés :** Champignons endophytes, activités biologiques, bactéries multirésistantes, *Aspergillus neobridgeri*, *Penicillium griseofulvum*, *Micronematobotrys verrucosus*.

## Abstract

The aim of this study is to isolate and identify of endophytic fungi of two plant species *Juniperus oxycedrus* L. and *Pistacia lentiscus* L. in order to evaluate their biological activities. After the preliminary screening and according to the intensity of inhibition, the spectrum of activity, and the morphotype of the isolates, 6 isolates were selected for further study. The PLR9, JOR22 and PLT7 isolates were identified as belonging to the species, *Aspergillus neobridgeri*, *Penicillium griseofulvum* and *Micronematobotrys verrucosus* respectively. The PLT8 and PLF5 strains have been proposed as a new species belonging to the genus *Neocucurbitaria*, while the JOR26 isolate has been proposed as a new family from the order of Diaporthales. The optimization of certain cultural conditions to improve the production and the maximum extraction of bioactive compounds, showed that the MEA was the best medium giving the best production for the isolates PLR9, JOR22, PLT8 and PLF5, the PDA for the isolate PLT7 and YMEA for the isolate JOR26. Ethyl acetate was the best organic solvent for the maximum extraction of bioactive compounds for all isolates. The production of bioactive molecules on liquid medium was more efficient than that on solid medium for the JOR26, JOR22, PLT7 and PLR9 isolates, while for the PLT8 and PLF5 isolates the production was better after fermentation on solid medium. The extracts of isolates PLT8, PLF5, PLT7 and JOR26 were active only against Gram positive bacteria, unlike the extracts of isolates PLR9 and JOR22 which were active against both groups of bacteria. For antifungal activity, only extracts of isolates PLT7, JOR22 and JOR26 were active. Based on the MIC values, the extracts of isolates JOR26 and PLT8 were the most effective, followed by extracts of PLT7 and PLF5 and finally the extracts of JOR22 and PLR9. The study of the kinetics of the lethality showed that the extracts of the isolates JOR26, PLT7 and JOR22 had a bactericidal effect, those of the isolates PLT8 and PLF5 had a bacteriostatic effect, while the effect of the extract of PLR9 was bactericidal against *E. faecium* 1 and bacteriostatic against *A. baumannii*. For antioxidant activity, the three extracts of PLT7, PLT8 and JOR22 were found to be the most effective in exhibiting antioxidant activity *in vitro* in the various methods used. However, the remaining extracts of JOR26, PLF5 and PLR9 showed the least effective activities. The results of antiproliferative tests against the tumor lines showed that the extract with the highest activity against all lines was that of JOR22, followed by the extract of PLT7 and finally, the extract of PLR9 isolate. However, the antiproliferative effect against HepG2 and cytotoxic against healthy lines of extracts from JOR26 and PLT8 isolates, was very weak. The endophytes JOR22 and PLR9 were the best producers of L-asparaginase, followed by isolate PLT8 and finally isolate PLT5 which showed the lowest activity. The use of MALDI-TOF MS enabled us to detect the production of griseofulvin by isolate JOR22.

**Key words:** Endophytic fungi, biological activities, multidrug resistant bacteria, *Aspergillus neobridgeri*, *Penicillium griseofulvum*, *Micronematobotrys verrucosus*

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.</b> Représentation schématique de l'association des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes..   | 5  |
| <b>Figure 2.</b> Mécanismes de transmission des champignons endophytes.....  | 7  |
| <b>Figure 3.</b> Structure de certaines molécules antibactériennes produits par les champignons endophytes.  | 10 |
| <b>Figure 4.</b> Structure de certaines molécules antifongiques produits par les champignons endophytes.   | 12 |
| <b>Figure 5.</b> Structure de certaines molécules anticancéreuses produits par les champignons endophytes.   | 14 |
| <b>Figure 6.</b> Structure de certaines molécules antioxydantes produits par les champignons endophytes.   | 15 |
| <b>Figure 7.</b> Structure de certaines molécules antivirales produits par les champignons endophytes. ....  | 17 |
| <b>Figure 8.</b> Structure de certaines molécules antiparasitaires produits par les champignons endophytes.  | 19 |
| <b>Figure 9.</b> Structure de certaines molécules antidiabétiques produits par les champignons endophytes.   | 20 |
| <b>Figure 10.</b> Structure de certaines molécules antiinflammatoires produits par les champignons endophytes.....   | 22 |
| <b>Figure 11.</b> Photographie de la plante <i>Juniperus oxycedrus</i> L.....  | 23 |
| <b>Figure 12.</b> Photographie de la plante <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....  | 24 |
| <b>Figure 13.</b> Site d'échantillonnage.....  | 27 |
| <b>Figure 14.</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des Polyphénols (à droite) de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes (à gauche)..   | 40 |
| <b>Figure 15.</b> Courbe d'étalonnage de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $\mu\text{mol/mL}$ )..   | 43 |
| <b>Figure 16.</b> Représentation schématique du fonctionnement d'un spectromètre de masse MALDI-TOF.   | 46 |
| <b>Figure 17.</b> Résultats du criblage préliminaire contre les bactéries pathogènes..   | 52 |
| <b>Figure 18.</b> Résultats du criblage préliminaire contre les champignons pathogènes filamenteux.....  | 53 |
| <b>Figure 19.</b> Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique de l'isolat PLT8 après 14 jours d'incubation à 28 °C.....   | 58 |
| <b>Figure 20.</b> Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique de l'isolat PLF5 après 14 jours d'incubation à 28 °C.....   | 59 |
| <b>Figure 21.</b> Arbre phylogénétique des souches PLT8/PLT12 et PLF5/PLR17 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-LSU-RPB2-TEF1-BenA..... | 60 |
| <b>Figure 22.</b> Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique des souches PLT7 et PLT10 après 7 jours d'incubation à 28 °C.....   | 62 |
| <b>Figure 23.</b> Arbre phylogénétique des souches PLT7 et PLT10 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-LSU.....                           | 63 |
| <b>Figure 24.</b> Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique de l'isolat JOR26 après 28 jours d'incubation à 28 °C.....  | 66 |
| <b>Figure 25 .</b> Arbre phylogénétique des souches JOR26/JOR27 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-LSU..                               | 67 |
| <b>Figure 26 .</b> Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique des isolats JORR22/JOR31 après 7 jours d'incubation à 28 °C.....   | 69 |
| <b>Figure 27.</b> Arbre phylogénétique des souches JOR22/JOR31 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-BenA-RPB2.....                       | 70 |
| <b>Figure 28.</b> Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique de l'isolat PLR9 après 7 jours d'incubation à 28 °C.....  | 71 |
| <b>Figure 29.</b> Arbre phylogénétique de l'isolat PLR9 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS, BenA et CaM.....                           | 72 |
| <b>Figure 30.</b> Effet des milieux de culture sur l'activité antimicrobienne des isolats endophytes. ....   | 79 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 31.</b> Effet de la nature physique du milieu et des solvants sur l'activité antimicrobienne des isolats endophytes.....                       | 82  |
| <b>Figure 32.</b> Effets des différents solvants sur l'extraction et l'activité antibactérienne des isolats fongiques.....                               | 83  |
| <b>Figure 33.</b> Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLT8 contre les bactéries à Gram positif.....      | 89  |
| <b>Figure 34.</b> Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLF5 contre les bactéries à Gram positif.....      | 89  |
| <b>Figure 35.</b> Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLT7 contre les bactéries à Gram positif.....      | 89  |
| <b>Figure 36.</b> Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat JOR26 contre les bactéries à Gram positif.....     | 90  |
| <b>Figure 37.</b> Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat JOR22 contre les bactéries à Gram positif.....     | 90  |
| <b>Figure 38.</b> Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat JOR22 contre les bactéries à Gram négatif.....     | 90  |
| <b>Figure 39.</b> Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLR9 contre les bactéries à Gram positif.....      | 91  |
| <b>Figure 40.</b> Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLR9 contre les bactéries à Gram négatif.....      | 91  |
| <b>Figure 41.</b> Comparaison de l'effet antibactérien des extraits sur les bactéries à Gram positif (G+) et à Gram négatif (G-).....                    | 91  |
| <b>Figure 42.</b> Effet des extraits d'acétate d'éthyle sur les bactéries pathogènes.....  | 92  |
| <b>Figure 43.</b> Effets de l'extrait d'acétate d'éthyle des isolats endophytes sur les dermatophytes.....   | 93  |
| <b>Figure 44.</b> Cinétique de létalité de l'extrait de PLT8 contre <i>E. faecium</i> 1 (à gauche) et <i>S. aureus</i> 2 (à droite).....                 | 108 |
| <b>Figure 45.</b> Cinétique de létalité de l'extrait de PLF5 contre <i>E. faecium</i> 1 (à gauche) et <i>S. aureus</i> 2 (à droite).....                 | 108 |
| <b>Figure 46.</b> Cinétique de létalité de l'extrait de PLT7 contre <i>E. faecium</i> 1 (à gauche) et <i>S. aureus</i> 2 (à droite).....                 | 109 |
| <b>Figure 47.</b> Cinétique de létalité de l'extrait de JOR26 contre <i>E. faecium</i> 1 (à gauche) et <i>S. aureus</i> 2 (à droite).....                | 109 |
| <b>Figure 48.</b> Cinétique de létalité de l'extrait de JOR22 contre <i>E. faecium</i> 1 (à gauche) et <i>A. baumannii</i> (à droite).....               | 109 |
| <b>Figure 49.</b> Cinétique de létalité de l'extrait de PLR9 contre <i>E. faecium</i> 1 (à gauche) et <i>A. baumannii</i> (à droite).....                | 110 |
| <b>Figure 50.</b> Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits fongiques.....  | 115 |
| <b>Figure 51.</b> Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en présence des différentes concentrations des extraits fongiques.....                       | 116 |
| <b>Figure 52.</b> Les concentrations des extraits fongiques et du standard inhibant 50% du radical DPPH.....   | 117 |
| <b>Figure 53.</b> Evaluation qualitative de la production de L-asparaginase en milieu gélosé.....  | 122 |
| <b>Figure 54.</b> Effets Cytotoxique et antiprolifératif sur les lignées saines HaCaT et C8-D1A et les lignées cancéreuses A549, U251 et MDA-MB 231..... | 126 |
| <b>Figure 55.</b> Spectres de la griséofulvine pure et de l'extrait brut de l'isolat JOR22 obtenus par MALDI-TOF MS.....                                 | 130 |

## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 1.</b> Les différentes souches bactériennes pathogènes utilisées. ....   | 25  |
| <b>Tableau 2.</b> Les différentes souches fongiques pathogènes utilisées.....   | 26  |
| <b>Tableau 3.</b> Liste des régions d'ADN et leurs amorces utilisées lors de l'amplification et du séquençage pour chacun des isolats fongiques.....  | 33  |
| <b>Tableau 4.</b> Les programmes des cycles thermiques de la PCR pour chaque région d'ADN amplifiée. ....   | 34  |
| <b>Tableau 5.</b> Nombre des isolats, taux de colonisation et d'isolement enregistrés chez les deux espèces de plantes utilisées. ....  | 48  |
| <b>Tableau 6.</b> Résultats du screening préliminaire de l'activité antibactérienne par la technique des cylindres d'agar.....  | 51  |
| <b>Tableau 7.</b> Résultats du screening préliminaire de l'activité antifongique par la technique de la double culture des meilleures souches. ....   | 53  |
| <b>Tableau 8.</b> Identification morphologique des isolats les plus actifs.....   | 54  |
| <b>Tableau 9.</b> Résultats du blast des séquences des différentes régions utilisées pour chaque isolat avec les souches les plus proches sur NCBI. ....  | 77  |
| <b>Tableau 10.</b> Résultats de l'activité antifongique des extraits d'acétate d'éthyle des isolats endophytes.. ....   | 94  |
| <b>Tableau 11.</b> Les valeurs des CMI et des CMB ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues par les extraits d'acétate d'éthyle des isolats PLT8 et PLF5 contre les différentes bactéries pathogènes. ....  | 104 |
| <b>Tableau 12.</b> Les valeurs des CMI et des CMB ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues par les extraits d'acétate d'éthyle des isolats PLT7 et JOR26 contre les différentes bactéries pathogènes. .... | 105 |
| <b>Tableau 13.</b> Les valeurs des CMI et des CMB ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues par l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat JOR22 contre les différentes bactéries pathogènes. ....            | 105 |
| <b>Tableau 14.</b> Les valeurs des CMI et des CMB ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues par l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLR9 contre les différentes bactéries pathogènes. ....             | 106 |
| <b>Tableau 15.</b> Les valeurs des CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues par les extraits d'acétate d'éthyle des isolats endophytes contre les champignons filamenteux et levures. ....             | 106 |
| <b>Tableau 16.</b> Résultats du pouvoir réducteur.....  | 117 |
| <b>Tableau 17.</b> Corrélation entre les activités antioxydantes et le TCP et le taux de flavonoïdes.....   | 118 |
| <b>Tableau 18.</b> Evaluation qualitative et quantitative de la production du L-asparaginase.....   | 121 |
| <b>Tableau 19.</b> Résultats de la cytotoxicité des extraits fongiques vis-à-vis HepG2.....   | 124 |
| <b>Tableau 20.</b> Résultats de la cytotoxicité des extraits fongiques vis-à-vis des différentes lignées cellulaires. ....  | 124 |

## Liste des abréviations

**AA :** Acide Ascorbique

**ADN :** Acide Désoxyribonucléique

**CaM :** Calmoduline

**CC50 :** Concentration Cytotoxique à 50%

**CDA:** Czapek Dox Agar

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMB :** Concentration Minimale Bactéricide

**CMF :** Concentration Minimale Fongistatique

**CMI :** Concentration Minimale Inhibitrice

**CYA :** Czapek Yeast Agar

**DMSO :** Diméthylsulfoxyde

**DPPH :** 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

**DV3 :** Virus de la Dengue humaine de type 3

**EAA :** Equivalent d'Acide Ascorbique

**EAG :** Équivalent d'Acide Gallique

**EQ :** Équivalent de Quercétine

**ESI-IT / MS:** ElectroSpray-ion Trap/Mass Spectrometry

**FRAP:** Ferric Reducing Antioxydant Power

**HCCA:**  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid

**IC50:** Concentration Inhibitrice à 50%

**ITS:** Internal Transcribed Spacer

**LC-MS :** Liquid chromatography-mass spectrometry

**LC-MS-MS:** Liquid Chromatography - Mass Spectrometry and Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometryometry

**Log<sub>10</sub>:** Logarithme Décimal

**LPS:** Lipopolysaccharide

**LSU:** Large-subunit

**MALDI-TOF:** Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight

**MCD:** Modified Czapek Dox

**MEA:** Malt Extract Agar

**MEB:** Malt Extract Broth

**MHA:** Mueller Hinton Agar

**MHB:** Bouillon Muller Hinton

**ML:** Maximum likelihood

**MS:** Mass Spectrometry  
**MTT :** Bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-y1) -2,5-diphényl tétrazolium.  
**NCBI:** National Center for Biotechnology Information  
**OSMAC:** One Strain-Many Compounds  
**PCA:** Plate Count Agar  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**PDA:** Potato Dextrose Agar  
**PDB:** Potato Dextrose Broth  
**PR :** Pouvoir Réducteur  
**RPB2 :** RNA polymerase II second largest subunit  
**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium  
**RSM :** Response Surface Methodology  
**SARM :** *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline  
**SD :** Standard Déviation  
**SDA :** Sabouraud Dextrose Agar  
**SDB :** Sabouraud Dextrose Broth  
**SM :** Spectrométrie de Masse  
**T2D :** Diabète de type 2  
**TCA :** Acide Trichloroacétique  
**TCP :** Teneur en Composés Phénoliques  
**TEF1 :** Translation Elongation Factor 1  
**TPTZ :** 2,4,6-tris- (2-pyridyl) -S-triazine  
**tr/min :** Tour par Minute  
**UFC :** Unité Formant Colonie  
**UI :** Unité internationale  
**VIH :** Virus de l'Immunodéficiéce Humaine  
**VMT :** Virus de la Mosaïque du Tabac  
**YES :** Yeast Extract Sucrose Agar  
**YMEA :** Yeast Extract Malt Extract Agar

# *Introduction*

### **Introduction**

L'augmentation du nombre de personnes ayant des problèmes de santé causés par divers cancers, bactéries résistantes aux médicaments, protozoaires parasites et champignons est alarmante et demeure un défi mondial pour le secteur des soins de santé dans une grande partie du monde, dans les pays en développement comme dans les pays développés (Sharma et *al.*, 2016).

Le cancer est un groupe de maladies qui peuvent affecter divers organes du corps et se caractérise par la croissance incontrôlée de cellules anormales et l'invasion des tissus normaux. L'accès à un nombre limité de chimiothérapies anticancéreuses, leurs effets secondaires délétères, et le coût élevé de la plupart sinon de tous ces médicaments rendent le traitement de la maladie particulièrement difficile. De plus, de nombreuses thérapies existantes ne traitent pas efficacement certains cancers et les tumeurs multirésistantes aggravant les difficultés de traitement (Thirumurugan et *al.*, 2018).

Le développement récent de la résistance aux antimicrobiens par des microorganismes pathogènes intimide le traitement actuel et la prévention d'une gamme toujours croissante d'infections provoquée par des bactéries et des champignons, et conduit à de nouveaux microorganismes ne pouvant pas être contrôlés (Mefteh et *al.*, 2017). En outre, la propagation de ces microorganismes multirésistants dans les hôpitaux et les communautés reste un problème largement non résolu et un lourd fardeau pour les services de santé. Malgré les progrès de l'antibiothérapie, les complications des infections restent une cause importante de mortalité et de morbidité chez les patients hospitalisés (Jouda et *al.*, 2016).

Par conséquent, il existe un besoin urgent de nouvelles approches thérapeutiques et de molécules antimicrobiennes et anticancéreuses rentables et durables dans la médecine, l'industrie et l'agriculture qui pourraient surmonter ces problèmes avec succès, et qui incitent au développement de divers programmes tels que le dépistage de nouvelles espèces de plantes ou de champignons ayant des activités biologiques dans des niches et des habitats écologiques inexplorés (Mookherjee et *al.*, 2018).

Un autre problème important, rencontré dans la recherche des produits naturels biologiquement actifs, est lié à la faible concentration de ces composés dans les plantes. Par exemple, la concentration du Taxol dans les arbres d'ifs (genre *Taxus*) est extrêmement faible, allant de zéro à 0,069% et la teneur la plus élevée se trouve dans l'écorce. En effet, 10000 kg d'écorce de *Taxus* ou environ 3000 ifs sont nécessaires pour produire seulement 1 kg de médicament et, un arbre centenaire pourrait produire 3 kg d'écorce, ce qui fournit suffisamment de paclitaxel pour une dose de 300 mg. Un patient atteint de cancer a généralement besoin d'environ 2,5 à 3 g de Taxol. Par conséquent, le traitement de chaque patient consomme environ huit ifs centenaires (Liu et *al.*, 2016).

Avec les endophytes, il serait possible de résoudre ce problème. En effet, certains peuvent produire du paclitaxel ou les mêmes composés que leur plante hôte. Ceci permettrait la production des composés actifs en conditions *in vitro* et d'augmenter la productivité en quelques semaines alors qu'il est nécessaire d'attendre des années, notamment pour les arbres, avant de pouvoir les récolter en vue de procéder à l'extraction de la molécule d'intérêt. Par ailleurs, cette approche permettrait non seulement de préserver l'environnement et la biodiversité mais aussi une diminution du prix de revient des médicaments (Khiralla, 2015).

Les principales sources de métabolites secondaires sont les plantes (80% du métabolite secondaire), les bactéries, les champignons et de nombreux organismes marins (éponges, tuniciers, coraux et escargots) (Thirumurugan et *al.*, 2018). Le taux de découverte de nouveaux métabolites fongiques s'est considérablement accéléré au cours des deux dernières décennies par rapport au taux de découverte des métabolites produits par les actinomycètes, des bactéries filamenteuses qui ont traditionnellement été la source la plus riche de produits naturels microbiens. Parmi les 33500 métabolites microbiens bioactifs décrits, environ 12,5% (4200) sont des métabolites de bactéries unicellulaires et de cyanobactéries, 41% (13700) sont des produits de fermentations d'actinomycètes et environ 47% (15600) sont d'origine fongique (Bills et Gloer, 2016).

Parmi les différents groupes de champignons les plus importants, les champignons endophytes peuvent représenter un réservoir sous-exploré de nouvelles ressources biologiques destinées à être exploitées dans les secteurs pharmaceutique, industriel et agricole (Zheng et *al.*, 2016). Ces endosymbiotes vivent dans des tissus végétaux sains à un certains ou à tous les stades de leur cycle de vie sans provoquer de maladie apparente (Yu et *al.*, 2014). Les champignons endophytes sont présents dans toutes les espèces végétales étudiées et ils peuvent être trouvés dans les tissus internes des racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits ou graines (Tanapichatsakul et *al.*, 2018). Ils reçoivent l'habitat et les nutriments de leurs hôtes et protègent chimiquement ces derniers contre les herbivores, les insectes et les microorganismes phytopathogènes (Ibrahim et *al.*, 2018). Dans cette relation, les endophytes produisent une grande variété de métabolites secondaires bioactifs qui peuvent affecter la physiologie, la défense et la tolérance de la plante hôte contre les stress biotiques et abiotiques, et améliorer la croissance de leur hôte (Malhadas et *al.*, 2017).

Les champignons endophytes sont à l'origine de différents composés qui sont regroupés en différentes catégories structurelles telles que les métabolites aliphatiques, les alcaloïdes, le benzofurane, le cyclohexanone, la dihydroisocoumarine, les flavonoïdes, les lipoides, les acides organiques, les peptides, les phénylpropanoïdes, les pyridines, la quinone, les stéroïdes, les terpénoïdes, les glycosides et les xanthonnes (Zheng et *al.*, 2016; Rana et *al.*, 2020). La plupart des nouveaux métabolites secondaires synthétisés par les endophytes ont montré des activités antimicrobiennes, antiparasitaires, anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-insectes, antioxydantes,

anticancéreuses, antinéoplasiques, cytotoxiques et neuroprotectrices etc. (Zheng et *al.*, 2016; Malhadas et *al.*, 2018).

En raison de leur capacité à produire cette large gamme de composés biologiquement actifs ; les endophytes des plantes médicinales deviennent de plus en plus intéressants à explorer et sont considérés comme un réservoir important et une ressource prometteuse pour de nouveaux composés bioactifs (Atiphasaworn et *al.*, 2017).

Dans le but d'évaluer des activités biologiques des métabolites secondaires bioactifs produits par champignons endophytes, nous avons étudié, pour la première fois, les champignons endophytes isolés à partir de deux plantes médicinales Algériennes *Pistacia lentiscus* L. et *Juniperus oxycedrus* L.

Cette thèse est répartie en trois chapitre principaux dont :

Le premier est consacré à une revue bibliographique abordant une généralité sur les champignons endophytes ainsi que, l'importance de ces champignons dans la production de métabolites secondaires bioactifs et leurs différentes activités biologiques.

Le deuxième chapitre est consacré à la description du matériel et des méthodes utilisées. Ce travail a nécessité différentes étapes qui sont décrites ci-dessous :

- Isolement de champignons endophytes à partir de deux plantes médicinales de l'Algérie (Bordj Bou Arreridj) *P. lentiscus* L. et *J. oxycedrus* L. couramment utilisées en médecine traditionnelle.
- La mise en évidence de leur activité antagoniste.
- L'étude taxonomique classique et moléculaire des isolats endophytes sélectionnés lors du dépistage préliminaire.
- Etude de l'effet de certains paramètres influençant quantitativement et qualitativement la production des métabolites bioactifs tels que, les milieux de culture et les solvant d'extraction.
- Fermentation, extraction et semi-purification des métabolites bioactifs.
- Mise en évidence des activités biologiques des extraits fongiques.

Le troisième chapitre est réservé à la présentation des résultats et leur interprétation.

# *Revue bibliographique*

## **I. Revue bibliographique**

### **I.1. Généralités sur les champignons endophytes**

#### **I.1.1. Définition des endophytes**

Il existe dans le monde vivant, diverses associations entre les micro-organismes et les macroorganismes (plantes et animaux), l'une d'elle impliquant les plantes et les microorganismes est appelée endophytisme. Des preuves de cette association ont été trouvées dans les tiges et les feuilles fossilisées qui datent de plus de 400 millions d'année (Toghueo et al., 2020). Cependant, la première description d'un champignon endophyte s'est faite en 1904 à partir des graines de *Lolium temulentum* (Ratnaweera et de Silva, 2017). Les champignons sont le groupe le plus dominant des endophytes, ils colonisent les espaces intercellulaires et intracellulaire internes des plantes pendant au moins une partie de leur cycle de vie, sans provoquer de maladies à leurs hôtes (Bamisile et al., 2018; Ikram et al., 2019; Manzotti et al., 2020; Gupta et al., 2020). Les champignons endophytes ont été décrits dans les différentes parties de plantes telles que les racines, tiges, feuilles, fleurs et les graines (Shahzad et al., 2018; Bamisile et al., 2018), ainsi que dans toutes les espèces végétales étudiées jusqu'à maintenant (Wemheuer et al., 2019).

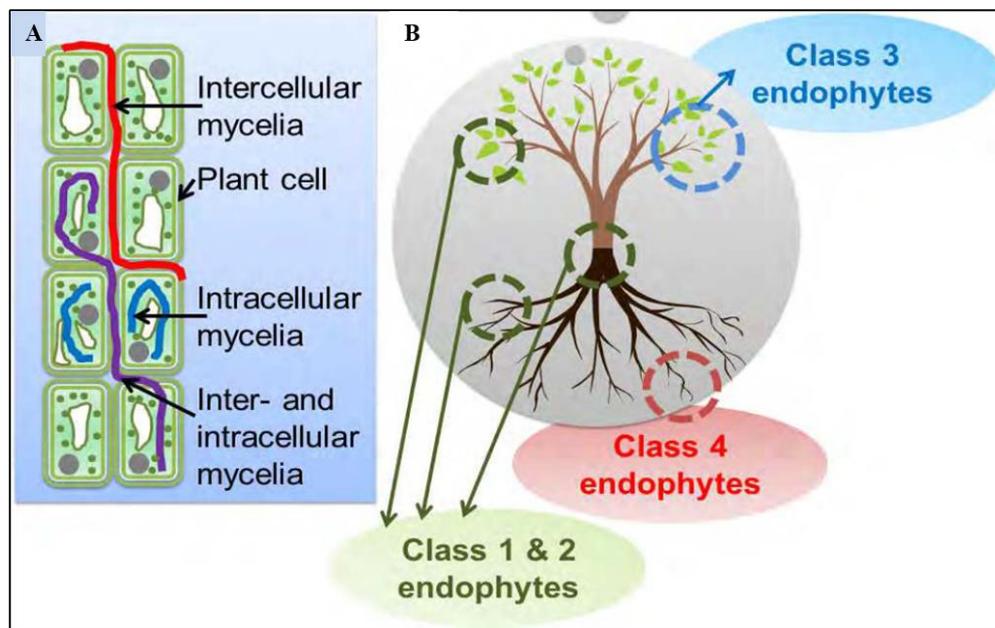
#### **I.1.2. Diversité et classification des champignons endophytes**

Selon différents critères, les champignons endophytes sont classés en 2 grands groupes, les endophytes Clavicipitaceae (Classe 1) et les non-Clavicipitaceae (Classe 2, 3 et 4) (**figure 1**).

Les endophytes du premier groupe des Clavicipitaceae (Classe 1), appartenant aux *Ascomycota*, se limitent aux graminées des saisons chaudes et froides comme hôtes qu'elles colonisent de façon systémique, se transmettent souvent verticalement via les graines. Ces champignons produisent des molécules permettant de conférer à leurs hôtes une résistance à la sécheresse et une protection contre les herbivores, ils jouent également un rôle dans l'augmentation de la biomasse (Bao et Roossinck 2013 ; Mishra et al., 2015 ; Ikram et al., 2019).

Contrairement au premier groupe, les champignons non-Clavicipitaceae forment un groupe très diversifié infectant une large gamme de plante et sont divisés en trois classes. La première (classe 2) comprenant des champignons appartenant plus généralement aux *Ascomycota* et certains aux *Basidiomycota*, colonisant aussi bien les parties aériennes que souterraines de leurs hôtes, et se transmettent aussi bien verticalement qu'horizontalement, ces champignons confèrent à leurs hôtes une résistance aux stress abiotique, induisent la synthèse et synthétisent eux même des phytohormones ainsi que des métabolites secondaires permettent

l'amélioration de la biomasse des racines et des pousses ainsi que la protection contre les pathogènes (Bao et Roossinck 2013 ; Mishra et al., 2015). Les champignons de la deuxième classe (classe 3), contenant principalement des membres appartenant aux *Ascomycota* ou *Basidiomycota*, se transmettent uniquement de façon horizontale et ne colonisent que les parties aériennes de leurs hôtes. Ils induisent une résistance systémique chez leurs hôtes et les protègent contre les herbivores, les insectes et les agents pathogènes (Terhonen et al., 2019). La troisième classe (classe 4), quant à elle, regroupe des endophytes bruns cloisonnés appartenant principalement aux *Ascomycota*, se transmettant horizontalement et se limitent aux racines de leurs hôtes, et protègent ces derniers des pathogènes en réduisant la disponibilité en carbone dans le milieu (Mishra et al., 2015 ; Hardoim et al., 2015; Sridhar 2019).



**Figure 1.** Représentation schématique de l'association des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes. (A) Différentes localisation des champignons endophytes dans les tissus végétaux. (B) Localisation des différentes classes d'endophytes (Kusari et Spiteller 2012).

### **I.1.3. Critères de sélection des plantes et d'isolement efficace des endophytes**

Dans le but d'isoler une grande diversité d'endophytes ainsi que de nouvelles espèces, produisant probablement de nouvelles molécules bioactives, plusieurs critères sont pris en considération :

#### **I.1.3.1. Choix des plantes hôtes et du site d'échantillonnage**

Il est important de prendre en considération plusieurs points lors du choix de la plante à utiliser ainsi que de son habitat :

- Les plantes vivant dans des milieux distincts et spécifiques, pouvant résister à des conditions extrêmes telles que les hautes altitudes, les déserts, la salinité, etc. pourraient

héberger des champignons endophytes qui seraient responsables de cette résistance (Yu et *al.*, 2010; Gupta et *al.*, 2020).

- Les plantes poussant dans des milieux de grande biodiversité doivent être également sélectionnées dans le but d'isoler une grande diversité de champignons endophytes (Yu et *al.*, 2010; Ratnaweera et de Silva, 2017).
- Les plantes n'ayant pas été explorées préalablement comme hôtes d'endophytes, mais également les plantes endémiques sont considérées comme de bonnes sources permettant l'isolement de nouvelles espèces mais également une grande diversité de champignons endophytes (Yu et *al.*, 2010; Tiwari 2014; Ratnaweera et de Silva, 2017).
- Les plantes utilisées par nos ancêtres en médecine traditionnelle, ayant une histoire ethnobotanique intéressante sont considérés comme une bonne source d'endophytes bioactifs, il se pourrait même que le pouvoir de ces plantes ne soit dû qu'au molécules produites par les endophytes et non pas par la plante elle-même (Tiwari 2014).
- Celles ne présentant pas de symptômes de maladies et sont entourées par des plantes infectées par des agents pathogènes sont susceptibles d'héberger des endophytes produisant des molécules bioactives les protégeant de ces pathogènes (Yu et *al.*, 2010; Mane et *al.*, 2018).

### **I.1.3.2. La taille et l'âge des échantillons**

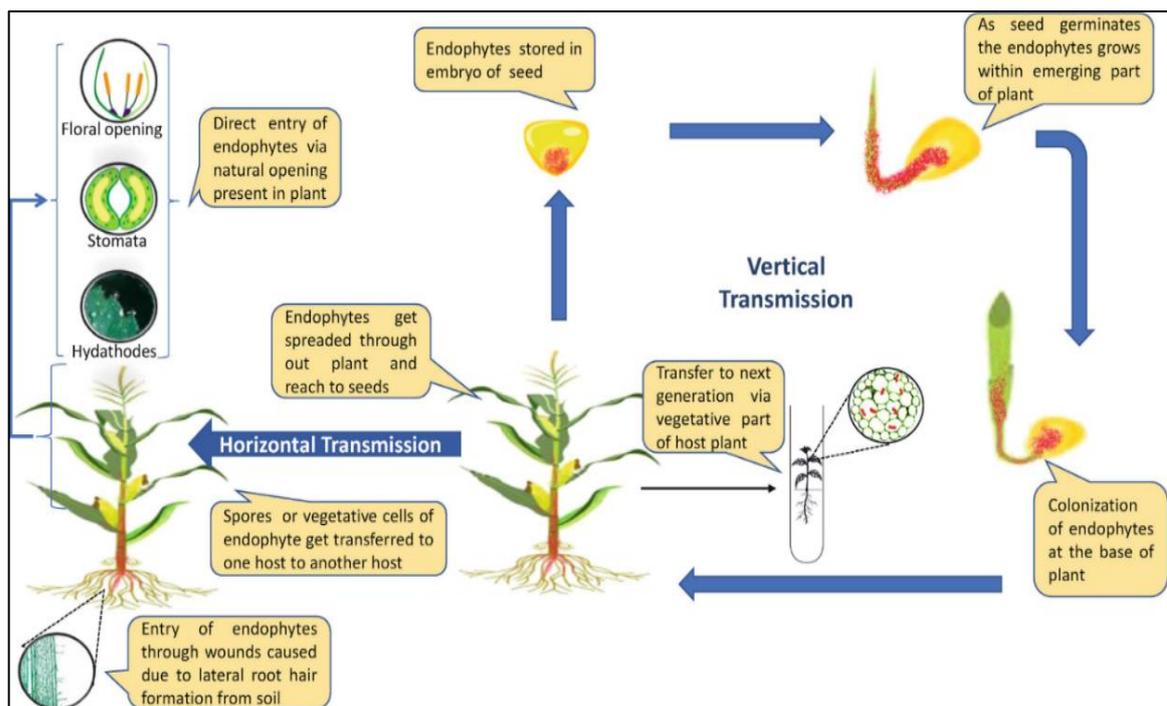
Afin d'obtenir toute la biodiversité des champignons endophytes vivant dans la plante sélectionnée, la taille des échantillons à utiliser est très important. Selon Petrini et *al.* (1993), l'utilisation de 40 individus avec 30 à 40 segments par tissu serait suffisante pour obtenir 80% de la population d'endophyte de cette plante ; d'un autre côté, l'âge des échantillons joue également un rôle important dans l'isolement des champignon endophytes, car les tissus plus âgés seraient plus colonisés que les tissus jeunes, ceci est dû à leur exposition prolongée à l'environnement (Stone et *al.*, 2004; Gupta et *al.*, 2020).

### **I.1.3.3. Influence des saisons**

Il a été observé que pendant les saisons de pluie, la fréquence de colonisation par les endophyte était plus grande que pendant les saisons sèches, ceci a été expliqué par le fait que les gouttes de pluie ainsi que les températures modérées permettraient une meilleure dispersion et une plus longue viabilité des spores fongiques. De plus, l'humidité, la température et les précipitations influent sur la conductance stomatique et du mésophylle des feuilles contrôlant ainsi les taux de transpiration et de CO<sub>2</sub>, ce qui a un impact sur la colonisation des endophytes (Rather et *al.*, 2018; Gupta et *al.*, 2020).

#### I.1.4. Mode de transmission des champignons endophytes

Les champignons endophytes se transmettent d'un hôte à un autre en utilisant deux voies, verticale ou horizontale (**figure 2**). Concernant la transmission verticale, les champignons endophytes se transmettent de la plante mère à la graine via la lignée germinale. Le champignon va ensuite passer de la graine à la plante nouvellement formée lorsque la graine germe (Christian et *al.*, 2017 ; Bamisile et *al.*, 2018; Yan et *al.*, 2019). A l'inverse et au cours de la transmission horizontale, les spores ou le mycélium endophyte se trouvant sur une plante hôte sont transmis à une autre via différents vecteurs biotiques ou abiotiques, tels que les insectes, les gouttes de pluie, le vent, etc. (Christian et *al.*, 2017). Certains champignons vont utiliser des ouvertures naturelles ou artificielles pour rentrer à l'intérieur des tissus de plante, d'autres utilisent des enzymes hydrolytiques ou des structures spécialisées telles que les appressoria ou les haustoria pour permettre leur entrée (Soares et *al.*, 2017). Certains champignons endophytes et selon les conditions environnementales peuvent utiliser les deux modes de transmission, verticale et horizontale (Christian et *al.*, 2017).



**Figure 2.** Mécanismes de transmission des champignons endophytes (Chowdhury et *al.*, 2019).

#### I.1.5. Interaction endophyte-hôte

Selon Schulz et Boyle, (2005), les champignons endophytes établissent plusieurs types de relation avec leurs hôtes, allant du mutualisme, à l'antagonisme en passant par le commensalisme. La relation asymptotique entre l'endophyte et son hôte est alors expliquée par une relation d'antagonisme équilibré, où le système immunitaire de l'hôte s'active dès l'entrée du champignon endophyte pour le contrer et limiter son développement ; en réponse à

cela, l'endophyte synthétise des métabolites secondaires, le protégeant contre les défenses de l'hôte (Yan *et al.*, 2018).

Dans cet équilibre entre la virulence fongique et la défense des plantes, les deux partenaires tirent profit l'un de l'autre, le champignon tire ses nutriments de son hôte, et il lui procure à son tour une protection contre divers stress aussi bien biotiques qu'abiotiques (Patil *et al.*, 2016). Dans le cas où un déséquilibre se produit, dû à différents facteurs tels que les facteurs environnementaux, l'état nutritionnel des deux partenaires etc., l'hôte peut alors entraîner la mortalité de l'endophyte ou au contraire des symptômes de maladie apparaissent sur l'hôte à cause de l'endophyte (Sarasan *et al.*, 2017).

## **I.2. Molécules bioactives des champignons endophytes**

Il existe trois voies pour découvrir de nouvelles molécules pharmaceutiques : la conception rationnelle de médicaments, la synthèse chimique et la découverte de produits naturels, cette dernière voie, a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs en raison des faibles coûts et des bioactivités puissantes des molécules naturelles (Liu *et al.*, 2019). Les plantes médicinales ont été depuis des années, la source de divers molécules antibactériennes, anticancéreuses, antioxydantes, etc. Cependant, plusieurs plantes médicinales sont uniques, ont un taux de croissance lent, se trouvent en haute altitude ou dans des habitats difficiles d'accès ou bien contiennent une quantité insuffisante de composés bioactifs dans leurs tissus (Gupta *et al.*, 2020). Pour ces raisons, les chercheurs se sont tournés vers les microorganismes en général et les champignons endophytes en particulier surtout que ces champignons sont à l'origine de diverses catégories de molécules telles que les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpénoïdes, les flavonoïdes, les glycosides, les xanthones, les isocoumarines, les quinones, les phénylpropanoïdes, les lignanes, les métabolites aliphatiques, les lactones, etc. (Kaul *et al.*, 2012). En plus de la diversité de leurs molécules, les champignons endophytes présentent des avantages par rapport aux plantes, car leur productivité est reproductible et fiable et peut être optimisée en optimisant les conditions de fermentation telles que le milieu, l'agitation, la charge de l'inoculum, le pH, la température, ainsi que la durée d'incubation (Kaul *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2016). Certaines des catégories importantes des métabolites bioactives produites par les champignons endophytes sont cités ci-dessous :

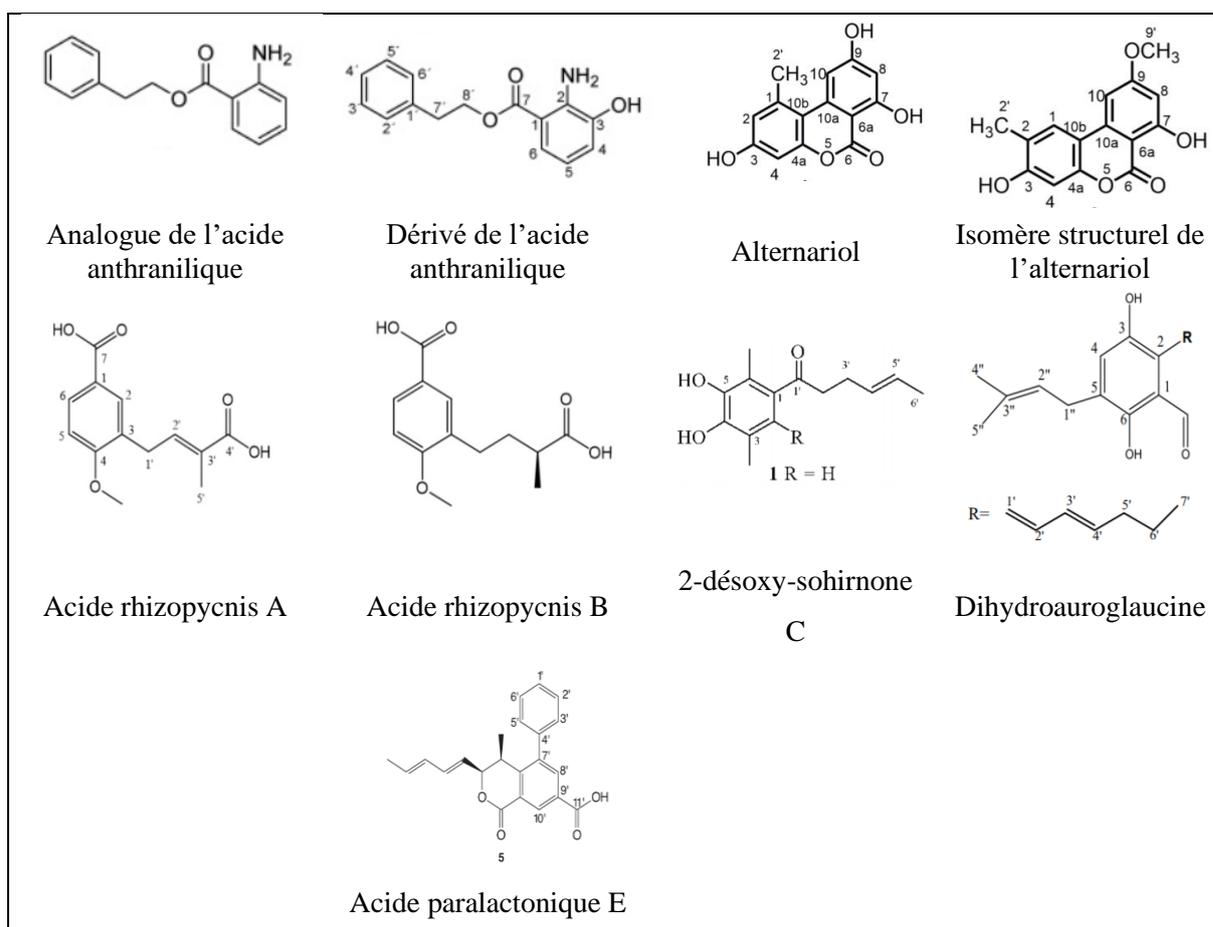
### **I.2.1. Molécules antibactériennes**

Selon Liu et *al.*, (2019), environ 700000 personnes sont tuées chaque année par des bactéries résistantes aux antibiotiques, et ce problème ne fera qu'augmenter si la recherche de nouvelles molécules ne s'accélère pas. Plusieurs études ont été faites sur les champignons endophytes qui se sont révélées avoir une grande capacité à produire de nombreuses molécules antibactériennes efficaces (**figure 3**).

Teponno et *al.*, (2017) ont permis l'isolement d'un analogue connu, et d'un nouveau dérivé de l'acide nitranilique à partir de *Dendrothyrium variisporum*, un champignon endophyte des racines de *Globularia alypum*. Le test de l'activité antibactérienne a révélé que la première molécule inhibait *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 66.67 µg/mL alors que la deuxième inhibait *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* avec des valeurs de CMI de 8,33 et 16,66 µg/mL respectivement. Deshidi et *al.* (2017) ont testé l'activité antibactérienne de l'alternariol ainsi qu'un nouvel isomère structurel de ce dernier, ces deux molécules produites par le champignon endophyte *Alternaria alternata*, ont montré une activité contre *Staphylococcus aureus* (CMI = 32 et 128 µg/mL), Enterocoque résistant à la vancomycine (CMI = 32 et 128 µg/mL) et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (CMI = 8 et 64 µg/mL).

Deux nouveaux dérivés de l'acide anisique, l'acide rhizopycnis A et B produits par *Rhizopycnis vagum* Nitaf22 endophyte isolé à partir de *Nicotiana tabacum* présentaient une activité antibactérienne contre six bactéries pathogènes avec des IC<sub>50</sub> (Concentration inhibitrice à 50%) variant de 16.1 à 81.3 µg/mL (A. Wang et *al.*, 2018). Jiang et *al.* (2018) a montré l'activité antibactérienne d'un nouveau dérivé de la sorbicilline, la 2-désoxy-sohironone C produit par l'endophyte *Penicillium* sp. GD6, avec une CMI de 80 µg/mL contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

Fathallah et *al.* (2019) ont isolé pour la première fois, à partir du champignon endophyte *Aspergillus amstelodami*, la Dihydroauroglaucine qui a montré une activité contre *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* et *Staphylococcus aureus* avec des CMI ne dépassant pas les 3.9 µg/mL. L'acide paralactonique E, un nouveau polycétide, produit par le champignon endophyte *Paraconiothyrium* sp. SW-B-1 a montré une activité contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 3.2 µg/mL (Suzuki et *al.*, 2019).



**Figure 3.** Structure de certaines molécules antibactériennes produits par les champignons endophytes.

### I.2.2. Molécules antifongiques

Il existe de nombreuses sources naturelles de composés bioactifs. Cependant, les chercheurs se sont focalisés dernièrement sur les champignons endophytes qui se sont révélés être des bons producteurs de molécules antifongiques, permettant de faire face aux différentes maladies humaines et végétales (**figure 4**).

#### I.2.2.1. Molécules contre les dermatophytes

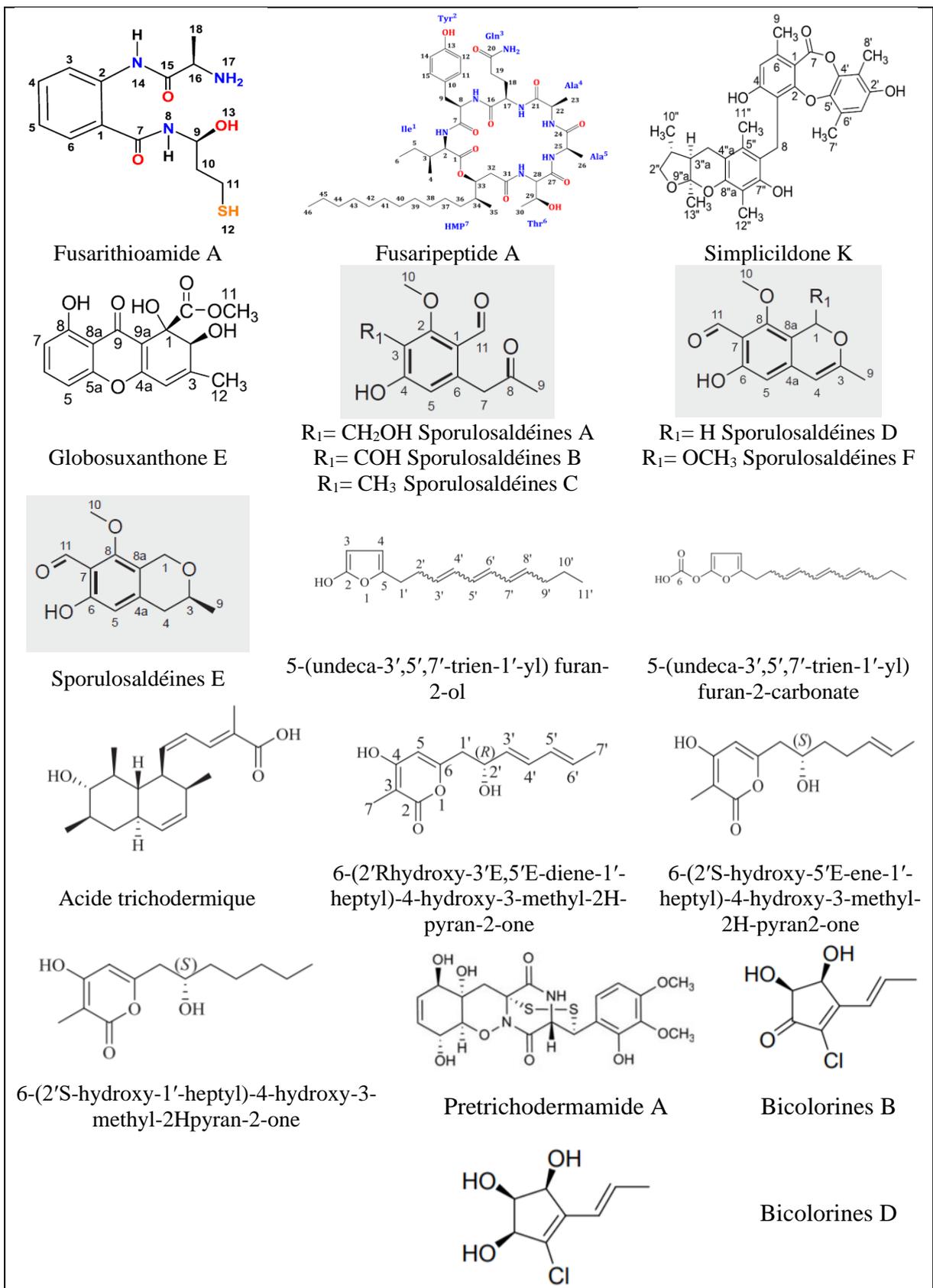
Un nouveau dérivé du benzamide, le fusarithioamide A a été caractérisé à partir de la culture de *Fusarium chlamydosporium*, un endophyte des feuilles de *Anvillea garcinii*, cette molécule a montré une puissante activité antifongique contre *Candida albicans* avec une CMI de  $2.6 \pm 0.52$  mg/ mL (Ibrahim et al., 2016). Un autre isolat du genre *Fusarium* a été isolé à partir des racines de *Mentha longifolia* L. et a permis l'identification d'un nouveau cyclodepsipeptide, à savoir le fusaripeptide A, ce dernier a montré une activité vis-à-vis de plusieurs espèces du genre *Candida*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* ainsi que contre *Aspergillus fumigates* avec des IC<sub>50</sub> de 0.11, 0.24, 0.19 et 0.14  $\mu$ M respectivement (Ibrahim et al., 2018).

Rukachaisirikul et al. (2019) ont permis l'isolement et l'identification de deux nouvelles molécules, dont l'une est un depsidone, le simplicildone K et l'autre une dihydroxanthénone (globosuxanthone E) à partir des cultures de deux isolats endophytes, *Simplicillium lanosoniveum* PSU-H168 et PSU-H261 respectivement. Le test antifongique de ces deux molécules a révélé qu'elles possèdent une activité antifongique contre *Cryptococcus neoformans* avec les mêmes valeurs de CMI de 32 µg/mL. Une autre étude a permis l'isolement et l'identification de 6 nouvelles molécules, dont trois sont des dérivés du benzaldéhyde, les sporulosaldéines A-C, et trois autres sont des dérivés du benzopyrane, les sporulosaldéines D-F produites par le champignon endophyte *Paraphaeosphaeria* sp. F03. Ces molécules avaient montré une activité antifongique vis-à-vis de plusieurs espèces du genre *Candida* avec des CMI variant de 7.8 à 250 µg/mL (De Amorim et al., 2019).

### **I.2.2.1. Molécules contre les phytopathogènes**

Les deux nouveaux dérivés des alkyles furanne, le 5-(undeca-3',5',7'-trien-1'-yl) furan-2-ol et 5-(undeca-3',5',7'-trien-1'-yl) furan-2-carbonate produits par le champignon endophyte *Emericella* sp. XL029 ont montré une activité antifongique contre plusieurs champignons phytopathogènes avec des CMI allant de 3.1 à 25 µg/mL pour la première molécule et de 12.5 à 50 µg/mL pour la deuxième (Wu et al., 2018). Zhao et al. (2019) ont permis l'identification en plus de l'acide trichodermique, de trois nouveaux dérivés de l'α pyrone produits par le champignon endophyte *Penicillium ochrochloronthe*, à savoir, le 6-(2'Rhydroxy-3'E,5'E-diene-1'-heptyl)-4-hydroxy-3-méthyl-2H-pyran-2-one, le 6-(2'S-hydroxy-5'E-ene-1'-heptyl)-4-hydroxy-3-méthyl-2H-pyran-2-one, et le 6-(2'S-hydroxy-1'-heptyl)-4-hydroxy-3-méthyl-2Hpyran-2-one. Ces quatre molécules ont présenté une activité antifongique vis-à-vis de vingt champignons phytopathogènes appartenant à 13 genres différents avec des CMI variant de 12.5 à 100 µg/mL.

La Pretrichodermamide A est une autre molécule à activité antifongique, elle est produite par le champignon endophyte *Trichoderma harzianum*, et a un effet sur la croissance du champignon phytopathogène *Ustilago maydis* (CMI = 1 mg/mL) (Harwoko et al., 2019). Récemment (Zhao et al., 2020) ont permis l'identification de neuf nouvelles cyclopenténone halogénées, les bicolorins A–I et de trois cyclopenténone connues produites par *Saccharicola bicolor* endophyte associé à *Bergenia purpurascens*. Toutes ces molécules ont démontré une activité antifongique plus ou moins forte contre les cinq champignons phytopathogènes testés. Cependant, les bicolorines B et D possédaient une forte activité contre *Pythium dissimile* avec des valeurs des CMI (6,2 30 et 8,5 µg/mL) comparables à celles obtenues avec le contrôle positif (8.6 µg/mL).



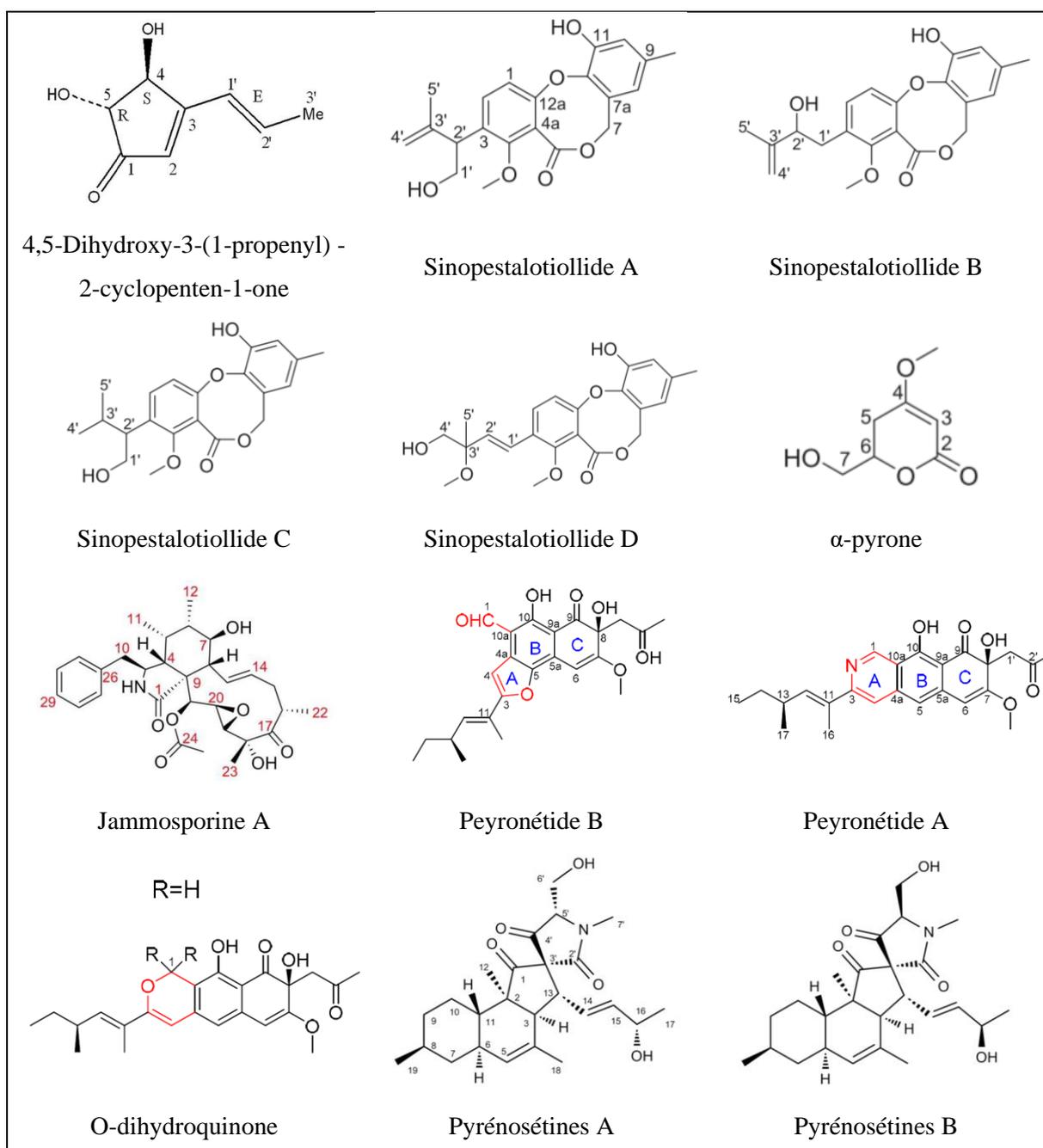
**Figure 4.** Structure de certaines molécules antifongiques produits par les champignons endophytes.

### **I.2.3. Molécules anticancéreuses**

Selon Teixeira et *al.*, (2019) en 2018, 18 millions de cas de cancer et 10 millions de décès ont été recensés dans le monde. Afin de palier à ce problème de santé, la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses est devenue très importante. Les champignons endophytes ont reçu de l'importance dans ce domaine et plusieurs molécules anticancéreuses ont été isolées (**figure 5**), telles que le 4,5-Dihydroxy-3-(1-propenyl) -2-cyclopenten-1-one (terrein) produit par le champignon endophyte *Aspergillus terreus* (JAS-2) isolé à partir de *Achyranthus aspera* et qui possède une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire du cancer du poumon humain (A-549) avec des valeurs des IC<sub>50</sub> de  $121,9 \pm 4,821 \mu\text{g/mL}$  (Goutam et *al.*, 2017). Un autre champignon endophyte, *Pestalotiopsis palmarum* producteur de quatre nouveaux dérivés du diphényléther, les sinopestalotiollides A-D, ainsi qu'un nouveau  $\alpha$ -pyrone a été isolé à partir de *Sinomenium acutum*. Ces molécules avaient démontré une activité cytotoxique contre les trois lignées cellulaires testées, Hela, HCT116 et A549 avec des IC<sub>50</sub> variant de  $1.19 \pm 0.02$  à  $47.82 \pm 2.19 \mu\text{M}$  (Xiao et *al.*, 2018).

Sharma et *al.* (2018) ont isolé et identifié une nouvelle cytochalasine nommée Jammosporine A et quatre analogues connus à partir de la culture du champignon endophyte *Rosellinia sanctae-cruciana*, le test de l'activité cytotoxique contre la lignée MOLT-4 a révélé que ces cinq molécules présentaient une activité cytotoxiques considérable avec des IC<sub>50</sub> de 20, 10, 25, 8 et 6.  $\mu\text{M}$  respectivement. Un nouveau polycétide contenant la fraction benzoisoquinoléine-9-one, le peyronétide A, un autre nouveau dérivé, le peyronétide B ainsi que le O-dihydroquinone ont été isolés et identifiés à partir du bouillon de fermentation du champignon endophyte *Peyronellaea* sp. FT431, ils présentaient une activité cytotoxique contre les lignées TK-10, A2780S et A2780CisR avec des IC<sub>50</sub> variant de 6.7 à 29.2  $\mu\text{M}$  (Li et *al.*, 2019).

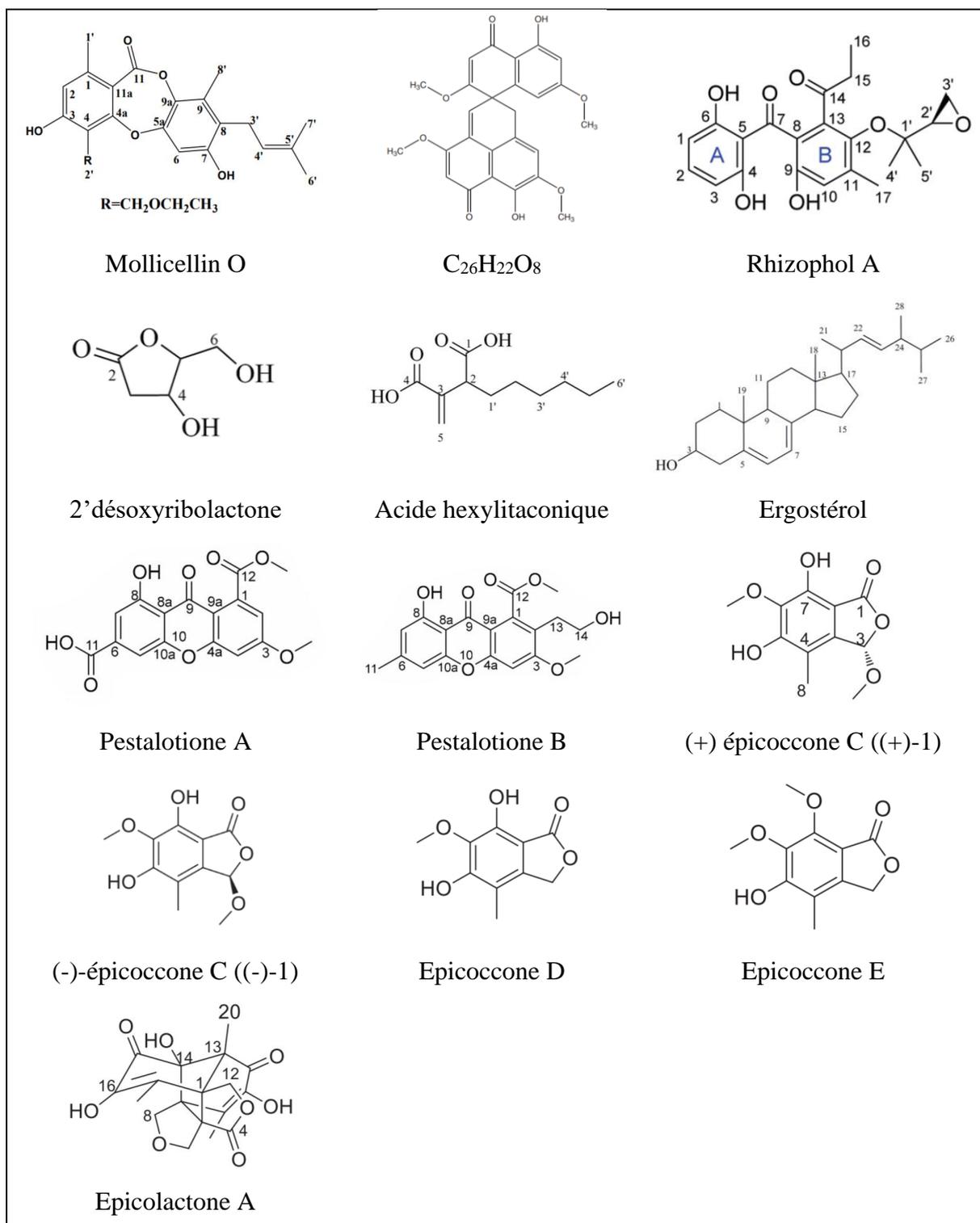
Fan et *al.* (2020) ont permis l'isolement et l'identification de deux nouveaux dérivés de l'acide décalinoylspirotétramique, les pyrénosétines A et B produits par *Pyrenochaetopsis* sp. FVE-001 un champignon endophyte de *Fucus vesiculosus*, ces deux molécules présentaient une haute activité anticancéreuse contre la lignée A-375 avec des IC<sub>50</sub> de 2.8 et 6.3  $\mu\text{M}$  respectivement.



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

#### I.2.4. Molécules antioxydantes

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène sont à l'origine de plusieurs maladies telles que diabète, le cancer, l'hypertension, la maladie d'alzheimer, la maladie de Parkinson etc. ; afin de prévenir et de traiter ces maladies, les antioxydants sont considérés comme une alternative prometteuse (Fadiji et Babalola 2020).



**Figure 6.** Structure de certaines molécules antioxydantes produits par les champignons endophytes.

Différentes études ont démontré la capacité des champignons endophytes à produire des molécules antioxydantes importantes (**figure 6**), on citera à titre d'exemple, une nouvelle dépsidone, la mollicellin O produite par *Chaetomium* sp. Eef-10, champignon endophyte isolé à partir de *Eucalyptus exserta* a été isolé et identifié et a montré une activité de piégeage des radicaux libres 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) avec une valeur  $IC_{50}$  de 71,92  $\mu\text{g/mL}$

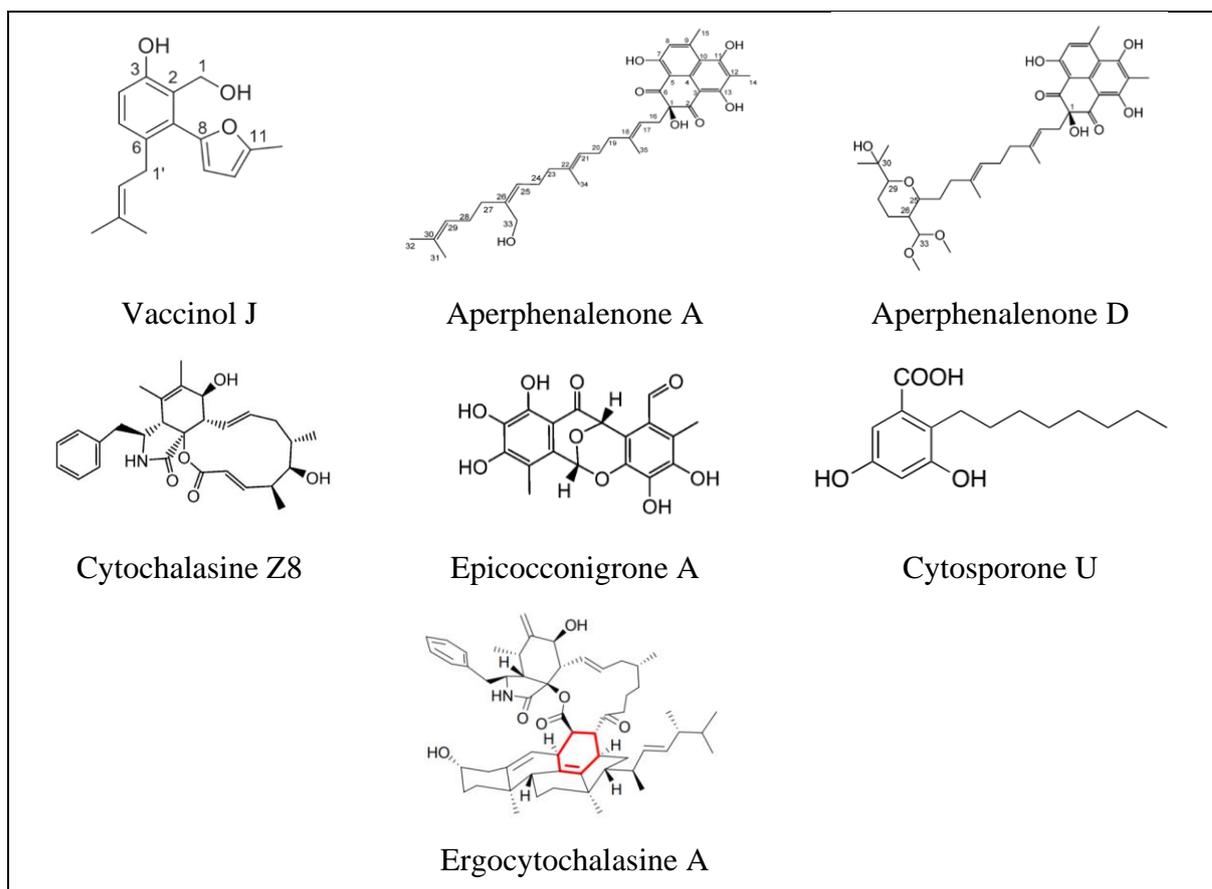
(Ouyang et al., 2018). Paudel et al. (2018) ont permis l'isolement de deux polycétides, à partir de la culture du champignon endophyte *Preussia* sp. La deuxième molécule, C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub> présentait une forte activité de piégeage du DPPH avec une IC<sub>50</sub> de 3 µg/mL, une valeur comparable à celle obtenue avec l'hydroxyanisole butylé utilisé comme témoin positif.

Parmi les deux nouvelles polycétones produites par le champignon endophyte *Cytospora rhizophorae* A761, rhizophol A a montré au cours du test de piégeage des radicaux DPPH une valeur de EC<sub>50</sub> (13.07 µM) plus basse que celle obtenue avec le contrôle positif (25.53 µM) (Liu et al., 2019). A partir de l'extrait du champignon endophyte *Curvularia* sp. isolé à partir de la plante médicinale *Rauwolfia macrophylla*, les trois molécules 2'désoxyribolactone, acide hexylitaconique et ergostérol ont été identifiées et leur pouvoir de piégeage des radicaux DPPH et de l'Acide 2,2-azino-bis-3-(thylBenzoThiazoline-6-Sulfonique) (ABTS) testé. Les valeurs des EC<sub>50</sub> (0.66, 0.56 et 1.09 µM) obtenues au premier test et (0.49, 0.88 et 0.83 µM) obtenues au deuxième test étaient très proches de celles obtenues avec les témoins positifs (Kaaniche et al., 2018).

Un autre champignon endophyte, *Epicoccum nigrum* SCNU-F0002 a été la source de 9 molécules dont 5 nouvelles molécules, (+) épicocone C ((+)-1), (-)-épicocone C ((-)-1), épicocone D, épicocone E et épicolactone A ayant un pouvoir de piégeage des radicaux DPPH supérieur de celui des témoins positifs avec des IC<sub>50</sub> allant de 10.2 à 15.3 µM (Yan et al., 2020). Récemment, Guo et al. (2020) ont testé le pouvoir antioxydant des 9 molécules produites par le champignon endophyte *Pestalotiopsis theae* (N635), parmi ces dernières, seuls les deux nouveaux dérivés du xanthone, les pestalotiones A et B ont montré une activité avec des valeurs de IC<sub>50</sub> de 54.2 et 59.2 µg/mL respectivement.

### **I.2.5. Molécules antivirales**

Compte-tenu de l'évolution de nouvelles souches de virus redoutables causant des effets terribles sur les vies humaines (Sharma et al., 2019), la recherche de nouvelles molécules antivirales naturelles est nécessaire. Les endophytes pourraient être une des sources les plus prometteuses. Cependant, le manque de système de criblage antiviral limite la production de ces composés et par ce fait, le nombre de molécules antivirales attribués aux endophytes est limité (**figure 7**) (Fadiji et Babalola 2020).



**Figure 7.** Structure de certaines molécules antivirales produits par les champignons endophytes.

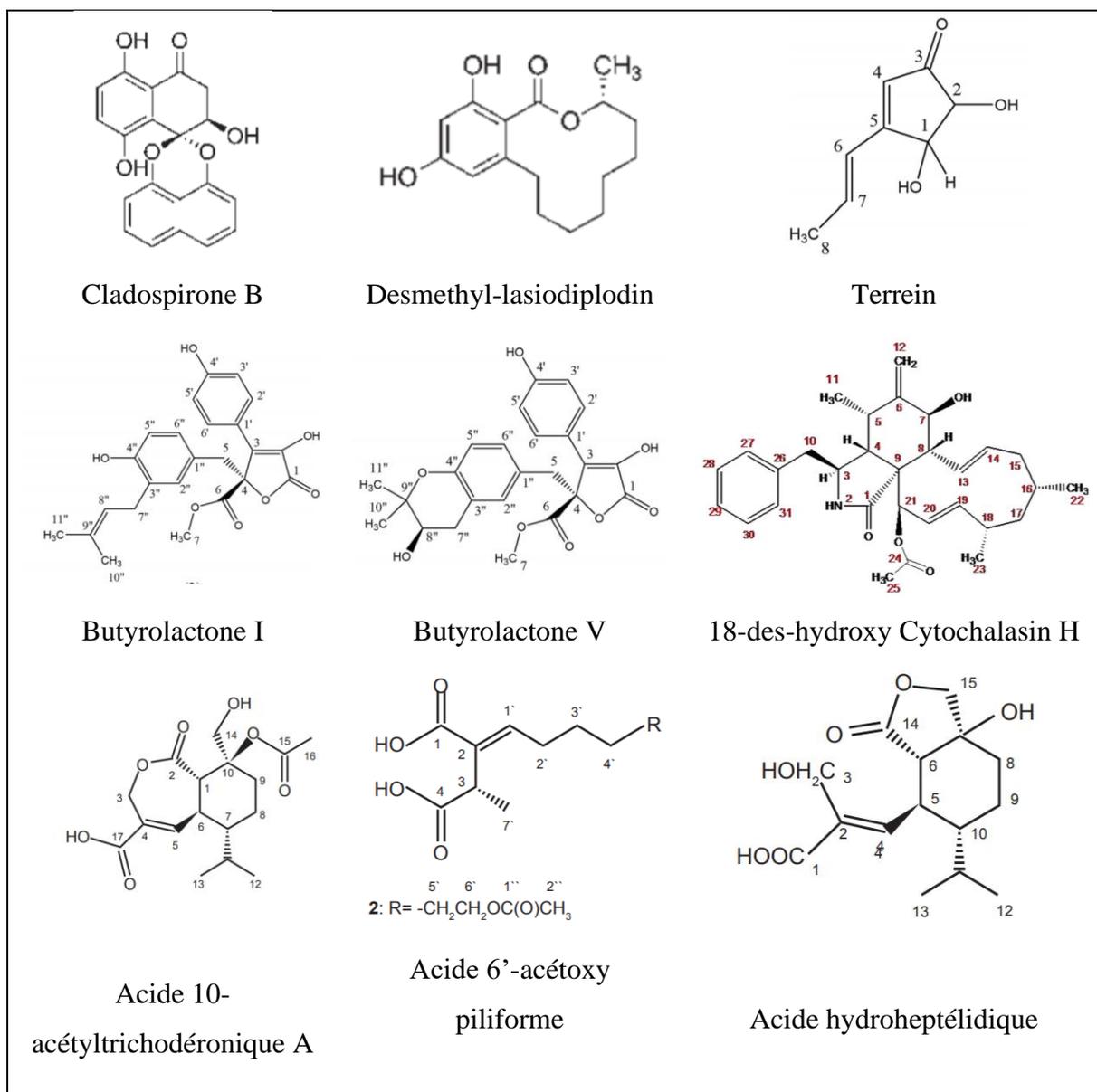
Parmi les 10 nouvelles molécules produites par *Pestalotiopsis vaccinii* (cgccc3.9199) un champignon endophyte isolé à partir de *Kandelia candel* (L.) Druce, le vaccinol J a montré une activité ( $IC_{50}$  de 30,7  $\mu$ M) plus élevée que celle du témoin positif ( $IC_{50}$  177,0  $\mu$ M) contre l'entérovirus 71 (EV71) (Wang *et al.*, 2017). Pang *et al.* (2017) ont permis l'identification de 2 nouvelles molécules, les aperphenalenones A et D ainsi que deux autres connues, la cytochalasine Z8 et l'épicocconigrone A produites par le champignon endophyte *Aspergillus* sp. CPCC 400735 ; ces molécules ont montré une forte activité contre le virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) avec des  $IC_{50}$  de 4.5, 2.4, 9.2 et 6.6  $\mu$ M respectivement. Cytosporone U, une molécule produite par le champignon endophyte *Phomopsis* sp. FJBR-11 a été testé pour son pouvoir inhibiteur du virus de la mosaïque du tabac (VMT), cette dernière présentait une puissante activité avec une  $IC_{50}$  de 144.6  $\mu$ g/mL (Tan *et al.*, 2017).

(Peng *et al.*, 2020) ont permis l'isolement et l'identification à partir de la culture du champignon endophyte *Phoma multirostrata* XJ2-1 de l'ergocytochalasine A, qui présentait une activité contre le virus de la dengue humaine de type 3 (DV3) et le virus de la grippe A (H1N1) avec des  $EC_{50}$  de 12.50 et 40.92 respectivement.

### **I.2.6. Molécules antiparasitaires**

Selon Fadji et Babalola (2020), près de la moitié du taux de mortalité dans le monde serait causé par les maladies infectieuses et parasitaires. Les champignons endophytes sont à l'origine de plusieurs molécules antiparasitaires (**figure 8**), on citera par exemple le champignon endophyte *Lasiodiplodia theobromae* isolé à partir des feuilles de *Vitex pinnata*, qui produit deux molécules nommées cladospirone B, desmethyl-lasiodiplodin possédant une bonne activité contre *Trypanosoma brucei brucei* avec des IC<sub>50</sub> de 17,8 µM et 22,5 µM respectivement (Kamal et al., 2017). Une autre étude a été faite sur l'effet des molécules produites par *Aspergillus terreus*-F7, endophyte associé à *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, contre *Schistosoma mansoni*, *Leishmania amazonensis* et *Trypanosoma cruzi*. Les résultats ont montré que les trois molécules, terrein, butyrolactone I et V tuaient à des concentrations de 1297.3, 235.6 et 454.1 µM, après 48, 72 et 72 heures, 100% des vers *S. mansoni* respectivement. Ils avaient également une activité leishmanicide modérée avec des IC<sub>50</sub> allant de 78.6, 26.0 et 23.7 à µM respectivement. Contre *T. cruzi*, c'est uniquement butyrolactone I et V qui étaient actives et ont tué 100% des cellules à des concentrations de 94,2 et 181,6 µM respectivement (da Silva et al., 2017).

50% des vers adultes de *Schistosoma mansoni* à une concentration de 50 µg/mL ainsi qu'une réduction de la viabilité des promastigotes de *Leishmania amazonenses* avec une IC<sub>50</sub> de 9,2 µg/mL ont été observées après traitement avec 18-des-hydroxy Cytochalasin H, une molécule produite par le champignon endophyte *Diaporthe phaseolorum*-92C (Brissow et al., 2017). Cota et al. (2018) ont évalué l'activité antileishmanienne des 7 composés produits par l'endophyte *Nectria pseudotrichia* endophyte de *Caesalpinia echinata*. Parmi ces molécules, deux nouvelles, l'acide 10-acétyltrichodéronique A, et l'acide 6'-acétoxy-piliforme et une connue, l'acide hydroheptélidique ont montré une activité avec des IC<sub>50</sub> de 21.4, 28.3 et 24.8 µM.



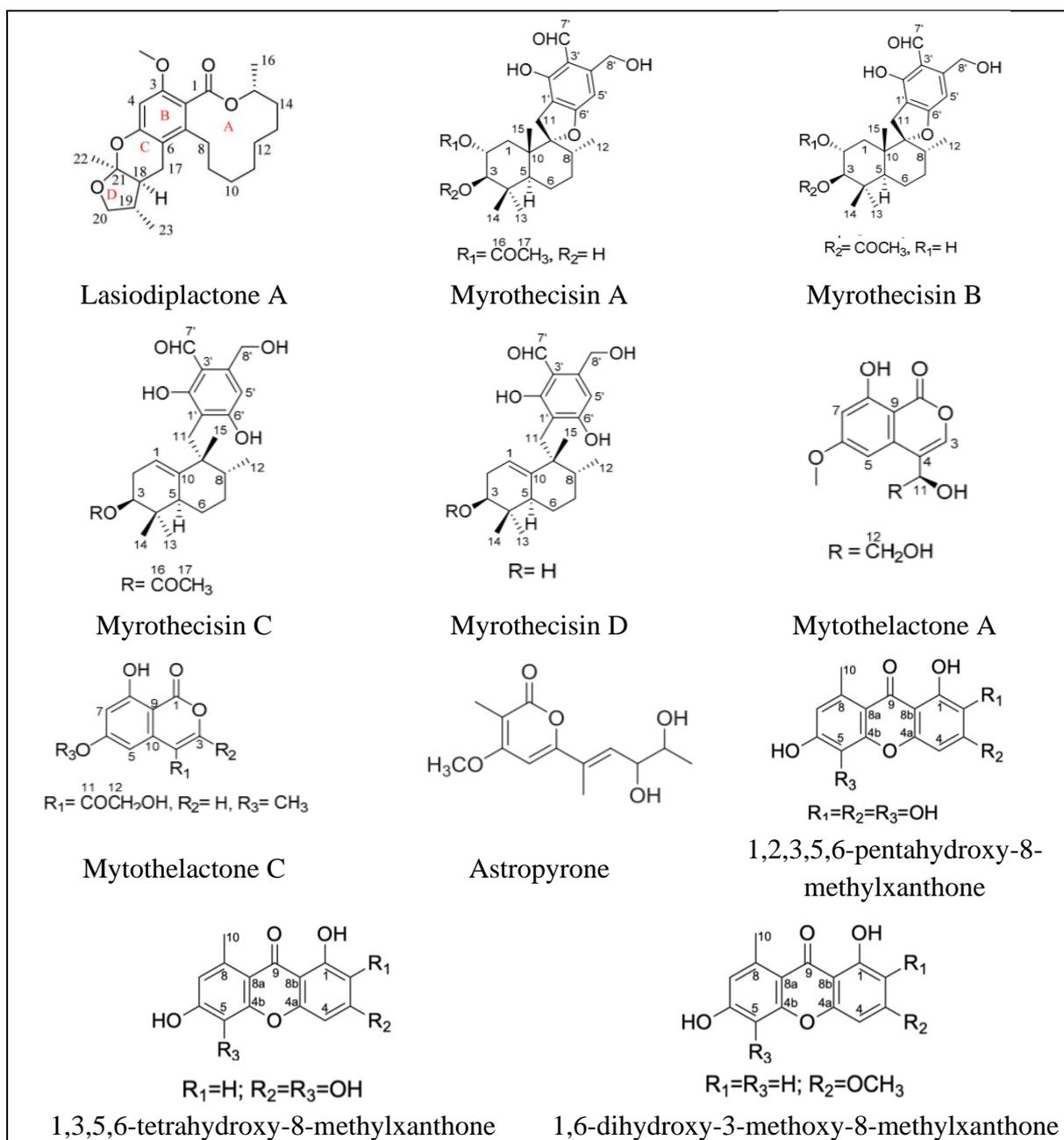
**Figure 8.** Structure de certaines molécules antiparasitaires produits par les champignons endophytes.

### I.2.7. Molécules antidiabétiques

Dans le monde et à l'heure actuelle, 463 millions de personnes reçoivent un diagnostic de diabète, 90% de ses cas sont attribués au diabète de type 2 (T2D). L'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase constitue une stratégie prometteuse pour la gestion du T2D. Cependant, les inhibiteurs commercialisés de cette enzyme sont généralement des glucides provoquant de multiples effets indésirables gastro-intestinaux, la découverte de nouvelles molécules pouvant inhiber cette enzyme et ayant moins d'effets indésirables serait une bonne alternative (Malik et *al.*, 2020).

Dans ce contexte, plusieurs études ont été faites sur les endophytes et leur pouvoir à produire de telles molécules, on citera à titre d'exemple, l'étude de Chen et *al.* (2017), qui ont

permis l'identification de la lasiodiplactone A, une nouvelle molécule produite par le champignon endophyte *Lasiodiplodia theobromae* ZJ- HQ1, cette molécule a la capacité d'inhiber l' $\alpha$ -glucosidase avec une  $IC_{50}$  de 29,4  $\mu$ M. Parmi les 13 molécules produites par *Myrothecium* sp. OUCMDZ-2784, endophyte associé à la plante médicinale, *Apocynum venetum*, quatre nouveaux méroterpénoïdes, les myrothecisin A-D et deux nouveaux isocoumarinoïde, mythelactone A et C ont montré une faible inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase avec des valeurs d' $IC_{50}$  de 0,50, 0,66, 0,058, 0,20, 0,32 et 0,036 mM, respectivement (Xu et al., 2018).



**Figure 9.** Structure de certaines molécules antidiabétiques produits par les champignons endophytes.

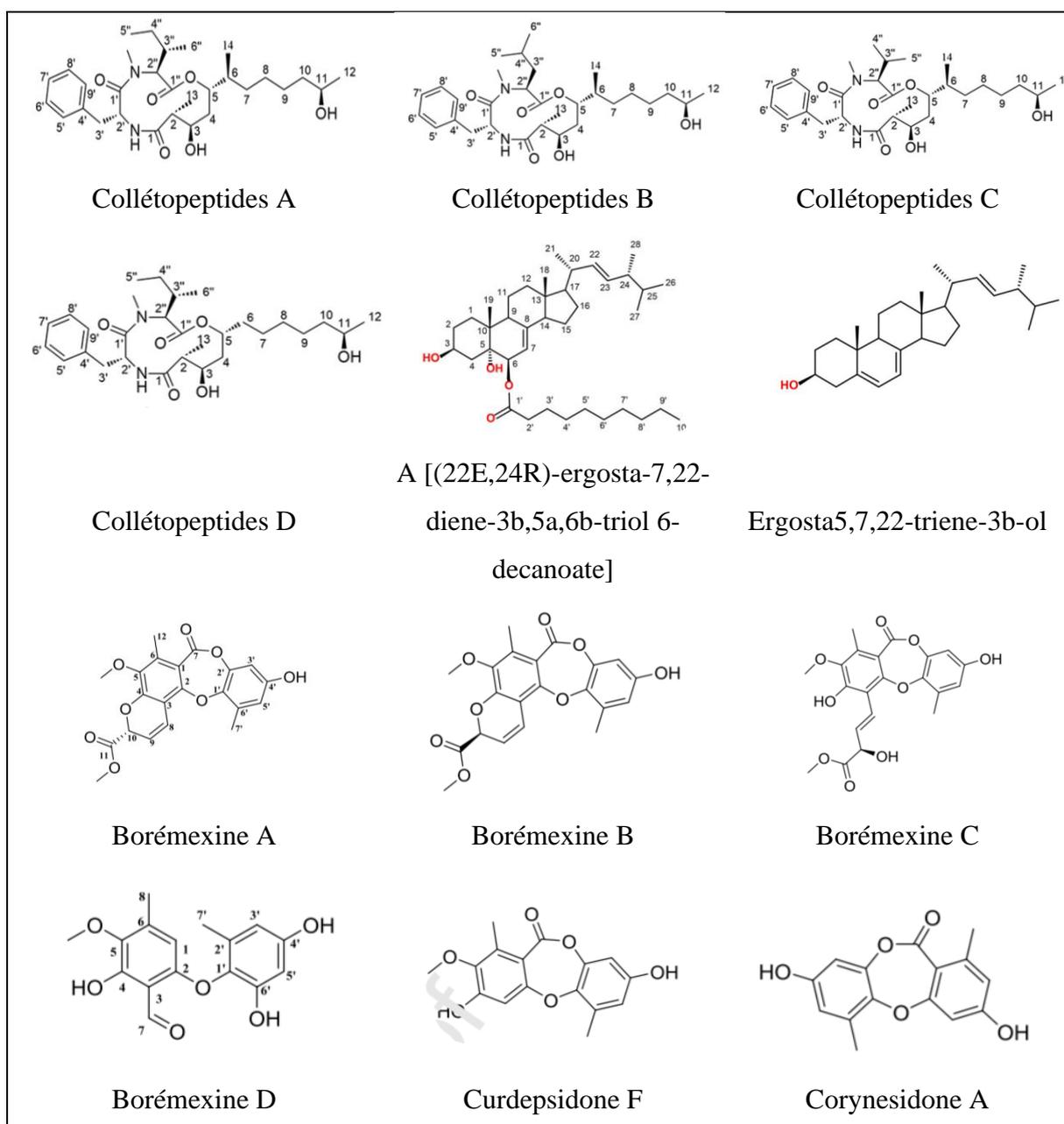
Wang *et al.* (2018) ont identifié parmi les molécules produites par *Xylaria* sp. HNWSW-2, l'astropyrone qui, à une concentration de 0,25 mg/ml, inhibe l' $\alpha$ -glucosidase avec un taux de 77%. Trois xanthones, une nouvelle, la 1,2,3,5,6-pentahydroxy-8-méthylxanthone ainsi que deux connues 1,3,5,6-tetrahydroxy-8-méthylxanthone et 1,6-dihydroxy-3-méthoxy-8-méthylxanthone produites par le champignon endophyte *Penicillium canescens* possèdent le pouvoir d'inhiber l' $\alpha$ -glucosidase avec des  $IC_{50}$  de  $38.80 \pm 1.01$ ,  $32.32 \pm 1.01$ , et  $75.20 \pm 1.02$   $\mu$ M respectivement (**figure 9**) (Malik *et al.*, 2020).

### **I.2.8. Molécules antiinflammatoires**

L'inflammation est un processus immunitaire normal, son rôle est de protéger le corps contre les infections et les lésions tissulaires. Cependant, une inflammation prolongée ou excessive peut entraîner diverses maladies car la surproduction de certains facteurs tels que les cytokines pro-inflammatoires et les facteurs inflammatoires pendant le processus inflammatoire peut entraîner des lésions cellulaires et des maladies inflammatoires ; pour cela, l'inhibition de la production de ces médiateurs inflammatoires est un moyen efficace de traiter les maladies inflammatoires (Roma-Marzio *et al.*, 2017), et les champignons endophytes représentent une bonne source de ces inhibiteurs (**figure 10**).

Plusieurs études ont été faites dans ce sens, on citera à titre d'exemple, l'étude de Feng *et al.* (2019) qui a permis l'isolement, la caractérisation ainsi que l'activité antiinflammatoire de quatre nouvelles molécules, les collétopeptides A-D produites *Colletotrichum* sp. S8 champignon endophyte des tiges de *Rubia podantha*. Ces quatre molécules ont montré une inhibition de la production de l'oxyde nitrique induite par le lipopolysaccharide (LPS) dans les macrophages RAW 264.7 avec les valeurs des  $IC_{50}$  de 8,3, 38,7, 13,5 et 22,2  $\mu$ M respectivement. Collétopeptides A a également inhibé la production induite par le LPS, des facteurs inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  dans les macrophages RAW264.7. Un autre champignon endophyte, *Fusarium chlamydosporum* isolé à partir des feuilles de *Anvillea garcinii* est à l'origine de deux molécules, A [(22E,24R)-ergosta-7,22-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol 6-decanoate] et ergosta5,7,22-triene-3 $\beta$ -ol possédant un pouvoir inhibiteur modéré de 5-LOX avec des  $IC_{50}$  de 3,06 et 3,57 mM respectivement (Al-Rabia *et al.*, 2020).

Parmi les neuf molécules produites par le champignon endophyte *Boeremia exigua* isolé à partir de *Solanum tuberosum* L., les borémexines A-D, curdepsidone F et corynesidone A possèdent un pouvoir d'inhibition de la synthèse induite par le LPS de l'oxyde nitrique dans les macrophages RAW 264.7 avec une des  $IC_{50}$  allant de 19,4 à 34,4  $\mu$ M (Chen *et al.*, 2020).



**Figure 10.** Structure de certaines molécules antiinflammatoires produits par les champignons endophytes.

### I. 3. Plantes médicinales étudiées

#### I. 3.1. *Juniperus oxycedrus* L.

*Juniperus* L. (figure 11) est un genre appartenant à la famille des *Cupressaceae*, c'est le genre le plus diversifié de la famille, avec ces 70 espèces (Mrid et al., 2019), il est subdivisé en trois section *J. sect. Caryocedrus* Endl., et *J. sect. Sabina* Spach. L'espèce *J. oxycedrus* appelé Genévrier cade en français ou « Taga » en arabe dialectal, appartient à la section *J. sect. Juniperus* (Roma-Marzio et al., 2017). C'est un arbuste ou petit arbre poussant à l'état sauvage dans les endroits caillouteux des pays méditerranéens et du Proche-Orient (Loizzo et al., 2007).

De l'ensemble du genre *Juniperus*, *J. oxycedrus* est l'une des espèces les plus renommées utilisées en médecine populaire (Mrid et al., 2019), elle est utilisée comme diurétique, stimulant tonique pour l'estomac, désinfectant, elle est également utilisée dans le traitement de plusieurs maladies, comme la tuberculose, la pneumonie, la bronchite, la diarrhée et l'hyperglycémie (Fadel et al., 2019) et comme épice dans la cuisine européenne (Medini et al., 2013). L'huile de cette plante (huile de cade) est utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour soigner les maladies de la peau telles que l'eczéma et le psoriasis et comme vermifuge (Dob et al., 2006; Loizzo et al., 2007).

Plusieurs extraits de feuilles, résines, écorces et fruits de *J. oxycedrus* se sont avérés inhiber la croissance de plusieurs micro-organismes (Loizzo et al., 2007). Selon Dob et al. (2006), les recherches sur les constituants non volatils de *J. oxycedrus* ont révélé la présence de composés polyphénoliques tels que les flavonols, les biflavones et les coumarines. D'un autre côté, l'huile de son bois est constituée de  $\gamma$ -cadinène, épi-cubinol, et  $\beta$ -caryophyllène, alors que l'huile de ses feuilles est dominée par le  $\alpha$ -pinène et le cédrole, avec une quantité modérée de  $\alpha$ -phellandrène, myrcène,  $\alpha$ -terpinéol, (*E*)-nérolidol et l'oxyde de manoylène (Hanène et al., 2012).



**Figure 11.** Photographie de la plante *Juniperus oxycedrus* L. (Personnelle, 2020).

**I. 3.2. *Pistacia lentiscus* L.**

Le genre *Pistacia* L. (**figure 12**) appartient à la famille des *Anacardiaceae*, il est composé de plus de onze espèces. Il est largement distribué dans les écosystèmes du bassin méditerranéen (Zohary, 1952). En Algérie, *P. lentiscus* appelée pistachier lentisque ou « Darou » en arabe dialectal est souvent dispersé sur tout le littoral et se développe également dans la zone semi-aride. C'est l'une des plantes les plus utilisées en médecine traditionnelle, ses parties aériennes sont utilisées comme stimulants et diurétiques, et pour traiter l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, les maux d'estomac, les calculs rénaux et la jaunisse, l'huile de ses fruits a des utilisations polyvalentes soit en interne dans le traitement des ulcères, soit en externe pour soigner le psoriasis. Son mastic inhibe la prolifération de différentes cellules cancéreuses *in vitro* (Mezni et al., 2016), alors que la mastication de sa résine est efficace dans la lutte contre *Helicobacter pylori* (Naouar et al., 2016). Cette plante est également utilisée en industrie alimentaire en tant qu'agent aromatisant dans le chewing-gum (Mehenni et al., 2016).

Plusieurs études ont montré les effets pharmacologiques, tels que les activités antimicrobiennes, antioxydantes et antiprolifératives, de différentes parties de cette plante (feuille, résine, fruit, graines, tige, écorce, racine...) (Boutemine et al., 2018), ces activités ont été attribuées à la présence de nombreuses molécules thérapeutiquement actives, surtout des composés hautement phénoliques et des acides gras (Abidi et al., 2017).



**Figure 12.** Photographie de la plante *Pistacia lentiscus* L. (Personnelle, 2020).

# *Matériel et méthodes*

## II. Matériel et Méthodes

### II.1. Matériel biologique

#### II.1.1. Matériel microbien

Toutes les espèces bactériennes et fongiques pathogènes utilisées dans cette étude sont regroupées dans les **tableaux 1** et **2**.

**Tableau 1.** Les différentes souches bactériennes pathogènes utilisées.

| Bactérie                                 | Abréviation            | Origine | Résistance                           | Gène de résistance    |
|--|------------------------|---------|--------------------------------------|-----------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876        | <i>B. cereus</i>       | LMA     | /                                    | /                     |
| <i>Micrococcus luteus</i> NRLL B-4375    | <i>M. luteus</i>       | LMET    | /                                    | /                     |
| <i>Microbacterium yannicii</i>           | <i>M. yannicii</i>     | LMMF    | /                                    | /                     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923  | <i>S. aureus</i> 1     | LMA     | /                                    | /                     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300  | <i>S. aureus</i> 2     | LMA     | Métiline                             | mecA                  |
| <i>Staphylococcus aureus</i> MUP-R       | <i>S. aureus</i> 3     | LMMF    | Mupirocine                           | mupA                  |
| <i>Staphylococcus aureus</i>             | <i>S. aureus</i> 4     | LMMF    | Chlorohexidine-Mupirocine            | qacA-mupA             |
| <i>Staphylococcus aureus</i>             | <i>S. aureus</i> 5     | LMMF    | Chlorohexidine                       | qacA/qacC             |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452  | <i>E. faecalis</i> 1   | LMA     |                                      | /                     |
| <i>Enterococcus faecalis</i>             | <i>E. faecalis</i> 2   | LMMF    | Macrolide-Lincosamide-Streptogramine | MLSB                  |
| <i>Enterococcus faecalis</i>             | <i>E. faecalis</i> 3   | LMMF    | Macrolide-Lincosamide-Streptogramine | MLSB                  |
| <i>Enterococcus faecalis</i>             | <i>E. faecalis</i> 4   | LMMF    | Vacomycine                           | VANA                  |
| <i>Enterococcus faecium</i>              | <i>E. faecium</i> 1    | LMMF    | Vacomycine                           | VANB                  |
| <i>Enterococcus faecium</i>              | <i>E. faecium</i> 2    | LMMF    | Vacomycine                           | VRE                   |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>            | <i>S. pyogenes</i>     | LMMF    | Colistine                            | /                     |
| <i>Streptococcus australis</i>           | <i>S. australis</i>    | LMMF    | /                                    | /                     |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090    | <i>C. freundii</i>     | LMA     | /                                    | /                     |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>           | <i>A. baumannii</i>    | LMMF    | Carbapénèmes                         | OXA -5, NDM-I, Oxa-23 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>P. aeruginosa</i> 1 | LMA     | /                                    | /                     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>            | <i>P. aeruginosa</i> 2 | LMMF    | Carbapénèmes                         | vim-2                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>            | <i>P. aeruginosa</i> 3 | LMMF    | Carbapénèmes                         | imp-15                |
| <i>Proteus mirabilis</i>                 | <i>P. mirabilis</i>    | LMMF    | Carbapénèmes                         | OXA -48               |
| <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       | LMMF    | Colistine                            | MCR1                  |
| <i>Escherichia coli</i>                  | <i>E. coli</i> 3       | LMMF    | β-lactamines                         | BLSE                  |
| <i>Escherichia coli</i>                  | <i>E. coli</i> 4       | LMMF    | Carbapénèmes                         | OXA -48               |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>             | <i>K. pneumoniae</i> 1 | LMMF    | Carbapénèmes                         | ndm                   |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>             | <i>K. pneumoniae</i> 2 | LMMF    | Carbapénèmes                         | OXA-48                |

LMA : Laboratoire de microbiologie appliquée- université de Sétif- Algérie, LMMF : Laboratoire de multi-résistance-Marseille-France, LMET : Laboratoire de mycologie- Eskişehir- Turquie.

**Tableau 2.** Les différentes souches fongiques pathogènes utilisées.

| Microorganisme                     | Abréviation              | Origine | Résistance | Gene de résistance |
|------------------------------------|--------------------------|---------|------------|--------------------|
| <i>Candida albicans</i> ATCC 1024  | <i>C. albicans</i>       | LMA     | /          | /                  |
| <i>Epidermophyton floccosum</i>    | <i>E. floccosum</i>      | LPMF    | /          | /                  |
| <i>Microsporium canis</i>          | <i>M. canis</i>          | LPMF    | /          | /                  |
| <i>Trichophyton rubrum</i>         | <i>T. rubrum</i>         | LPMF    | /          | /                  |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | LPMF    | /          | /                  |
| <i>Phytophthora infestans</i>      | <i>P. infestans</i>      | LMA     | /          | /                  |

LMA : Laboratoire de microbiologie appliquée-université de Sétif- Algérie, LPMF : Laboratoire de parasitologie-Marseille-France.

### II.1.2. Matériel végétal

Les deux plantes *Juniperus oxycedrus* L. et *Pistacia lentiscus* L. utilisés lors de cette étude ont été collectées de la région de Bordj Bou Arreridj (Djebel de Mansourah) en mars 2014. L'identification a été approuvée par le professeur Laouer Houcine, Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles de l'université de Sétif 1.

### II.1.3. Lignées cellulaires

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

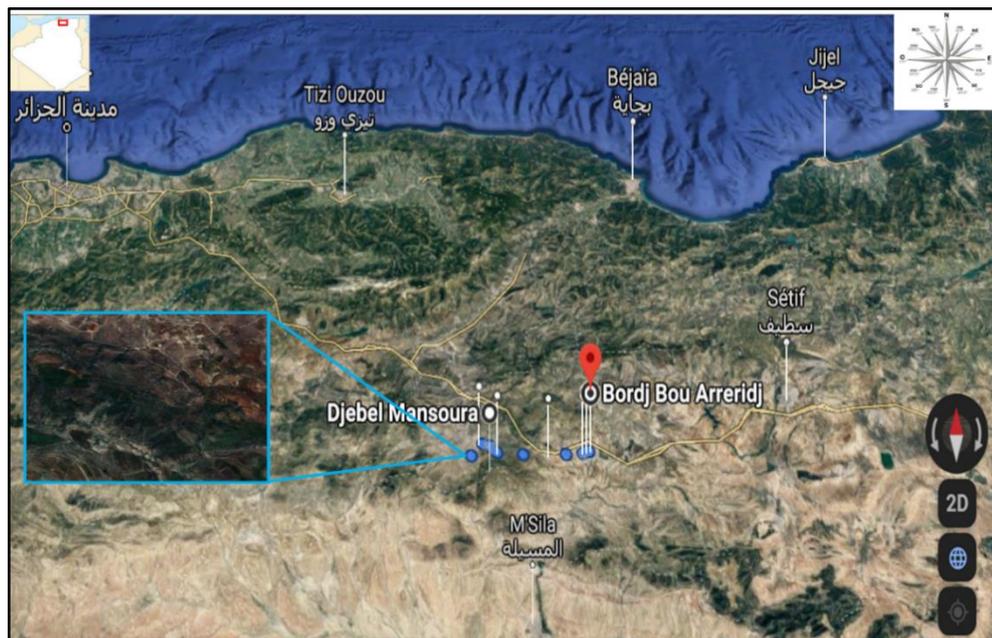
### II.1.4. Produits chimiques

Les réactifs, les solvants et les milieux de cultures utilisés dans cette étude ont été achetés auprès de Sigma Aldrich, Fluka, prolab et Biochem ou Fischer scientifique. Les autres milieux ont été préparés au laboratoire de microbiologie et sont présentés dans l'**annexe 1**.

## II.2. Échantillonnage

Des feuilles, tiges et racines fraîches de *J. oxycedrus* L. et de *P. lentiscus* L. ont été collectées du Djebel de Mansourah située à l'Ouest de Bordj Bou Arreridj (36.052538 N, 4.491563 E) en Algérie dans la période de mars 2014 (**figure 13**). L'identification des plantes a été réalisée au Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles de l'université Ferhat Abbas Sétif 1. Les échantillons ont été ensuite conservés dans des sacs en plastique scellés et acheminés au laboratoire dans une glacière le même jour. L'isolement des

champignons endophytes a été réalisé dans les 24 heures suivant la collecte (Zerroug et *al.*, 2018).



**Figure 13.** Site d'échantillonnage.

### **II.3. Isolement et purification des champignons endophytes**

Les champignons ont été isolés comme endophytes asymptomatiques à partir des feuilles, tiges et racines fraîches de *J. oxycedrus* L. et de *P. lentiscus* L en suivant le protocole de Campos et *al.* (2015). Les échantillons de plantes ont été lavés avec de l'eau courante, séchés à une température ambiante, et découpés en fragments d'environ 3 cm. Les surfaces de ces fragments ont été successivement stérilisées par immersion dans de l'éthanol à 70% (1 minute) suivie de l'hypochlorite de sodium à 2% (3 minutes) et de l'éthanol à 70% pendant 30 s, puis finalement rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile pendant 2 minutes. Les fragments ont ensuite été séchés à l'air dans la hotte à flux laminaire et coupés aseptiquement en morceaux de 0,5 cm.

Après cela, les échantillons ont été placés de manière aseptique dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture solide Potato Dextrose Agar (PDA) supplémenté de la pénicilline et de la gentamicine (30 mg/L) pour supprimer la croissance bactérienne. Les boîtes ont ensuite été incubées à 28°C jusqu'à ce que l'excroissance des champignons endophytes soit détectée.

Les champignons émergents ont été isolés et inoculés sur du PDA frais ne contenant pas d'antibiotiques et incubés à 28°C pendant 7 jours. Cette étape a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'isolats fongiques purs avec une colonie uniforme. 100 µL de l'eau distillée stérile utilisée pour le rinçage final ont étéensemencées sur PDA pour confirmer l'efficacité des différentes étapes de la stérilisation de surface, ainsi que la provenance interne des champignons isolés.

Les isolats purs ont été conservés par des repiquages périodiques sur PDA et maintenus à 4 °C pour une conservation à court terme et dans de l'eau distillée stérile contenant 30% v/v de glycérol au congélateur pour une conservation à long terme (Campos et *al.*, 2015).

Pour chaque type de tissu de plantes, les taux de colonisation et d'isolement ont été calculés selon Yuan et *al.* (2010) en utilisant les formules suivantes :

$$\text{Taux de colonisation} = \frac{\text{Nombre total de fragments donnant } \geq 1 \text{ isolat}}{\text{Nombre total de fragments utilisés}} \times 100$$

$$\text{Taux d'isolement} = \frac{\text{Nombre total d'isolats obtenu}}{\text{Nombre total de fragments utilisés}}$$

## **II.4. Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne**

Les activités antibactérienne et antifongique des isolats endophytes de chaque plante ont été dépistées par la technique des cylindres d'agar et celle de la double culture respectivement.

### **II.4.1. Criblage de l'activité antibactérienne et antilevurienne**

Le pouvoir antimicrobien des champignons endophytes isolés a été évalué contre quatre bactéries, *Escherichia coli* 1, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Staphylococcus aureus* 1, *Bacillus cereus* 1 et une levure *Candida albicans* ATCC 1024. La méthode des cylindres d'agar décrite par Astuti et *al.* (2014) a été utilisée en apportant quelques modifications mineures ; pour cela, les champignons ont été cultivés à la surface de la gélose PDA et incubés à 28°C pendant 14 jours ; à partir de ces cultures, des disques de 6 mm de diamètre ont été découpés à l'aide d'un emporte-pièce stérile et placés sur la surface de Mueller Hinton Agar (MHA) et Sabouraud Dextrose Agar (SDA) préalablement ensemencées avec les bactéries ( $1-2 \times 10^8$  UFC/mL) (Unité Formant Colonie) et la levure ( $1-5 \times 10^6$  cellules/mL) à tester respectivement.

Les boîtes ont ensuite été scellées avec du parafilm et placées au réfrigérateur à 4°C pendant 4 heures pour permettre la diffusion des composés antimicrobiens, puis incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure. L'activité antimicrobienne a été ensuite déterminée par la mesure en millimètre des zones d'inhibition autour des cylindres d'agar des champignons endophytes (Astuti et *al.*, 2014).

### **II.4.2. Criblage de l'activité antifongique**

Les isolats purs de champignons endophytes ont été testés pour leur antagonisme *in vitro* contre un champignon phytopathogène *Phytophthora infestans*, et deux dermatophytes *Microsporum canis* et *Trichophyton mentagrophytes* par la technique de double culture décrite par Orole et Adejumo (2009) et Srividya et *al.* (2012).

Les champignons endophytes et pathogènes ont été cultivés sur des boîtes de PDA pendant une période de 5 à 7 jours, l'activité antifongique a ensuite été réalisée en plaçant un disque de 6mm de diamètre provenant des hyphes en croissance du champignon endophyte sur un côté d'une boîte de PDA et sur le côté opposé un autre disque provenant du champignon pathogène. Toutes les boîtes ainsi que la boîte contrôle dépourvue d'endophyte ont été incubées à 28°C.

Après 5 jours d'incubation, Le pourcentage de réduction de la croissance radiale du champignon pathogène a été calculé pour chaque endophyte comme suit :

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

Où ; le **A** : Le rayon du champignon pathogène dans la boîte contrôle.

et le **B** : Le rayon du champignon pathogène dans la double culture.

## **II.5. Identification des champignons endophytes sélectionnés**

Les isolats de champignons endophytes qui ont montré une forte activité antagoniste contre les bactéries et/ou les champignons pathogènes ont été sélectionnés et identifiés.

### **II.5.1. Identification morphologique**

L'identification des isolats fongiques au niveau du genre a été basée sur différents critères morphologiques macroscopiques (culturelles) en ensemençant les isolats sur plusieurs milieux de culture, PDA SDA, Malt Extract Agar (MEA), Yeast Extract Sucrose Agar (YES) Yeast Extract Malt Extract Agar (YMEA), Czapek Yeast Agar (CYA=Czapek Dox+Yeast extract), et Czapek Dox Agar (CDA), et des critères morphologiques microscopiques après coloration au bleu coton au lactophénol.

Les critères macroscopiques retenus étaient :

- Taux de croissance : Rapide, lent ou modéré, en mesurant les diamètres des colonies.
- La détermination de la couleur de la colonie et du revers de la culture : Une couleur uniforme ou une distribution fluctuante.
- Sécrétion de pigments colorés diffusibles dans le milieu de culture.
- La structure superficielle de la colonie : Veloutée, cotonneuse, granuleuse ou lisse, plate ou surélevée à la surface du milieu.
- La présence de gouttelettes aqueuses transpirées par le mycélium aérien (exsudats).

Pour l'identification microscopique, elle consiste en la préparation des frottis au bleu coton au lactophénol sur une lame suivie d'une observation microscopique des critères suivants :

- Propriétés des hyphes : Couleur, cloisonnés ou coenocytiques.
- Production de fructifications : Sporenia, perithecia, pycnidia, sporodochia, corenia.
- La couleur, la taille et la forme des fructifications.
- Le mécanisme de production des spores et ses caractéristiques.

Ces critères macroscopiques et microscopiques ont été comparés à des clés d'identification telles que Dufresne, (2013), Pitt et Hocking, (1985) et Botton *et al.*, (1990) afin d'arriver à identifier les isolats fongiques au niveau du genre.

## **II.5.2. Identification moléculaire des champignons**

### **II.5.2.1. Extraction de l'ADN total et purification**

L'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) fongique a été réalisée à l'aide du robot automatique EZ1 Advanced XL (Qiagen BioRobot EZ1, Tokyo, Japon), en utilisant le kit EZ1 Advanced DNA bacteria extraction (EZ1 DNA, Qiagen, Hilden, Germany) et en suivant les instructions du fabricant avec quelques modifications. En bref, 3 ou 4 colonies fongiques ont été déposées dans un tube Eppendorf de 1.5 mL contenant 210 µL du tampon G2, 20 µL de protéinase K et 100 mg de billes de verre (billes de verre, lavées à l'acide, SIGMA®). La lyse mécanique a été réalisée à l'aide d'un broyeur FastPrep-24 (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France) à la puissance maximale pendant 40 s. Ensuite, les tubes ont été incubés pendant une nuit à 56°C pour permettre une lyse complète. Les tubes Eppendorf ont ensuite été agités pendant 2 minutes et centrifugés à 13 000 g pendant 2 minutes. Enfin, le surnageant a été récupéré et l'ADN total a été purifié en suivant le protocole automatisé en utilisant l'extracteur EZ1 Advanced XL. L'ADN extrait a été élué dans 200 µL et conservé à -20 °C (Hamad *et al.*, 2017; Menu, 2019).

### **II.5.2.2. Amplification par PCR, visualisation et purification des amplicons**

Six régions de l'ADN génomique ont été amplifiées par une Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction=PCR) en utilisant un thermocycleur (ThermoCycle2720 Applied Biosystems ®), la calmoduline (CaM), Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation elongation factor 1-alpha (TEF1) la bêta-tubuline (BenA), Large-subunit (LSU) et RNA polymérase II second largest subunit (RPB2), en utilisant les amorces CMD5-F / CMD6-R, ITS1F et ITS4R, EF1- EF1-1018F / EF1-2218R 688F / EF1-1251R, Bt2a-F / Bt2b-R, LR0R / LR5 et 5F-F / 7CReur-R ou 5Feur-F / 7CReur-R pour JOR26

respectivement. Toutes les PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µL contenant 25 µL de Master Mix 2× PCR (Qiagen, Hilden, Allemagne), 1 µL de chaque amorce forward et reverse, 18 µL d'eau exempte de nucléase, et 5 µL d'ADN. Un mélange de PCR sans ADN a été utilisé comme contrôle négatif. Les séquences des amorces ainsi que les conditions des cycles d'amplification sont répertoriées dans le **tableau 4**.

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse en utilisant un gel d'agarose à 1,5% contenant un colorant de gel, ADN SYBR™ Safe (Invitrogen™, Carlsbad, USA) et visualisés avec un éclairage ultraviolet. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés en utilisant le kit de PCR Nucleo-Fast®96 (Marcherey-Nagel, Hoerd, France) et ont été conservés à - 20 °C. (Hamad et *al.*, 2017; Menu, 2019).

### **II.5.2.3. Réaction de séquence (BigDye) et séquençage**

Les produits de PCR purifiés ont été séquencés en utilisant le BigDye Terminator v 1.1 cycle sequencing kits (Applied Biosystems) conformément aux instructions du fabricant. Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 20 µL contenant, 3 µL de tampon de séquençage 5x, 2 µL de Big Dye® Terminator V1.1 Cycle, 9 µL d'eau exempte de nucléase, 1 µL d'amorce forward ou reverse et 5 µL d'ADN. Les séquences des amorces pour séquençage sont présentées dans le **tableau 3**.

Les réactions ont été effectuées dans les conditions suivantes : dénaturation initiale à 96 °C pendant 60 s suivi de 25 cycles de PCR avec une dénaturation de l'ADN à 96 °C pendant 10 s, une hybridation à 50 °C pendant 5 s et une élongation à 60 °C pendant 3 minutes. Les produits de séquençage (20 µL) ont ensuite été purifiés par la méthode de chromatographie d'exclusion en utilisant du Sephadex G-50 rempli dans des plaques MAHVN45.

Le séquençage des produits purifiés a ensuite été réalisé avec un séquenceur automatisé ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems®). Les données des séquences forward et reverse ont été assemblées et corrigées en utilisant le logiciel Codon Code Aligner (Centreville, MA, USA) et comparées à celles disponibles dans la base de données GenBank, en utilisant l'option BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Hamad et *al.*, 2017; Menu, 2019).

### **II.5.2.4. Analyse phylogénétique**

Les séquences ont été déposées dans la base de données GeneBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI). Par la suite, les données de séquences consensus de chaque région ont été blastées contre la base de données préexistante sur NCBI et toutes les séquences qui présentaient un pourcentage élevé de similitude avec nos séquences ont été récupérées. Des bases de données de séquences ont été créés pour chaque région en utilisant les séquences nouvellement générées et celles téléchargées à partir de GenBank.

Pour l'analyse phylogénétique, l'alignement de séquences multiples a été effectué à l'aide du logiciel MEGA7 par l'option MUSCLE, suivi d'un ajustement manuel. Les séquences des différentes régions alignées pour chaque isolat ont ensuite été concaténées ensemble en utilisant le logiciel Mesquite 3.6. Les analyses du maximum de vraisemblance (Maximum likelihood = ML) ont été appliquées sur tous les alignements individuels et concaténés en utilisant MEGA7 avec le modèle « Tamurai-Nei ». Le support des branches internes de l'arbre a été évalué par la méthode bootstrap avec 1000 répliques (Visagie et *al.*, 2013 ; Houbraken et *al.*, 2014 ; Siqueira et *al.*, 2017).

## **II.6. Sélection du milieu de culture optimum**

Pour optimiser la production des métabolites bioactifs, cinq milieux de culture ont été testés : MEA, PDA, SDA, YES et YMEA. Le test de l'activité antimicrobienne a ensuite été effectué en utilisant la technique des cylindres d'agar décrite précédemment contre *Escherichia coli* 1, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* 1, *Enterococcus faecalis* 1, *Staphylococcus aureus* 2, *Bacillus cereus* et une levure *Candida albicans*. Après avoir recueilli les résultats, une comparaison des moyennes des zones d'inhibition a été effectuée pour déterminer le meilleur milieu de production qui sera utilisé lors de l'étape suivante de la fermentation (Devaraju and Satish, 2011).

## **II.7. Choix du meilleur solvant d'extraction et du type de fermentation**

Pour sélectionner le meilleur type de fermentation et le meilleur solvant permettant une meilleure production et extraction des molécules bioactives et donnant une activité antimicrobienne maximale, chaque champignon endophyte a été cultivé sur son milieu optimum liquide et solide à petit volume, ensuite une extraction par trois solvants de polarité différente a été réalisée.

### **II.7.1. Fermentation et extraction**

Des disques de 1 cm de diamètre ont été excisés de la périphérie des cultures fongiques âgées de 7 jours, puis pour chaque champignon endophyte, deux disques ont été inoculés dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL du milieu liquide sélectionné à l'étape précédente et sur 5 boîtes contenant le même milieu mais gélosé. Les Erlenmeyers et les boîtes ont été incubés à 28°C pendant 21 jours avec agitation périodique à 150 tr/min (tour par minute) pour les Erlenmeyers.

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

| Régions  | Amorces pour PCR standard (5'-3')         | Amorces pour séquençage (5'-3')           | Taille (paires de bases) | Références   | Isolats fongiques                          |
|--|---|---|--------------------------|--|--|
| <b>Internal Transcribed Spacer (ITS)</b>               | <b>ITS1F</b><br>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA    | <b>ITS1F</b><br>CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA    | ~ 450-800                | (Visagie et al., 2014 ; Demirel, 2016 ; Raja et al., 2017)     | Tous les isolats                           |
|  | <b>ITS4</b><br>TCCTCCGCTTATTGATATGC       | <b>ITS4</b><br>TCCTCCGCTTATTGATATGC       |                          |  |  |
| <b>β-tubuline (BenA)</b>                               | <b>Bt2a-F</b><br>GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC | <b>Bt2a-F</b><br>GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC | ~500                     | (Visagie et al., 2014 ; Raja et al., 2017 ; Jens et al., 2004) | PLF5/PLR17, PLT8/PLT12, JOR22, JOR31, PLR9 |
|  | <b>Bt2b-R</b><br>ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC | <b>Bt2b-R</b><br>ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC |                          |  |  |
| <b>RNA polymerase II second largest subunit (RPB2)</b> | <b>5F-F</b><br>GAYGAYMGWGATCAYTTYGG 7     | <b>5F</b><br>GAYGAYMGWGATCAYTTYGG 7       | ~1000                    | (Visagie et al., 2014)   | PLF5/PLR17, PLT8/PLT12, JOR22, JOR31       |
|  | <b>Ou 5FeurF</b><br>GAYGAYCGKGAYCAYTTCGG  |   |                          |  |  |
| <b>Large-subunit (LSU)</b>                             | <b>LR0R</b><br>ACCCGCTGAACTTAAGC          | <b>LR0R</b><br>ACCCGCTGAACTTAAGC          | ~800                     | (Demirel, 2016 ; Raja et al., 2017)                            | PLF5/PLR17, PLT8/PLT12, PLT, PLT10, JOR26  |
|  | <b>LR5</b><br>TCCTGAGGGAACTTCG            | <b>LR5</b><br>TCCTGAGGGAACTTCG            |                          |  |  |
| <b>Calmoduline (CaM)</b>                               | <b>CMD5-F</b><br>CCGAGTACAAGGARGCCTTC     | <b>CMD5-F</b><br>CCGAGTACAAGGARGCCTTC     | ~580                     | (Visagie et al., 2014)   | PLR9                                       |
|  | <b>CMD6-R</b><br>CCGATRGAGGTCATRACGTGG    | <b>CMD6-R</b><br>CCGATRGAGGTCATRACGTGG    |                          |  |  |

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

| Régions                                      | Amorces pour PCR standard (5'-3') | Amorces pour séquençage (5'-3')                       | Taille (paires de bases) | Références          | Isolats fongiques      |
|--|-----------------------------------|---|--------------------------|---------------------|------------------------|
| Translation elongation factor 1-alpha (TEF1) |                                   | <b>EF1-1018F</b><br>GAYTTCATCAAGAACATGAT              | ~1000                    | (Raja et al., 2017) | PLF5/PLR17, PLT8/PLT12 |
|  |                                   | <b>EF1-1018F</b><br>GAYTTCATCAAGAACATGAT              |                          |                     |                        |
|  |                                   | <b>EF1-1577F</b><br>CAR GAY GTB TAC AAG ATY<br>GGT GG |                          |                     |                        |
|  |                                   | <b>EF1-2218R</b><br>ATG ACA CCR ACR GCR ACR<br>GTY TG |                          |                     |                        |
|  |                                   | <b>EF1-1567R</b><br>ACH GTR CCR ATA CCA CCR<br>ATC TT |                          |                     |                        |
|  |                                   | <b>EF1-2218R</b><br>ATG ACA CCR ACR GCR ACR<br>GTY TG |                          |                     |                        |

**Tableau 4.** Les programmes des cycles thermiques de la PCR pour chaque région d'ADN amplifiée.

| Régions | Amplification | Conditions des cycles d'amplification |                 |  |                |               |                   | Références                                      |               |
|---------|---------------|---------------------------------------|-----------------|--|----------------|---------------|-------------------|---|---------------|
|         |               | Dénaturation initiale                 | Nombre de cycle | Dénaturation                                   | Hybridation    | Elongation    | Elongation finale |   |               |
| TEF1    | Touchdown     | 94°C / 2 min                          | 9               | 94°C / 45 sec                                  | 66°C / 45 sec  | 72°C / 1min   | /                 | (Raja et al., 2017)                             |               |
|         |               | /                                     |                 | En diminuant de 1°C à chaque cycle 66°C – 56°C | /              |               |                   |   |               |
|         |               | /                                     |                 | 36   | 94°C / 45 sec  | 56°C / 45 sec | 72°C / 1min       |   | 72°C / 10 min |
| RPB2    | Touch-up      | 94 °C 5 min                           | 5               | 94°C / 45 sec                                  | 50°C / 45 sec  | 72°C / 60 sec | /                 | (Visagie et al., 2014 ; Samson et al., 2014)    |               |
|         |               | /                                     |                 | 5  | 94°C / 45 sec  | 52°C / 45 sec | 72°C / 60 sec     |   | /             |
|         |               | /                                     |                 | 30   | 94°C / 45 sec  | 55°C / 45 sec | 72°C / 60 sec     |   | 72°C / 7 min  |
| ITS     | Standard      | 94°C / 5 min                          | 35              | 94°C / 30 sec                                  | 55°C / 30 sec  | 72°C / 1min   | 72°C / 7 min      | (Visagie et al., 2014 ; Moretti et Susca, 2017) |               |
| LSU     | Standard      | 95°C / 10 min                         | 40              | 95°C / 30 sec                                  | 54 °C / 30 sec | 72°C / 1min   | 72°C / 7 min      | (Alvarez et al., 2016)                          |               |
| BenA    | Standard      | 95°C / 10 min                         | 35              | 95°C / 45 sec                                  | 58 °C / 45 sec | 72°C / 1min   | 72°C / 7 min      | (Moretti et Susca, 2017)                        |               |
| CaM     | Standard      | 94°C / 5 min                          | 36              | 94°C / 45 sec                                  | 56°C / 45 sec  | 72°C / 1min   | 72°C / 10 min     | (Visagie et al., 2013; Moretti et Susca, 2017)  |               |

Après la croissance complète, les cultures liquides ont été filtrées à travers une étamine stérile pour séparer le mycélium du bouillon fermenté. Les filtrats obtenus ont ensuite été extraits séquentiellement trois fois en utilisant trois solvants de polarité différente ; n-hexane, dichlorométhane et acétate d'éthyle ; pour cela, des volumes égaux de chaque solvant ont été ajoutés aux filtrats et les flacons contenant ces mélanges ont été placés sur un agitateur pendant 2 heures pour permettre une complète extraction. Ces mélanges ont ensuite été placés dans une ampoule à décanter et maintenus pendant 1 heure jusqu'à séparation de deux couches limpides non miscibles, pour au final récupérer les phases organiques (Devaraju and Satish, 2011).

Pour la fermentation en milieu solide, les géloses de chaque champignon ont été décollées des boîtes de Pétri et placées dans des Erlenmeyers contenant 100 mL du solvant d'extraction. L'ensemble (biomasse fongique et gélose) a ensuite été broyé et laissé toute une nuit pour macérer. Le broyat a été soumis à une étape de filtration pour récupérer la phase organique et les résidus de culture ont été réextraits avec le deuxième et le troisième solvant de la même manière.

Les phases organiques provenant de la fermentation en milieu liquide et solide ont été évaporées à l'aide du l'évaporateur rotatif à une température de 45 °C. Les extraits bruts obtenus ont été pesés, dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), passés à travers une membrane de filtration de 0,2 µm et maintenus à 4 °C.

### **II.7.2. Activité antimicrobienne**

Tous les extraits bruts obtenus pendant l'étape précédente ont été testés pour leur potentiel antimicrobien et les résultats obtenus ont ensuite été traités statistiquement. Le test a été réalisé en utilisant la méthode des puits contre 8 bactéries, *Escherichia coli* 1, *Pseudomonas aeruginosa* 1, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* 1, *Enterococcus faecalis* 1, *Staphylococcus aureus* 2, *Bacillus cereus* et une levure *Candida albicans*.

Les souches bactériennes et de levure ont été cultivées et incubées à 37 °C sur la gélose Plate Count Agar (PCA) pendant 18 heures et SDA pendant 48 heures respectivement ; quelques colonies de chaque bactérie et de levure ont été mises en suspension dans du NaCl (0,85%) et mélangées pendant 15 secondes pour assurer l'homogénéité. La turbidité a ensuite été ajustée à  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL, ce qui correspond à une densité optique égale à 0.12- 0.15 à 625 nm pour les bactéries et à  $1-5 \times 10^6$  cellules/mL, ce qui correspond à une densité optique égale à 0.12- 0.15 à 530 nm pour les levures en utilisant la spectrophotométrie. Les suspensions microbiennes ont étéensemencées uniformément avec des écouvillons stériles sur de la gélose MH pour les bactéries et SDA pour la levure. En utilisant un emporte-pièce stérile, des puits de 6 mm ont été réalisés dans les gélosesensemencées, ces puits ont été remplis avec 30 µL des

extraits fongiques stérilisés. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure à 37 °C, et les diamètres des zones claires d'inhibition entourant les puits ont été mesurés. Les tests ont été effectués en duplicata (Abiala et *al.*, 2016 ; Mefteh et *al.*, 2018).

## **II.8. Fermentation à grand volume**

Après avoir sélectionné le meilleur mode de fermentation pour chaque isolat et après sélection de l'acétate d'éthyle comme meilleur solvant d'extraction pour tous les isolats endophytes, la préparation de l'extrait d'acétate d'éthyle a été effectuée d'une manière similaire à celle utilisée dans l'étape ci-dessus. Cependant, avant l'évaporation, l'acétate d'éthyle a été lavé avec un volume égal d'eau pour éliminer les constituants polaires et les sels restants. Ensuite, l'extrait sec de l'acétate d'éthyle a été partagé entre de l'hexane et du méthanol à 90% (1 :1) pour éliminer les acides gras et autres constituants non polaires. La phase de méthanol à 90% restante semi-purifiée a été concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 45 °C et finalement dissoute dans du DMSO (Kumar and Kaushik, 2013).

## **II.9. Activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle contre les bactéries multirésistantes et les champignons pathogènes**

La fraction semi-purifiée d'acétate d'éthyle a été testée pour sa capacité à inhiber la croissance d'une large gamme de microorganismes pathogènes composée de 25 bactéries ; dont 17 sont des bactéries multirésistantes, ainsi qu'une levure et quatre champignons filamenteux (**tableau 1 et 2**). Pour cela, des suspensions bactériennes ( $1-2 \times 10^8$  UFC/mL), levurienne ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) et sporales ( $0.4- 5 \times 10^6$  spore/mL) ont été préparées et la technique des puits précédemment décrite a été utilisée. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif, la vancomycine et l'imipénème comme contrôles positifs pour les bactéries à Gram positif et à Gram négatif respectivement (Abiala et *al.*, 2016).

### **II.9.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)**

Les CMI des extraits d'acétate d'éthyle des isolats ont été déterminées par la technique colorimétrique de microdilution en bouillon dans des plaques de microtitration à 96 puits avec des modifications mineures, conformément aux recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Rani et *al.*, 2017).

Des plaques contenant 90 µL du bouillon Muller Hinton (MHB) pour les bactéries et le milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640) pour la levure ont été préparées ; ensuite 90 µL d'extrait fongique dissous dans du DMSO (solution mère dissous dans du DMSO dilué au  $1/ 10^{\text{ème}}$  dans du MHB ou de RPMI-1640) ont été déposés dans la première rangée de la

plaque. Des dilutions en cascade ont été ensuite effectuées à l'aide d'une micropipette (A1–A10) pour obtenir des concentrations finales dont on a besoin.

Les inoculums des microorganismes à tester ont été ajustés à 0,5 McFarland correspondant à  $10^8$  UFC/mL et à  $5 \times 10^6$  cellules/mL pour les bactéries et la levure respectivement. Les suspensions microbiennes ajustées ont ensuite été diluées au 1:20 dans le MHB pour les bactéries et au 1:50 suivie d'une dilution au 1:20 dans RPMI-1640 pour la levure afin d'obtenir des inoculums de  $10^6$  UFC/mL et de  $5 \times 10^3$  cellules/mL respectivement. 10  $\mu$ L des suspensions préparées ont ensuite été inoculés dans les puits des plaques (A1-A11) pour avoir des charges finales approximatives de  $2 \times 10^5$  UFC/mL pour les bactéries et de  $2.5 \times 10^3$  cellule / mL pour la levure.

Les colonnes A11 de chaque plaque contenant du MHB ou du RPMI-1640 et les microorganismes d'essai correspondaient au contrôle négatif. Un contrôle à blanc ne contenant que du MHB ou du RPMI-1640 dans la colonne A12 permettait de vérifier la stérilité. La vancomycine (Bactéries à Gram +), l'imipénème (Bactéries à G-), l'amphotéricine B (levure) et le DMSO dilué au 1/10<sup>ème</sup> ont été utilisés comme contrôles positifs et négatif respectivement.

Après incubation des plaques à 37 °C pendant 24 et 48 heures pour les bactéries et la levure respectivement, 10  $\mu$ L d'une solution à 0.2% de chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium ont été ajoutés dans chaque puit, les plaques ont été ensuite incubées à 37 °C pendant 1 heure. Le changement visible de couleur du violet au rose indique une croissance des microorganismes. La valeur MIC de l'extrait a été considérée comme étant la concentration la plus faible qui n'a montré aucune croissance microbienne.

## **II.9.2. Détermination de la concentration minimale fongistatique (CMF)**

A partir de colonies fongiques âgées de 7 jours, une suspension sporale a été ajustée à 0,5 McFarland. Ensuite, une dilution de 1 : 50 a été réalisée dans le milieu RPMI 1640, ceci correspond à 2 fois la densité dont on a besoin. 100  $\mu$ L de chaque suspension sporale ont été transférés dans les puits de la microplaque contenant déjà 100  $\mu$ L des extraits en double concentration, ceci permet d'avoir un inoculum final d'environ 0,4 à  $5 \times 10^4$  UFC / mL. Les deux dernières lignes ont été réservées pour le contrôle positif (Amphotéricine B) et le contrôle négatif (DMSO à 1%). Les deux dernières colonnes ont servi de contrôle de croissance et de stérilité. Après incubation à 35°C pendant 46 à 50 heures, la CMF est déterminée comme étant la plus faible concentration de l'extrait inhibant la croissance du champignon pathogène visuellement en comparants aux puits du contrôle de croissance (sans extraits) (CLSI, 2002).

### **II.9.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La concentration bactéricide minimale (CMB) a été déterminée en utilisant les résultats du test précédent. Les concentrations ne montrant aucune croissance bactérienne visible ont été déterminées, et à partir de ces puits, 10 µL ont été prélevés et striés sur des plaques d'agar pour juger de la viabilité. Après une incubation à 37 °C pendant 24 heures, les concentrations les plus faibles des extraits n'ayant pas permis une croissance bactérienne (empêchant la croissance de > 99,9% des cellules microbiennes) sur le milieu solide ont été considérées comme les valeurs des CMB (Rakholiya et *al.*, 2015).

### **II.9.4. Détermination de l'indice CMB/CMI**

Pour déterminer l'efficacité et l'effet bactéricide ou bactériostatique sur la croissance des bactéries des extraits d'acétate d'éthyle, le rapport (CMB / CMI) a été calculé. Si le rapport  $CMB / CMI \leq 4$  l'effet est bactéricide et si  $4 < CMB / CMI < 32$  l'effet est bactériostatique (Rakholiya et *al.*, 2015).

### **II.9.5. Etude de la cinétique de létalité (Time kill)**

Afin d'évaluer le mode d'action des différents extraits fongiques, une cinétique de létalité en fonction du temps et des concentrations a été réalisée ; pour cela ; un volume de 200 µL des suspensions bactériennes dont la densité a été ajustée à 0,5 McFarland, et diluée 1/10 fois dans le milieu MHB a été introduit dans des tubes Falcon stériles de 15 mL contenant 1800 µL de MHB et différentes concentrations des extraits fixées à CMI/2, CMI et CMI x2 pour l'isolat JOR26 et CMI, CMI x2 et CMI x4 pour le reste des isolats. La concentration finale des suspensions bactériennes présente dans les tubes était d'environ  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Des tubes contenant 1% de DMSO, l'inoculum bactérien, du MHB et sans extraits ont été utilisés comme contrôles positifs. Tous les tubes ont ensuite été incubés à 37 °C dans un agitateur rotatif à 150 tr/min. Un volume de 100 µL d'échantillon a été prélevé de chaque tube à (0, 1, 2, 4, 6, 12 et 24 heures d'incubation), 4 dilutions décimales ont été réalisées et 25 µL de chaque dilution ont été étalés sur MHA et incubés à 37 °C. Après 24 heures d'incubation, les colonies bactériennes émergentes ont été comptées, les UFC's/mL ont été calculées et comparées avec celles des cultures témoins sans extraits.

Le pourcentage de réduction du nombre total d'UFC viables a été compté en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de réduction} = \frac{\text{Le nombre initial} - \text{Le nombre à un intervalle X}}{\text{nombre initial}} \times 100$$

Une courbe  $\log_{10}$  UFC/mL en fonction du temps a été tracée pour déterminer le taux de destruction. En effet, l'effet bactéricide est obtenu avec un pourcentage de létalité de 90% après 6 heures, ce qui équivaut 99,9 % ( $\geq 3 \log_{10}$ ) de létalité après 24 heures. Cependant, si l'inoculum d'origine est maintenu ou la réduction est inférieure à 99,9% ( $< 3 \log_{10}$ ), l'effet est bactériostatique (Rani et *al.*, 2017 ; Perim et *al.*, 2018).

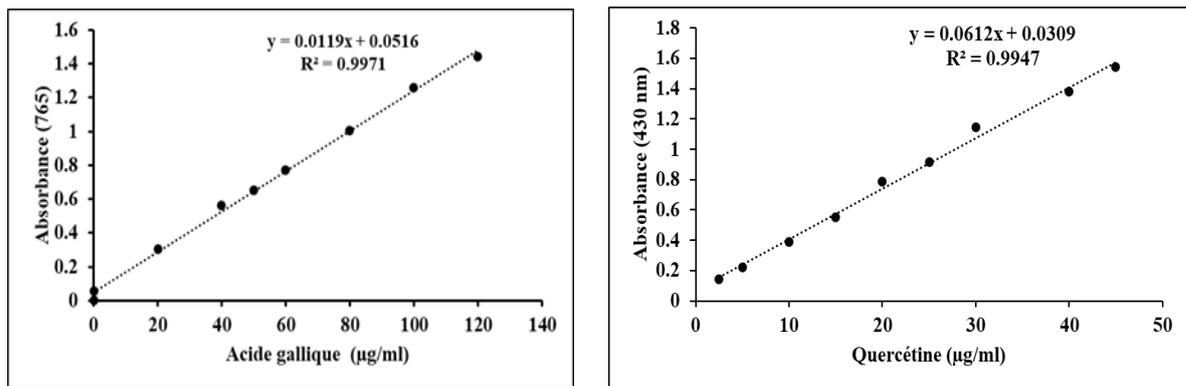
## **II.10. Activité antioxydante**

### **II.10.1. Détermination de la teneur phénolique totale**

La teneur en composés phénoliques (TCP) des extraits d'acétate d'éthyle des champignons endophytes a été déterminée par le test basé sur le réactif de Folin-Ciocalteu décrit par Tan et *al.* (2017) avec des modifications mineures. En bref, 10  $\mu$ L des extraits d'acétate d'éthyle à 1 mg/mL ont été oxydés avec 50  $\mu$ L du réactif Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillée) pendant 5 minutes à température ambiante. La réaction a ensuite été neutralisée avec 40  $\mu$ L de carbonate de sodium à 7,5%. Après 30 minutes à une température ambiante, l'absorbance de chaque puits a été mesurée avec un lecteur de microplaques à 765 nm. La même procédure a été répétée pour des aliquotes de (0-160  $\mu$ g/mL) d'une solution méthanolique d'acide gallique utilisés comme étalons pour la courbe d'étalonnage (**figure 14**). Le contenu phénolique total a été exprimé en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec ( $\mu$ g EAG/mg d'extrait).

### **II.10.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes**

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode spectrophotométrique sur microplaques à 96 puits en utilisant du trichlorure d'aluminium (Tan et *al.*, 2017). Pour cela, 100  $\mu$ L d'eau distillée, 10  $\mu$ L de  $\text{NaNO}_2$  (50 g/L) et 25  $\mu$ L du standard ou des extraits (1 mg/mL) ont été ajoutés successivement dans chacun des 96 puits de la microplaque, le mélange a été agité puis laisser au repos pendant 6 minutes à température ambiante. 15  $\mu$ L d'une solution aqueuse d' $\text{AlCl}_3$  (10% p/v) ont ensuite été ajoutés au mélange. Après 6 minutes, les échantillons ont été alcalinisés en utilisant 50  $\mu$ L d'une solution aqueuse de NaOH (1 M) et 50  $\mu$ L d'eau distillée. Les mélanges ont été incubés à température ambiante pendant 15 minutes, puis l'absorbance a été déterminée à 510 nm en utilisant un lecteur de microplaques. La même procédure a également été effectuée pour la quercétine en tant que solution standard avec des concentrations comprises entre 0 et 40  $\mu$ g/mL pour la construction de la courbe d'étalonnage (**figure 14**). Le contenu total en flavonoïdes a été exprimé en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EQ/mg d'extrait).



**Figure 14.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des Polyphénols (à droite) de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes (à gauche). Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

### II.10.3. Evaluation de l'activité antioxydante

#### II.10.3.1. Test du pouvoir piègeur du radical DPPH

L'activité antioxydante des extraits et de l'acide ascorbique a été mesurée en se basant sur le pouvoir de piégeage du radical libre DPPH en utilisant la méthode décrite par Caicedo et *al.*, (2019) et Quy et Xuan (2019) avec quelques ajustements. Pour ce faire, différentes concentrations des extraits fongiques ont été préparées (2-1024  $\mu\text{g/mL}$ ), puis 50  $\mu\text{L}$  de chaque concentration ont été transvasés dans les puits des microplaques, auxquelles, 100  $\mu\text{L}$  de DPPH (0,2 mM DPPH dans le méthanol) ont été ajoutés. Après mélange, la réaction a été laissée dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes et l'absorbance a été mesurée à 517 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Tunable Microplate Reader). L'acide ascorbique (AA) a été utilisé comme témoin positif et l'activité de piégeage du radical DPPH des extraits fongiques a été exprimée en pourcentage d'inhibition. La diminution de l'absorbance de la solution de DPPH indique une augmentation de l'activité de piégeage du radical DPPH.

L'activité de piégeage du radical DPPH (%) a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{DPPH Scavenging activity (\%)} = \frac{(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}})}{\text{contrôle}} \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$  = Absorbance du contrôle (solvent + DPPH).

$A_{\text{échantillon}}$  = Absorbance de l'extrait fongique (échantillon + DPPH).

La valeur  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) a été déterminée comme la concentration requise pour diminuer la concentration initiale en radical DPPH de 50%. Par conséquent, la valeur  $\text{IC}_{50}$  la plus faible indiquait l'activité de piégeage du radical DPPH la plus élevée.

### **II.10.3.2. Test du pouvoir réducteur (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power) TBTZ**

L'activité antioxydante des extraits a été mesurée en utilisant le test du pouvoir réducteur du fer (FRAP) comme il a été décrit par Tešanović et *al.* (2017) avec quelques modifications. Les solutions mères comprenant une solution tampon d'acétate (300 mM, pH 3,6) (25 mL), une solution 10 mM de 2,4,6-tris- (2-pyridyl) -S-triazine (TPTZ) dans du HCl 40 mM (2,5 mL) et une solution aqueuse de chlorure ferrique  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM) (2,5 mL) a été préparée. Une solution de travail fraîche du réactif FRAP a été préparée en mélangeant 25 mL du tampon acétate, 2,5 mL de TPTZ et 2,5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

10  $\mu\text{L}$  des extraits de champignons endophytes à différentes concentrations (2-1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ont été transférés dans les puits des microplaques avec 225  $\mu\text{L}$  du réactif FRAP fraîchement préparé. 10  $\mu\text{L}$  du solvant ( $\text{H}_2\text{O}$ ) avec 225  $\mu\text{L}$  du réactif FRAP ont été utilisés comme blanc. Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité à 37 °C, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 593 nm. Les valeurs du pouvoir réducteur exprimées en milligramme d'équivalents d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g d'extrait) ont été calculées selon la courbe d'étalonnage standard de la solution d'acide ascorbique (Tešanović et *al.*, 2017).

### **II.10.3.3. Test du pouvoir réducteur (PR) du fer**

Le pouvoir réducteur des extraits a été testé en suivant la méthode décrite par Hameed et *al.* (2017) et Prihantini et Tachibana (2017) avec de légères modifications. Les extraits d'acétate d'éthyle des champignons endophytes à différentes concentrations (2-1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}$ ) ont été mélangés avec du tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 6,5, 500  $\mu\text{L}$ ) et du ferricyanure de potassium  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1%, 500  $\mu\text{L}$ ) suivi d'une incubation à 50°C pendant 20 minutes. Après incubation, la réaction a été interrompue par addition d'acide trichloracétique (10%, 500  $\mu\text{L}$ ) et centrifugée à 3000 tr/min pendant 10 minutes. 500  $\mu\text{L}$  du surnageant ont été mélangés avec 500  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et 100  $\mu\text{L}$  de la solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 0,1%. Après 10 minutes, l'absorbance de toutes les solutions a été mesurée à 700 nm. Une absorbance plus élevée du mélange réactionnel indique un meilleur pouvoir réducteur. Les valeurs du pouvoir réducteur ont été exprimées en milligramme d'équivalents d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g d'extrait).

## **II.11. Détermination de la production du L-asparaginase par les champignons endophytes**

### **II.11.1. Criblage qualitative de la production du L-asparaginase sur gélose**

La méthode de screening sur boîte est une procédure de criblage qualitative, simple et rapide pour la production de L-asparaginase (Uzma et *al.*, 2016). Une augmentation du pH due

à l'accumulation de l'ammoniac dans le milieu entraîne le changement de couleur du milieu du jaune au rose et suggère que les champignons endophytes sont capables d'utiliser l'asparagine (substrat) par la sécrétion de l'asparaginase.

Afin de vérifier la production de L-asparaginase par les champignons endophytes, ces derniers ont été inoculés sur des boîtes contenant le milieu Modified Czapek Dox (MCD). Tous les composants du MCD étaient bien mélangés à l'exception de l'agar, du L-asparagine et du rouge de phénol. Le pH a été ajusté avec du HCl (1N) à 6.2, puis l'agar a été ajouté et mélangé aux autres ingrédients, et le milieu a été passé à l'autoclave (121°C/20 minutes). Après refroidissement du milieu, le L-asparagine et le rouge de phénol stérilisés par filtration ont été ajoutés et mélangés correctement. Des disques de 5 mm des cultures fongiques âgées de 7 jours ont été inoculés sur la gélose MCD puis incubé à 28°C pendant 5-7 jours. Des boîtes non inoculées ont servi de contrôle

Les isolats qui présentaient une zone rose autour des colonies indiquaient une production de L-asparaginase. Le changement de couleur du milieu du jaune au rose est causé par libération de l'ammoniac, qui est le sous-produit de l'hydrolyse du L-asparagine provoquée par l'enzyme L-asparaginase. L'indice enzymatique a ensuite été calculé selon la formule suivante :

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

Les champignons qui ont donné les indexes enzymatiques les plus élevés ont été sélectionnés pour l'estimation de l'activité enzymatique (El-Gendy et *al.*, 2017).

### **II.11.2. Production de L-asparaginase par fermentation submergée et extraction**

Les isolats fongiques qui ont montré des résultats positifs dans le test précédent ont été sélectionnés et la production de L-asparaginase a été réalisée par fermentation submergée en utilisant le milieu liquide MCD. Les isolats fongiques ont été cultivés sur le milieu PDA et incubés à 28 °C pendant 5 jours. Des disques de 5 mm des inoculums ont été prélevés des cultures fongiques en utilisant un emporte-pièce et inoculés dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL du milieu liquide MCD (pH 6,4) et incubé à 28 °C pendant 7 jours. Un milieu non inoculé a servi de témoin. Après incubation, les cultures fongiques ont été récoltées par filtration sur papier filtre Whatman n°1. Les filtrats ont été clarifiés à travers quatre couches de gaze ; centrifugés à 10 000 tr/min pendant 15 minutes et les surnageants ont été utilisés comme enzyme brute pour estimer l'activité de la L-asparaginase (Bhosale et As-Suhbani 2019).

### II.11.3. Evaluation quantitative de la production du L-asparaginase

L'activité de L-asparaginase a été mesurée selon la méthode de Uzma *et al.* (2016), qui utilise la réaction de Nesslerization dans laquelle l'ammoniac libéré du L-asparagine est indiqué par la formation d'une solution de couleur orange.

A un mélange réactionnel contenant 0,5 mL de tampon tris HCl 0.5 M (pH 8,2) et 0,1 mL de L-asparagine 0.04 M, 1 mL de l'enzyme brute a été ajouté, le volume du mélange réactionnel a été complété à 2 mL avec de l'eau distillée et incubé à 37 °C pendant 30 minutes. La réaction a été arrêtée ensuite par addition de 0.5 mL d'acide trichloroacétique (TCA) 1.5 M et centrifugée à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Des tubes ont été préparés en ajoutant la source d'enzyme après l'ajout du TCA, ont servis de blanc. Après centrifugation, 0.1 mL du surnageant est dilué dans 3.7 mL d'eau distillée et traité avec 0.2 mL du réactif de Nessler et incubé pendant 15 à 20 minutes à une température ambiante. L'absorbance a été enregistrée ensuite à 450 nm.

La quantité d'ammoniac libérée par l'échantillon a été calculée en utilisant une courbe standard de sulfate d'ammonium et l'activité enzymatique a été exprimée en unité internationale (UI) (**figure 15**). Une unité internationale de L-asparaginase est la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 µmol d'ammoniac en 1 minute par mL dans les conditions du test.

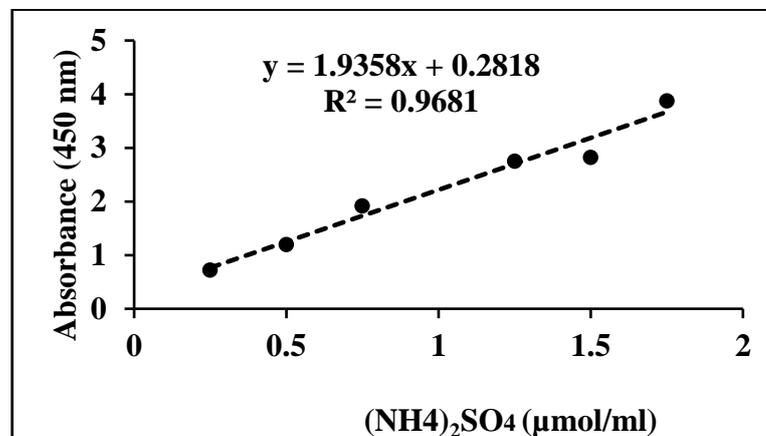
$$\text{Enzyme (UI/ml)} = \frac{(\mu \text{ mole de NH}_3 \text{ libérée}) (2.5)}{(0.1) (20) (1)}$$

Où ; 2.5 = Volume initial du mélange enzymatique (mL)

0.1 = Volume du mélange enzymatique utilisé dans la réaction finale (mL)

30 = Temps d'incubation (minutes)

1 = Volume d'enzyme utilisée (mL)



**Figure 15.** Courbe d'étalonnage de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (µmol/mL). Chaque point représente la moyenne ± SD (n = 3).

## **II.12. Évaluation de l'effet cytotoxique et antiprolifératif sur les cellules tumorales *in vitro***

L'activité antiproliférative des extraits fongiques a été évaluée initialement contre les cellules HepG2 en utilisant le protocole standard de la méthodologie colorimétrique MTT (bromure de 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium).

### **II.12.1. Culture des lignées cellulaires**

Les cellules ont été cultivées dans du RPMI-1640 sans glutamine, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>. Après incubation, le milieu a été rejeté et les cellules ont ensuite été lavées une fois avec un mélange (0.25% Trypsine /0.02% EDTA) pour éliminer les cellules mortes. Après avoir rejeté le mélange de lavage, les cellules ont été encore une fois traitées avec le même mélange, agitées et incubées 5 minutes à 37 °C pour détacher les cellules vivantes adhérentes. Après cela, le milieu complet RPMI-1640 additionné de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal permettant l'arrêt de l'action de la trypsine a été rajouté aux flacons de culture (Malhão et *al.*, 2019).

### **II.12.2. Test de l'MTT**

Les suspensions cellulaires ont été diluées avec du milieu RPMI-1640 et ajustées approximativement à 5.10<sup>4</sup> cellules/mL. Après cela, 100 µL des cellules HepG2 ont étéensemencées dans des plaques de culture tissulaire à 96 puits et laissées se fixer pendant 24 heure à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Les extraits de champignons endophytes et la doxorubicine (contrôle positif) ont été dissous dans du DMSO afin d'obtenir une solution mère à 10% (p/v). Une solution de travail (1% v/v) a ensuite été préparée en dissolvant l'extrait dans le milieu RPMI-1640. Pour toutes les expériences, la concentration finale de DMSO dans le milieu était de 1% (v/v) et les témoins n'ont reçu que 1% de DMSO. Après 24 heures d'incubation, 100 µL des extraits à différentes concentrations ont été ajoutés aux cellules adhérentes. Et une incubation pendant 96 heures à 37 °C dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub> a été réalisée. Des cellules traitées au DMSO et à la doxorubicine ont été préparées comme témoin négatif et positif respectivement. Le milieu ne contenant que les cellules a été utilisé comme témoin de croissance.

Après la période visée, les plaques ont été vidées du RPMI-1640 et remplacé par 100 µL de la solution de MMT (5 mg /mL dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS)) et incubées pendant 3 heures à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37 °C. Le contenu des plaques de culture a

ensuite été centrifugé pendant 2 minutes à 1.800 tr/min à 4 °C, le surnageant éliminé et 100 µL de DMSO ont été ajoutés pour dissoudre les cristaux de formazan précédemment constitués et précipités. Après une légère agitation de 15 minutes, l'absorbance a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (Zhao et *al.*, 2014; Minarni et *al.*, 2017; Malhão et *al.*, 2019).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au témoin solvant (cellules incubées avec du milieu de culture avec 1% de DMSO) et calculés à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = [(\text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle})] \times 100$$

Abs contrôle = DO moyenne des cellules non traitées ;

Abs échantillon = DO moyenne des cellules traitées.

La relation entre les cellules survivantes et les concentrations des extraits est tracée pour obtenir la courbe de survie. La concentration d'extrait qui a entraîné la mort 50% des cellules cancéreuses (CC<sub>50</sub>) a ensuite été calculée.

Les extraits ayant l'activité la plus élevée sur la base de la valeur des CC<sub>50</sub> (CC<sub>50</sub> très basses) ont ensuite été testés sur d'autres lignées de cellules cancéreuses A549, U251 et MDA-MB 231 en utilisant une gamme de concentrations de 0.01-20 µg/mL. Par contre les extraits ayant montré des valeurs de CC<sub>50</sub> élevée ont été testés contre des lignées saines HaCaT et C8-D1A pour évaluer leurs cytotoxicités en utilisant la même méthode décrite ci-dessus, la gamme de concentration utilisée est de 0.01-40 µg/mL.

## **II.13. Détection de la griséofulvine par MALDI-TOF MS (Autoflex-speed)**

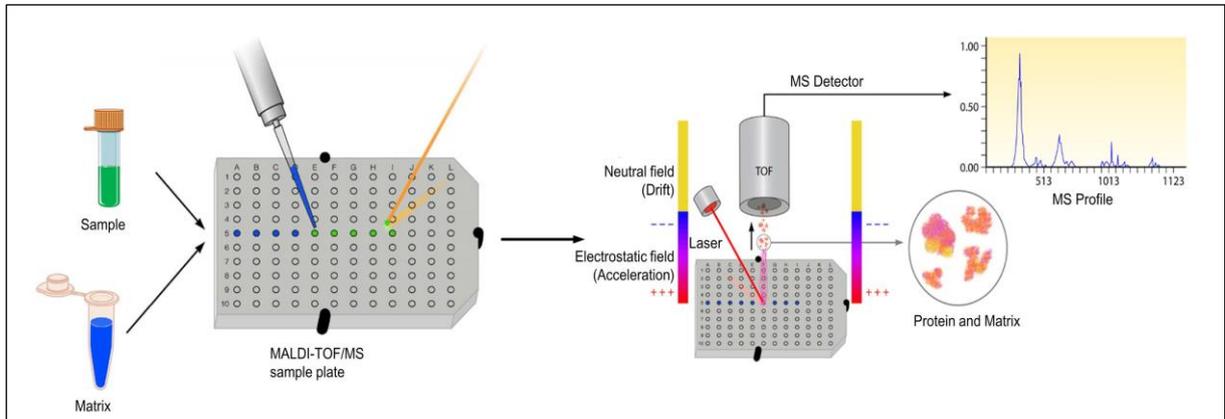
### **II.13.1. Principe de la méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF.**

Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse, couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI = **M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onisation) et un analyseur à temps de vol (TOF = **T**ime-**O**f-**F**light mass spectrometry) (Seng et *al.*, 2009).

On peut schématiser un spectromètre de masse en 4 parties (**figure 16**) : Le système d'introduction de l'échantillon, la chambre d'ionisation produisant des ions en phase gazeuse, l'analyseur, séparant les ions en fonction de leur rapport masse sur charge et le détecteur transformant le courant ionique en courant électrique. L'ionisation est l'étape la plus importante pour l'identification des molécules (Descy et *al.*, 2010).

La principale fonction de la spectrométrie de masse MALDI TOF (Bruker Daltonics, Germany), en microbiologie clinique, est l'identification des microorganismes par l'analyse de leurs protéines totales. La spectrométrie de masse combinée à une désorption- ionisation laser assistée par une matrice, d'un microorganisme isolé, permet de réaliser cette identification en

quelques minutes et avec une haute précision (Seng et al., 2009). Également, la spectrométrie de masse MALDI TOF est une technique physique d'analyse extrêmement sensible, permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt comme les protéines, les oligosaccharides, les oligonucléotides et les polymères (Jerome Jeyakumar et al., 2018).



**Figure 16.** Représentation schématique du fonctionnement d'un spectromètre de masse MALDI-TOF (Suarez et al., 2015).

### II.13.2. Préparation des échantillons pour MALDI-TOF MS

L'extrait fongique de l'isolat *Penicillium griseofulvum* JOR22 et la griséofulvine pure ont été dissous dans du méthanol à une concentration de 100 µg/mL, 1,5 µL des solutions ont été déposés en triple sur une plaque cible MALDI en acier (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Après séchage à une température ambiante pendant 15 minutes, 1,5 µL de suspension de matrice HCCA (acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamique saturé dissous dans la solution contenait 50% d'acétonitrile, 47,5% d'eau HPLC et 2,5% d'acide trifluoroacétique) ont ensuite été superposés sur chaque point pour permettre la cristallisation. 1,5 µL de la solution de matrice HCCA ont été déposés en triple sur la plaque cible comme contrôle négatif. La cible a été ensuite séchée à l'air et à une température ambiante pendant 15 minutes (Hleba et al., 2017).

### II.13.3. Analyse des échantillons par MALDI-TOF MS

Pour le profilage métabolique, un spectromètre de masse à désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF) a été utilisé. Après séchage, la plaque a été immédiatement introduite dans l'Autoflex-Speed linear MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Allemagne), équipé d'un laser Nd : YAG à 355 nm pour être analysé. Les spectres ont été acquis automatiquement à l'aide du logiciel FlexControl 3.4 (Bruker Daltonics, Allemagne) en mode ion-positif linéaire en utilisant les paramètres suivants : source d'ions 1 = 19,5 kV, source d'ions 2 = 18,2 kV, tension du détecteur = 2872 V, gamme de masses de  $m/z$  = 100 à 2500. Les spectres ont été mesurés au hasard à une moyenne de 500 tirs laser avec une fréquence laser de 1000 Hz. La tension de la lentille était de 7,00 kV et le temps d'extraction des ions pulsés était de 140

ns. Les spectres acquis ont été exportés dans le logiciel FlexAnalysis v.3.4 (Bruker Daltonics, Allemagne) et prétraités en utilisant des algorithmes standard pour la soustraction, le lissage et la normalisation de la ligne de base (Chang et *al.*, 2016; Sivagnanam et *al.*, 2017 Hleba et *al.*, 2017).

#### **II.14. Analyses statistiques**

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont été analysés statistiquement par le test de (One-way ANOVA) suivi de celui de Student-Newman-Keuls multip-rang test en utilisant le logiciel SAS/STAT® 9.2. La comparaison de l'effet des extraits sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif et ceux des différents tests antioxydants et de l'activité asparaginase ont été analysés par One-way ANOVA, suivi 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 sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD, les valeurs de  $p \leq 0.05$  sont considérées statistiquement significatives.

## *Résultats et discussion*

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Isolement et purification des champignons endophytes

Aucune croissance de champignons ou de bactéries n'a été enregistrée sur les milieux de culture utilisés pour le contrôle de l'efficacité de la stérilisation de surface. Ceci nous conduit à déduire que les étapes utilisées dans le processus de stérilisation étaient suffisantes pour se débarrasser des microorganismes de surface (Epiphytes) et de leurs spores, et que les isolats obtenus peuvent être considérés comme étant des champignons internes (Endophytes) pour les plantes étudiées.

Toutes les parties de plantes utilisées ont été colonisées par des champignons endophytes. A partir des 230 fragments utilisés (racines, tiges et feuilles) et à raison de 115 fragments pour chacune des deux plantes *J. oxycedrus* L. et *P. Lentiscus* L., 126 isolats ont été obtenus dont 70 à partir de *J. oxycedrus* L. et 56 à partir de *P. Lentiscus* L.

La comparaison du nombre des isolats et des taux de colonisation et d'isolement, a montré que ces derniers étaient plus élevés dans les racines, suivi des tiges, alors que les feuilles venaient en dernier pour les deux plantes. Pour *J. oxycedrus* L., le nombre des isolats dans les racines était de 32 avec des taux de colonisation et d'isolement de 86.67 % et 1.07 respectivement, pour les tiges, le nombre des isolats étaient de 26 (76.67%, 0.87) alors que pour les feuilles, 12 isolats ont été obtenus avec un taux de colonisation de 36% et d'isolement de 0.48. Concernant *P. Lentiscus* L., le nombre des isolats étaient de 33, 20 et 3, avec des taux de colonisation de 60 %, 44.44% et 4.44% et d'isolement de 0.6, 0.44 et 0.07 pour les racines, tiges et feuilles respectivement (**tableau 5**).

**Tableau 5.** Nombre des isolats, taux de colonisation et d'isolement enregistrés chez les deux espèces de plantes utilisées.

| Plantes                                | <i>Pistacia lentiscus</i> L. |       |         | <i>Juniperus oxycedrus</i> L. |       |         |
|--|------------------------------|-------|---------|-------------------------------|-------|---------|
|  | Feuilles                     | Tiges | Racines | Feuilles                      | Tiges | Racines |
| <b>Nombre des isolats</b>              | 03                           | 20    | 33      | 12                            | 26    | 32      |
| <b>Nombre total des isolats</b>        | <b>56</b>                    |       |         | <b>70</b>                     |       |         |
| <b>Taux de colonisation (%)</b>        | 4.44                         | 44.44 | 60.00   | 36.00                         | 76.67 | 86.67   |
| <b>Taux de colonisation global (%)</b> | <b>37.93</b>                 |       |         | <b>68.24</b>                  |       |         |
| <b>Taux d'isolement</b>                | 0.07                         | 0.44  | 0.60    | 0.48                          | 0.87  | 1.07    |
| <b>Taux d'isolement global</b>         | <b>0.39</b>                  |       |         | <b>0.82</b>                   |       |         |

Dans cette étude, tous les échantillons testés ont donné au moins un isolat, le nombre des isolats, les valeurs des taux de colonisation et d'isolement de ces deux plantes étaient significativement plus élevés dans les racines que dans les tiges et les feuilles indiquant que la distribution des champignons endophytes diffère entre les différents tissus et les organes des

végétaux, cette variation a également été constatée par Li et al. (2020) qui ont récupéré 1046 isolats de champignons endophytes à partir de dix espèces de plantes halophytes et ont trouvé que les taux de colonisation des champignons endophytes variaient entre  $7.5 \pm 3.33\%$  et  $83.75 \pm 8.95\%$  dans les tiges et entre  $33.75 \pm 11.19\%$  et  $97.5 \pm 1.67\%$  dans les racines. Du et al. (2020) ont isolé 420 isolats fongiques endophytes à partir de *Securinegas ufruticosa*, 170 provenaient des racines, 143 des tiges et 107 des feuilles. Dans leur étude sur *Mukia maderaspatana* (L.), Kannan (2017) ont trouvé que les segments racinaires étaient plus densément colonisés par les champignons endophytes, comme en témoigne la colonisation totale des feuilles, tiges et racines qui s'est avérée être de 86, 64 et 92% respectivement.

Le taux de colonisation, la diversité et la composition des communautés des champignons endophytes sont affectées par la saison, la situation géographique, l'âge et le type de tissus (Yao et al., 2017; Zhou et al., 2018). Ces différences peuvent être expliquées par le fait que le sol est relativement humide et riche en matières organiques et est capable de participer à l'augmentation de l'abondance et de la diversification des champignons du sol et des champignons rhizosphériques, ce qui facilite l'établissement des relations endophytiques avec les racines des plantes et la pénétration par rapport aux autres organes (Yao et al., 2017; Li et al., 2020).

Une autre raison a été abordée par des études précédentes qui suggéraient que la morphologie et les substances chimiques des tissus influençaient également la composition communautaire dans les différents organes de plantes, les racines en tant que sources importantes de substrat facilement accessible peuvent fournir un microenvironnement relativement stable favorisant la survie et la coexistence de nombreux champignons. Certains genres présentent une sorte de préférence ou de spécialisation envers les tissus d'un organe végétal en raison de la capacité de ces genres à consommer et à croître sur une substance spécifique dans ces tissus (Yao et al., 2017).

### III.2. Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne

Après les étapes d'isolement, et de purification, les activités antibactérienne et antifongique des isolats endophytes ont été dépistées par la technique des cylindres d'agar et celle de la double culture respectivement. Parmi les 126 isolats testés, 33 (26.19 %) isolats seulement étaient actifs au moins contre une bactérie pathogène, parmi eux 3 (9.09 %) étaient actifs contre toutes les bactéries testées alors que 30 (90.91 %) étaient uniquement actifs contre les bactéries à Gram positif (**tableau 6**).

Les deux isolats JOR22 et JOR31 ont montré l'activité la plus importante contre toutes les bactéries pathogènes où les zones d'inhibition atteignaient les 34 et 31 mm contre *E. coli* 1 et *B. cereus* respectivement, alors que les isolats PLT7, PLT8, PLF5 et l'isolat JOR26 ont été très actifs contre les bactéries à Gram positif avec des zones d'inhibition de 20, 20, 22 et 12 mm contre *B. cereus* et de 24, 17, 21 et 11mm contre *S. aureus* 1 respectivement (**tableau 6**, **figure 17**).

D'un autre côté, l'isolat PLR9 avait montré un large spectre d'activité, inhibant les bactéries à Gram positif et à Gram négatif avec une activité modérée de 10 mm contre *B. cereus* 1. Cependant, contre *S. aureus* 1 et *E. coli* 1 l'activité était plus forte avec des zones d'inhibition de 15 et 16 mm respectivement. D'autre part, l'isolat a montré une faible capacité d'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* 1 (**tableau 6**).

Concernant l'activité contre les champignons filamenteux et la levure (**tableau 7**), les deux isolats JOR31 et JOR22 ont montré l'activité la plus forte contre toutes les espèces fongiques y compris la levure. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé (81.46%) a été observé avec l'isolat JOR22 contre *M. canis*, alors que le reste des isolats avaient montré des activités moyennes à faibles, dont les plus importantes étaient celles obtenues par PLT8, PLT7 et JOR26 avec des pourcentages d'inhibition de 73.97%, 54.89%, 14.14% contre *P. infestans*, de 41.83%, 43%, 45.96% contre *T. mentagrophytes* et de 45.03%, 46.97%, 49.46% contre *M. canis* respectivement (**figure 18**).

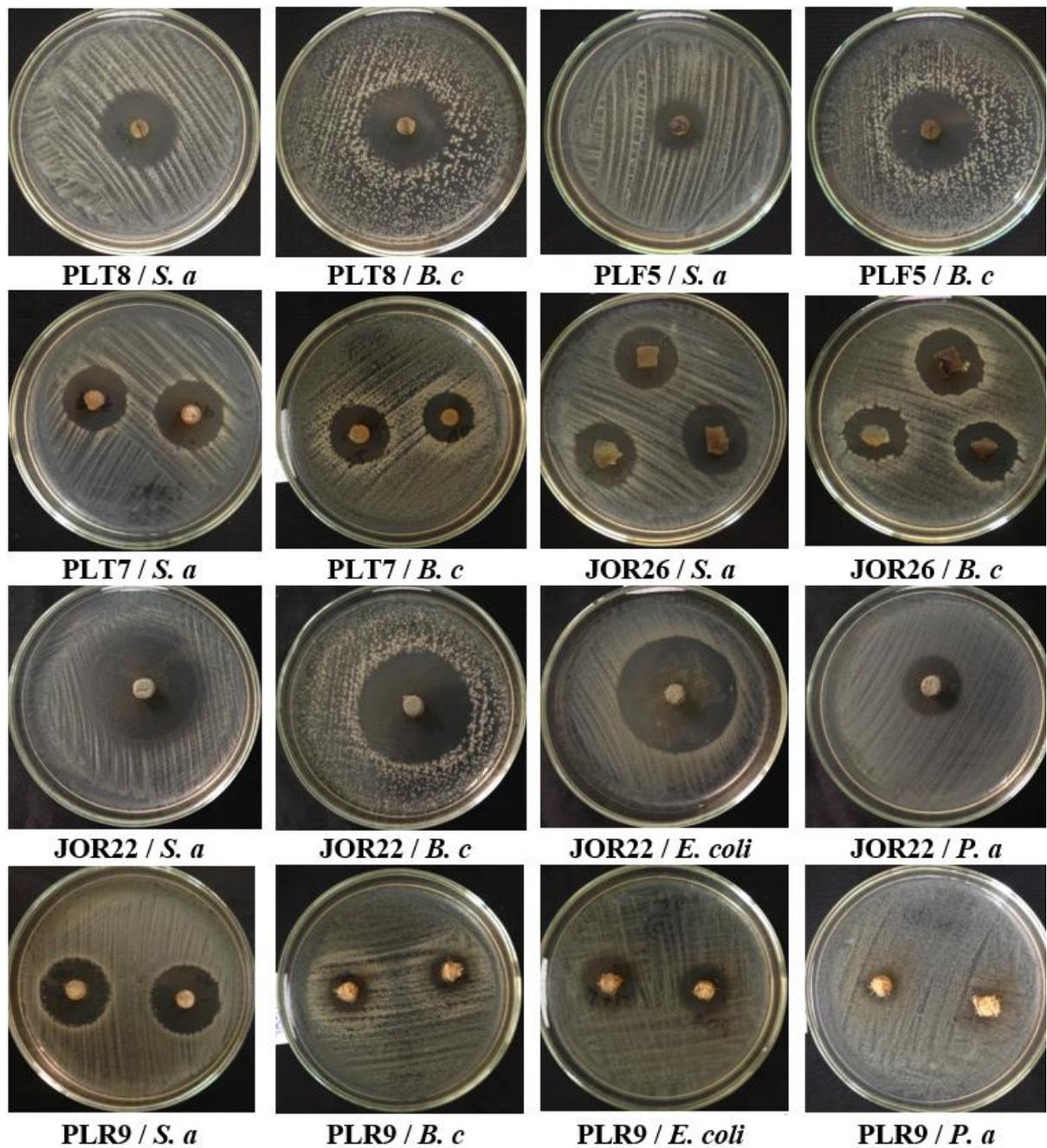
En se basant sur le morphotype et les résultats des activités antibactérienne et antifongique des isolats fongiques obtenus contre des microorganismes pathogènes pour les plantes et/ou les humains, une dizaine d'isolats ayant eu une très bonne activité ont été sélectionnés et regroupés en trois groupes :

- **Groupe 1.** Incluant les deux isolats JOR22 et JOR31 morphologiquement identiques et possédant une très bonne activité et un large spectre contre toutes les bactéries et les champignons pathogènes.
- **Groupe 2.** Incluant des isolats possédant une activité inhibitrice contre toutes les bactéries à Gram positif et une activité antifongique moyenne. Ce groupe a été subdivisé en 4 sous-groupes selon leur similarité morphologique ; (PLT8, PLT12), (PLF5, PLR17), (PLT7, PLT10) et (JOR26 JOR27).
- **Groupe 3.** Ce groupe est représenté par l'isolat PLR9 qui possède une bonne activité contre les bactéries pathogènes à Gram positif et certaines à Gram négatif ainsi qu'une activité antifongique moyenne.

**Tableau 6.** Résultats du screening préliminaire de l'activité antibactérienne par la technique des cylindres d'agar.

| Isolats<br>fongiques | Zones d'inhibition (mm)       |                    |                        |                  |
|----------------------|-------------------------------|--------------------|------------------------|------------------|
|                      | <i>B. cereus</i>              | <i>S. aureus 1</i> | <i>P. aeruginosa 1</i> | <i>E. coli 1</i> |
|                      | <i>Pistacia lentiscus L.</i>  |                    |                        |                  |
| PLF2                 | 07                            | 00                 | 00                     | 00               |
| PLF4                 | 15                            | 14                 | 00                     | 00               |
| PLT6                 | 08                            | 09                 | 00                     | 00               |
| PLT7                 | 20                            | 24                 | 00                     | 00               |
| PLT8                 | 20                            | 17                 | 00                     | 00               |
| PLT10                | 20                            | 21                 | 00                     | 00               |
| PLT12                | 22                            | 20                 | 00                     | 00               |
| PLT14                | 07                            | 00                 | 00                     | 00               |
| PLR4                 | 10                            | 11                 | 00                     | 00               |
| PLR5                 | 14                            | 00                 | 00                     | 00               |
| PLR9                 | 10                            | 15                 | 00                     | 16               |
| PLR17                | 17                            | 15                 | 00                     | 00               |
| PLF5                 | 22                            | 21                 | 00                     | 00               |
| PLR6                 | 11                            | 14                 | 00                     | 00               |
| PLR20                | 11                            | 11                 | 00                     | 00               |
|                      | <i>Juniperus oxycedrus L.</i> |                    |                        |                  |
| JOF1                 | 00                            | 10                 | 00                     | 00               |
| JOF12                | 10                            | 00                 | 00                     | 00               |
| JOT7                 | 09                            | 00                 | 00                     | 00               |
| JOT22                | 11                            | 00                 | 00                     | 00               |
| JOR1                 | 19                            | 09                 | 00                     | 00               |
| JOR2                 | 12                            | 00                 | 00                     | 00               |
| JOR3                 | 16                            | 10                 | 00                     | 00               |
| JOR5                 | 09                            | 06                 | 00                     | 00               |
| JOR12                | 11                            | 00                 | 00                     | 00               |
| JOR14                | 11                            | 11                 | 00                     | 00               |
| JOR22                | 30                            | 28                 | 8                      | 34               |
| JOR23                | 11                            | 08                 | 00                     | 00               |
| JOR24                | 11                            | 00                 | 00                     | 00               |
| JOR25                | 11                            | 11                 | 00                     | 00               |
| JOR26                | 12                            | 11                 | 00                     | 00               |
| JOR27                | 11                            | 10                 | 00                     | 00               |
| JOR28                | 14                            | 20                 | 00                     | 00               |
| JOR30                | 17                            | 00                 | 00                     | 00               |
| JOR31                | 28                            | 28                 | 11                     | 31               |

*B. cereus* : *Bacillus cereus*, *S. aureus 1* : *Staphylococcus aureus 1*, *P. aeruginosa 1* : *Pseudomonas aeruginosa 1*, *E. coli 1* : *Escherichia coli 1*.

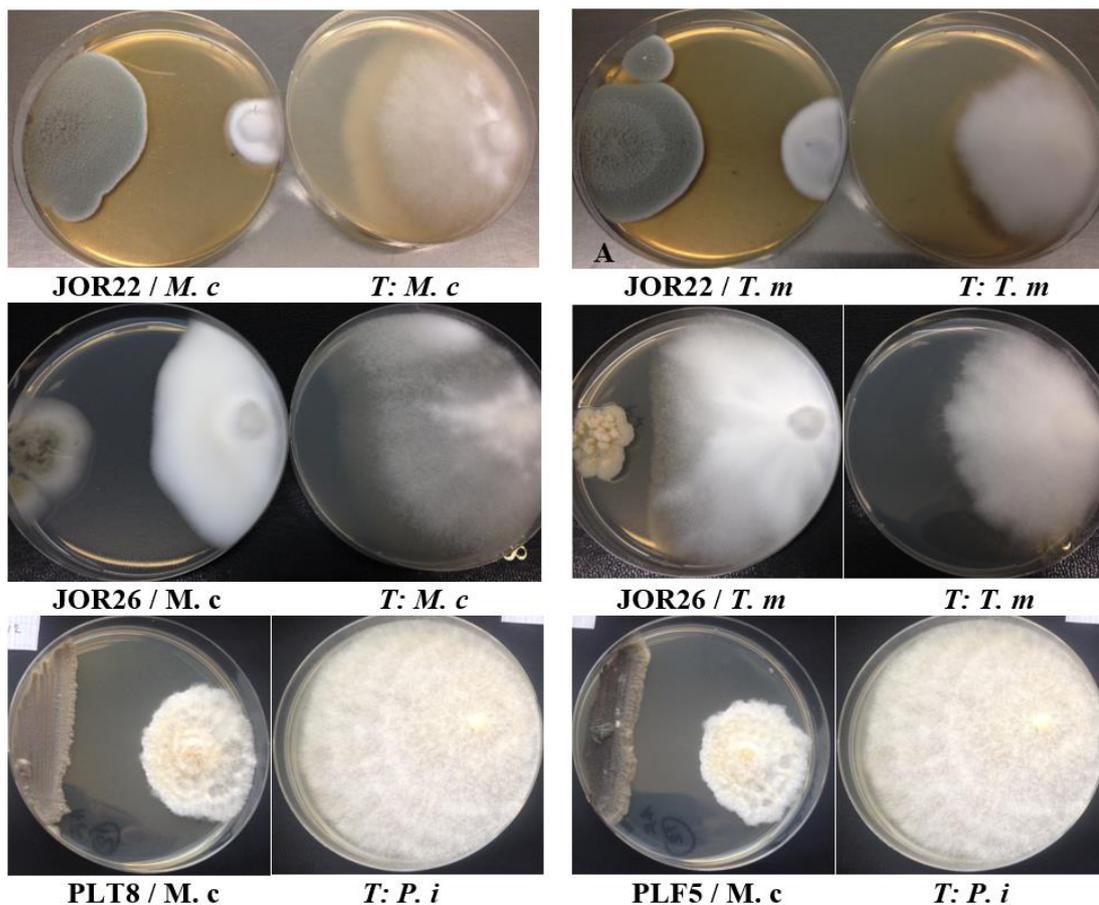


**Figure 17.** Résultats du criblage préliminaire contre les bactéries pathogènes. (*B. c*) *Bacillus cereus* ATCC 10876, (*S. a*) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (*E. c*) *Escherichia coli* ATCC 25922, (*P. a*) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

**Tableau 7.** Résultats du screening préliminaire de l'activité antifongique par la technique de la double culture des meilleures souches.

| Isolats<br>fongiques          | Pourcentages d'inhibition (%) |                          |                     | Zones d'inhibition<br>(mm) |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------|
|                               | <i>M. canis</i>               | <i>T. Mentagrophytes</i> | <i>P. infestans</i> | <i>C. albicans</i>         |
| <i>Pistacia lentiscus</i> L.  |                               |                          |                     |                            |
| PLT8                          | 45.03±1.45                    | 41.83±0.24               | 73,97±1.73          | 00                         |
| PLT12                         | 53.64±0.43                    | 31.54±6.31               | 78,56±1.69          | 00                         |
| PLF5                          | 43.05±1.34                    | 30.63±0.88               | 73,97±1.73          | 00                         |
| PLR17                         | 46.36±0.43                    | 36.75±1.06               | 66,32±1.79          | 00                         |
| PLT7                          | 46.97±9.86                    | 43.00±5.78               | 54,89±1.36          | 00                         |
| PLT10                         | 47.66±3.31                    | 33.00±3.58               | 53,39±1.36          | 00                         |
| PLR9                          | 58.80±3.02                    | 38.82±4.40               | 66,92±1.39          | 00                         |
| <i>Juniperus oxycedrus</i> L. |                               |                          |                     |                            |
| JOR31                         | 80.80±0.76                    | 61.00±0.41               | 66,03±1.42          | 10±00                      |
| JOR22                         | 81.46±0.29                    | 70.66±0.64               | 57,14±1.52          | 10±00                      |
| JOR26                         | 49.46±0.50                    | 45.96±2.77               | 14,14±0.82          | 00                         |
| JOR26                         | 43.33±1.34                    | 40.65±1.06               | 13,68±1.36          | 00                         |

*M. canis* : *Microsporium canis*, *T. mentagrophytes* : *Trichophyton mentagrophytes*, *P. infestans* : *Phytophthora infestans*, *C. albicans* : *Candida albicans*, ± xx= SD (standard deviation).



**Figure 18.** Résultats du criblage préliminaire contre les champignons pathogènes filamenteux. (*M. c*) : *Microsporium canis*, (*T. m*) : *Trichophyton mentagrophytes*. (*P. i*) : *Phytophthora infestans*, (T) : Témoin.

La technique des cylindres d'agar est couramment utilisée pour le criblage préliminaire afin de minimiser le temps, les dépenses et les tentatives de sélection des microorganismes actifs. Cette technique est également utilisée pour détecter les composés non volatils produits par les micro-organismes (Sadrati *et al.*, 2013 ; Hamzah *et al.*, 2018). Au cours de la croissance, les champignons endophytes sécrètent des métabolites extracellulaires dans le milieu gélosé. Dans la méthode des cylindres d'agar, le milieu fongique contenant ces métabolites extracellulaires est déposé sur le milieu gélosé préalablement inoculé avec les bactéries pathogènes. Pendant le temps d'incubation, les métabolites extracellulaires fongiques diffusent à partir des cylindres d'agar dans le milieu gélosé afin de tuer ou d'inhiber les bactéries testées. L'apparition d'une zone d'inhibition autour des cylindres d'agar indique l'activité antibactérienne (Sibero *et al.*, 2018).

L'activité antagoniste obtenue contre les bactéries pathogènes par cette technique, peut donc être due à la sécrétion dans le milieu gélosé des métabolites antibactériens diffusibles (antibiotiques) (Kamil *et al.*, 2018), alors que celle obtenue contre les champignons phytopathogènes peut être due aussi bien à la sécrétion de molécules antifongiques, ou d'enzymes extracellulaires dégradant la paroi cellulaire (protéase, cellulase, lipase, chitinase) ou les deux (Mohamad *et al.*, 2018), mais aussi au mycoparasitisme ou à la compétition par rapport aux nutriments (Aramsirirujwet *et al.*, 2016).

### **III.3. Identification des champignons endophytes sélectionnés**

L'identification des isolats actifs a été réalisée, en se basant dans un premier temps sur les caractères morphologiques (**tableau 8**), cette identification a ensuite été complétée et confirmée par une autre identification moléculaire.

**Tableau 8.** Identification morphologique des isolats les plus actifs.

| <b>Sources (Plantes)</b>      | <b>Isolats</b> | <b>Organes</b>   | <b>Identification morphologique</b> |
|-------------------------------|----------------|------------------|-------------------------------------|
| <i>Pistacia lentiscus</i> L.  | PLT8/PLT12     | Tiges            | <i>Phoma</i> sp. 1                  |
|                               | PLF5/PLR17     | Feuilles/Racines | <i>Phoma</i> sp. 2                  |
|                               | PLT7/PLT10     | Tiges            | <i>Botrytis</i> sp.                 |
|                               | PLR9           | Racines          | <i>Aspergillus</i> sp.              |
| <i>Juniperus oxycedrus</i> L. | JOR22          | Racines          | <i>Penicillium</i> sp. 1            |
|                               | JOR31          | Racines          | <i>Penicillium</i> sp. 2            |
|                               | JOR26          | Racines          | <i>Diaporthe</i> sp.                |
|                               | JOR27          | Racines          | <i>Diaporthe</i> sp.                |

Les caractéristiques morphologiques et phylogénétiques de chaque isolat sont décrites ci-dessous :

- **Les souches PLT8/PLT12 et PLF5/PLR17**

Les souches PLF5/PLR17 et PLT8/PLT12 ont montré après 14 jours d'incubation à 28°C, des caractéristiques morphologiques différentes sur les divers milieux de cultures utilisés (**figure 19** et **20**) :

**Les souches PLT8/PLT12 (figure 19)**

Sur PDA, la croissance de ces champignons était très lente avec des diamètres atteignant les 16 mm. Les colonies étaient veloutées au centre avec des marges cotonneuses, denses, un peu épaisses et légèrement granuleuses avec des sillons étroits et des bords légèrement ondulés. La surface des colonies était de couleur grise blanchâtre et le revers de couleur marron avec des sillons étroits.

Sur MEA, la croissance était très lente avec des diamètres atteignant les 14 mm. Les colonies étaient très denses, veloutées, plates, légèrement granuleuses au centre et lisses sur les bords avec des sillons espacés et des bords ondulés. La surface des colonies était de couleur blanche et le revers grisâtre au centre avec des marges beiges.

Sur YES, la croissance était lente avec des diamètres atteignant les 18 mm. Les colonies étaient denses, veloutées, plates, lisses au bords et ridées au centre avec des sillons étroits et des bords ondulés. La surface des colonies était de couleur jaunâtre à beige au centre et blanchâtre aux bords, le revers était jaunâtre à brun au centre avec des marges beiges.

Sur CYA, la croissance était moyenne avec des diamètres atteignant les 25 à 26 mm. Les colonies étaient très denses, veloutées, plates et lisses avec des sillons très espacés et des bords bien définis. La surface des colonies était de couleur beige à beige claire et le revers jaunâtre à beige.

**Les souches PLF5/PLR17 (figure 20)**

Sur PDA, la croissance était très lente avec des diamètres atteignant les 16 mm. Les colonies étaient veloutées, denses, lisses et plates avec des bords ondulés. La surface des colonies était de couleur grise à brune pâle au centre et blanchâtre sur les bords, peu sillonnées, le revers était de couleur vert olive et peu sillonné.

Sur MEA, la croissance était très lente avec des diamètres atteignant les 17 mm. Les colonies étaient poudreuses, denses, granuleuses et légèrement surélevées au centre avec des

bords bien définies. La surface des colonies était de couleur noire au centre et blanche transparente sur les bords, le revers était de couleur verte olive foncée avec des marges claires.

Sur YES, la croissance était lente avec des diamètres atteignant les 20 à 21 mm. Les colonies étaient veloutées, denses, lisses et plates avec des bords ondulés et une croissance radiale avec formation de sillons étroits. La surface des colonies était formée de cercles de différentes couleurs allant du brun clair au centre, suivie du brun foncé, du blanc, du brun clair et du beige sur les bords, le revers était de couleur gris pâle à brune pâle et sillonné.

Sur CYA, la croissance était moyenne avec des diamètres atteignant les 26 à 27 mm. Les colonies étaient veloutées, denses, lisses et plates avec des sillons espacés et des bords bien définis. La surface des colonies était de couleur beige foncé au centre à beige clair sur les bords, le revers était jaunâtre à beige avec des sillons espacés.

En ce qui concerne les caractéristiques microscopiques, ces quatre souches ont montré presque les mêmes caractéristiques à l'exception de la forme et de la taille des conidies.

Les pycnides apparaissent en grand nombre après 8 à 10 jours d'incubation sur MEA pour PLF5 /PLR17 et sur MEA et PDA pour PLT8/PLT12, cependant avec un nombre moindre. Elles apparaissent au centre des colonies, solitaires ou bien agrégées, sur la surface ou bien partiellement immergées dans la gélose avec des tailles différentes et des formes plus ou moins globuleuses avec un ostiole centrale papillaire permettant la sortie des conidies sous forme de gouttelettes grises à blanchâtres. Au début de la croissance, les pycnides sont de couleur vert olive et deviennent vert olive foncé à noir à maturation (**figure 19 et 20**).

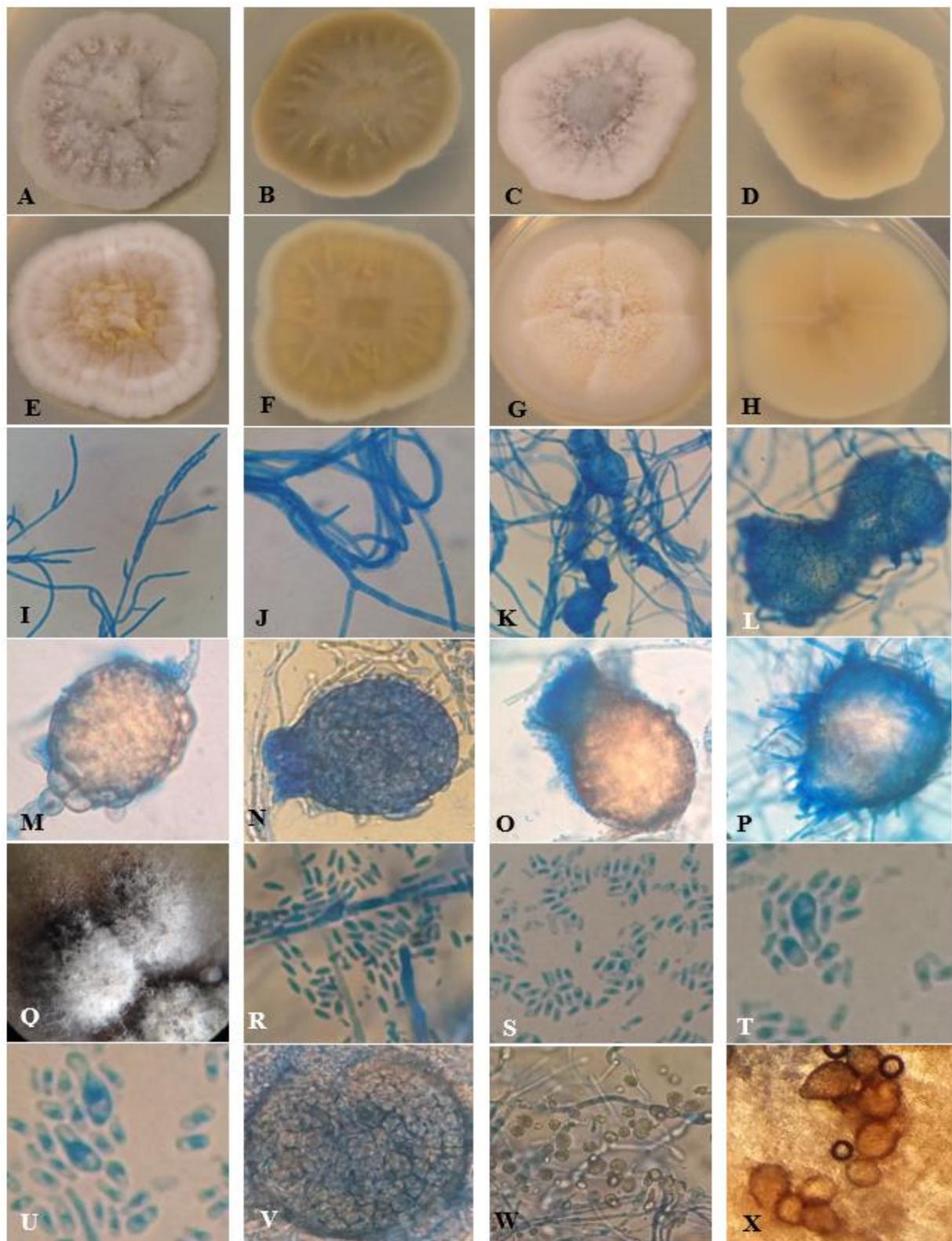
Le péridium constitué d'une paroi épaisse brune à noir avec des cellules angulaires à globuleuses, sa surface interne est bordée de cellules hyalines donnant naissance aux cellules conidiogènes, alors que sa surface externe est généralement entourée d'appendices hyphales bruns surtout au niveau de l'ostiole. Les cellules conidiogènes produites en grand nombre, sessiles, phialidiques, hyalines, à parois lisses, avec des formes très variables ; majoritairement sous-globuleuses à lagéniformes ou coniques, souvent à cou allongé. Les conidies de PLF5/ PLR17 formées d'une seule cellule, sont cylindriques à légèrement allantoides avec des extrémités arrondies légèrement gonflées et un centre rétréci, droites ou légèrement incurvées, hyalines, lisses et non septées, elles possèdent de 0 à 2 globules terminales. Pour PLT8/PLT12, les conidies étaient plus larges et plus courtes que celles produites par PLF5/ PLR17, elles ont des formes variables ; ellipsoïdales, oblongues à lagéniformes, lisses et non septées, possèdent de 0 à 2 globules centrales ou subterminales.

Les hyphes sont cloisonnés avec des ramifications en alternance, hyalins, minces, à parois lisses (figure 19 et 20).

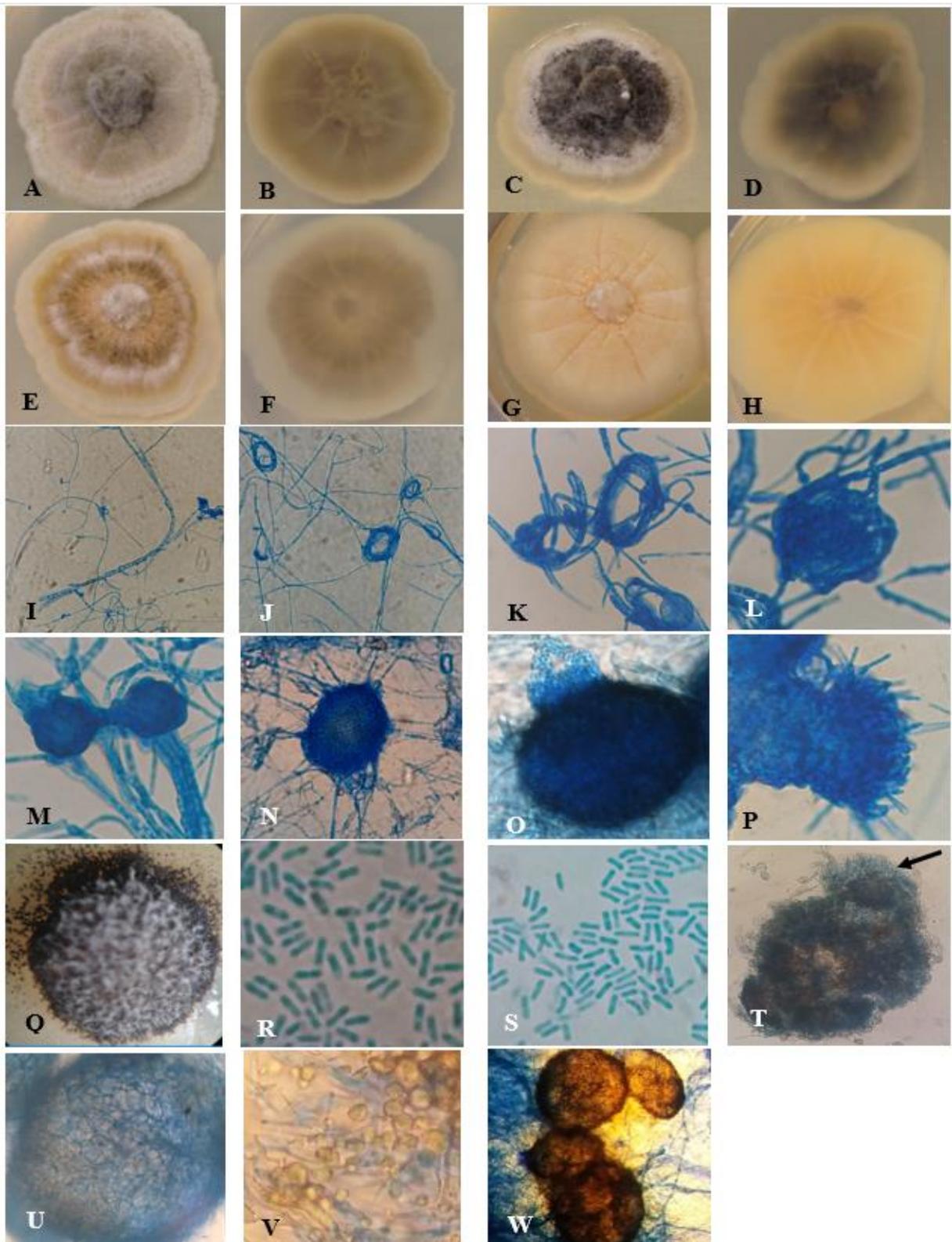
**Forme sexuée :** indéterminée.

En se basant sur la recherche mégablast sur la base de données nucléotidiques GenBank du NCBI, les isolats les plus proches de PLT8/PLF5 étaient *Ochrocladosporium frigidaria* CBS 103.81 (99.80 / 99.80%) et *Neocucurbitaria quercina* CBS 115095 (96.47 / 96.47 %) pour l'ITS, *Neocucurbitaria keratinophila* CBS 121759 (99.67/100%) pour LSU, alors que pour BenA, RPB2 et TEF1 les isolats le plus proches étaient *Neocucurbitaria acanthocladae* CBS 142398 (94.83 / 94.83%), *Neocucurbitaria aetnensis* C261 (92.41/92.84%) et *Neocucurbitaria acerina* CBS 142403(97.89 / 97.79%) respectivement (**tableau 9**).

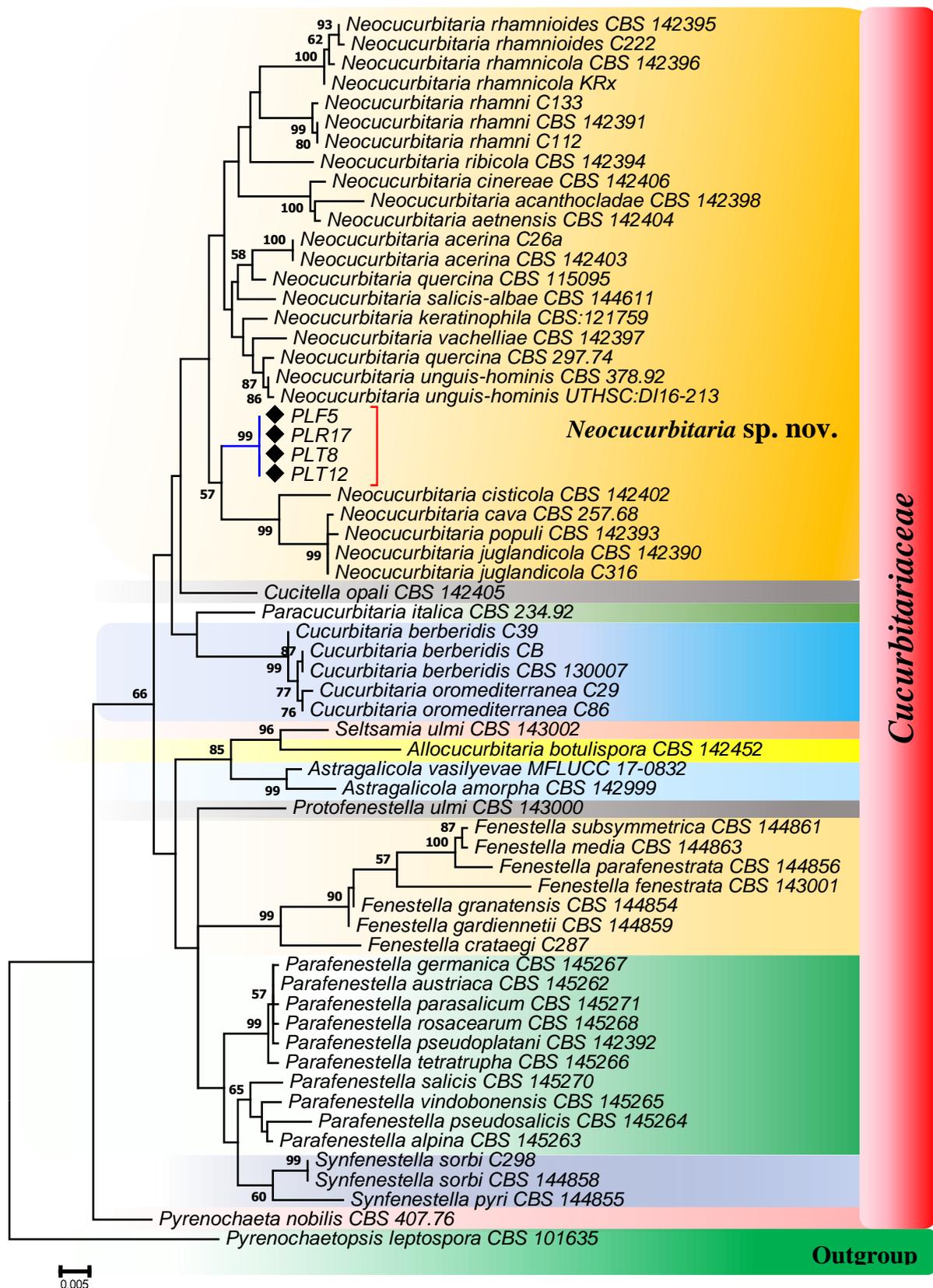
L'ensemble des données des séquences ITS-LSU-RPB2-TEF1-BenA des membres de la famille des *Cucurbitariaceae* comprenant les quatre souches de cette étude et 60 souches de référence, étaient regroupés en 13 clades correspondant à 12 genres appartenant à la famille des *Cucurbitariaceae*, et un clade correspondant à l'outgroup ont été analysés. Le résultat de cette analyse a montré que nos quatre souches font partie du genre *Neocucurbitaria* (famille des *Cucurbitariaceae*) et sont proches des espèces *Neocucurbitaria cisticola* CBS 142402 et *Neocucurbitaria acanthocladae* CBS 142398. Cependant, elles se détachent nettement de ces dernières et forment un clade monophylétique distinct, ce qui montre donc que l'on est en présence d'une nouvelle espèce *Neocucurbitaria* sp. nov. (**figure 21**).



**Figure 19.** Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique de l'isolat PLT8 après 14 jours d'incubation à 28 °C ; sur PDA (A, B), MEA (C, D), YES (E, F), CYA (G, H). A, C, E, G, Surface. B, D, F, H, Revers. En vue microscopique ; I, Mycélium. J-O, Etapes de formations des pycnides. O, pycnide mature. P, Pycnide avec appendices. Q, Pycnides sur gélose. R, S, Conidies. T, U, Cellules conidiogènes. V, Paroi pycnidiale. W, Cellules de la paroi pycnidiale. X, Pycnides matures agrégées.



**Figure 20.** Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique de l'isolat PLF5 après 14 jours d'incubation à 28 °C ; sur PDA (A, B), MEA (C, D), YES (E, F). CYA (G, H). A, C, E, G, Surface. B, D, F, H, Revers. En vue microscopique ; I, Mycélium. J-O, Etapes de formations des pycnides. O, pycnide mature. P, Pycnide avec appendices. Q, Pycnides sur gélose. R, S, Conidies. T, Cellules conidiogènes. U, Paroi pycnidiale. V, Cellules de la paroi pycnidiale. W, Pycnides matures agrégées.



**Figure 21.** Arbre phylogénétique des souches PLT8/PLT12 et PLF5/PLR17 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-LSU-RPB2-TEF1-BenA. L'arbre est enraciné avec *Pyrenochaetopsis leptospora* CBS 101635. Les valeurs maximales du bootstrap  $ML \geq 50\%$  sont représentées au niveau des nœuds.

- **Les souches PLT7/PLT10**

Sur PDA, les colonies ont une croissance rapide avec des diamètres atteignant les 38 mm en 7 jours d'incubation. Elles étaient légèrement laineuses, un peu élevés, à bords réguliers, leur revers brun et leurs surfaces étaient brune grisâtre, devenant brunes avec l'âge avec une production de pigments marrons diffusibles. Sur MEA, les diamètres des colonies étaient de 21 mm après 7 jours d'incubation, elles étaient légèrement cotonneuses ou velues, planes, à bords réguliers, leur surface était blanche à brune claire et leur revers beige à jaunâtre. Pas de production d'exsudats sur les deux milieux.

Le mycélium était brun pâle, ramifié, septé, superficiel, à parois minces, granulé ou ponctué. Les conidiophores micronémateux, brun pâle, lisses, granuleux ou ponctués, non ramifiés et droits. Les cellules conidiogènes holoblastiques, polyblastiques, intégrées, intercalaires, brunes pâles. Les conidies produites au niveau de la région gonflée s'élevant latéralement des cellules conidiogènes. La région conidiogène gonflée hyaline à brune pâle, simple ou formant une large tête à branche dichotomiques ou trichotomiques, pyriforme, cylindrique ou sphérique, lisse, à paroi mince, déterminée, denticulée, de taille variable. Les conidies solitaires à une cellule, 1-5 conidies sur chaque conidiogène, simples, brunes pâles, verruqueuses à capitées, à parois minces, ellipsoïdes, obovoïdes, clavées, droites ou légèrement courbées, la base tronquée et l'apex obtus (**figure 22**).

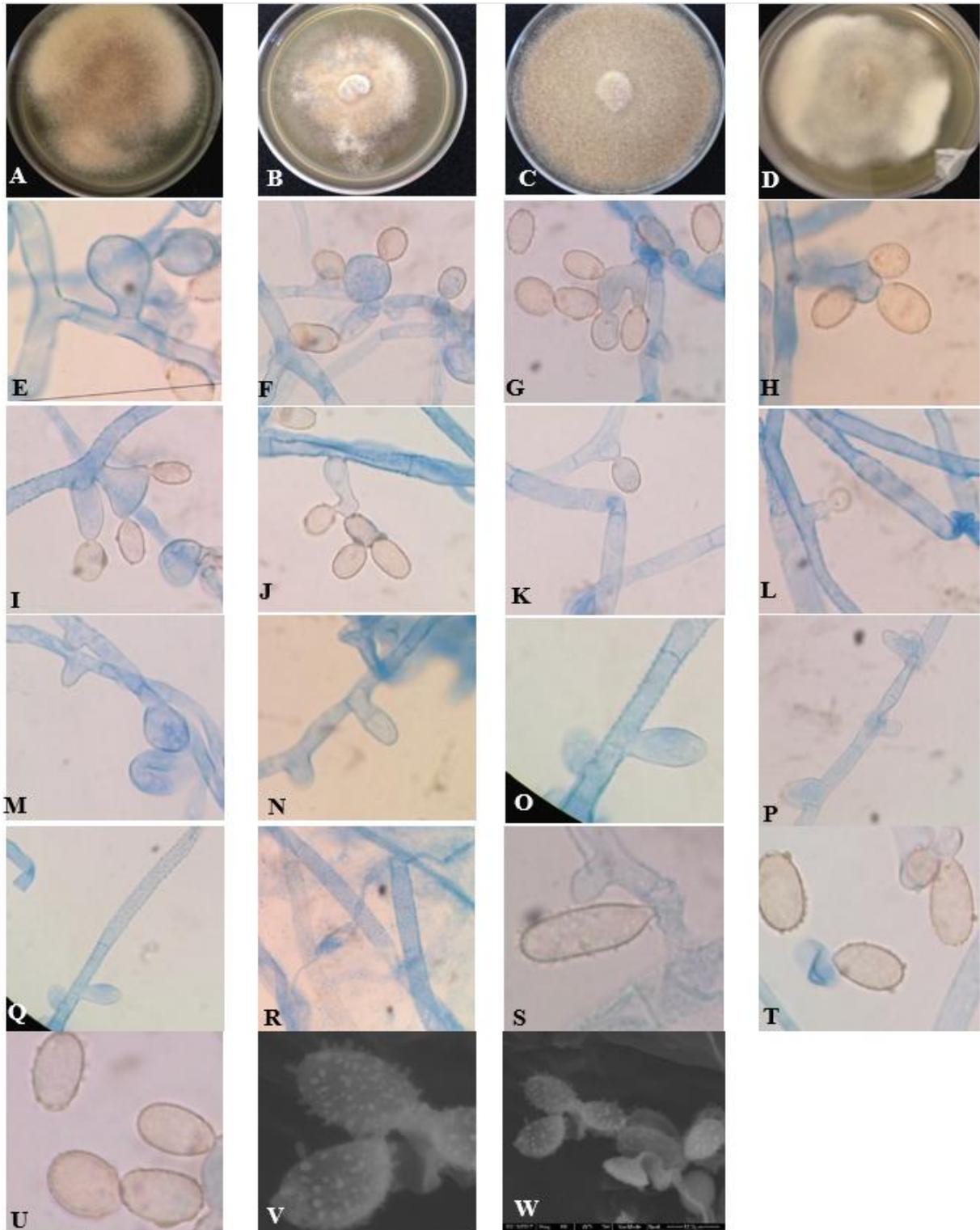
**Forme sexuée :** indéterminée.

La recherche mégablast sur la base de données nucléotidiques GenBank du NCBI des régions ITS et LSU pour les souches PLT7/PLT10 a montré que les isolats les plus proches ayant les plus grands pourcentages de similarité étaient *Micronematobotrys verrucosus* O15-2161 (98.50/98.50 %) et *Smardaea australis* PSC4043 (98.37/98.37 %) respectivement (**tableau 9**).

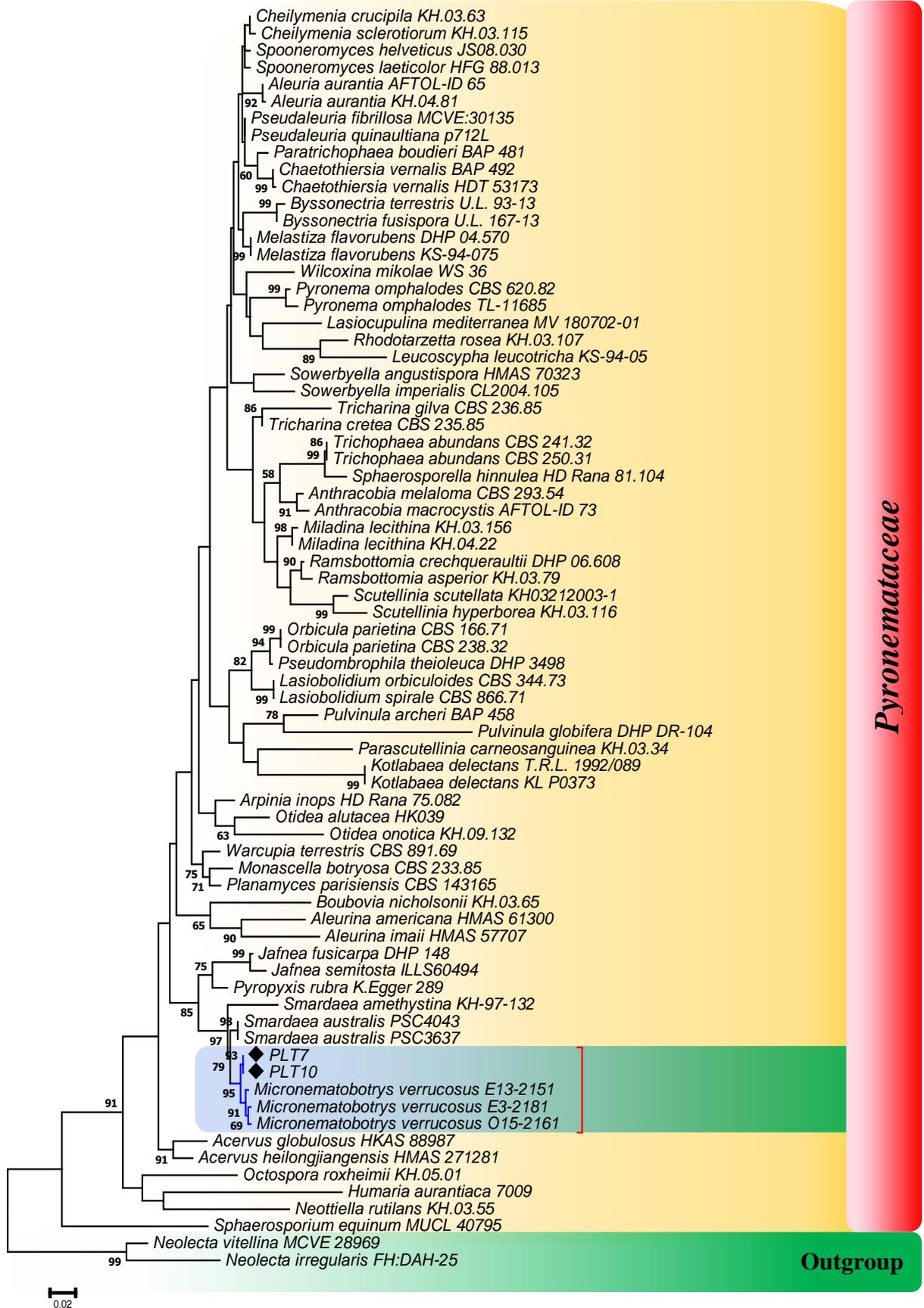
Les analyses phylogénétiques ont été effectuées en utilisant les données des séquences combinées de ITS et de LSU des taxons de *Pyronemataceae*, sélectionnés après le blast précédent. Les données finales de l'alignement multiple comprenaient 72 séquences représentant 44 différents genres de la famille *Pyronemataceae* et les 2 séquences de cette étude.

L'arbre phylogénétique généré par l'analyse du Maximum likelihood des régions combinées a montré que les souches PLT7/PLT10 étaient clairement intégrés dans la famille des *Pyronemataceae* et très proches de *Micronematobotrys verrucosus* E13-215 soutenu par

une valeur élevée du bootstrap du Maximum likelihood (ML=95 %). Pour cela et en se basant sur les caractéristiques morphologiques et phylogénétiques, les souches PLT7/PLT10 ont été confirmées comme étant *Miconematobotrys verrucosus* (figure 23).



**Figure 22.** Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique des souches PLT7 et PLT10 après 7 jours d'incubation à 28 °C ; sur PDA (A), MEA (B) et de l'isolat PLT10 sur PDA (C), MEA (D). En vue microscopique ; E-L, Différentes formes des cellules conidiogènes avec conidies. M-P, Formation des cellules conidiogènes sur le mycélium. Q, R, Mycélium. S-U, Conidies sous microscope optique. V, W, Conidies sous microscope électronique.



**Figure 23.** Arbre phylogénétique des souches PLT7 et PLT10 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-LSU. L'arbre est enraciné avec *Neolecta vitellina* MCVE 2896 9 et *Neolecta irregularis* FH: DAH-25. Les valeurs maximales du bootstrap  $ML \geq 50\%$  sont représentées au niveau des nœuds.

- **Les souches JOR26/JOR27**

Les souches JOR26/JOR27 ont montré après 28 jours d'incubation à 28°C, une croissance très lente sur la plupart des milieux de culture utilisés avec des caractéristiques culturales différentes (**figure 24**) :

Sur PDA, le diamètre des colonies était de 26 à 27 mm. Elles étaient veloutées, denses, lisses, surélevées au centre et partiellement immergées dans la gélose, avec des bords bien définis. La surface des colonies était de couleur verte olive au centre et verte grisâtre pour le reste de la colonie, le revers était de couleur brun pâle avec des fissures au centre.

Sur MEA, le diamètre des colonies était de 11 à 12 mm. Elles étaient veloutées, denses, lisses, plates avec des bords bien définis. La surface des colonies était blanche et le revers brun avec un centre brun foncé.

Sur YES, le diamètre des colonies était de 10 à 11 mm. Les colonies étaient veloutées, denses, lisses, plates, partiellement immergées dans la gélose avec des bords irréguliers. La surface des colonies était noire au centre et brune sur les bords et le revers était brun grisâtre.

Sur YMEA, le diamètre des colonies était de 16 à 17 mm. Les colonies étaient veloutées, denses, lisses, plates avec des bords ondulés et bien définis. La surface des colonies était verte grisâtre et le revers verdâtre. Une pigmentation verdâtre diffusible du milieu a été observée.

Sur CYA, le diamètre des colonies était de 12 à 13 mm. Les colonies étaient veloutées, denses, lisses, plates avec des bords irréguliers. La surface des colonies était noire au centre et grise aux bords et le revers était de couleur noir au centre et grisâtre sur les marges.

Sur SDA, le diamètre des colonies était de 14 à 15 mm. Les colonies étaient veloutées, denses, lisses, bombées, partiellement immergé dans la gélose avec des bords irréguliers. La surface des colonies était blanche à brune et le revers était de couleur rouge brique.

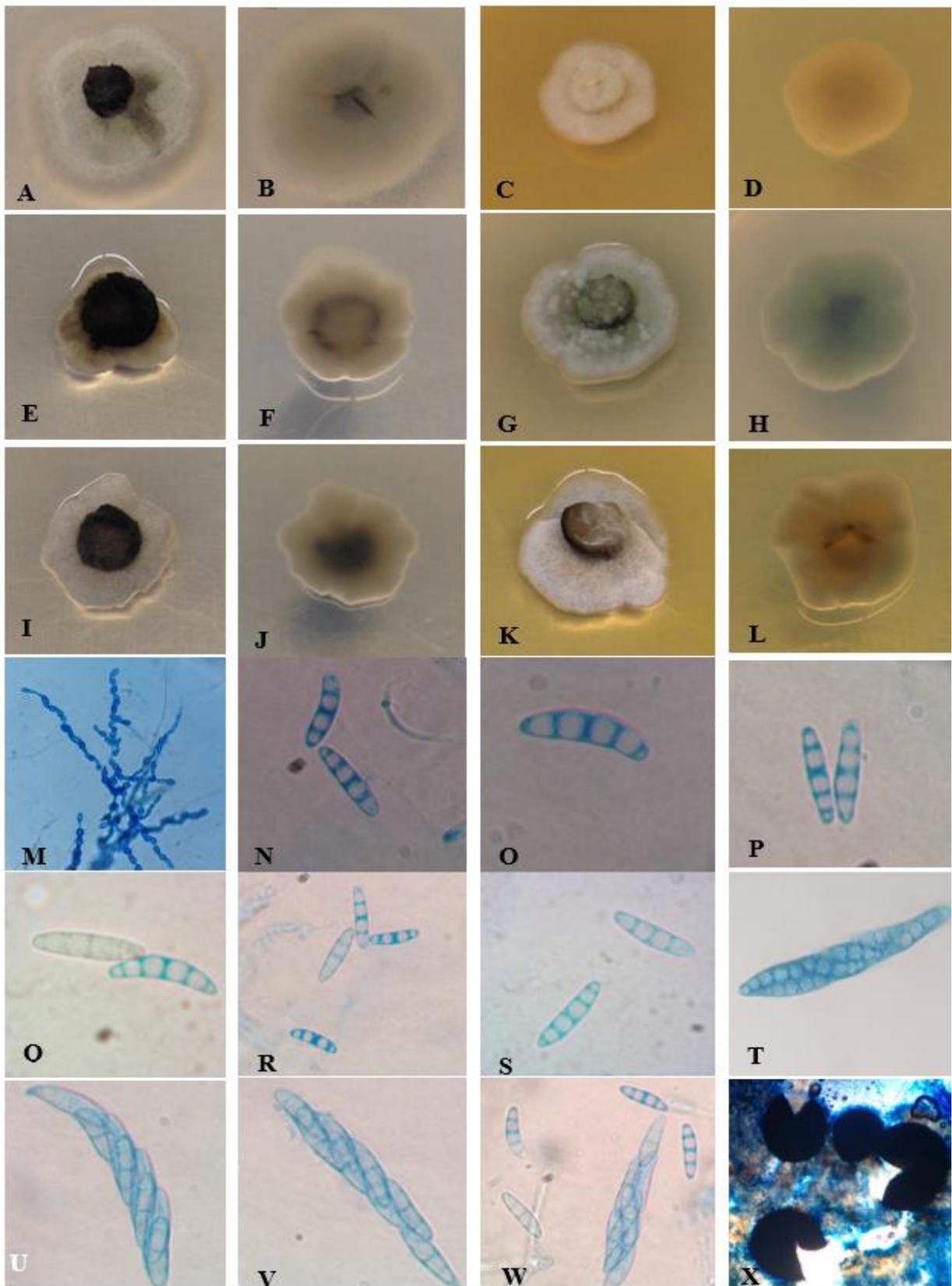
Pour les caractéristiques microscopiques, les périthèces non ostiolés, brun foncé à noir, solitaires, dispersés, globuleux à sous-globuleux. Ils sont généralement produits sur PDA après plus de 40 jours d'incubation. Les asques englobent 8 ascospores, sessiles, hyalines, unituniquées, fusiformes allongés à clavés, étroits, se rétrécissant vers la base, apex arrondi, sans anneau apical distinct et sans paraphyses. Les ascospores, uni à bisériées, cylindriques à fusiformes allongées, extrémités arrondies, 3–5 cloisons, brunes pâles, à parois lisses, avec trois à quatre gros globules au centre et deux petits globules aux extrémités, non resserrés au niveau

du septum, droites ou légèrement incurvées. Les hyphes sont cloisonnés ramifiés, hyalins, minces, à parois lisses (**figure 24**).

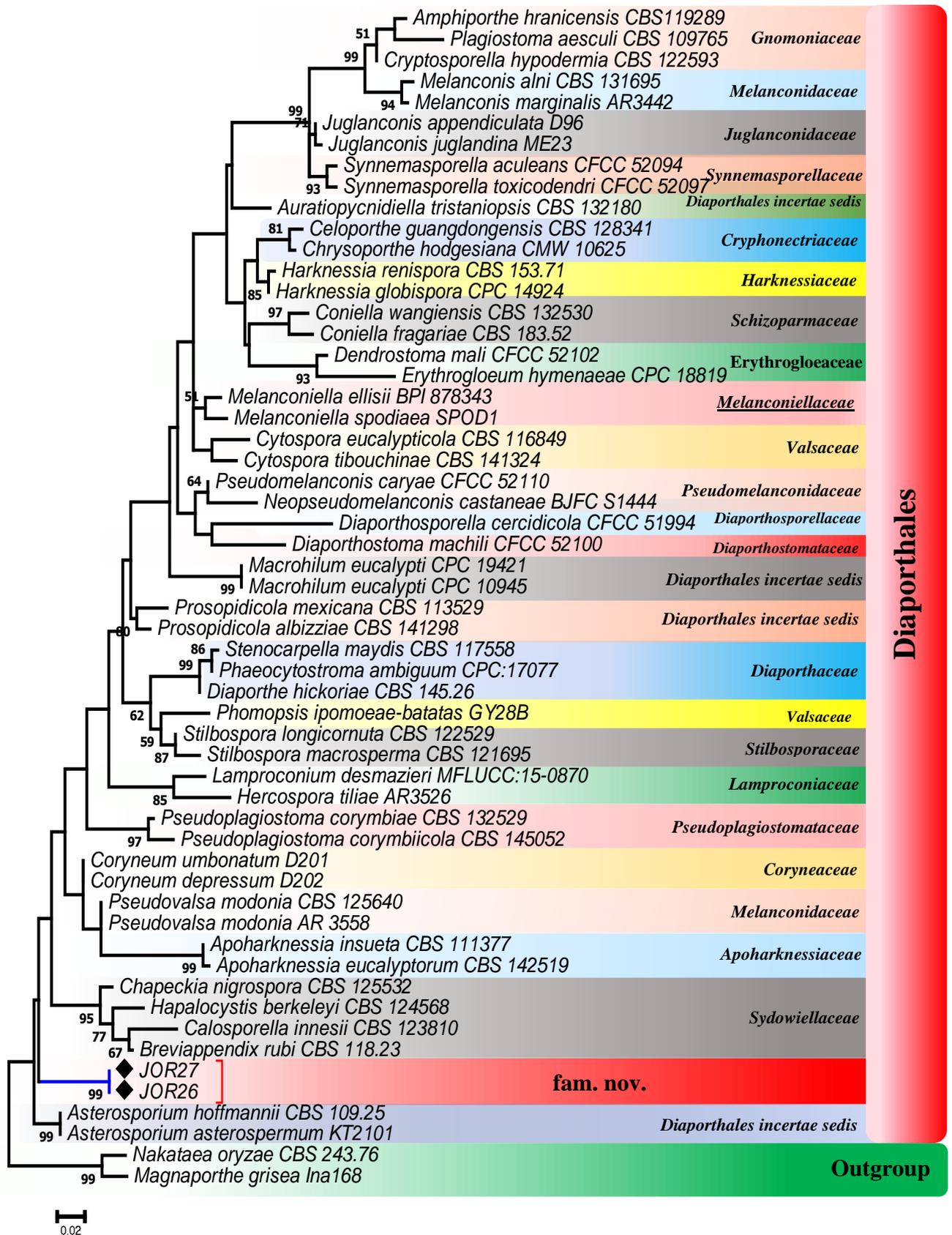
**Forme asexuée :** indéterminée.

Le test du blast a permis de déterminer de manière très nette que les souches JOR26/JOR27 appartenait à l'ordre des Diaporthales et sont étroitement liées aux familles *Coryneaceae*, *Sydowiellaceae* et *Stilbosporaceae* avec de très faibles pourcentages de similitude avec les membres de ces familles. Ces pourcentages étaient de 83.14/ 83.25 % obtenus avec l'espèce *Hapalocystis kickxii* D108 de la famille des *Sydowiellaceae*, 81.85/81.82 % avec *Stilbospora orientalis* CBS 135075 de la famille *Stilbosporaceae* pour l'ITS, 95.83/ 95.74 % avec *Coryneum depressum* D202 de la famille *Coryneaceae* et 95.62/95.52% avec *Chapeckia nigrospora* CBS 125532 de la famille *Sydowiellaceae* pour LSU (**tableau 9**).

L'alignement des séquences des membres appartenant à l'ordre des Diaporthales comprenait les deux souches de cette étude ainsi que 54 souches de référence d'études récentes. Ces 56 isolats étaient regroupés en 26 clades correspondant à 25 familles des Diaporthales, et un clade supplémentaire correspondant à l'outgroup. Selon l'arbre phylogénétique généré par ces datas concaténés des séquences ITS-LSU, les deux souches se détachent nettement des espèces des genres les plus proches et forment un clade monophylétique distinct, ce qui montre donc que l'on est en présence d'un nouveau genre. En plus, elles se positionnent entre des genres appartenant à deux familles distinctes, celles des *Asterosporiaceae* (qui comporte *Asterosporium* comme unique genre) et celle des *Sydowiellaceae* (qui comporte les genre *Chapeckia*, *Hapalocystis* ainsi que d'autres genres encore plus éloignés), alors que les genres membres des familles *Coryneaceae* et *Stilbosporaceae* étaient très loin. Les deux isolats étaient plus proches à *Asterosporium* (famille des *Asterosporiaceae*) mais se détachent nettement des espèces de ce genre. Ceci suggère donc fortement que nos souches appartiennent à un nouveau genre faisant lui-même partie d'une nouvelle famille (**figure 25**).



**Figure 24.** Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique de l'isolat JOR26 après 28 jours d'incubation à 28 °C ; sur PDA (A, B), MEA (C, D), YES (E, F), YMEA (G, H), CYA (I, J), SDA (K, L). A, C, E, G, I, K, Surface. B, D, F, H, J, L, Revers. En vue microscopique ; M, Mycélium. N-S, Ascospores. T-W, Asci. X, Ascomata.



**Figure 25** . Arbre phylogénétique des souches JOR26/JOR27 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-LSU. L'arbre est enraciné avec *Nakataea oryzae* CBS 243.76 et *Magnaporthe grisea* Ina168. Les valeurs maximales du bootstrap  $ML \geq 50\%$  sont représentées au niveau des nœuds.

- **Les souches JOR22/JOR31**

Après 7 jours d'incubation à 28°C, les caractéristiques suivantes ont été observées sur les différents milieux de culture (**figure 26**).

Sur PDA, le diamètre des colonies était de 28 à 30 mm, les colonies étaient plates, denses, très veloutées à poudreuses avec un centre un peu en relief, des bords bien définies et une sporulation abondante. La surface des colonies était bleu-grisâtre au centre et blanche au bord avec une grande production d'exsudats jaunâtres à transparents, et des pigments solubles dorés, le revers était gris pâle et peu sillonné.

Sur MEA, le diamètre des colonies était de 31 à 32 mm, les colonies étaient plates, denses, veloutées à poudreuses, avec un centre un peu en relief, bords bien définis et une sporulation abondante, La surface des colonies était verte terne à grise-jaunâtre au centre et blanches sur les bords ; des exsudats jaunâtres à transparents ont été produits, mais pas de pigments solubles, le revers était beige-jaunâtre et sillonné.

La croissance des colonies sur CDA était restreinte, avec des diamètres atteignant les 25 à 26 mm, avec des colonies plates à bords bien définis et une faible sporulation. La surface des colonies était grisâtre à rougeâtre, et le revers orange à rouille pâle.

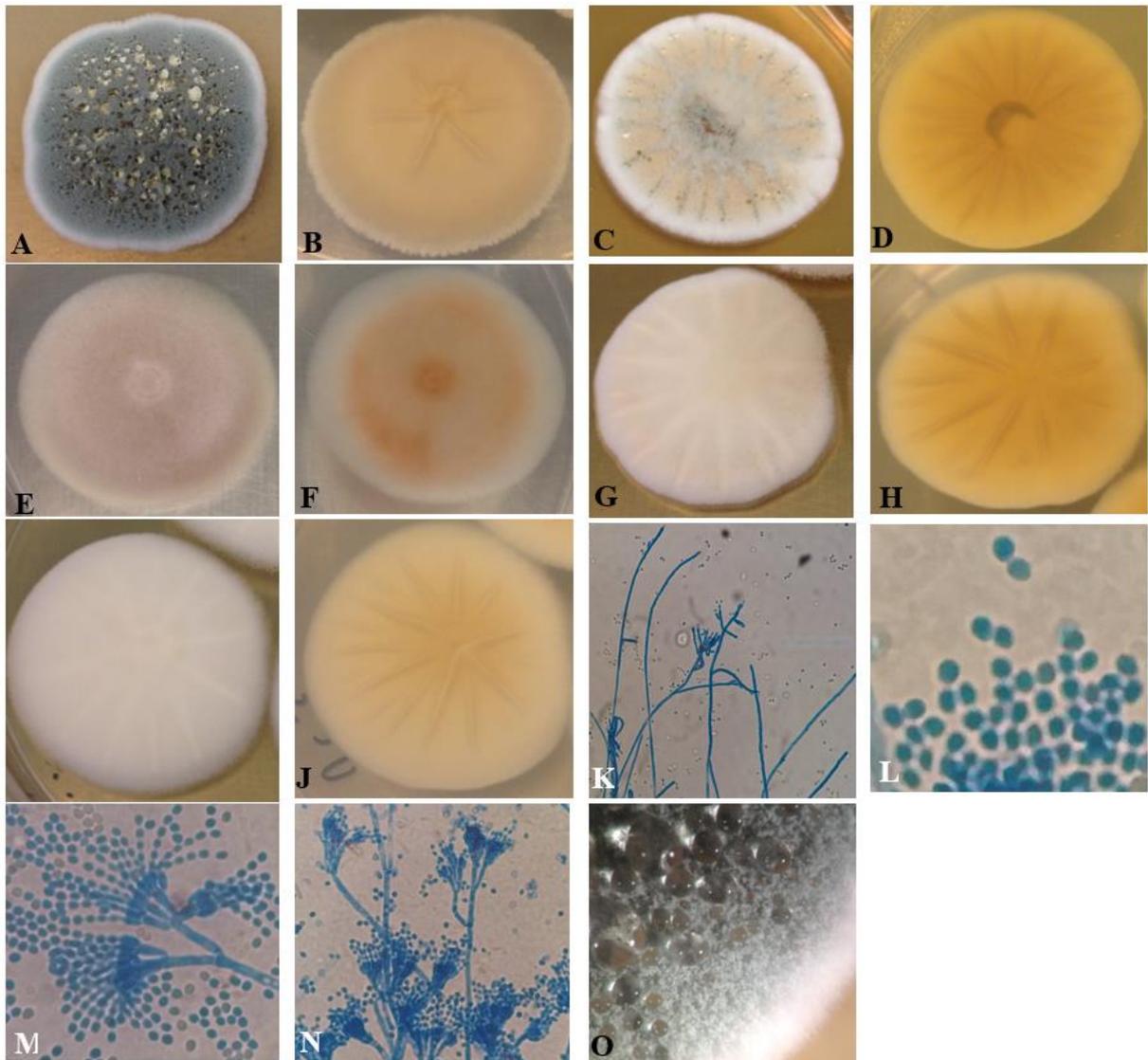
Sur CYA, les colonies étaient d'un diamètre de 38 à 39 mm, légèrement denses, veloutées, un peu surélevées avec des bords bien définis et une faible sporulation. La surface des colonies était blanchâtre et le revers beige-jaunâtre et sillonné.

Sur YES, les colonies étaient d'un diamètre de 34 à 35 mm, légèrement denses, veloutées, un peu surélevées, avec des bords bien définis, sans sporulation, La surface des colonies était blanche et le revers beige sillonné.

Les conidiophores à parois lisses, hyalins, ter à tetra-verticillés irréguliers avec trois à cinq branches ou plus, les branches étaient fortement divergentes. Les phialides en forme de flacons avec un col très court et peu visible. Les conidies largement ellipsoïdales, parfois sous-globuleuses, hyalines à verdâtres, à parois lisses. Les métules et les ramis cylindrique. Les stipes à parois lisses, Le mycélium hyalin et cloisonné. Aucun sclérote n'a été détecté (**figure 26**).

**Forme sexuée** : indéterminée.

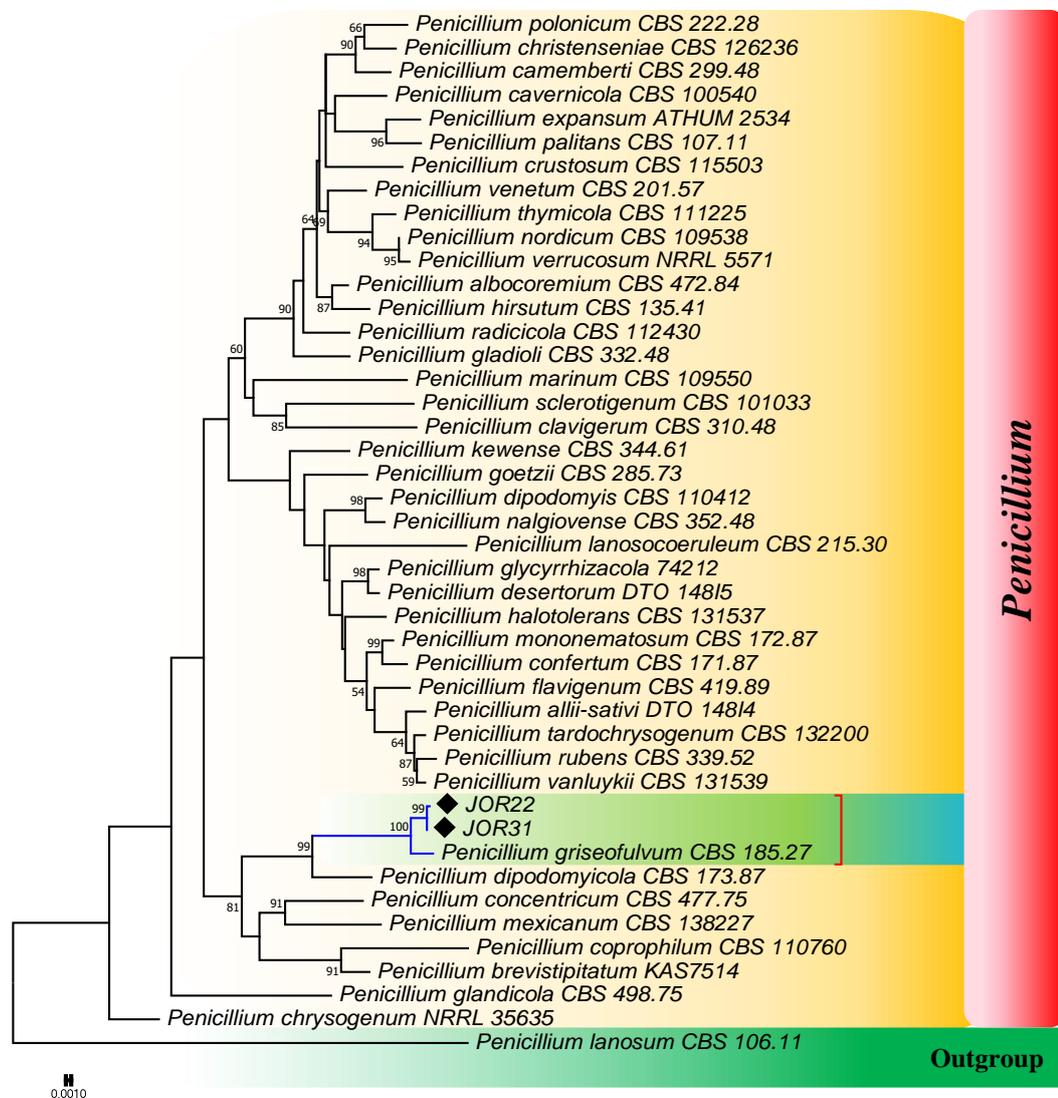
Selon les résultats du mégablast sur la base de données nucléotidiques GenBank du NCBI, les espèces les plus proches de JOR22/JOR31 étaient *Penicillium griseofulvum* CBS 185.27, *Penicillium dipodomyicola* NRRL 35583 et *Penicillium camemberti* 944 avec un pourcentage de similarité identique et très élevé de 100 % pour l'ITS. Cependant, pour BenA et RPB2, l'espèce la plus proche était *Penicillium griseofulvum* CBS 185.27 avec des pourcentages de similarité de 98.82/99.05 % pour BenA et de 98.76/98.76 % pour RPB2 (tableau 9).



**Figure 26.** Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique des isolats JOR22/JOR31 après 7 jours d'incubation à 28 °C ; sur PDA (A, B), MEA (C, D), CDA (E, F). CYA (G, H) YES (I, J). A, C, E, G, I, Surface. B, D, F, H, J, Revers. En vue microscopique ; K, Mycélium. L, Conidies. M, N, Conidies et Conidiophores. O, Exsudats sous microscope binoculaire stéréo.

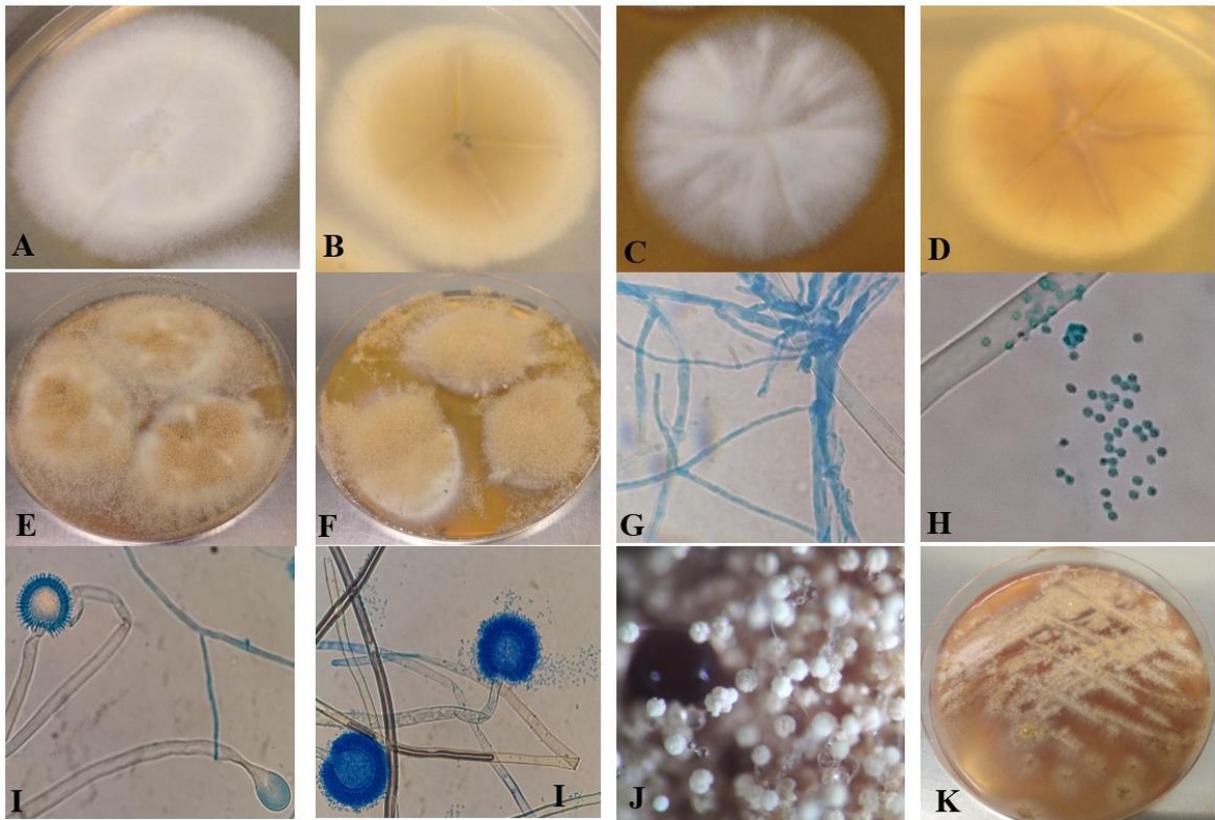
L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant un total de 44 séquences fongiques dont 41 séquences obtenues à partir du GenBank et représentant les différentes espèces les plus proches de *Penicillium* ainsi qu'une séquence de *Penicillium lanosum* CBS 106.11 utilisé comme outgroup, et les deux séquences de cette étude (JOR22/JOR31).

L'analyse phylogénétique multicentrique des régions combinées de ITS, BenA et RPB2 a été utilisée pour identifier et différencier les souches JOR22/JOR31 des espèces de *Penicillium* étroitement apparentées. L'analyse a montré que JOR22/JOR31 appartenaient clairement au clade *Penicillium* et sont étroitement groupés avec l'espèce *Penicillium griseofulvum* CBS 185.27 avec une valeur de bootstrap du Maximum likelihood très élevée (ML=100 %). Les souches JOR22/JOR31 ont donc été confirmées comme étant *Penicillium griseofulvum* (figure 27).



**Figure 27.** Arbre phylogénétique des souches JOR22/JOR31 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS-BenA-RPB2. L'arbre est enraciné avec *Penicillium lanosum* CBS 106.11. Les valeurs maximales du bootstrap  $ML \geq 50\%$  sont représentées au niveau des nœuds.

• L'isolat PLR9



**Figure 28.** Caractéristiques coloniales et morphologie microscopique de l'isolat PLR9 après 7 jours d'incubation à 28 °C ; sur PDA (A, B), MEA (C, D). Après 10 jours d'incubation sur PDA (E), sur MEA (F). A, C, Surface. B, D Revers. En vue microscopique ; G, Mycélium. H, Conidies. I, Conidiophores. J, Exsudats sous microscope binoculaire stéréo. K, Pigments rougeâtres / brunâtres.

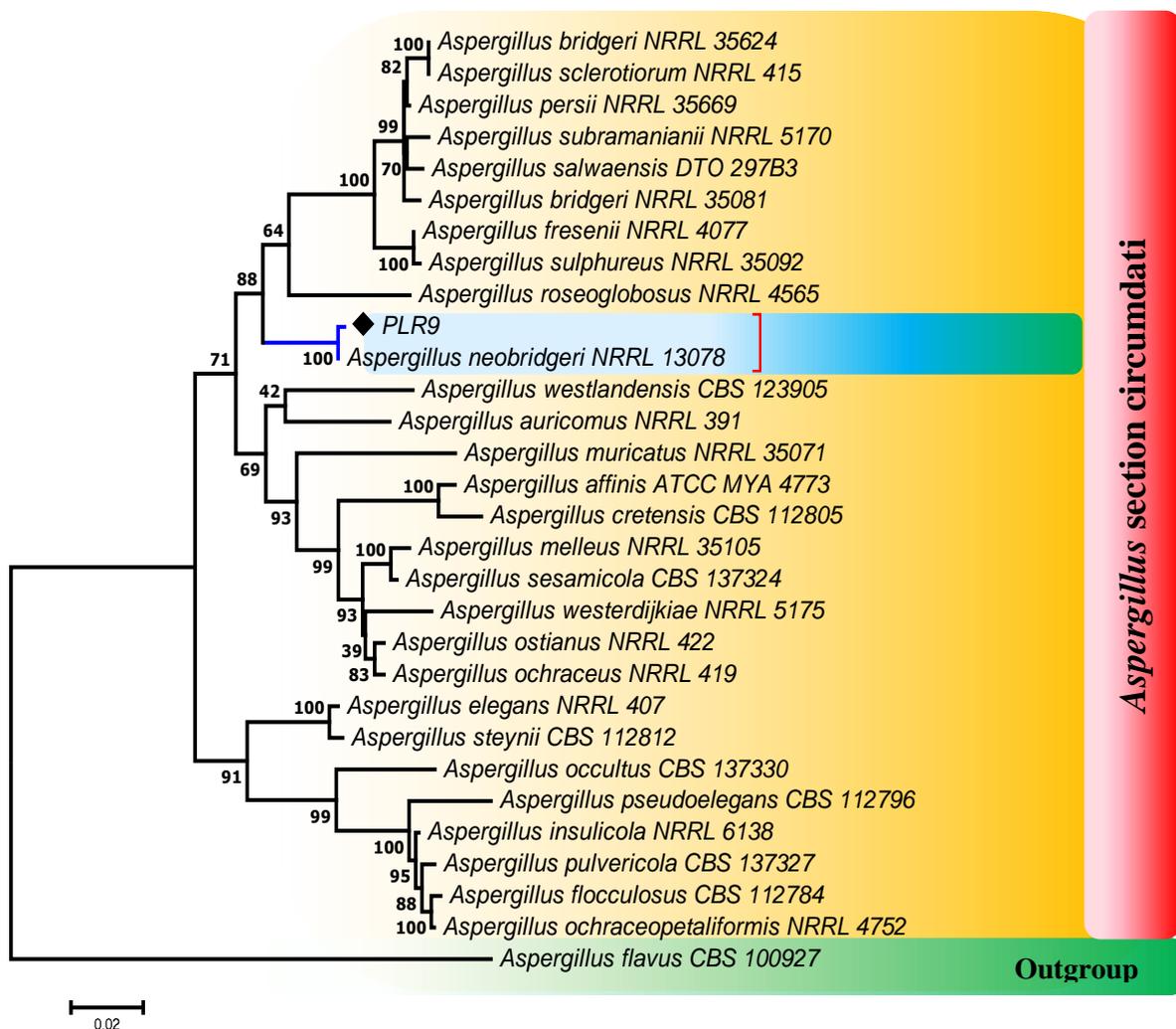
Les colonies de PLR9 ont montré une croissance rapide sur MEA et PDA, les diamètres des colonies après 7 jours d'incubation étaient respectivement de 36-38 et 38-40 mm. Les colonies étaient veloutées, lisses et plates. Leur surface était blanche sans aucune production de spores, le revers était sillonné de couleur beige à brun clair sur PDA et brunâtre sur MEA. Au-delà du septième jour d'incubation, le champignon commence à produire un pigment rougeâtre-brunâtre sur les deux milieux de culture et devient brun avec le vieillissement sur MEA. La sécrétion d'exsudats transparents a également été observée uniquement sur MEA et aucun sclérote n'a été détecté sur les deux milieux de culture. Une forte sporulation de couleur brune-jaunâtre a été observée avec une formation d'un mycélium aérien après une incubation prolongée (à partir du huitième jour d'incubation).

Les conidies étaient globuleuses, hyalines-verdâtres et lisses, regroupées en chaînes courtes. Les vésicules spatulées. Le mycélium hyalins et septé à paroi lisse et mince (**figure 28**).

Forme sexuée : indéterminée.

La recherche mégablast sur la base de données nucléotidiques GenBank du NCBI des séquences ITS, BenA et CaM de l'isolat PLR9 a montré que l'isolat de PLR9 partageait 99% de similitude avec *Aspergillus neobridgeri* NRRL 13078 (tableau 9).

L'ensemble des données alignées des séquences ITS, BenA et CaM de 30 souches, comprenant l'isolat PLR9, les souches de référence des espèces apparentées et de l'outgroup, ont été utilisés pour l'analyse phylogénétique. L'analyse du Maximum likelihood a montré que PLR9 était étroitement apparenté à l'espèce *Aspergillus neobridgeri* NRRL 13078 soutenu par une valeur du bootstrap très élevée (ML=100%). Sur la base de l'identification morphologique et moléculaire, l'isolat PLR9 a été donc identifié comme étant *Aspergillus neobridgeri* appartenant à la section Circumdati (figure 29)



**Figure 29.** Arbre phylogénétique de l'isolat PLR9 généré par l'analyse du Maximum Likelihood basé sur l'alignement combiné des données des séquences ITS, BenA et CaM. L'arbre est enraciné avec *Aspergillus flavus* CBS 100927. Les valeurs maximales du bootstrap  $ML \geq 70\%$  sont représentées au niveau des nœuds.

A ce jour et selon la littérature, aucune étude n'a été faite sur les champignons endophytes et leurs activités biologiques des plantes étudiées dans ce travail, *J. oxycedrus* L. et *P. lentiscus* L. Cependant, les endophytes associés à d'autres espèces appartenant aux genres *Juniperus* et *Pistacia* ont été examinés comme par exemple : *Juniperus procera* (Gherbawy et Elhariry, 2014, 2016), *Juniperus communis* (Pelaez et al., 2000; Kusari et al., 2009), *Juniperus chinensis* var. *sargentii*, *Juniperus rigida*, *Pistacia vera* (Dolatabad et al., 2017) et *Pistacia atlantica* (Gerchman et Inbar 2011).

Dans la présente étude, tous les isolats sélectionnés appartiennent aux *Ascomycota* et représentent les familles des Eurotiales, Diaporthales, Pleosporales et des Pezizales. Des résultats similaires ont été obtenus dans des travaux précédents sur les endophytes, où les communautés endophytes les plus couramment isolées à l'aide des protocoles d'isolement standards étaient celles des *Ascomycota* suivi des *Basidiomycota*. La plupart des champignons endophytes isolés par Zhou et al. (2018) et Du et al. (2020) appartenaient aux ordres des Eurotiales, Diaporthales, Pleosporales, Sordariales, Hypocreales Xylariales et Capnodiales, tous des ordres appartenant aux ascomycètes, ce qui confirme notre constat.

Diverses études sur la biodiversité des champignons endophytes de différentes plantes ont révélé que les genres dominants étaient ceux de *Aspergillus* et de *Penicillium* (Kim et al., 2014; Rana et al., 2019). Dans notre étude, deux isolats ont été identifiées en tant que *Penicillium griseofulvum* (isolats JOR22/JOR31) et un en tant que *Aspergillus neobridgeri* (isolat PLR9). Cette dernière espèce a été caractérisée pour la première fois en 2004 par Samson et al. (2004), qui l'a isolée du sol dans le Nebraska, aux États-Unis, elle a été décrite et validée comme nouvelle espèce. Elle n'a jamais été isolée comme endophyte, et notre étude est la première à l'isoler comme endophyte à partir de la plante *P. lentiscus* L. Cependant, diverses autres espèces du genre *Aspergillus* ont été isolées, telles que *Aspergillus flavipes* Y-62 qui a été isolé de *Suaeda glauca* (Akhter et al., 2018), *Aspergillus tennesseensis* isolé à partir des tissus internes d'une algue marine non identifiée (Li et al., 2018), *Aspergillus fumigatus* à partir des fleurs de *Rhizophora stylosa* (Zhou et al., 2018), *Aspergillus flavus* QQSG-3 isolé à partir de *Kandelia obovata* (Wu et al., 2018), *Aspergillus* sp. de *Trpterygium wilfordii* (Qi et al., 2018), *Aspergillus nidulans*, un champignon endophyte isolé à partir de *Nyctanthes arbor-tristis* Linn (Talea et al., 2018). Cheng et al. (2018), ont même constaté que le genre *Aspergillus* était parmi les champignons endophytes les plus dominants isolés de *Paeonia lactiflora* Pallas.

En ce qui concerne *Penicillium griseofulvum*, il a été isolé en tant qu'endophyte à partir de plusieurs plantes médicinales, telles que *Centella asiatica* (Prabakaran et al., 2012), certaines plantes du Brésil (Rosa et al., 2010), *Huperzia serrata* en Chine (Wang et al., 2011), les racines

des plantes côtières habitant la côte de la Corée (Kim et al., 2014), *Strychnos nux-vomica* Linn, *Piper nigrum* Linn, *Garcinia indica* Choisy, *Chlorophytum* sp., *Saraca asoca* (Roxb.), *Holarrhena Antidysentrica* Wall, *Hydnocarpus laurifolia* (Dennst.) et *Rauwolfia serpentina* L. (D'Souza et Hiremath 2015). Il a également été isolé de *Tephrosia purpurea* (Luo et al., 2015) et *Astragalus membranaceus* var. (Liu et al., 2016)

L'isolat PLT7 a été identifié et confirmé comme étant *Micronematobotrys verrucosus* appartenant au genre *Micronematobotrys* qui est un genre monotypique de l'ordre des Pezizales et de la famille des *Pyronemataceae*, ce genre ne contient qu'une seule espèce qui n'a jamais été signalée précédemment en Algérie, elle n'a été isolée qu'une seule fois et décrite comme nouvelle espèce endophyte en 2010 à partir *Quercus liaotungensis* et *Ulmus macrocarpa* de la montagne de Dongling, près de Pékin, en Chine (Sun et Guo 2010). Notre étude serait la deuxième à avoir permis l'isolement de cette espèce.

Pour les souches PLT8, PLT12, PLF5 et PLR17, et après les analyses phylogénétiques ; toutes les espèces de *Neocucurbitaria* analysées se regroupent dans un clade monophylétique dans la famille des *Cucurbitariaceae*. Nos souches se regroupent également au sein de ce genre mais dans un sous-clade monophylétique distinct de ceux des autres espèces, ce qui nous a conduit donc à proposer ces souches comme nouvelle espèce appartenant au genre *Neocucurbitaria* (famille des *Cucurbitariaceae*, ordre des Pléosporales).

Les Pléosporales sont associées à une large gamme d'hôtes et sont principalement saprobes sur les débris des végétaux, épiphytes, endophytes ou parasites des plantes vivantes, champignons et insectes, ou mycobiontes dans les lichens (Sun et Guo 2010). Un certain nombre d'espèces de *Neocucurbitaria*, comme *Neocucurbitaria quercina* (anciennement *Pyrenochaeta quercina*) et en particulier *Neocucurbitaria cava* (anciennement *Pyrenochaeta cava*) se retrouvent principalement comme endophytes ou saprobes sur les dicotylédones, les arbres et les arbustes en particulier (de Gruyter et al., 2010; Wanasinghe et al., 2017). A ce jour, *Neocucurbitaria cava* est l'espèce la plus isolée en tant qu'endophyte, elle a été isolée à partir de *Quercus cerris* (Ragazzi et al., 2001), *Ulmus* spp. (Martín et al., 2013), les aiguilles des conifères en Corée (Eo et al., 2015), *Fraxinus ornus* (Schlegel et al., 2016), *Quercus robur* (Kwaśna et al., 2016), *Cistus monspelliensis* (de Vries et al., 2018), et également de *Hydrastis canadensis* (Egan et al., 2016). De plus, plusieurs études rapportent les infections opportunistes (superficielles et systémiques) causées par certaines espèces de ce genre, elles peuvent être des agents pathogènes humains provoquant des infections de la peau et des ongles humains, par exemple *Neocucurbitaria unguis-hominis* (anciennement *Pyrenochaeta unguis-hominis*) (Toh et al., 2016). Elles provoquent également la kératite, comme *Neocucurbitaria*

*keratinophila* (anciennement *Pyrenochaeta keratinophila*) (Verkley et al., 2010; Valenzuela-Lopez et al., 2019).

L'analyse phylogénétique basée sur les données des séquences LSU et ITS montre que les isolats JOR26 et JOR27 se positionnent au sein des Sordariomycetes, et se regroupent en un nouveau taxon phylogénétique au sein de l'ordre des diaporthales. Ils constituent un clade bien apparenté aux *Sydowiellaceae* et aux *Asterosporiaceae*. Par conséquent, nous avons proposé une nouvelle famille pour accueillir les espèces de ce groupe.

Les Diaporthales est un ordre distinct des ascomycètes dans la sous-classe des Diaporthomycetidae (Sordariomycetes) et sont bien connus en tant que champignons saprobes, endophytes ou pathogènes des plantes, avec une large distribution et une large gamme d'hôtes (Du et al., 2017; Senanayake et al., 2017). Les membres des genres, à savoir les holomorphes tels que *Apiognomonina/Discula* et en particulier *Diaporthe/Phomopsis* sont les plus couramment isolés en tant qu'endophytes à partir des plantes ligneuses (Rossman et al., 2007; Moricca et al., 2018).

Les genres fongiques les plus couramment isolés à partir de *Distylium chinense*, *Paeonia ostii* « Feng Dan » et *Vellozia gigantea* étaient *Phomopsis* sp. et *Diaporthe* sp. (Ferreira et al., 2017a; Yang et al., 2018; Duan et al., 2019). Dávila et al. (2018) ont trouvé que parmi les 68 champignons isolés à partir de *Solanum quitoense*, *Diaporthe citri* et *D. schini* étaient les espèces les plus fréquemment isolées. *Diaporthe* a également été signalé comme le deuxième genre fongique dominant présent dans les tissus de *Carapichea ipecacuanha* (Ferreira et al., 2020). Dans une étude de grande envergure, les espèces de *Phomopsis* / *Diaporthe* ont été isolées d'un ensemble des 25 espèces des mangroves (Rajamani et al., 2018). *Apiognomonina* / *Discula* ont été également enregistrés comme endophytes isolés à partir de divers feuillages de plantes ligneuses vivaces comme *Quercus robur*, *Fraxinus ornus* et *Fagus sylvatica* (Stone et al., 2004; Bahnweg et al., 2005; Unterseher et al., 2007; Pelleteret et al., 2017; Ibrahim et al., 2017).

En revanche, les membres des clades sœurs de nos isolats *Asterosporiaceae* et *Sydowiellaceae*, ont été très peu isolés en tant qu'endophytes. *Asterosporium* a été isolé à partir de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (Rodrigo et al., 2018) et *Fagus sylvatica* (Kowalski et Kehr, 1992), et seules deux espèces de la famille des *Sydowiellaceae* ont été signalées comme endophyte, *Sydowiella fenestrans* à partir *Paullinia cupana* (Mart.) Ducke et *Cainiella johansonii* à partir *Ryas octopetala* (Du et al., 2017).

Cette étude nous a donc permis d'isoler trois espèces déjà connues, *Penicillium griseofulvum* ; *Aspergillus neobridgeri* qui pour la première fois est isolé comme endophyte dans le monde dans cette étude, la troisième espèce est celle de *Micronematobotrys verrucosus*, notre étude est la deuxième à permettre l'isolement et la description de cette espèce appartenant à ce nouveau genre ne contenant que cette espèce. Elle nous a également permis d'obtenir une nouvelle espèce appartenant au genre *Neocucurbitaria* (famille des *Cucurbitariaceae*) ainsi qu'une nouvelle famille appartenant à l'ordre des Diaporthales de la classe des Sordariomycetes.

**Tableau 9.** Résultats du blast des séquences des différentes régions utilisées pour chaque isolat avec les souches les plus proches sur NCBI.

| Isolats     | Régions            | Les espèces les plus proches                     | Pourcentages de similarité (%) | Numéros d'accension |
|-------------|--------------------|--|--------------------------------|---------------------|
| PLT8/PLF5   | ITS                | <i>Ochrocladosporium frigidaria</i> CBS 103.81   | 99.80 /99.80                   | KU314995            |
|             |                    | <i>Neocucurbitaria quercina</i> CBS 115095       | 96.47 /96.47                   | LT623220            |
|             | LSU                | <i>Neocucurbitaria keratinophila</i> CBS :121759 | 99.67/100.00                   | LT623215            |
|             | $\beta$ - tubuline | <i>Neocucurbitaria acanthocladae</i> CBS 142398  | 94.83 /94.83                   | MF795894            |
|             | RPB2               | <i>Neocucurbitaria aetnensis</i> C261            | 92.41 /92.84                   | MF795811            |
|             | TEF1               | <i>Neocucurbitaria acerina</i> CBS 142403        | 97.89 /97.79                   | MF795856            |
| PLT7/PLT10  | ITS                | <i>Micronematobotrys verrucosus</i> O15-2161     | 98.50/98.50                    | EU908690            |
|             | LSU                | <i>Smardaea australis</i> PSC4043                | 98.37/98.37                    | KY067463            |
|             | RPB2               | <i>Byssonectria terrestris</i> KS-94-4           | 80.68/80.68                    | AY500504            |
|             | TEF1               | <i>Smardaea reticulosperma</i>                   | 94.29 /93.99                   | KC109312            |
| JOR26/JOR27 | ITS                | <i>Hapalocystis kickxii</i> D108                 | 83.14/ 83.25                   | MG548640            |
|             |                    | <i>Stilbospora orientalis</i> CBS 135075         | 81.85 / 81.82                  | NR_155789           |
|             | LSU                | <i>Coryneum depressum</i> D202                   | 95.83/ 95.74                   | MH674330            |
|             |                    | <i>Chapeckia nigrospora</i> CBS125532            | 95.62/ 95.52                   | MK524458            |
| JOR22/JOR31 | ITS                | <i>Penicillium griseofulvum</i> CBS 185.27       | 100.00/ 100.00                 | DQ339557            |
|             |                    | <i>Penicillium dipodomyicola</i> NRRL 35583      | 100.00/100.00                  | DQ339570            |
|             |                    | <i>Penicillium camemberti</i> 944                | 100.00/100.00                  | DQ681327            |
|             | $\beta$ - tubuline | <i>Penicillium griseofulvum</i> CBS 185.27       | 98.82/ 99.05                   | JF909942            |
|             | RPB2               | <i>Penicillium griseofulvum</i> CBS 185.27       | 98.76/ 98.76                   | JF909924            |
| PLR9        | ITS                | <i>Aspergillus neobridgeri</i> NRRL 13078        | 99.82                          | EF661410            |
|             | $\beta$ -tubuline  | <i>Aspergillus neobridgeri</i> NRRL 13078        | 99.81                          | EF661345            |
|             | CaM                | <i>Aspergillus neobridgeri</i> NRRL 13078        | 98.66                          | EF661359            |

### **III.4. Optimisation des conditions de la production des molécules bioactives**

L'isolat le plus actif de chaque morphotype, JOR22, PLT8, PLF5, PLT7, JOR26 et PLR9 a été sélectionné pour le dépistage secondaire de la production des métabolites bioactifs, ainsi que pour l'optimisation des conditions de production de ces derniers.

#### **III.4.1. Sélection du milieu de culture optimum**

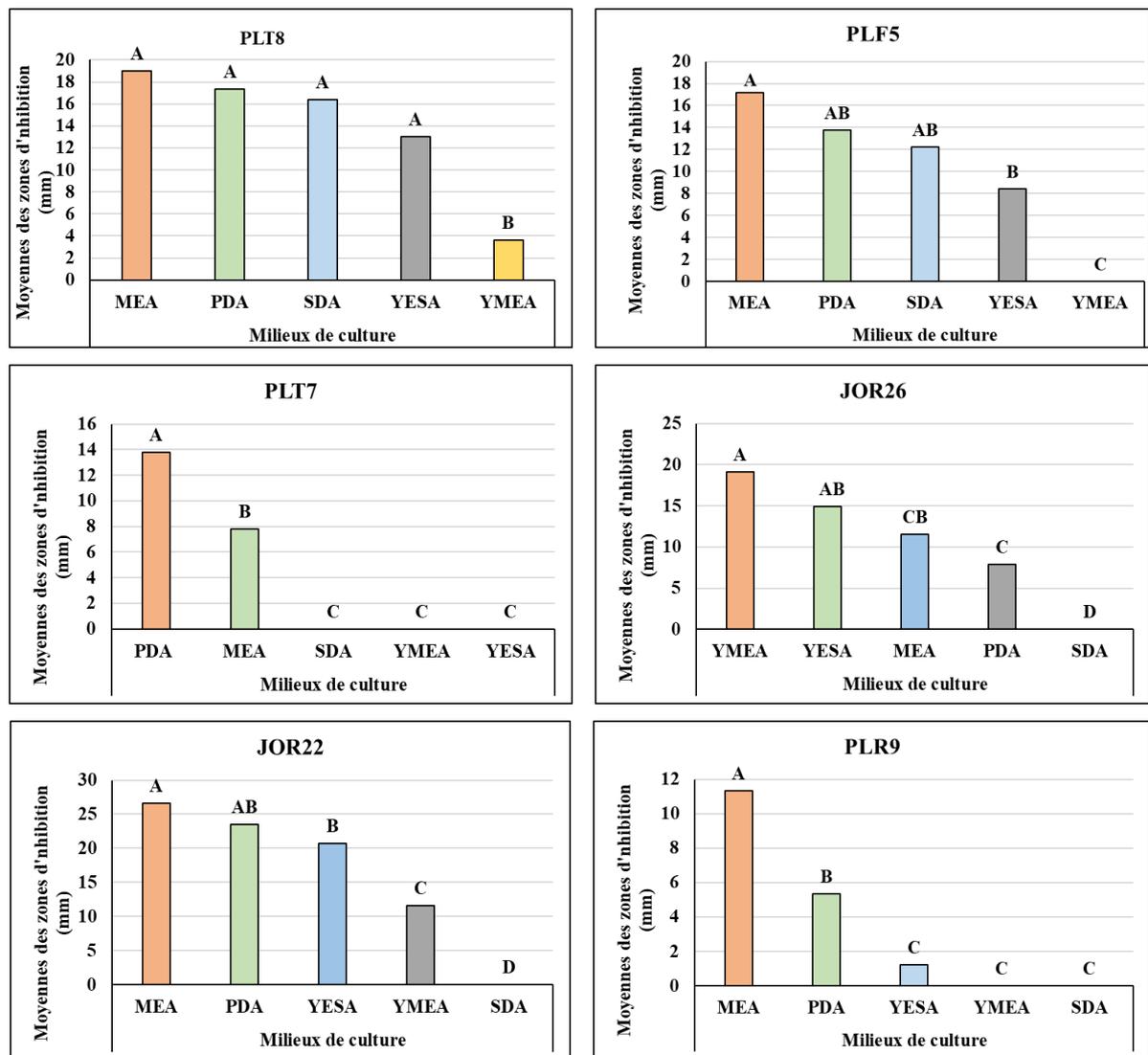
Dans cette étape, on a procédé à une sélection du milieu de culture optimum donnant une meilleure production des molécules bioactives. Pour cela ; les isolats fongiques sélectionnés précédemment ont été ensemencés sur cinq milieux de culture et leur activité antimicrobienne a été évaluée. Selon les résultats obtenus, il s'est avéré que l'activité antimicrobienne varie selon le milieu de culture ainsi que la nature des isolats, où la majorité des isolats ont donné une meilleure activité sur le milieu MEA, certains sur PDA et les autres sur YMEA.

Pour les isolats PLT8 et PLF5, le milieu de culture optimum était le MEA, où les moyennes des zones d'inhibition étaient de 19 et 17.2 mm, suivi du PDA (17.33 et 13.33 mm) puis le SDA (16.40 et 12.20 mm) respectivement. Concernant l'activité enregistrée avec les deux milieux YESA et YMEA, elle était faible à nulle surtout avec l'isolat PLF5 (**figure 30**).

La même chose a été observée pour les isolats JOR22 et PLR9 (**figure 30**), où le MEA était le milieu permettant la meilleure production des molécules bioactives, avec des moyennes des zones d'inhibition de 26.56 et 11.33 mm, suivi du PDA (23.44 et 5.33 mm) respectivement. Une bonne et une moyenne production des molécules bioactives par l'isolat JOR22 a été observée sur les deux milieux YESA (20.67 mm) et YMEA (11.56 mm), alors qu'elle était absente sur le SDA. L'activité de l'isolat PLR9 obtenue après croissance sur les autres milieux était très faible à nulle.

Le PDA était le meilleur milieu pour l'isolat PLT7 où la moyenne des zones d'inhibition a atteint les 13.80 mm, alors que l'activité obtenue sur le MEA était faible (7.80 mm) et nulle sur les autres milieux (**figure 30**).

L'isolat JOR26 était différent des autres isolats, où le milieu le mieux adapté à ce dernier était le YMEA avec une moyenne des zones d'inhibition de 19.80 mm. Une moyenne activité a été observée sur les milieux YESA et MEA (14.93 et 11.57 mm) respectivement, alors que sur le SDA l'activité antimicrobienne était nulle (**figure 30**).



**Figure 30.** Effet des milieux de culture sur l'activité antimicrobienne des isolats endophytes, les moyennes portant la même lettre ne sont pas significativement différentes à ( $p < 0,05$ ).

La production de biomasse et de composés bioactifs par les champignons est affectée qualitativement et quantitativement par les conditions de culture appliquées telles que la température, le pH, la composition du milieu, la disponibilité des nutriments, la vitesse d'agitation ainsi que la période d'incubation (Bhalkar et al., 2016). Selon l'approche « OSMAC » (One Strain-Many Compounds), il est très important de faire varier les différents paramètres de culture pour augmenter le nombre de métabolites secondaires disponibles à partir d'une même souche microbienne (Bode et al., 2002). La variation de ces conditions permet la stimulation ou l'activation des différentes voies de la biosynthèse augmentant ainsi la diversité métabolique d'une souche et par là même, les possibilités d'obtenir des composés originaux (Knight et al., 2003).

La composition chimique des milieux de culture (par exemple les sources de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre ou de fer) est l'un des facteurs les plus importants influençant

la production des métabolites secondaires. Les résultats obtenus ont démontré que la productivité variait selon l'isolat fongique et la composition des milieux. D'une façon similaire, plusieurs études ont également observé ces différences ; on citera à titre d'exemple l'étude de Dulay et al. (2015), où le Sabouraud Dextrose Broth (SDB) était le milieu de culture le plus approprié pour les quatre espèces de champignons étudiées. Kalyani et al. (2016) ont constaté également que la croissance et la production des métabolites par *Aspergillus niger* étaient maximales lorsque le milieu Sabouraud est utilisé. D'autres études ont montré que la croissance et la production maximales des métabolites secondaires par *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Xiang et al., 2016), la souche 50 de *Penicillium* sp. (Fan et al., 2019), *Colletotrichum gloeosporioides* KP11 (Gasong et Tjandrawinata 2016), *Alternaria* sp. MGTMMPO31 (Palanichamy et al., 2018) et *Aspergillus ochraceus* MSEF6 (Attia et al., 2019) étaient observées avec le milieu Potato Dextrose Broth (PDB). D'un autre côté, Nguyen et al. (2018), Kumari et al. (2018), Keral et al. (2019) et Chatterjee et al. (2019) ont rapporté que le milieu Malt Extract Broth (MEB), est celui qui facilite la croissance fongique et est le plus efficace pour une production maximale des métabolites bioactifs par rapport aux autres milieux utilisés, ce qui s'accorde également avec les résultats obtenus dans cette étude.

Le carbone et l'azote sont les composants les plus importants des milieux de culture, la sélection de leurs sources et de leurs concentrations jouent un rôle crucial dans la croissance des champignons ainsi que dans leur production des métabolites primaires et secondaires (Singh et al., 2017). Shahid et Nadeem, (2015) ont indiqué que le saccharose et l'extrait de levure étaient les sources de carbone et d'azote les plus favorables à la croissance du mycélium et la production des alcaloïdes de l'ergot de certaines espèces de *Penicillium* par rapport à diverses autres sources. Une autre étude de Fan et al. (2019) a montré que la production d'une famille spécifique d'aminolipides linéaires était exclusivement détectée dans le milieu contenant du saccharose. Cependant, dans l'étude de Gasong et Tjandrawinata (2016), il a été montré que par rapport à d'autres sources de carbone, la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides* était à son maximum lorsqu'il était incubé dans un milieu riche en amidon.

L'influence des sources de carbone et d'azote sur la production des métabolites secondaires a également été signalée. Petersen et al. (2019) ont observé que l'inoculation des souches de *Penicillium* sur un milieu Wickerham 15 riche en nutriments, contenant de grandes quantités de sources de carbone (glucose et malt) et d'azote (peptone et levure), ainsi qu'une source de sel sous forme de mélange de sel marin, produisent une grande diversité chimique. Au contraire, ces souches produisent un faible nombre de composés chimiques lorsqu'elles sont inoculées sur le milieu Artificial Seawater pauvre en nutriments.

Nos résultats peuvent être expliqués par le fait que les champignons ont une très grande préférence pour un ou plusieurs composés chimiques de leur milieu approprié. Le MEA est composé de glucose, amidon et de maltose comme sources de carbone, alors que la source d'azote est constituée de peptone et de protéines dégradées. Il est clair que les isolats ayant donné une bonne activité après fermentation sur le MEA exigent les deux sources à la fois et en quantité importante pour que leur activité soit élevée. Cette exigence est expliquée par la diminution de l'activité de ces isolats avec le PDA et les autres milieux ne contenant pas de peptone comme source d'azote ou contiennent une faible concentration de glucose comme source de carbone. En ce qui concerne, l'isolat PLT7, une grande préférence à l'amidon a été observée ; puisque le PDA contient en plus du glucose qui est le sucre le plus simple et qui est prêt à une assimilation directe, une teneur en amidon plus élevée. Une autre raison principale suggérerait que la PDA pourrait avoir des composants tels que des ions métalliques ou d'autres micronutriments appropriés pour que les enzymes agissent efficacement et améliorent la croissance et la production de métabolites (Pradeep et *al.*, 2013).

Le milieu YMEA est constitué de glucose, et de concentrations élevées de sources d'azote représentées par du peptone, l'extrait de malt et surtout l'extrait de levure qui est très riche en protéines, ce qui montre qu'une concentration plus élevée en azote dans le milieu YMEA semble importante pour déclencher les voies de synthèse des métabolites bioactifs pour l'isolat JOR26. D'un autre côté, cette activité plus forte observée sur le milieu YMEA peut également s'expliquer par la présence de certains acides aminés, vitamines, coenzymes et facteurs de croissance dans les extraits de levure et de malt nécessaires aux organismes exigeants (Pradeep et *al.*, 2013).

Nos résultats ainsi que d'autres données de la littérature indiquent clairement que la croissance et le rendement de la biomasse et des métabolites secondaires bioactifs des différentes espèces de champignons varient considérablement en fonction des espèces et de leur état nutritionnel.

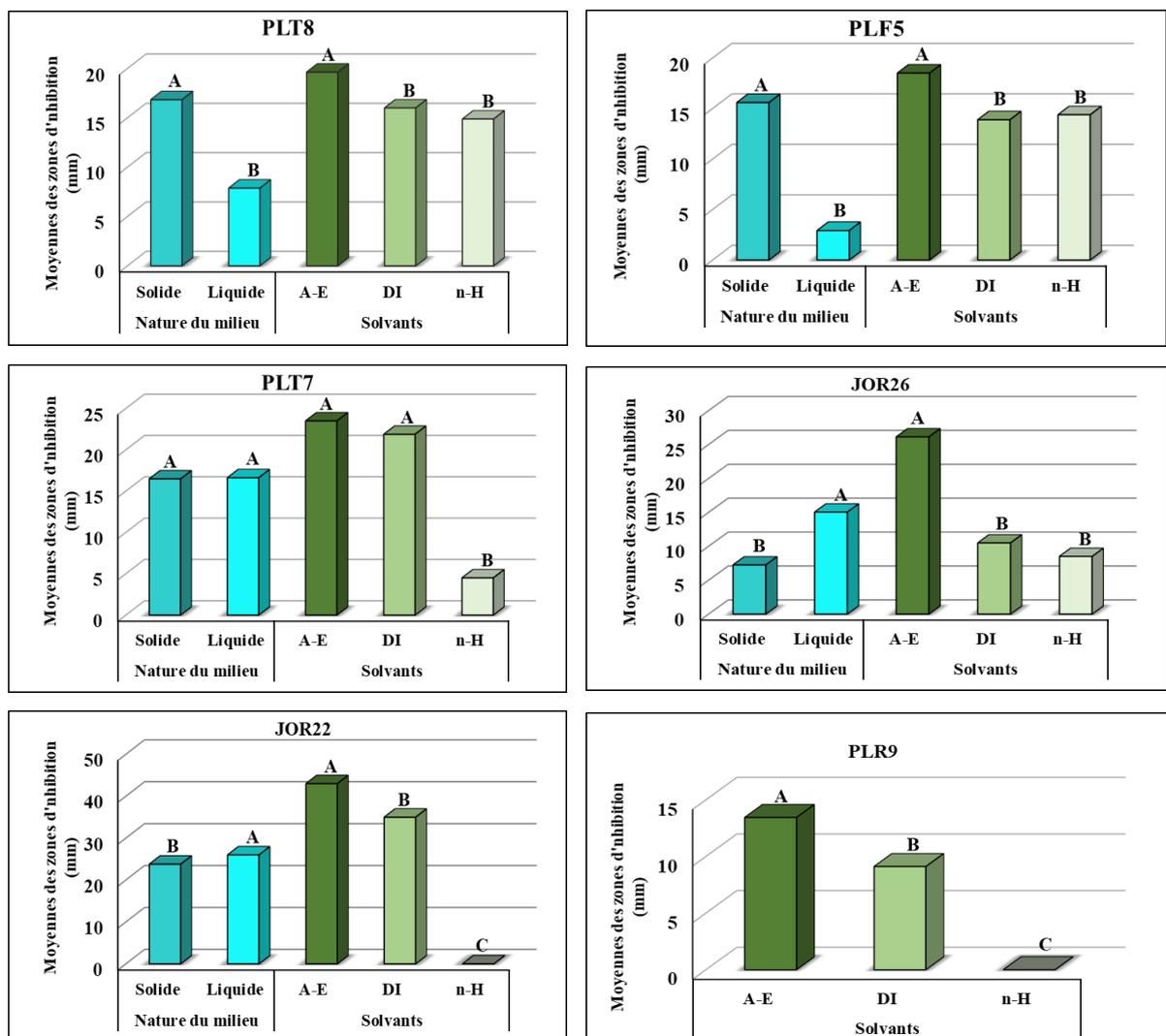
### **III.4.2. Choix du meilleur solvant d'extraction et du type de fermentation**

Afin de choisir la nature physique du milieu (solide ou liquide) ainsi que le meilleur solvant donnant une meilleure activité, chaque isolat a été inoculé sur son milieu optimum précédemment sélectionné en phase liquide et solide, ensuite une extraction par trois solvants de polarité différente, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'n-hexane a été réalisée.

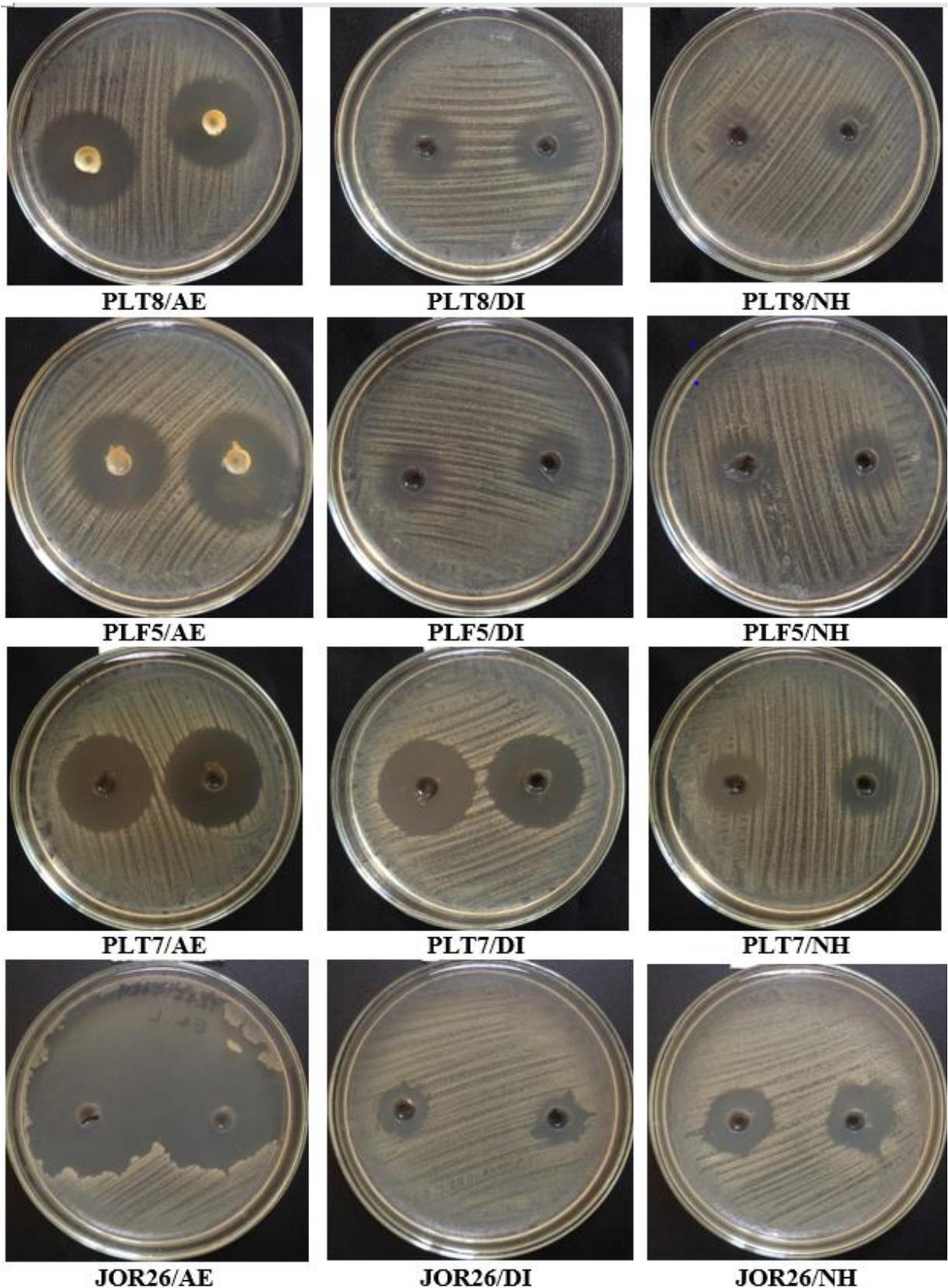
Selon l'analyse statistique et les résultats obtenus après dépistage de l'activité antimicrobienne, tous les extraits des isolats fongiques ont montré une activité antimicrobienne

à l'exception de certains obtenus après extraction avec l'n-hexane. D'une manière générale, l'efficacité des extraits fongiques, dépendait aussi bien du type de fermentation, de l'isolat, que de la polarité du solvant (**figure 31**).

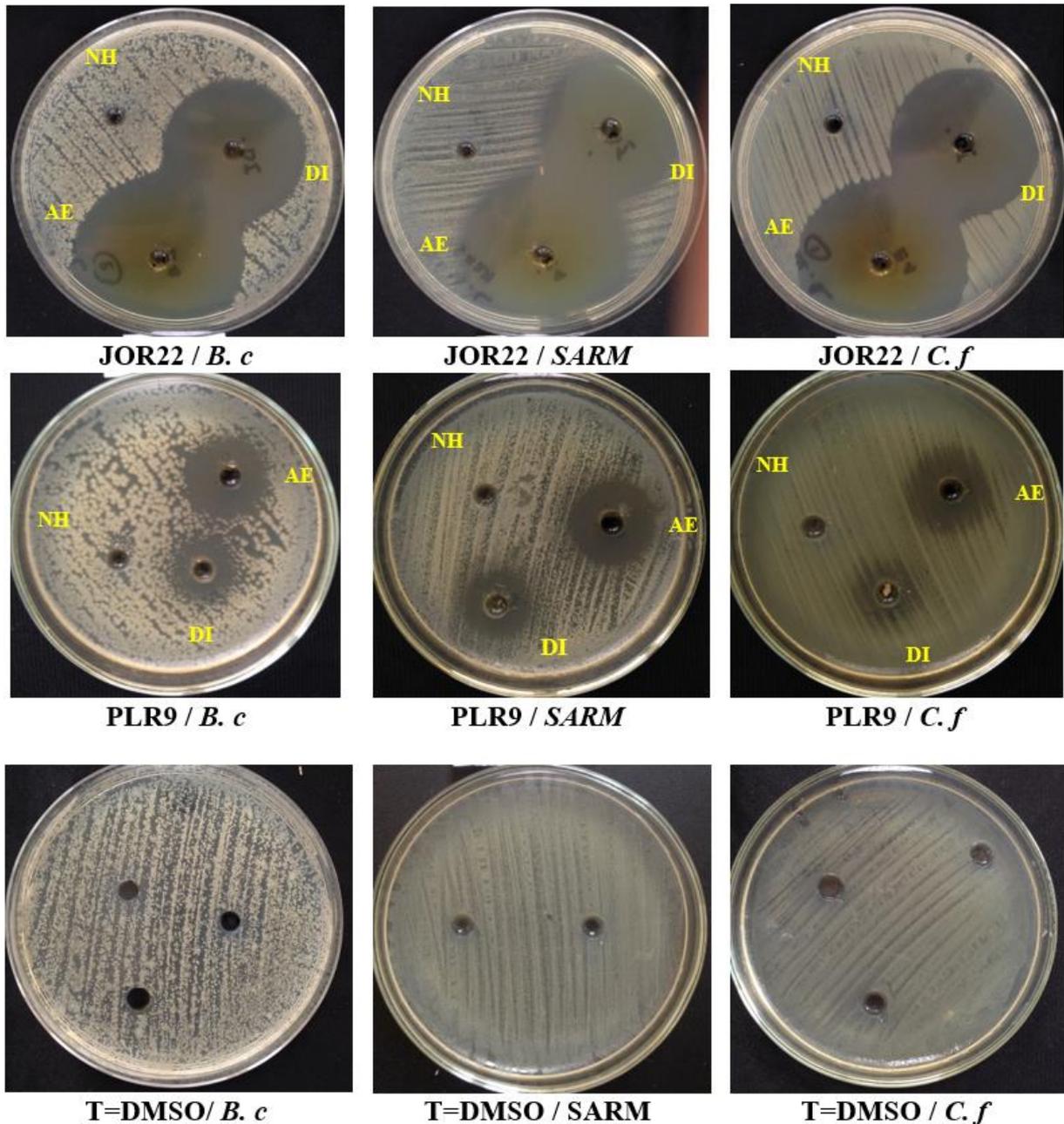
Concernant le type de fermentation, pour PLT8 et PLF5, les extraits obtenus après extraction des milieux solides étaient plus actifs que ceux obtenus après fermentation sur milieux liquides. Les moyennes des zones d'inhibition étaient de 16.83 et 15.58 mm respectivement. En revanche, pour les isolats JOR22 et JOR26, les extraits obtenus après fermentation en milieux liquides étaient plus actifs (26 et 15.04 mm) respectivement. Pour l'isolat PLT7, aucune différence significative n'a été observée entre l'efficacité des extraits obtenus après fermentation en milieu liquide et solide (16.63 et 16.48 mm) respectivement. Concernant l'isolat PLR9, une seule fermentation sur milieu liquide a été réalisée.



**Figure 31.** Effet de la nature physique du milieu et des solvants sur l'activité antimicrobienne des isolats endophytes. Les moyennes portant la même lettre ne sont pas significativement différentes à ( $p < 0,05$ ). **A-E** : Acétate d'éthyle, **DI** : Dichlorométhane, **n-H** : n-Hexane.



**Figure 32.** Effets des différents solvants sur l'extraction et l'activité antibactérienne des isolats fongiques. (*B. c*) : *Bacillus cereus* ATCC 10876, (*SARM*) : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ATCC 43300, (*E. c*) *Escherichia coli* 1, (*C. f*) : *Citrobacter freundii* ATCC 8090, (T) : Témoin négatif (DMSO), (EA) : Acétate d'éthyle, (DI) : Dichlorométhane, (NH) : n-Hexane.



**Figure 32 (suite).** Effets des différents solvants sur l'extraction et l'activité antibactérienne des isolats fongiques. (*B. c*) : *Bacillus cereus* ATCC 10876, (*SARM*) : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ATCC 43300, (*E. c*) *Escherichia coli* 1, (*C. f*) : *Citrobacter freundii* ATCC 8090, (*T*) : Témoin négatif, (DMSO), (EA) : Acétate d'éthyle, (DI) : Dichlorométhane, (NH) : n-Hexane.

Pour les solvants, les extraits les plus actifs des isolats PLT8, PLF5, JOR22, JOR26 et PLR9 étaient ceux obtenus après extraction à l'acétate d'éthyle, avec des moyennes des zones d'inhibition de 19.63, 18.50, 43, 26.13 et 13.44mm respectivement et une différence significative à  $p < 0.05$  avec les deux autres solvants, contrairement à l'isolat PLT7 où il n'y avait aucune différence significative entre l'extrait d'acétate d'éthyle (23.50mm) et de dichlorométhane (21.88mm). En deuxième position, on trouve les extraits de dichlorométhane, suivis des extraits de n-Hexane avec une activité faible à nulle pour la plupart des isolats à

l'exception de PLT8 et PLF5 qui avaient une activité considérable et sans différence significative à  $p < 0.05$  avec celles des extraits du dichlorométhane, où les moyennes des zones d'inhibition étaient de 16 et 13.88mm pour le dichlorométhane et de 14.88 et 14.38mm pour l'n-Hexane respectivement (**figure 31 et 32**).

Plusieurs études ont trouvé que la production, les changements dans le métabolisme et la diversité des molécules biochimiques produites par les champignons sont non seulement affectés par la composition chimique des milieux de culture mais aussi par le régime de culture solide ou liquide. Fan et *al.*, (2019) ont trouvé que certains métabolites sont produits uniquement sur un seul régime de culture, comme le cyclic depsipeptide (enniain B1) qui n'a été détecté que dans des conditions de culture liquide, sa production dépendait du régime de culture, mais n'était pas très affectée par la variation des milieux de croissance. Cependant, certains métabolites sont présents dans les deux régimes de culture comme le polykétide aromatique produite par l'isolat 68 de *Penicillium* sp. qui a été trouvé dans tous les milieux solides et liquides utilisés, alors que ses analogues atrovenetinone ( $m/z [M + H]^+ 341.1123$ ) et atrovenetin ( $m/z [M + H]^+ 343.1276$ ) étaient exclusifs au régime de cultures liquides. Très peu de métabolites se sont révélés très exclusifs ; leur production dépendait à la fois du régime de culture mais aussi de la nature du milieu, par exemple, la penitrem B produite par l'isolat 68 de *Penicillium* sp. a uniquement été détecté dans l'extrait du milieu solide Sucrose Yeast Medium (Fan et *al.*, 2019). Dans une étude récente, Zhang et *al.* (2015) ont observé que lorsque *Xylaria* sp. est mise en culture sur milieu solide, elle produisait cinq analogues connus de type cytochalasine 1–5, alors que sur milieu liquide, elle produisait six nouveaux dérivés d' $\alpha$ -pyrone, les xylapyrones A – F (composés 6-11),

Cette variation dans les résultats obtenus entre les isolats confirme ce qui a été trouvé auparavant et peut-être expliqué par le fait que le régime de culture et la nature chimique du milieu de culture influencent fortement la quantité et/ou la diversité chimique des métabolites bioactifs produits par les champignons et par conséquent influencent également les activités biologiques des extraits.

L'un des principaux problèmes rencontrés lors de la production des produits naturels dans l'industrie pharmaceutique est leur faible rendement. Pour résoudre ce problème, la recherche et l'optimisation d'un bon système de solvant permettant l'extraction du maximum de molécules et l'amélioration du rendement des composés bioactifs présents dans les extraits bruts sont souvent effectuées (Kamat et *al.*, 2020).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus dans plusieurs études précédentes par exemple ceux de Tong et *al.* (2014) et Mu'azzam et *al.* (2015) qui ont constaté que les extraits d'acétate d'éthyle présentaient la plus forte activité antimicrobienne, suivis par l'extrait de dichlorométhane, et enfin par celui de l'n-Hexane qui présentait la plus faible ou aucune activité. Le potentiel antimicrobien le plus élevé de l'extrait d'acétate d'éthyle par rapport à d'autres solvants a également été observé chez plusieurs espèces de champignons endophytes telles que, *Alternaria alternata* isolé de l'olivier *Olea europaea* L. (Malhadas et *al.*, 2017), *Chaetomium* sp. NF15 isolé à partir de *Justicia adhatoda* L. (Fatima et *al.*, 2016), *Neofusicoccum ribis* à partir du Gandaria (*Bouea macrophylla* Griffith) (Anindyawati et Praptiwi 2019), *Aspergillus twelwitschiae* un champignon marin (Sewelam et *al.*, 2017), *Aspergillus terreus* (JAS-2) associé à *Achyranthus aspera* (Goutam et *al.*, 2016) et *Alternaria* sp. isolé à partir de la plante médicinale *Euphorbia hirta* (L.) (Singh et *al.*, 2015). Rahmawati et *al.* (2018) ont également trouvé des activités antibactériennes et antifongiques plus élevées dans la fraction d'acétate d'éthyle de champignons endophytes isolés de *Falcataria moluccana* suivis par les extraits du méthanol et de l'n-Hexane. (Ramos et *al.*, 2010) ont démontré que les extraits fongiques d'acétate d'éthyle et de n-butanol présentaient l'activité antimicrobienne la plus élevée contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif par rapport aux extraits aqueux et éthanolique. De même, l'activité maximale des extraits fongiques a été observée avec les extraits d'acétate d'éthyle même avec d'autres types d'activités biologiques. Par exemple, l'activité antioxydante (Fatima et *al.*, 2016; Rahmawati et *al.*, 2018), et l'activité cytotoxique et antiproliférative (Kumari et *al.*, 2018; Dhayanithy et *al.*, 2019).

Dans certaines études, les composés antimicrobiens étaient présents dans la fraction hautement polaire (méthanol), des champignons endophytes *Cochliobolus kusanoi* isolé à partir de *Nerium oleander* L. (Alurappa et *al.*, 2014), et *Chaetomium globosum* isolé à partir de *Withania somnifera* (Kumar et *al.*, 2013). Rahmawati et *al.* (2018) ont au contraire constaté que l'extrait brut de l'hexane du mycélium fongique est le seul extrait qui a présenté une activité antifongique par rapport aux extraits d'acétate d'éthyle et de méthanol.

Les solvants organiques jouent un rôle important dans l'extraction des produits naturels bioactifs sous forme de composés bruts à partir des milieux de culture (Sewelam et *al.*, 2017). En fonction de leur polarité, ils peuvent également extraire des métabolites secondaires présents de manière différentielle (Kamat et *al.*, 2020). L'acétate d'éthyle, le chloroforme et le dichlorométhane sont des solvants semi-polaires qui peuvent dissoudre les stérols, les alcaloïdes, les glycosides, les terpénoïdes et les flavonoïdes. Tandis que l'hexane est non polaire et peut dissoudre des composés non polaires tels que la lignine, la cire, les lipides, l'aglycone,

et le stérol (Tata et *al.*, 2020). Cela signifie que les extraits des isolats PLT8, PLF5, PLT7 et JOR26 renferment au moins deux différents groupes chimiques de métabolites actifs répartis selon leur polarité, le premier avec des molécules semi-polaires qui sont extraites par l'acétate d'éthyle avec une forte concentration, et le second avec des molécules apolaires qui sont extraites avec le n-Hexane mais à faible quantité. Tandis que les isolats JOR22 et PLR9, ne produisent que des molécules semi-polaires avec des quantités importantes. De plus, Il existe divers rapports selon lesquels l'activité antibactérienne dépend du solvant utilisé, de la structure des composés présents dans les extraits et de la souche étudiée. Les extraits bruts récupérés par des différents solvants organiques possèdent des composés chimiques différents et en différentes quantités et par conséquent, ils agissent de manière différentielle sur les bactéries (Padalia et Chanda 2015).

### **III.5. Activité antimicrobienne des extraits d'acétate d'éthyle**

Tous les extraits de l'acétate d'éthyle ont été testés contre une large gamme de bactéries de référence et multirésistantes aux antibiotiques, et un plus grand nombre de champignons dermatophytes par la technique des puits.

#### **III.5.1. Activité contre les bactéries multirésistantes**

Selon les diamètres des zones d'inhibition, l'efficacité des extraits contre les bactéries testées a été classée comme suit :

- Activité très forte, diamètre de zone  $\geq 30$  mm ;
- Activité forte, diamètre de zone 21–29 mm ;
- Activité modérée, diamètre de zone 16–20 mm ;
- Activité faible, diamètre de zone 11–15 mm ;
- Peu ou pas d'activité, diamètre de zone  $\leq 10$  mm (Mutai et *al.*, 2009).

Les extraits d'acétate d'éthyle des isolats PLT8, PLT7, PLF5 et JOR26 étaient actifs uniquement contre toutes les bactéries à Gram positif, alors que les bactéries à Gram négatif étaient complètement résistantes (**figure 42**).

Pour l'extrait de l'isolat PLT8 (**figure 33**), l'activité était très forte contre *M. luteus* et *M. yannicii*, la même chose a été observée avec l'extrait de PLF5 contre ces deux bactéries en plus de *S. aureus* 3,4 et 5 et *S. pyogenes*. *M. yannicii* était la bactérie la plus sensible avec des zones d'inhibition atteignant les 50 mm. Pour le reste des bactéries, l'activité de ces deux extraits était forte (**figure 34**).

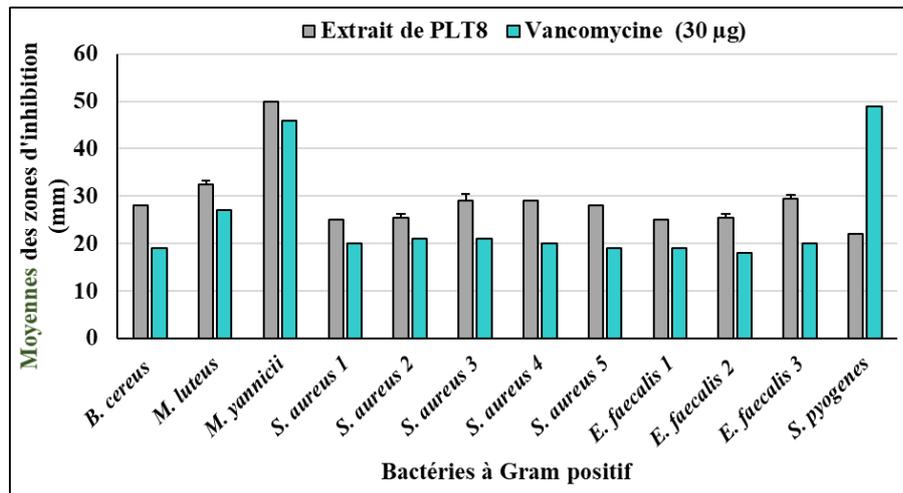
L'activité antibactérienne de l'extrait de l'isolat PLT7 était très forte contre 4 des bactéries pathogènes testées, où les plus grandes zones d'inhibition étaient de 27.5 et 28 mm contre *S. aureus* 2 et *M. yannicii* respectivement, l'activité était moyenne contre la plupart des autres bactéries (17 à 18 mm) sauf contre *E. faecalis* 1 où elle était faible (11 mm) (**figure 35**).

L'efficacité de l'extrait de l'isolat JORR26 était très forte contre *S. aureus* 1 (30 mm), *B. cereus* (31.5 mm) et *S. aureus* 2, (33 mm), forte contre *S. pyogenes* et *M. yannicii* avec des moyennes des zones d'inhibition de 24 et 25.5 mm respectivement. Pour le reste des souches de *S. aureus*, l'activité était moyenne (17 à 19 mm), alors que contre les espèces du genre *Enterococcus* l'activité était faible (14 mm) (**figure 36**).

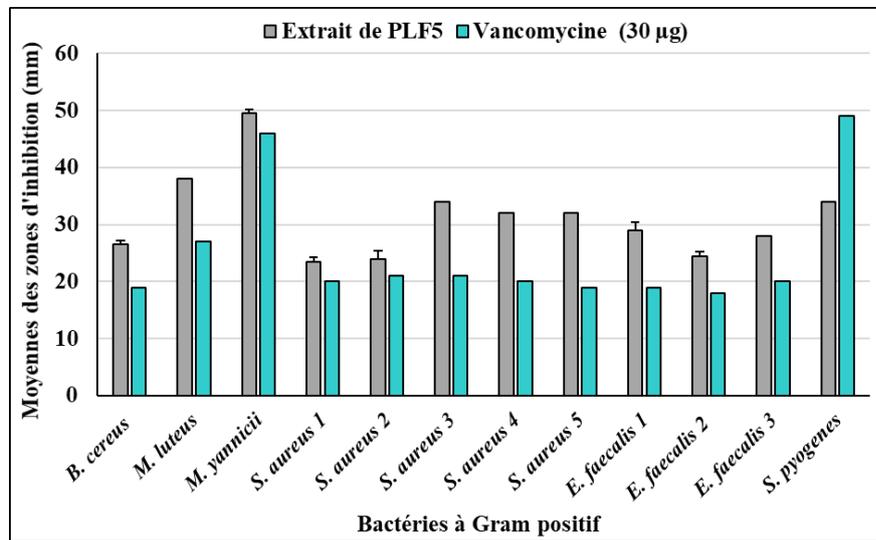
L'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLR9 s'est révélé avoir une activité antibactérienne importante contre les bactéries à Gram positif et une activité modérée contre les bactéries à Gram négatif. Les zones d'inhibition les plus importantes ont été observées contre *S. aureus* 3, *S. aureus* 5 et *E. coli* 1 avec 21 mm de diamètre. En revanche, une inhibition d'uniquement 9 mm a été observé contre *K. pneumoniae* 1 et *K. pneumoniae* 2. Cependant, les souches *P. aeruginosa* 2 et *P. aeruginosa* 3 étaient les bactéries les plus résistantes (**figure 37 et 38**).

En se basant sur les diamètres des zones d'inhibition, en plus d'être l'extrait le plus actif par rapport aux extraits des autres isolats, l'extrait de l'isolat JOR22 était actif contre toutes les bactéries à Gram positif et négatif. L'efficacité de cet extrait était très forte contre la plupart des bactéries pathogènes surtout contre les différentes souches d'*E. coli* et celles de *S. aureus* où les moyennes des zones d'inhibition atteignaient les 45 mm contre *S. aureus* 1 et 51.5 mm contre *E. coli* 1, alors que contre la plupart des autres bactéries, l'activité était forte (**figure 39 et 40**).

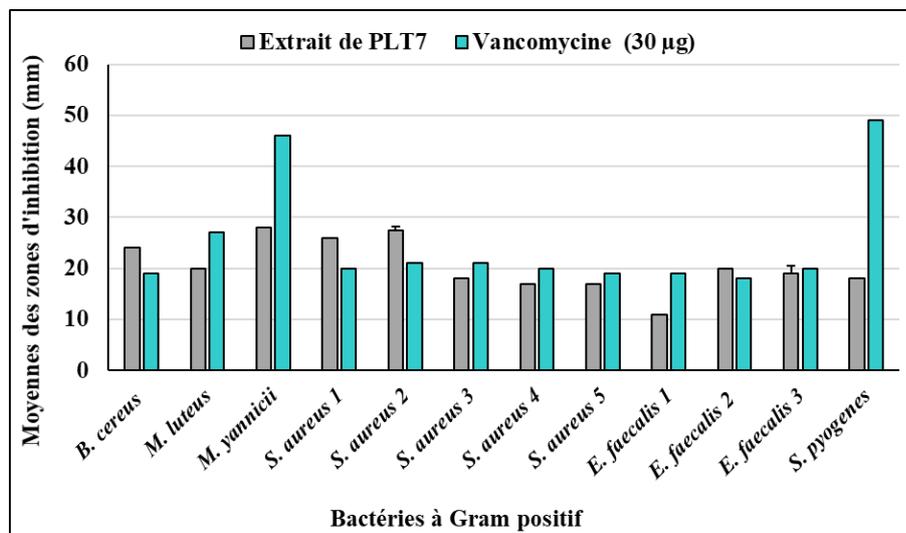
La comparaison des moyennes des zones d'inhibition pour les isolats PLR9 et JOR22, montre que les bactéries à Gram positif ont une sensibilité plus grande aux extraits d'acétate d'éthyle (17.96 et 36.08 mm) par rapport à celle des bactéries à Gram négatif (11 et 34.27 mm) respectivement. Cependant, les extraits des isolats PLT7, PLT8, PLF5 et JOR26 étaient actifs uniquement contre les bactéries à Gram positif, alors que les bactéries à Gram négatif étaient complètement résistantes (**figure 41**).



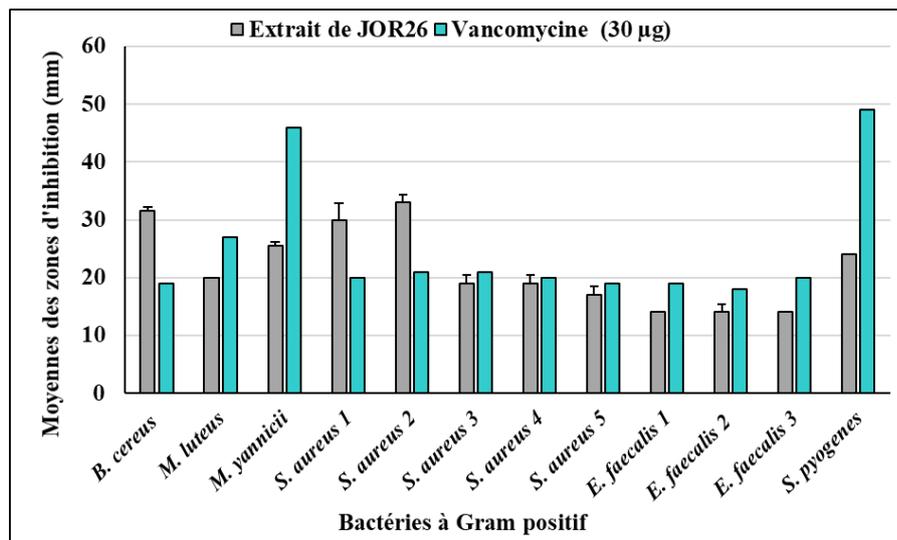
**Figure 33.** Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLT8 contre les bactéries à Gram positif, (n=3, moyenne  $\pm$ SD).



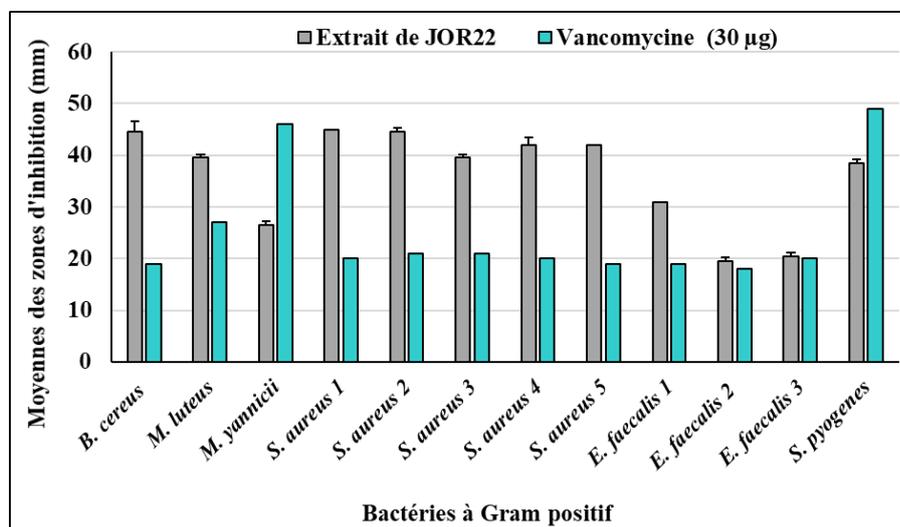
**Figure 34.** Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLF5 contre les bactéries à Gram positif, (n=3, moyenne  $\pm$ SD).



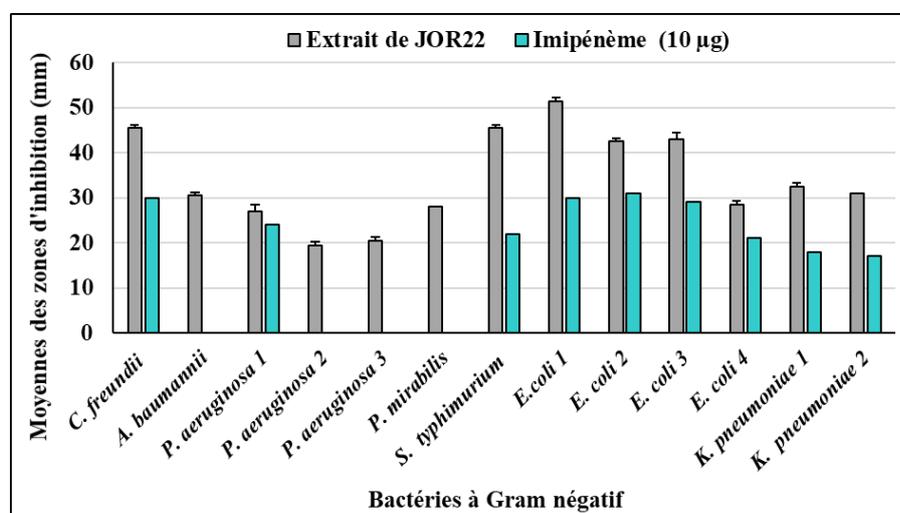
**Figure 35.** Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLT7 contre les bactéries à Gram positif, (n=3, moyenne  $\pm$ SD).



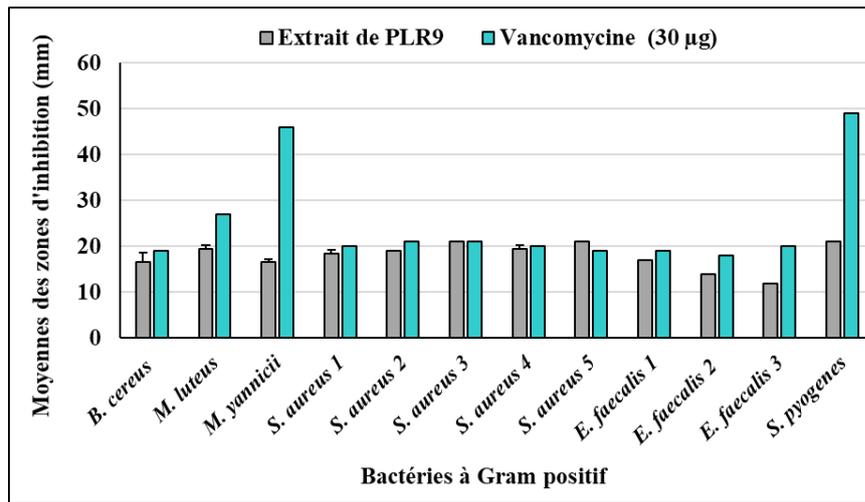
**Figure 36.** Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat JOR26 contre les bactéries à Gram positif, (n=3, moyenne ±SD).



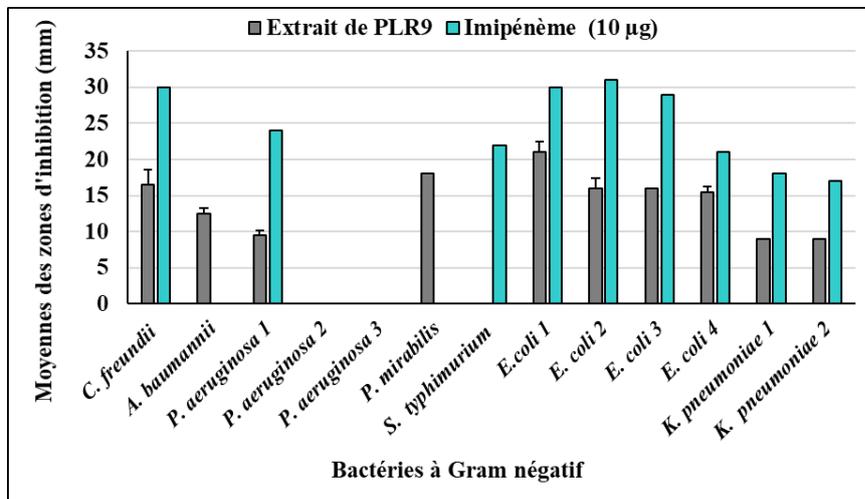
**Figure 37.** Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat JOR22 contre les bactéries à Gram positif, (n=3, moyenne ±SD).



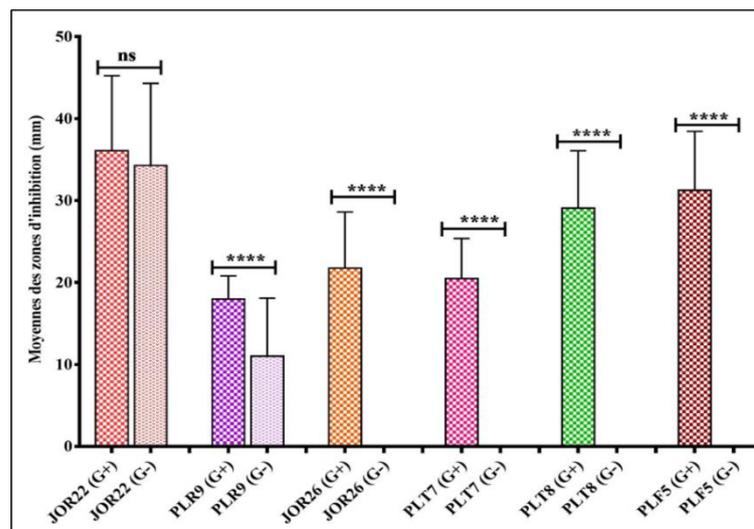
**Figure 38.** Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat JOR22 contre les bactéries à Gram négatif, (n=3, moyenne ±SD).



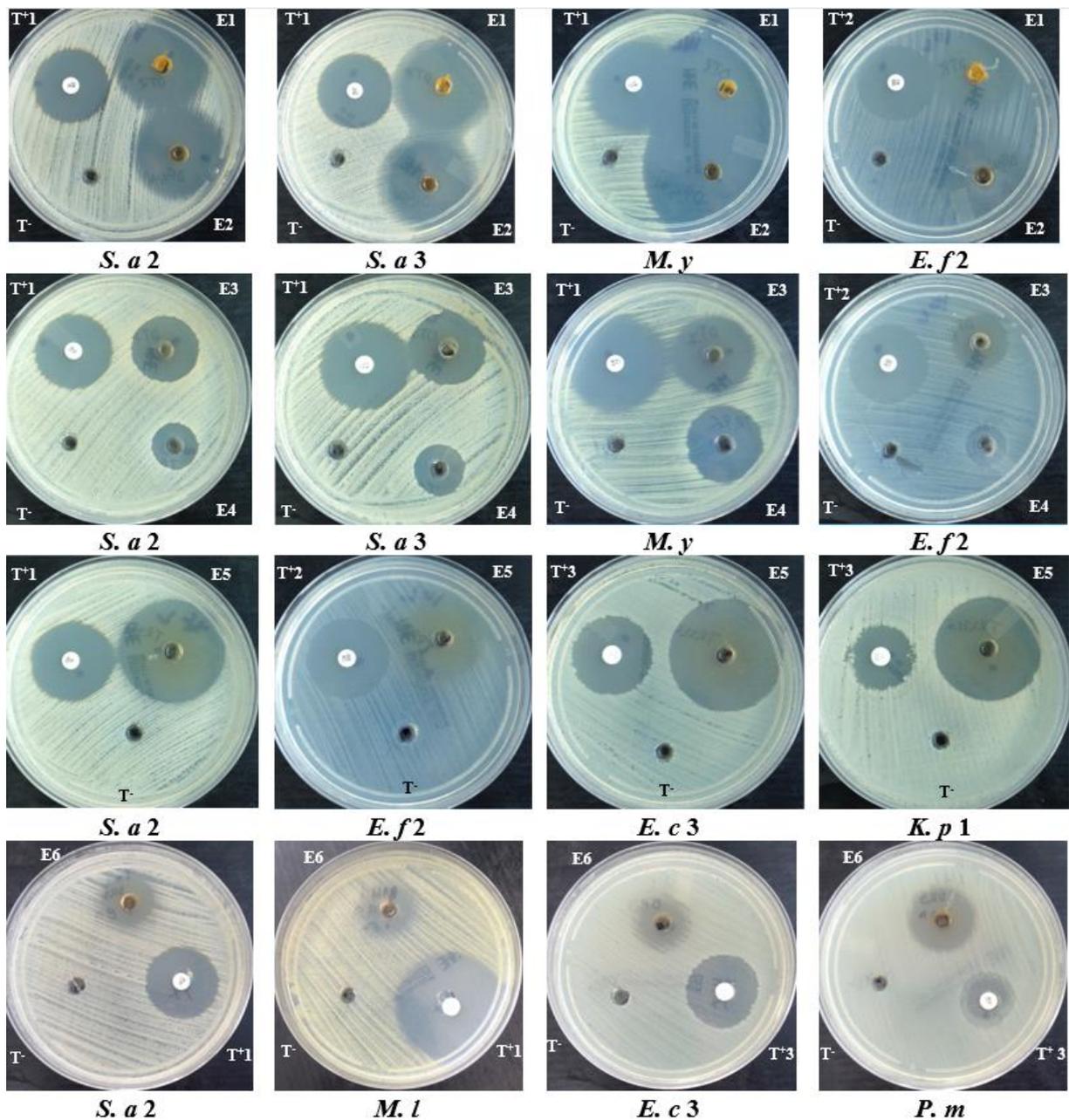
**Figure 39.** Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLR9 contre les bactéries à Gram positif, (n=3, moyenne  $\pm$ SD).



**Figure 40.** Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLR9 contre les bactéries à Gram négatif, (n=3, moyenne  $\pm$ SD).



**Figure 41.** Comparaison de l'effet antibactérien des extraits sur les bactéries à Gram positif (G+) et à Gram négatif (G-). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD, ns : pas de différence significative, \*\*\*\* :  $p \leq 0.0001$ .



**Figure 42.** Effet des extraits d'acétate d'éthyle sur les bactéries pathogènes. (*S. a 2*): *Staphylococcus aureus* 2, (*S. a 3*): *Staphylococcus aureus* 3, (*M. y*) : *Microbacterium yannicii*, (*E. f 2*) : *Enterococcus faecalis* 2, (*E. c 3*) : *Escherichia coli* 3, (*K. p 1*) : *Klebsiella pneumoniae* 1, (*P. m*) : *Proteus mirabilis*, (*M. l*) : *Micrococcus luteus*, (**E1, E2, E3, E4, E5, E6**) : Extraits de PLT8, PLF5, PLT7, JOR26, JOR22 et PLR9 respectivement, (**T<sup>+</sup>1**) : Témoin positif Gentamicine (500 µg), (**T<sup>+</sup>2**) : Témoin positif Gentamicine (15 µg), (**T<sup>+</sup>3**) : Témoin positif Imipenème (10 µg), (**T<sup>-</sup>**) : Témoin négatif (DMSO).

### III.5.2. Activité contre les champignons filamenteux et levure

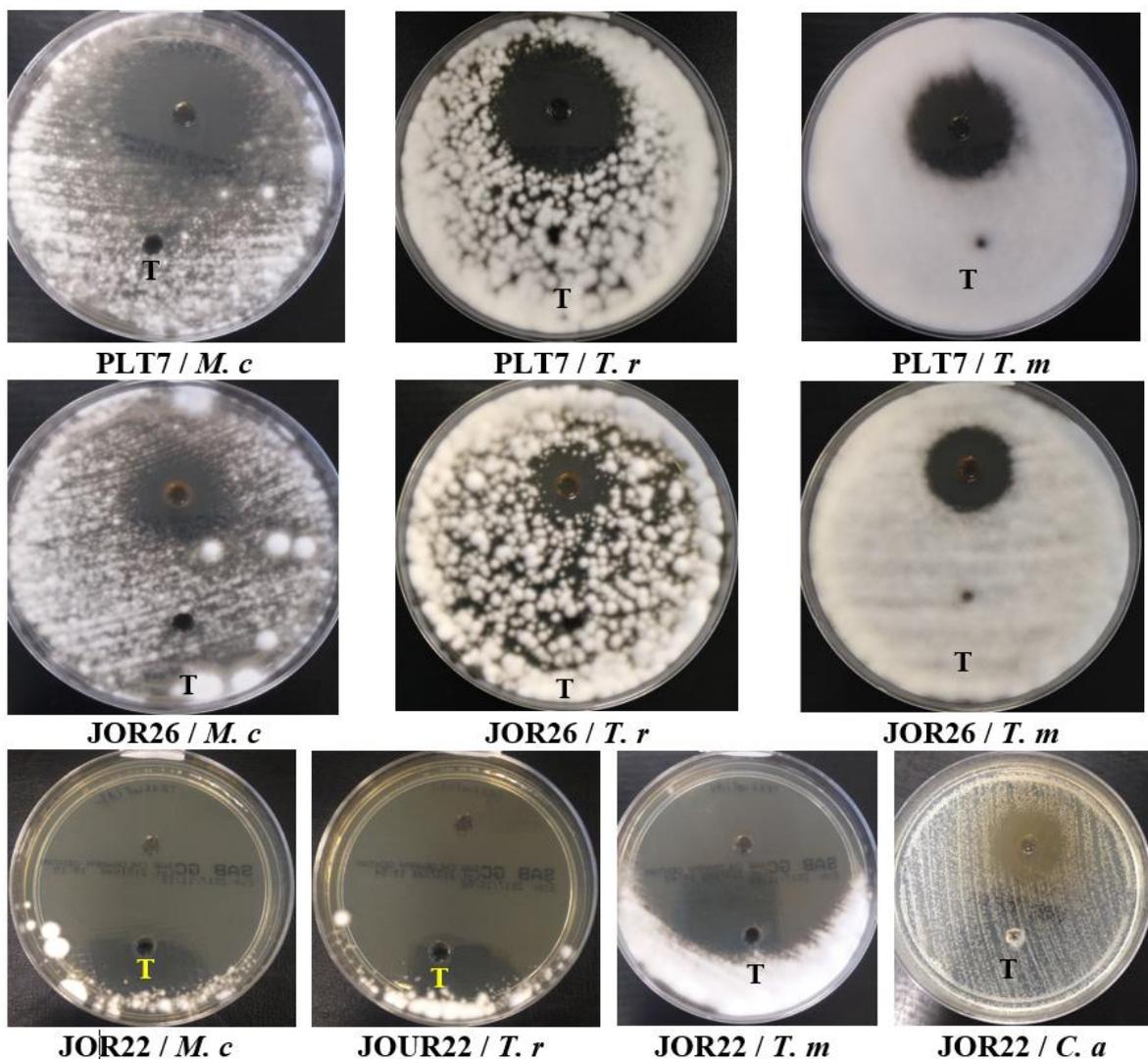
Pour l'activité antifongique, les extraits des isolats PLT8, PLF5 et PLR9 n'ont montré aucune activité malgré que ces isolats possédaient une activité antagoniste moyenne à forte au cours du dépistage préliminaire (**figure 43**).

Concernant l'extrait de l'isolat PLT7, une très forte activité antifongique a été observée contre *T. rubrum* et *E. floccosum* avec des zones d'inhibition de 34 et 44 mm respectivement.

Contre *T. mentagrophytes* et *M. canis*, l'activité était forte (25.5 mm) alors que *C. albicans* était la plus résistante (16.5 mm) (**tableau 10**).

L'extrait de l'isolat JOR26, a été plus actif contre *T. mentagrophytes* et *E. floccosum* avec des moyennes des zones d'inhibition de 23 et 25 mm respectivement, cependant cette activité était faible à moyenne contre le reste des champignons, où la plus faible zone d'inhibition était enregistrée contre *P. infestans* et *C. albicans* (10 mm) (**tableau 10**).

Concernant l'extrait de l'isolat JOR22, il reste celui qui est le plus actif par rapport aux autres extraits, où son activité antifongique était très forte contre la plupart des champignons testés avec la plus grande zone d'inhibition atteignant les 94.5 mm contre *M. canis* alors que la plus faible activité a été observée contre *P. infestans* (20.5 mm) (**tableau 10**).



**Figure 43.** Effets de l'extrait d'acétate d'éthyle des isolats endophytes sur les dermatophytes. (*M. c*) : *Microsporium canis*, (*T. r*) : *Trichophyton rubrum*, (*T. m*) : *Trichophyton mentagrophytes*, (*C. a*) : *Candida albicans* ATCC 1024, (T) : Témoin négatif (DMSO).

**Tableau 10.** Résultats de l'activité antifongique des extraits d'acétate d'éthyle des isolats endophytes. (n=3, moyenne  $\pm$ SD).

| Souches endophytes | Zones d'inhibition (mm) |                 |                  |                          |                     |                    |
|--------------------|-------------------------|-----------------|------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|
|                    | <i>E. floccosum</i>     | <i>M. canis</i> | <i>T. rubrum</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>P. infestans</i> | <i>C. albicans</i> |
| <b>PLT8</b>        | 0.00                    | 0.00            | 0.00             | 0.00                     | 0.00                | 0.00               |
| <b>PLF5</b>        | 0.00                    | 0.00            | 0.00             | 0.00                     | 0.00                | 0.00               |
| <b>PLR9</b>        | 0.00                    | 10.5 $\pm$ 0.71 | 0.00             | 0.00                     | 0.00                | 0.00               |
| <b>PLT7</b>        | 44 $\pm$ 0.00           | 25.5 $\pm$ 0.71 | 34 $\pm$ 1.41    | 25.5 $\pm$ 0.71          | 20.5 $\pm$ 0.71     | 16.5 $\pm$ 0.71    |
| <b>JOR26</b>       | 25 $\pm$ 0.00           | 13.5 $\pm$ 0.71 | 16.5 $\pm$ 0.71  | 23 $\pm$ 1.41            | 10 $\pm$ 00         | 10 $\pm$ 0.00      |
| <b>JOR22</b>       | 85 $\pm$ 4.24           | 94.5 $\pm$ 0.71 | 55 $\pm$ 1.41    | 79.5 $\pm$ 14.85         | 23.5 $\pm$ 0.71     | 24.5 $\pm$ 0.71    |

*E. floccosum* : *Epidermophyton floccosum*, *M. canis* : *Microsporium canis*, *T. rubrum* : *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* : *Trichophyton mentagrophytes*, *P. infestans* : *Phytophthora infestans*, *C. albicans* : *Candida albicans*. (n=2, moyenne  $\pm$ SD).

Les défis de la résistance bactérienne aux antibiotiques, l'émergence de la résistance antifongique aux classes de médicaments les plus couramment utilisées et les virus hautement virulents constituent un problème de santé majeur et représentent toujours une véritable menace pour le système de santé à l'échelle mondiale. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches de découverte de nouveaux médicaments pour y faire face (Marcellano et al., 2017; McCarthy et al., 2017). De plus, ces dernières années, les composés naturels bioactifs sont fortement demandés dans les domaines pharmaceutique et naturopathique, en raison de leurs bienfaits pour la santé humaine et végétale (Singh et al., 2017). Les nouveaux composés bioactifs des plantes et des micro-organismes pourraient constituer la meilleure alternative comme source de médicaments potentiels et prometteurs (Nurunnabi et al., 2020).

Parmi ces microorganismes, les champignons endophytes, qui ont rapidement été reconnus comme de véritables sources de nouveaux produits naturels bioactifs et se sont révélés exceptionnellement utiles dans le processus de découverte de médicaments (Omeje et al., 2017). Les résultats de cette étude suggèrent également que les champignons endophytes des plantes médicinales pourraient être une source très intéressante pour les nouveaux composés anti-infectieux naturels.

Si nous excluons les isolats PLT8, PLF5 et PLR9 qui ont perdu leurs activités antifongiques obtenues lors du dépistage préliminaire après l'extraction, la plupart des extraits d'acétate d'éthyle des isolats sélectionnés ont montré une grande activité inhibitrice, cette inhibition est probablement due à la production de métabolites secondaires bioactifs plutôt qu'à la compétition pour les nutriments car les composés antibactériens sont sécrétés dans le milieu de culture. Après extraction et lorsque les agents pathogènes sont traités avec les extraits, la croissance est supprimée après 24 heures d'incubation. Cela peut s'expliquer par le fait que ces

métabolites secondaires peuvent diffusés dans le milieu et inhiber la croissance des microorganismes pathogènes sélectionnés (Nurunnabi et *al.*, 2020).

Les isolats PLT8, PLF5 ont été identifiés en tant que nouvelles espèces appartenant au genre de *Neocucurbitaria*, famille des *Cucurbitariaceae* de l'ordre des *Pleosporales*. Ces derniers possèdent une forte activité antibactérienne dirigée principalement contre les bactéries à Gram positif, mais pas d'activité antifongique.

Nos isolats appartiennent aux Pléosporales, le plus grand ordre des Dothideomycètes (Schoch et *al.*, 2006), cet ordre a été signalé comme étant une source de différents types de métabolites bioactifs, tels que les dicétopipérazines, les phtalides, les dérivés des nonadrines, les dérivés phényliques et les heptakétides, ces molécules ont montré des activités cytotoxiques et antimicrobiennes (Lai et *al.*, 2020).

La famille des *Cucurbitariaceae* est l'une des familles les plus mal connues de cet ordre, elle est très peu décrite dans la littérature, notre étude est la première à avoir signalé l'activité antibactérienne des métabolites secondaires du genre *Neocucurbitaria*. À ce jour, il n'y a que deux genres de cette famille, *Seltsamia* et *Pyrenochaeta* qui ont été rapportés pour leurs pouvoir antimicrobien. *Seltsamia galinsogisoli* a d'abord été isolée en tant que nouvelle espèce à partir de *Galinsoga Parviflora* par (Zhang et *al.*, 2019), et s'est avérée capable de produire neuf molécules dont deux nouvelles (1–2) et sept composés connus (3–9). Tous ces composés ont montré une activité antibactérienne, cependant, les composés 1, 2 et 5 étaient les plus efficaces en particulier contre *S. aureus*. Le macrosphelide A isolé à partir de l'endophyte *Pyrenocheta cava* a présenté une activité contre *S. aureus* (Egan et *al.*, 2016; Kellogg et *al.*, 2016). L'endophyte *pyrenochaeta* sp. s'est révélé moins efficace contre *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger* (Wang et *al.*, 2007). Opong-Danquah et *al.* (2020) ont constaté que les deux souches de *Pyrenochaeta* sp. isolées des sédiments dérivés de la mer Baltique présentaient une activité antifongique contre *P. infestans*. D'autre part, *Pyrenochaeta* sp. BYCDW20 isolé par Xu et *al.* (2020) à partir des termites, n'a présenté aucune activité antimicrobienne.

En plus de la famille des *Cucurbitariaceae*, différents genres membres des *Pleosporales* tels que *Alternaria*, *Ascochyta*, *Curvularia*, *Lophiostoma*, *Pleospora*, *Phoma*, *Preussia*, *Phaeosphaeria* et surtout *Pleosporales* sp. ont été décrit comme étant des producteurs de métabolites secondaires bioactifs.

Parmi les cinq nouveaux dérivés du chlamydosporol, appelés pléospyrones A-E (1–5), produits par le champignon endophyte *Pleosporales* sp., le composé 5 a montré une faible

activité antibactérienne, alors que les composés 1 à 3 ont montré des activités antifongiques modérées contre *Magnaporthe oryzae* (Lai et al., 2020). Dans deux études récentes, Cao et al. (2016) et Cao et al. (2019) ont isolé à partir du *Pleosporales* sp. CF09-1 un nouveau dérivé d'azaphilone, appelé pléosporalone A (1), qui a montré une forte activité antifongique contre trois champignons phytopathogènes *Phytophthora capsica*, *Rhizopus oryzae* et *Botrytis cinerea*. De plus, ils ont isolé à partir la même souche six nouveaux dérivés d'azaphilone, les pléosporalones B et C (1 et 2) et les pléosporalones E – H (4–7). Seul le pléosporalone B (1) a montré une activité antifongique contre les champignons *Alternaria brassicicola* et *Fusarium oxysporum*, le pléosporalone C (2) a montré une activité significative contre le champignon *Botryosphaeria dothidea*. Tandis que les composés 6 et 7 ont montré une activité modérée contre *Vibrio anguillarum* et *Vibrio parahaemolyticus*.

Les genres *Phoma* et *Alternaria* sont également connus pour produire divers composés ayant une activité antimicrobienne. A partir de *Phoma* sp. un champignon endophyte isolé de *Fucus serratus*, les composés Phomalactone (18), (3R) -5-hydroxymelléine (19) et l'émodyne (20) ont été purifiés. Tous ces composés ont montré une activité antifongique contre *Microbotryum violaceum* (Deshmukh et al., 2018). L'éther méthylique d'alternariol produit par la souche *Alternaria* sp. MGTMMMP031, un endophyte associé à la plante *Vitex negundo* a montré une bonne activité à la fois contre les Gram positif et les Gram négatif (Palanichamy et al., 2018). De même, la chloromonilicine (8) d'*Alternaria sonchi* s'est révélée avoir une activité antimicrobienne élevée (Dalinova et al., 2020).

Bien qu'on ait utilisé le même milieu solide utilisé lors du screening préliminaire, après extraction, les isolats PLT8 et PLF5 ont perdu leur potentiel antifongique enregistré lors du screening préliminaire. Cela peut être expliqué soit par le fait que certains composés peuvent être perdus, car ils peuvent être dégradés ou devenir inactifs pendant les étapes d'extraction (Charousová et al., 2019), soit par le fait que le mode d'action antifongique de ces isolats en double culture n'est pas par production des métabolites antifongiques mais peut être par compétition pour les nutriments ou par parasitisme et la sécrétion des enzymes lytiques de la paroi cellulaire fongique, (Aramsirirujwet et al., 2016; Mohamad et al., 2018).

Etant donné que les isolats PLT8, PLF5 ont été décrits comme nouvelle espèce, et possèdent un grand pouvoir antibactérien contre les bactéries multirésistantes aux antibiotiques, il existe une forte possibilité que ces derniers produisent un ou plusieurs nouveaux composés antibactériens, encourageant ainsi la poursuite des recherches sur ces isolats et sur les produits bioactifs qu'ils sécrètent.

L'espèce *M. verrucosus* (PLT7) appartenant à la famille des *Pyronemataceae*; ordre des Pezizales, n'a jamais été signalée auparavant en Algérie. Elle n'a été isolée qu'une seule fois en Chine en tant qu'endophyte, notre étude serait la deuxième à l'isoler et la première à rapporter son activité antimicrobienne. L'espèce *M. verrucosus* PLT7 possède un fort potentiel d'inhibition dirigée contre les bactéries pathogènes à Gram positif multirésistantes aux antibiotiques mais aussi contre les champignons dermatophytes.

*Pyronemataceae* est la plus grande famille de champignons appartenant à l'ordre des Pezizales (Kajevska et al., 2013), les genres de cette famille sont peu signalés comme producteurs de composés bioactifs, il y a peu d'articles qui ont étudié l'activité antimicrobienne des genres de cette famille. Deng et al. (2017) ont isolé dix composés (1-10) à partir du champignon endophyte *Pyronema* sp.; parmi ces composés, le composé (1) est une nouvelle molécule. Les composés 1, 8 et 9 présentaient une activité antibiotique modérée contre *Mycobacterium marinum* ATCCBAA-535. Le Ascopyrone P produit par le champignon *Anthracobia melaloma* a été trouvé actif contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Thomas et al., 2002). Shiono, (2006) a isolé deux polycétides, à savoir les acides anthracobes A et B, produits par le champignon endophyte *Anthracobia* sp, ces deux composés présentaient une activité antimicrobienne.

Le genre *Micronematobotrys* n'a qu'une seule espèce qui est *M. verrucosus* ; à ce jour, aucun travail n'a été effectué sur l'activité biologique de cette espèce. Sur la base de l'activité inhibitrice intéressante contre les bactéries à Gram positifs mais également contre les dermatophytes, il semble que cette espèce soit capable de sécréter au moins deux molécules différentes ; une molécule antibactérienne et l'autre antifongique et mérite des études plus approfondies.

L'isolat JOR26 a été identifié comme étant une nouvelle espèce appartenant à un nouveau genre faisant lui-même partie d'une nouvelle famille de l'ordre des Diaprthales. Cet isolat était très actif contre les bactéries à Gram positif multirésistantes, mais pas contre les bactéries à Gram négatif. Il a également été démontré qu'il avait une grande activité contre les dermatophytes.

L'ordre des diaprthales contient un nombre important de champignons endophytes tels que *Diaporthe*, *Phomopsis*, *Gnomonia*, *sydowiella*, dont certains produisent des composés bioactifs en particulier *Diaporthe* et sa forme asexué, *phomopsis*-like. Ils ont été largement étudiés par les chimistes et se sont révélés être des producteurs d'une variété de métabolites uniques de faible poids moléculaire possédant différentes bioactivités, y compris,

antibactérienne, anticancéreuse, antifongique, antipaludéen, antiviral, cytotoxique et herbicide (Chepkirui et Stadler 2017).

À partir de l'extrait de *Diaporthe lithocarpus*, un endophyte isolé à partir de *Artocarpus heterophyllus*, un nouveau composé, l'acide diaporthindoïque (1), ainsi que sept composés connus (2–8) ont été purifiés. Le composé Emodine (6) et le composé (7) 1,2,8-trihydroxyanthraquinone étaient actifs contre les bactéries et les levures, tandis que le composé (2) la 7-hydroxy-6-méthoxycoumarine était le plus efficace dans l'inhibition de la croissance du champignon *Sporobolomyces salminicolor* (Riga et al., 2019). La diaporthine et l'orthosporine isolées à partir du champignon *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907, un endophyte associé à la plante *Schinus terebinthifolius*, ont montré un effet bactériostatique contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (de Medeiros et al., 2018). Le métabolite secondaire bioactif Verbanol produit par le champignon endophyte *Diaporthe terebinthifolli* LGMF658 s'est révélé présenter une activité bactéricide contre *Staphylococcus aureus* et fongicide contre *Candida albicans* (Tonial et al., 2019). Le diaporone A (1), un nouveau dérivé de la dihydroisocoumarine produit par le champignon endophytique *Diaporthe* sp. s'est avéré inhiber modérément la bactérie *Bacillus subtilis* (Guo et al., 2020).

*Phomopsis* a également été fréquemment signalé comme producteur de nombreux nouveaux produits secondaires bioactifs ayant des activités antimicrobiennes.

La fraction d'acétate d'éthyle de l'endophyte *Phomopsis* sp. FPSP-25 isolé à partir du *Ficus pumila* Linn. présentait des activités antibactérienne et antifongique à large spectre contre une large gamme de microorganismes testés (Rakshith et al., 2013). À partir de l'extrait de *Phomopsis* sp., un endophyte associé à *Garcinia kola* (Heckel), trois cytochalasines connues, 18 méthoxycytochalasine J (1), les cytochalasines H (2) et J (3) et l'alternariol (4) ont été isolées. Ces composés étaient actifs contre plusieurs bactéries pathogènes, en particulier *Shigella flexneri* et *Staphylococcus aureus* avec un effet bactéricide (Jouda et al., 2016). Les métabolites produits par *Phomopsis* sp. ZSU-H76, la phomopsine A (1), B (2) et C (3) avaient des activités antibiotiques modérées, tandis que les composés cytosporone B (4) et C (5) inhibaient deux champignons *Candida albicans* et *Fusarium oxysporum* (Huang et al., 2008). Le nouveau composé lactone (4) a démontré une activité antifongique contre plusieurs pathogènes de plantes, ce dernier a été isolé d'un champignon endophyte *Phomopsis* sp., obtenu à partir des tiges de *Azadirachta indica* (Wu et al., 2008). De plus, récemment (Qu et al., 2020) ont isolé des nouveaux composés, les Phomoterpènes A, B [(±) -1] et le Phomoisocoumarine D à partir du champignon endophyte *Phomopsis prunorum*, qui présentaient une activité antibactérienne modérée contre la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* pv. Lachrymans. *Phomopsis*

sp. XP-8 s'est révélé être capable de sécréter une substance appelée quercétine méthyle qui a montré une activité antibactérienne significative contre les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella shubra* (X. Zhao et al., 2019).

Selon Strobel (2003), l'isolement de nouvelles espèces de champignons endophytes ou d'espèces rarement isolées augmente la chance d'avoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs. En plus de ses activités antibactérienne et antifongique importantes, le fait que l'isolat JOR26 soit défini comme étant une nouvelle espèce appartenant à un nouveau genre et à une nouvelle famille, lui donne une grande importance car il y a une grande possibilité d'obtention de nouvelles molécules bioactives, cette souche mérite la poursuite des recherches sur les molécules qu'elle produit, pour les isoler, purifier et identifier.

En plus du genre *Aspergillus*, *Penicillium* est le genre fongique le plus communément signalé comme endophyte (Chauhan et al., 2019; Fan et al., 2020). Les espèces de *Penicillium* sont connues par la production d'un grand nombre de métabolites secondaires tels que les stéroïdes, les terpénoïdes, les esters, les quinoléines, les polykétides, les alcaloïdes de l'ergot, les peptides dicétopipérazines, les quinazolines, le chamazulène, l'azétidine et de nombreux autres composés non identifiés (Ghareeb et al., 2018; Singh et al., 2020). Certains de ces composés sont des agents antibactériens, antifongiques, antiviraux, antioxydants, anticancéreux, antidiabétiques, immunosuppresseurs, agents hypocholestérolémiant, anti-Alzheimer, ils ont également été utilisés pour le traitement de l'épilepsie et de la toxocarose, et comme agents anti-leishmania et anti-inflammatoires (Singh et al., 2020).

Il est à noter que l'extrait d'acétate d'éthyle de l'espèce *P. griseofulvum* JOR22 a montré une activité très forte vis-à-vis de toute la gamme de bactéries et de champignons pathogènes utilisée. Cette espèce a déjà été isolée précédemment à partir plusieurs niches écologiques comme le sol et les plantes, sa capacité antimicrobienne a également été prouvée. D'Souza et Hiremath, (2015) ont trouvé que *P. griseofulvum* D-608 isolé à partir de *Saraca asoca* (Roxb.) présentait une bonne activité contre *Bacillus subtilis* et *Alternaria brassicola*. *P. griseofulvum* TPL25 isolé à partir de *Tephrosia purpurea* présentait le spectre d'activité antifongique le plus large contre 5 champignons phytopathogènes (Luo et al., 2015). *P. griseofulvum* isolé de la mer turque a montré l'activité antibactérienne la plus élevée contre les bactéries à Gram négatif par rapport aux autres extraits fongiques testés et une activité modérée contre les levures testées (Heydari et al., 2019).

Les espèces de *Penicillium* sont actuellement parmi les champignons les plus étudiés par les chimistes intéressés par les produits naturels bioactifs et sont considérées comme une source majeure de découverte de médicaments (Youssef et Alahdal 2018). Ils sont bien connus comme producteurs d'une grande variété de métabolites secondaires (Grijseels et al., 2017).

Certains de ces métabolites secondaires sont des mycotoxines dangereuses telles que la patuline et d'autres ont des intérêts médicaux utilisés comme médicaments, par exemple, l'antibiotique pénicilline et l'antifongique griséofulvine qui sont parmi les principaux dérivés de *Penicillium chrysogenum* et *P. griseofulvum* respectivement (Liu et al., 2017). Parfois, les métabolites toxiques et bénéfiques peuvent être produits par la même espèce fongique. C'est le cas de *P. griseofulvum* qui est capable de produire une large gamme de composés chimiques comme la patuline, roquefortine C, la griséofulvine et ses dérivés (6-O-desmethyldechlorogriseofulvin, 6'-hydroxygriseofulvin et dechlorogriseofulvin), et l'acide cyclopiazonique (Asthana et Kumar 2018; Peromingo et al., 2019; Valente et al., 2020). *P. griseofulvum* est également connu pour être capable de synthétiser d'autres composés, tels que la chanoclavine I, la pénicilline, le yanuthone D, le cyclopiamide, l'acide déhydrofulvique, le mycelinamide et le phénylpyropène (Banani et al., 2016). De plus, un nouveau composé de l'acide phénolique, l'acide 46-diméthylcurvulinique et un nouveau dérivé de citrinine monomère, le pénicitrinol P, ont été isolés à partir d'un champignon d'origine marine *P. griseofulvum* T21-03 (Liu et al., 2017).

Dans une étude très récente, (Yang et al., 2018) ont isolé et purifié à partir du champignon marin *P. griseofulvum* GT-10 deux énantiomères (+)- et (-)-penicilactam A avec une faible activité inhibitrice contre *Micrococcus lysodeikticus* et *Vibrio anguillarum* et un nouveau dérivé de polykétide, la pénicitrinone F, qui a montré une activité inhibitrice modérée envers *Bacillus subtilis*.

Les pénicillines font partie de la classe des  $\beta$ -lactamines (BLA) et sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire depuis leur introduction en 1941. Leur mode d'action est l'inhibition de la formation des liaisons croisées du peptidoglycane qui affaiblit la paroi cellulaire bactérienne. Par conséquent, les bactéries seront vulnérables à la lyse cellulaire causée par la pression osmotique (Ratnam et al., 2014).

En analysant les résultats obtenus contre les bactéries à Gram négatif, ayant une  $\beta$ -lactamase ou non, nous pouvons conclure plusieurs choses. *E. coli* 1 sans  $\beta$ -lactamase était la plus sensible à l'extrait de *P. griseofulvum* JOR22, cette activité antibactérienne peut être attribuée à la présence d'un antibiotique  $\beta$ -lactame, vraisemblablement la pénicilline. Mais avec

les souches ayant une  $\beta$ -lactamase *E. coli* 3 et 4, seule une partie de l'activité antibactérienne peut être attribuée à la pénicilline, car un halo d'inhibition plus petit est toujours formé en présence de  $\beta$ -lactamase et les souches restent relativement sensibles. De plus, les souches  $\beta$ -lactamase *P. aeruginosa* 2 et *P. aeruginosa* 2 hautement résistantes à l'imipénème présentaient une sensibilité importante à l'extrait de *P. griseofulvum* JOR22, ce qui indique que l'activité antibactérienne observée dans ce cas n'est pas causée par la pénicilline mais par un ou plusieurs autres composés. En conclusion l'activité antibactérienne obtenue peut être due à la présence de l'antibiotique Pénicilline et/ou la présence d'autres composés, cela peut aussi être le résultat d'une action synergique de divers composés dans l'extrait plutôt que de composés majeurs individuellement (Laich et al., 2002; Pansanit et Pripdeevech 2018).

Le polykétide griséofulvine est un bon antifongique largement utilisé pour le traitement des infections humaines et animales causées par les dermatophytes (Teimoori-Boghsani et al., 2020), et en agriculture contre les phytopathogènes (Liu et al., 2017). Récemment, ils ont commencé à utiliser cette molécule en chimiothérapie du cancer tellement elle a une action antimétabolique et antiproliférative spécifique aux cellules cancéreuses (Peromingo et al., 2019). *P. griseofulvum* est bien connu pour sa production de la griséofulvine ou de ses dérivés, ce qui indique que la forte activité antifongique observée dans ce cas peut être attribuée à la présence de la griséofulvine dans les extraits de *P. griseofulvum* JOR22 ou à l'un de ses dérivés.

L'extrait du champignon *A. neobridgeri* PLR9 a présenté une activité à large spectre contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, y compris certaines souches multirésistantes. Le présent travail est le premier sur le champignon *A. neobridgeri* isolé à partir de *P. lentiscus*. Son isolement en tant qu'endophyte et son activité antimicrobienne n'ont pas été rapportés précédemment. Cependant, plusieurs travaux ont été rapportés sur l'isolement et l'activité antibactérienne de différentes espèces de champignons endophytes appartenant au genre *Aspergillus*.

Bezerra et al. (2015) ont montré que l'endophyte *Aspergillus ochraceus* présentait une gamme élevée d'activité antibactérienne et inhibait la croissance de quatre bactéries pathogènes sur 10. Six espèces différentes d'*Aspergillus* ont été isolées à partir de *Calotropis procera* présentaient une bonne activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées, mais elles étaient plus faibles contre les bactéries à Gram négatif (Rani et al., 2017 ; Murali et al., 2017). Yadav et al. (2016) ont signalé que les extraits de deux champignons endophytes *Aspergillus terreus* et *Aspergillus tubingensis* sont capables d'inhiber la croissance des souches multirésistantes *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

Le champignon endophyte *Aspergillus* est considéré comme une énorme source de pistes chimiques avec des activités biologiques prometteuses. Différentes espèces d'*Aspergillus* ont prouvé leur capacité à produire de nombreux métabolites secondaires, notamment des buténolides, des alcaloïdes, des terpénoïdes, des cytochalasines, des phénalénones, des  $\rho$ -terphényles, des xanthones, des stérols, des dérivés de diphényléther et d'antraquinone avec des activités biologiques diverses, telles que l'activité anti-cancéreuse, antifongique, antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, anti-trypanosomienne et l'activité anti-leishmanienne. De janvier 2015 à décembre 2019, trois cent soixante métabolites secondaires ont été signalés chez différentes espèces endophytes d'*Aspergillus* (El-Hawary et al., 2020).

Les espèces d'*Aspergillus* sont également capables de synthétiser plusieurs molécules actives contre les bactéries pathogènes (Ma et al., 2016 ; Gombodorj et al., 2017 ; Monggoot et al., 2018 ; Yang et al., 2018). *A. neobridgeri* et selon les résultats obtenus par Samson et al. (2004), Visagie et al. (2014) et Varga et al. (2015) concernant la production des mycotoxines, cette espèce s'est avérée capable de synthétiser les acides pénicilliques, les xanthomégnes, les insulicolides, et l'aspochracine. L'activité antibactérienne significative obtenue dans la présente étude peut être due à la présence d'une ou plusieurs de ces molécules dans l'extrait brut notamment l'acide pénicillique, celui qui s'est révélé actif contre les bactéries (Ezzat et al., 2007 ; Varga et al., 2015 ; Nguyen et al., 2016), ou en raison de la présence d'autres molécules qui ne sont pas encore caractérisées.

La plus grande sensibilité aux métabolites secondaires sécrétés par les isolats fongiques est notée chez les bactéries à Gram positif, tandis que les bactéries à Gram négatif testées sont beaucoup plus résistantes. Ces résultats sont conformes à ceux rapportés précédemment dans de nombreuses études sur les champignons endophytes (Pansanit et Pripdeevech 2018; Duan et al., 2019; Sebola et al., 2019; Xu et al., 2020).

La plus grande sensibilité des bactéries à Gram positif aux composés bioactifs par rapport à celle des bactéries à Gram négatif est en soi un phénomène connu. Cette sensibilité différente pourrait être attribuée aux différences dans les constituants de la paroi cellulaire et leur disposition dans les deux groupes de bactéries (Stefanovic et al., 2012). La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est plus complexe, constituée d'un espace périplasmique et d'une fine couche de peptidoglycane adjacente à la membrane cytoplasmique, elle est également entourée d'une membrane externe supplémentaire composée de phospholipides et de lipopolysaccharides (Praptiwi et al., 2020), ce qui pourrait rendre la paroi cellulaire imperméable aux composés bioactifs et a tendance à expulser les antibiotiques des cellules en agissant comme une barrière sélective (Sebola et al., 2019). Alors que les parois des bactéries

à Gram positif sont caractérisées par la perméabilité aux composés efficaces, car elle est constituée d'une couche de peptidoglycane, une barrière de perméabilité inefficace (Stefanovic et al., 2012; Hateet 2017).

### III.5.3. Détermination des CMI et CMB

La méthode de microdilution en bouillon a été utilisée pour évaluer les valeurs des CMI de tous les extraits fongiques ayant montré une activité contre les micro-organismes pathogènes cités dans le **tableau 1**.

En général et en ce qui concerne les résultats de la CMI, les extraits des isolats PLT8 et PLF5 ont montré presque le même profil antibactérien contre la plupart des espèces bactériennes, où les valeurs des CMI variaient de 10.94 et 175 µg/mL à l'exception de *S. aureus* 5 et les trois souches de *E. faecalis* 2,3 et 4 qui étaient plus résistantes surtout par rapport à l'extrait de PLF5, où les rapports CMB/ CMI étaient supérieur à 4 (**tableau 11**).

Les extraits des deux isolats JOR26 et PLT7, avaient un effet très efficace contre toutes les espèces bactériennes à Gram positif, y compris toutes les souches de *S. aureus*, *E. faecalis* et *faecium* multirésistantes (**tableau 12**). L'extrait de l'isolat JOR26 était le meilleur par rapport aux autres extraits avec des valeurs de CMI très basses et très proches de celles obtenues par le contrôle positif (Vancomycine), variant de 2.9 à 23.125 µg/mL. En deuxième position, venait l'extrait de PLT7 qui lui aussi montrait des valeurs de CMI basses, comprises entre 1.15 et 150 µg/mL. On note également que les valeurs des CMB pour ces deux extraits étaient les mêmes que celles des CMI pour la plupart des bactéries, ce qui indique que ces extraits ont un effet bactéricide contre les bactéries à Gram positif, avec des valeurs des rapports CMB/ CMI inférieurs à 4.

Il a été également observé que les valeurs des CMI des trois extraits des isolats PLT8, JOR26 et PLT7 étaient inférieures à celles obtenues avec la vancomycine contre des espèces bactériennes résistantes à cet antibiotique, *E. faecalis* 4, *E. faecium* 1 et *E. faecium* 2. Les valeurs de ces CMI étaient de (256, 256 et 128 µg/mL) pour la vancomycine, (43.75, 10.9 et 10.9 µg/mL) pour l'extrait de PLT8 (5.8, 11.6 et 23.125 µg/mL) pour l'extrait de JOR26 et (37.5, 18.75 et 37.5 µg/mL) pour l'extrait de PLT7 respectivement.

En ce qui concerne les extraits de JOR22 et PLR9 qui étaient actifs aussi bien contre les bactéries à Gram positif que négatif, l'extrait de l'isolat JOR22 avait montré des valeurs de CMI comprises entre 11.72 et 1500 µg/mL et un effet bactéricide ( $CMB/CMI \leq 4$ ) contre la plupart des bactéries, alors qu'un effet bactériostatique ( $CMB/CMI > 4$ ) a été observé sur certaines espèces bactériennes multirésistantes, comme *P. aeruginosa* 3 et *K. pneumoniae* 1 et

2. Il a été noté également que pour l'extrait de cet isolat, certaines valeurs des CMI obtenues contre certaines bactéries à Gram positif résistantes à la vancomycine (*E. faecalis* 4, *E. faecium* 1 et *E. faecium* 2) étaient inférieures à celles obtenues avec cet antibiotique. La même chose a été observée avec certaines espèces à Gram négatif résistantes à l'imipénème (*A. baumannii*, *P. aeruginosa* 2), avec des valeurs des CMI inférieures à celles obtenus avec l'antibiotique (**tableau 13**).

Les CMI obtenues avec l'extrait de l'isolat PLR9 étaient comprises entre 312.5 et 1250 µg/mL, alors que les valeurs des CMB étaient ≤ 2500 µg/mL pour la plupart des bactéries à Gram positif, mais pour la plupart des bactéries à Gram négatif, elles étaient ≥ 2500 µg/mL. Le rapport CMB / CMI était ≤ 4 pour toutes les bactéries à Gram positif, ceci montre que l'effet de cet extrait était bactéricide. En revanche, l'extrait avait un effet bactériostatique (CMB/CMI ≥ 4) contre la plupart des bactéries à Gram négatif, en particulier *K. pneumoniae* 1, *K. pneumoniae* 2, *P. aeruginosa* 2 et *P. aeruginosa* 3 ce qui confirme la résistance observée dans la précédente partie (**tableau 14**).

**Tableau 11.** Les valeurs des CMI et des CMB (µg/mL) obtenues par les extraits d'acétate d'éthyle des isolats PLT8 et PLF5 contre les différentes bactéries pathogènes.

| Bactéries à Gram +   | Extrait de PLT8 |       |         | Extrait de PLF5 |       |         | VAN  |
|----------------------|-----------------|-------|---------|-----------------|-------|---------|------|
|                      | CMI             | CMB   | CMB/CMI | CMI             | CMB   | CMB/CMI | CMI  |
| <i>B. cereus</i>     | 10.9            | 21.88 | 2       | 43.75           | 87.5  | 2       | 1    |
| <i>M. luteus</i>     | 21.88           | 21.88 | 1       | 175             | 175   | 1       | 0.5  |
| <i>M. yannicii</i>   | 2.25            | 2.25  | 1       | 10.94           | 10.94 | 1       | 0.25 |
| <i>S. aureus</i> 1   | 21.88           | 43.75 | 2       | 87.5            | 175   | 2       | 1    |
| <i>S. aureus</i> 2   | 10.9            | 21.88 | 2       | 43.75           | 175   | 4       | 0.5  |
| <i>S. aureus</i> 3   | 21.88           | 87.5  | 4       | 87.5            | 87.5  | 1       | 1    |
| <i>S. aureus</i> 4   | 10.9            | 21.88 | 2       | 43.75           | 43.75 | 1       | 0.5  |
| <i>S. aureus</i> 5   | 21.88           | 350   | 16      | 87.5            | 700   | 8       | 0.5  |
| <i>E. faecalis</i> 1 | 21.88           | 43.75 | 2       | 87.5            | 350   | 4       | 0.5  |
| <i>E. faecalis</i> 2 | 21.88           | 21.88 | 1       | 17.5            | 700   | 40      | 2    |
| <i>E. faecalis</i> 3 | 21.88           | 43.75 | 2       | 17.5            | 700   | 40      | 0.5  |
| <i>E. faecalis</i> 4 | 43.75           | 175   | 4       | 175             | >700  | >4      | 256  |
| <i>E. faecium</i> 1  | 10.9            | 10.9  | 1       | 43.75           | 43.75 | 1       | 256  |
| <i>E. faecium</i> 2  | 10.9            | 43.75 | 4       | 87.5            | 87.5  | 1       | 128  |
| <i>S. pyogenes</i>   | 10.9            | 10.9  | 1       | 10.94           | 10.94 | 1       | 0.25 |
| <i>S. australis</i>  | 5.5             | 5.5   | 1       | 10.94           | 10.94 | 1       | 0.25 |

VAN : Vancomycine.

**Tableau 12.** Les valeurs des CMI et des CMB ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues par les extraits d'acétate d'éthyle des isolats PLT7 et JOR26 contre les différentes bactéries pathogènes.

| Bactéries à Gram +   | Extrait de PLT7 |       |         | Extrait de JOR26 |        |         | VAN  |
|----------------------|-----------------|-------|---------|------------------|--------|---------|------|
|                      | CMI             | CMB   | CMB/CMI | CMI              | CMB    | CMB/CMI | CMI  |
| <i>B. cereus</i>     | 37.5            | 75    | 2       | 5.8              | 11.6   | 2       | 1    |
| <i>M. luteus</i>     | 18.75           | 18.75 | 1       | 5.8              | 5.8    | 1       | 0.5  |
| <i>M. yannicii</i>   | 9.375           | 9.375 | 1       | 2.9              | 2.9    | 1       | 0.25 |
| <i>S. aureus</i> 1   | 37.5            | 75    | 2       | 11.6             | 11.6   | 1       | 1    |
| <i>S. aureus</i> 2   | 37.5            | 150   | 4       | 5.8              | 11.6   | 2       | 0.5  |
| <i>S. aureus</i> 3   | 75              | 150   | 2       | 5.8              | 5.8    | 1       | 1    |
| <i>S. aureus</i> 4   | 75              | 150   | 2       | 5.8              | 5.8    | 1       | 0.5  |
| <i>S. aureus</i> 5   | 37.5            | 37.5  | 1       | 11.6             | 23.125 | 2       | 0.5  |
| <i>E. faecalis</i> 1 | 75              | 150   | 2       | 23.125           | 23.125 | 1       | 0.5  |
| <i>E. faecalis</i> 2 | 150             | 150   | 1       | 11.6             | 23.125 | 2       | 2    |
| <i>E. faecalis</i> 3 | 75              | 300   | 4       | 23.125           | 23.125 | 1       | 0.5  |
| <i>E. faecalis</i> 4 | 37.5            | 150   | 4       | 5.8              | 5.8    | 1       | 256  |
| <i>E. faecium</i> 1  | 18.75           | 18.75 | 1       | 11.6             | 11.6   | 1       | 256  |
| <i>E. faecium</i> 2  | 37.5            | 37.5  | 1       | 23.125           | 23.125 | 1       | 128  |
| <i>S. pyogenes</i>   | 1.15            | 1.15  | 1       | 2.9              | 2.9    | 1       | 0.25 |
| <i>S. australis</i>  | 9.375           | 9.375 | 1       | 2.9              | 2.9    | 1       | 0.25 |

VAN : Vancomycine.

**Tableau 13.** Les valeurs des CMI et des CMB ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues par l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat JOR22 contre les différentes bactéries pathogènes.

| Bactéries à Gram+    | Extrait de JOR22 |       |         | VAN  | Bactéries à Gram-      | Extrait de JOR22 |       |         | IMP  |
|----------------------|------------------|-------|---------|------|------------------------|------------------|-------|---------|------|
|                      | CMI              | CMB   | CMB/CMI | CMI  |                        | CMI              | CMB   | CMB/CMI | CMI  |
| <i>B. cereus</i>     | 93.75            | 375   | 4       | 1    | <i>C. freundii</i>     | 46.88            | 93.75 | 2       | 0.25 |
| <i>M. luteus</i>     | 93.75            | 187.5 | 2       | 0.5  | <i>A. baumannii</i>    | 46.88            | 93.75 | 2       | 128  |
| <i>M. yannicii</i>   | 46.88            | 93.75 | 2       | 0.25 | <i>P. aeruginosa</i> 1 | 187.5            | 375   | 2       | 4    |
| <i>S. aureus</i> 1   | 46.88            | 187.5 | 4       | 1    | <i>P. aeruginosa</i> 2 | 93.75            | 93.75 | 1       | 128  |
| <i>S. aureus</i> 2   | 46.88            | 93.75 | 2       | 0.5  | <i>P. aeruginosa</i> 3 | 93.75            | 750   | 8       | 128  |
| <i>S. aureus</i> 3   | 187.5            | 187.5 | 1       | 1    | <i>P. mirabilis</i>    | 11.72            | 46.88 | 4       | 2    |
| <i>S. aureus</i> 4   | 187.5            | 187.5 | 1       | 0.5  | <i>S. typhimurium</i>  | 46.88            | 93.75 | 2       | 1    |
| <i>S. aureus</i> 5   | 187.5            | 187.5 | 1       | 0.5  | <i>E. coli</i> 1       | 46.88            | 93.75 | 2       | 0.5  |
| <i>E. faecalis</i> 1 | 93.75            | 187.5 | 2       | 0.5  | <i>E. coli</i> 2       | 46.88            | 93.75 | 2       | 0,25 |
| <i>E. faecalis</i> 2 | 187.5            | 187.5 | 1       | 2    | <i>E. coli</i> 3       | 46.88            | 93.75 | 2       | 0.5  |
| <i>E. faecalis</i> 3 | 1500             | 1500  | 1       | 0.5  | <i>E. coli</i> 4       | 46.88            | 93.75 | 2       | 2    |
| <i>E. faecalis</i> 4 | 187.5            | 750   | 4       | 256  | <i>K. pneumoniae</i> 1 | 46.88            | 375   | 8       | 1    |
| <i>E. faecium</i> 1  | 93.75            | 93.75 | 1       | 256  | <i>K. pneumoniae</i> 2 | 46.88            | 375   | 8       | 1    |
| <i>E. faecium</i> 2  | 93.75            | 375   | 4       | 128  |                        |                  |       |         |      |
| <i>S. pyogenes</i>   | 11.72            | 23.44 | 2       | 0.25 |                        |                  |       |         |      |
| <i>S. australis</i>  | 46.88            | 46.88 | 1       | 0.25 |                        |                  |       |         |      |

VAN : Vancomycine, IMP : Imipénème.

**Tableau 14.** Les valeurs des CMI et des CMB ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues par l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat PLR9 contre les différentes bactéries pathogènes.

| Bactéries à Gram +   | Extrait de PLR9 |       |         | VAN  | Bactéries à Gram -     | Extrait de PLR9 |       |         | IMP  |
|----------------------|-----------------|-------|---------|------|------------------------|-----------------|-------|---------|------|
|                      | CMI             | CMB   | CMB/CMI | CMI  |                        | CMI             | CMB   | CMB/CMI | CMI  |
| <i>B. cereus</i>     | 312.5           | 1250  | 4       | 1    | <i>C. freundii</i>     | 312.5           | 1250  | 4       | 0.25 |
| <i>M. luteus</i>     | 625             | 625   | 1       | 0.5  | <i>A. baumannii</i>    | 312.5           | 1250  | 4       | 128  |
| <i>M. yannicii</i>   | 156.25          | 312.5 | 2       | 0.25 | <i>P. aeruginosa 1</i> | 625             | 1250  | 2       | 4    |
| <i>S. aureus 1</i>   | 625             | 625   | 1       | 1    | <i>P. aeruginosa 2</i> | 1250            | >2500 | >2      | 128  |
| <i>S. aureus 2</i>   | 625             | 2500  | 4       | 0.5  | <i>P. aeruginosa 3</i> | 625             | >2500 | >2      | 128  |
| <i>S. aureus 3</i>   | 625             | 1250  | 2       | 1    | <i>P. mirabilis</i>    | 312.5           | 2500  | 8       | 2    |
| <i>S. aureus 4</i>   | 625             | 625   | 1       | 0.5  | <i>S. typhimurium</i>  | 625             | >2500 | >4      | 1    |
| <i>S. aureus 5</i>   | 625             | 625   | 1       | 0.5  | <i>E. coli 1</i>       | 312.5           | 1250  | 4       | 0.5  |
| <i>E. faecalis 1</i> | 625             | 625   | 1       | 0.5  | <i>E. coli 2</i>       | 312.5           | 2500  | 8       | 0.25 |
| <i>E. faecalis 2</i> | 625             | 1250  | 2       | 2    | <i>E. coli 3</i>       | 312.5           | 2500  | 8       | 0.5  |
| <i>E. faecalis 3</i> | 625             | 2500  | 4       | 0.5  | <i>E. coli 4</i>       | 312.5           | 1250  | 4       | 2    |
| <i>E. faecalis 4</i> | 625             | 625   | 1       | 256  | <i>K. pneumoniae 1</i> | 625             | >2500 | >4      | 1    |
| <i>E. faecium 1</i>  | 625             | 2500  | 4       | 256  | <i>K. pneumoniae 2</i> | 625             | >2500 | >4      | 1    |
| <i>E. faecium 2</i>  | 625             | 2500  | 4       | 128  |                        |                 |       |         |      |
| <i>S. pyogenes</i>   | 312.5           | 312.5 | 1       | 0.25 |                        |                 |       |         |      |
| <i>S. australis</i>  | 625             | 625   | 1       | 0.25 |                        |                 |       |         |      |

VAN : Vancomycine, IMP : Imipenème.

**Tableau 15.** Les valeurs des CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenues par les extraits d'acétate d'éthyle des isolats endophytes contre les champignons filamenteux et levures.

| Souches endophytes | CMF ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                 |                  |                          |                     |                    |
|--------------------|--------------------------|-----------------|------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|
|                    | <i>E. floccosum</i>      | <i>M. canis</i> | <i>T. rubrum</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>P. infestans</i> | <i>C. albicans</i> |
| PLT8               | /                        | /               | /                | /                        | /                   | /                  |
| PLF5               | /                        | /               | /                | /                        | /                   | /                  |
| PLR9               | /                        | /               | /                | /                        | /                   | /                  |
| PLT7               | 25                       | 12,5            | 50               | 50                       | 400                 | 800                |
| JOR26              | 15,625                   | 500             | 62,5             | 125                      | 500                 | >2000              |
| JOR22              | 6,25                     | 6,25            | 50               | 50                       | 400                 | 800                |
| Amphotéricine B    | 0,125                    | 0,5             | 1                | 1                        | 2                   | 0,5                |

*E. floccosum* : *Epidermophyton floccosum*, *M. canis* : *Microsporium canis*, *T. rubrum* : *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* : *Trichophyton mentagrophytes*, *P. infestans* : *Phytophthora infestans*, *C. albicans* : *Candida albicans*.

Concernant l'activité antifongique, l'efficacité et la sensibilité dépendaient aussi bien de l'extrait que de l'espèce fongique pathogène. Parmi les extraits qui étaient actifs (JOR22, JOR26, PLT7), celui de JOR22 était le plus actif contre les champignons filamenteux dermatophytes avec des CMI très basses variant de 6.25 à 50  $\mu\text{g/mL}$ , suivie par l'extrait de PLT7 (25 à 50  $\mu\text{g/mL}$ ) ensuite l'extrait de JOR26 (15.625 à 500  $\mu\text{g/mL}$ ). La levure *C. albicans* et le champignon phytopathogène filamenteux *P. infestans* étaient les plus résistants à tous les extraits, avec des valeurs de CMI très élevées, ( $\geq 400$   $\mu\text{g/mL}$ ) pour *P. infestans* et ( $\geq 800$   $\mu\text{g/mL}$ )

pour *C. albicans*. Cependant, les valeurs des CMI les plus basses correspondant à une plus grande sensibilité ont été enregistrées avec *E. floccosum* (6.25 à 25 $\mu$ g/mL) (**tableau 15**).

### **III.5.4. Etude de la cinétique de létalité (*Time kill*)**

Une cinétique de létalité a été réalisée sur une période de 24 heures contre deux bactéries pathogènes. Selon les **figures 44** et **45**, l'effet des extraits de PLT8 et PLF5 sur la croissance des bactéries testées dépend de la concentration, ces deux extraits avaient un effet bactériostatique, avec des pourcentages de létalité inférieurs à 99.99% avec toutes les concentrations utilisées après 24 heures de contact.

Concernant l'extrait de PLT7, un effet bactéricide a été observé (réduction des cellules viables  $\geq 99.99$ ) contre la bactérie *S. aureus* 2 après 6 heures de contact et avec une concentration égale à la CMIx2, et 2 heures avec une CMIx4, alors qu'avec la CMI, une réduction des cellules viables faible a été observée et après 24 heures de contact les bactéries repoussaient de nouveau. Contre *E. faecium* 1, l'effet bactéricide a été obtenu avec une concentration de CMIx4 après 24 heures de contact alors qu'avec les autres concentrations, les pourcentages d'inhibition de la croissance étaient inférieurs de 99.99%. Ces résultats indiquent que l'activité bactéricide de cet extrait dépend à la fois du temps et de la concentration pour *S. aureus* 2 et uniquement de la concentration pour *E. faecium* 1 (**figure 46**).

L'extrait de l'isolat JOR26 était très efficace (**figure 47**), où il avait présenté un effet bactéricide contre les deux espèces bactériennes utilisées *S. aureus* 2 et *E. faecium* 1. Cet effet bactéricide ( $\geq 99.99$ ) a été obtenu contre *E. faecium* 1 avec la CMI/2 après 24 heures de contact et 6 heures contre *S. aureus* 2. En augmentant la concentration de cet extrait (CMI), le temps nécessaire pour réduire complètement les cellules bactériennes avait diminué, où 99.99% de ces cellules ont été tuées après 2 heures de contact. Pour la CMIx2, la réduction complète des cellules vivantes était observée après 45 minutes de contact pour *E. faecium* 1 et 15 minutes pour *S. aureus* 2. Ces résultats montrent que l'effet bactéricide de cet extrait est dépendant de la concentration ainsi que du temps.

L'étude de la cinétique de létalité de l'extrait JOR22 a montré que toutes les concentrations utilisées avaient un effet bactéricide contre les deux bactéries testées *A. baumannii* et *E. faecium* 1. Pour *E. faecium* 1, toutes les concentrations testées n'ont donné l'effet bactéricide qu'après 24 heures de contact, alors que pour *A. baumannii* et à la concentration la plus faible (CMI), une réduction de 99.99% a été observée après 12 heures de contact, pour la CMIx2 après 6 heures et avec la concentration la plus élevée (CMIx4) après 4 heures de contact. Ceci montre que l'effet bactéricide de cet extrait dépendant de la

concentration pour *E. faecium* 1 et à la fois du temps et de la concentration pour *A. baumannii* (figure 48).

Concernant l'extrait de l'isolat PLR9 et pour *E. faecium* 1 ; après 24 heures de contact la cinétique de létalité a montré plus de 99,9% de réduction à la CMIx4, mais aucune réduction significative n'a été observée avec les concentrations CMIx2 et CMI. Pour *A. baumannii*, aucune réduction n'a été observée avec les concentrations CMI et CMIx2, la réduction maximale notée était de 23,7% à la CMIx4. Par conséquent, l'effet de l'extrait fongique à la concentration CMIx4 était bactéricide contre *E. faecium* 1 et bactériostatique contre *A. baumannii* à toutes les différentes concentrations, cela confirme la résistance des bactéries à Gram négatif trouvée auparavant pour cet extrait (figure 49).

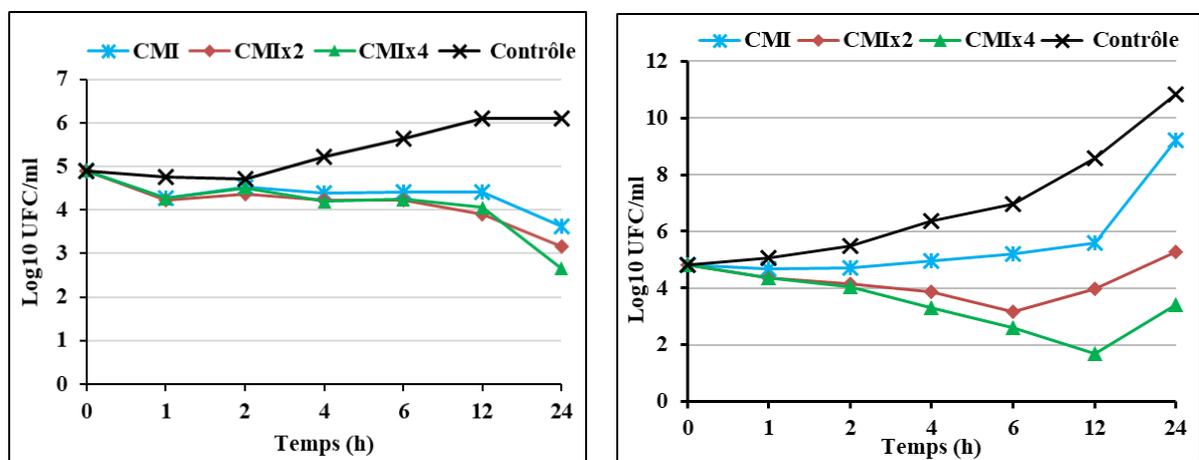


Figure 44. Cinétique de létalité de l'extrait de PLT8 contre *E. faecium* 1 (à gauche) et *S. aureus* 2 (à droite).

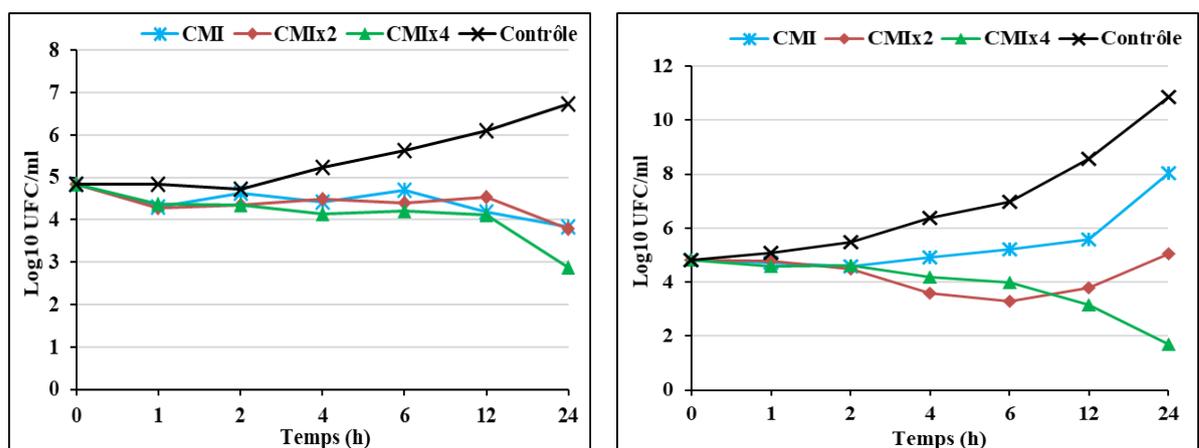


Figure 45. Cinétique de létalité de l'extrait de PLF5 contre *E. faecium* 1 (à gauche) et *S. aureus* 2 (à droite).

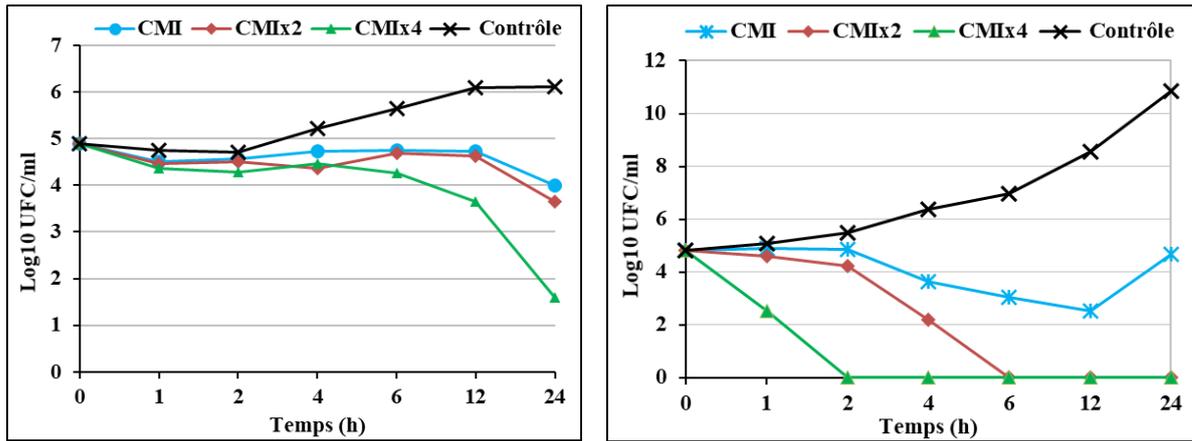


Figure 46. Cinétique de létalité de l'extrait de PLT7 contre *E. faecium* 1 (à gauche) et *S. aureus* 2 (à droite).

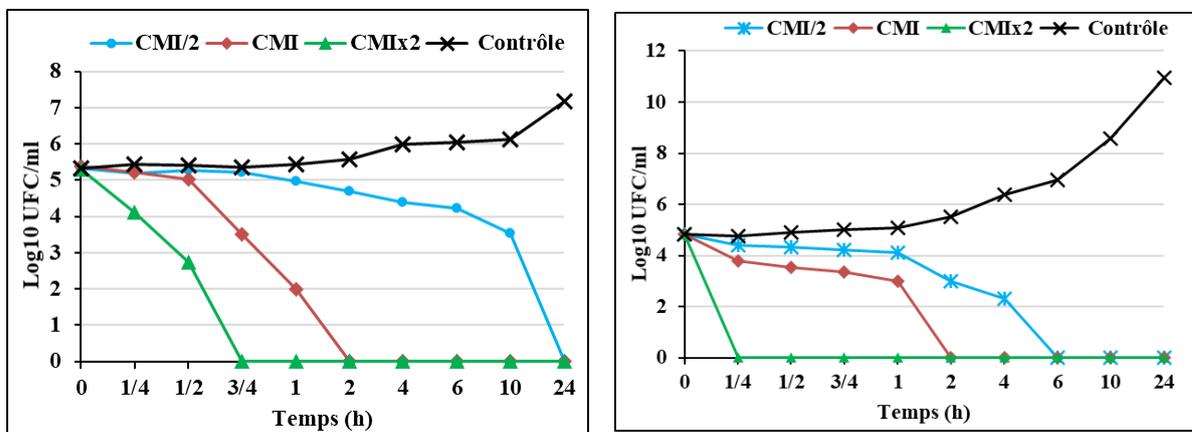


Figure 47. Cinétique de létalité de l'extrait de JOR26 contre *E. faecium* 1 (à gauche) et *S. aureus* 2 (à droite).

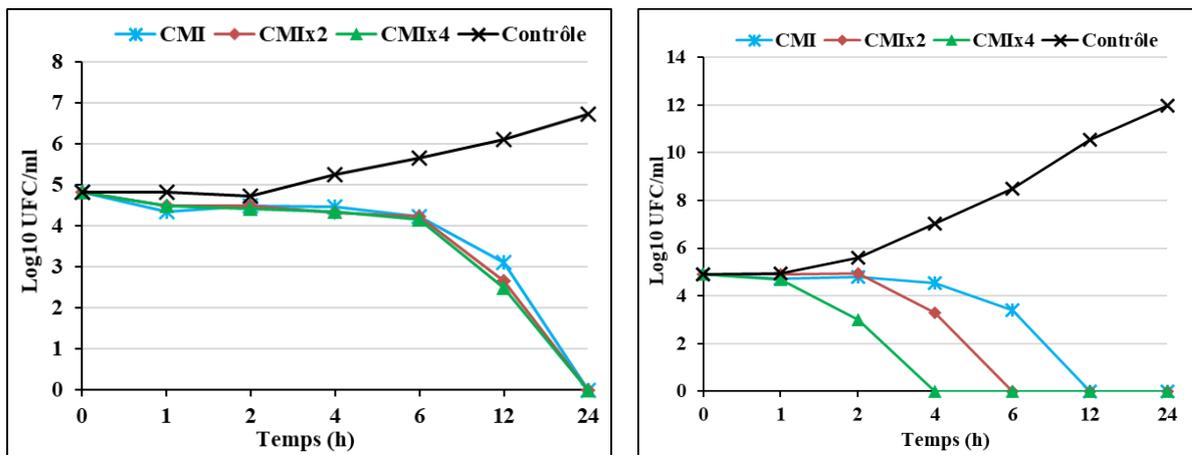
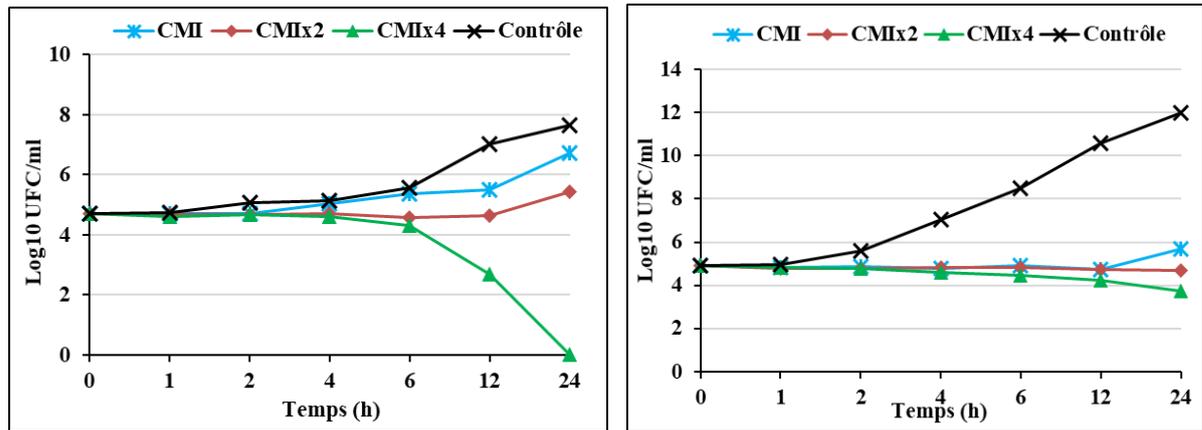


Figure 48. Cinétique de létalité de l'extrait de JOR22 contre *E. faecium* 1 (à gauche) et *A. baumannii* (à droite).



**Figure 49.** Cinétique de létalité de l'extrait de PLR9 contre *E. faecium* 1 (à gauche) et *A. baumannii* (à droite).

Dans cette étude, une enquête approfondie a été effectuée pour évaluer les effets bactéricides ou bactériostatiques des extraits d'acétate d'éthyle des isolats contre une gamme de microorganismes pathogènes en utilisant la CMI, CMB, le rapport CMB/CMI et le test de la cinétique de létalité (Time-Kill).

La CMI est définie comme la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après une incubation d'une nuit à 37 °C (Arivudainambi et al. 2011).

Pour les isolats actifs uniquement contre les bactéries à Gram positif, l'extrait le plus efficace était celui de JOR26 avec des CMI allant de 2.9 à 23.125 µg /mL, suivis par l'extrait de PLT8 avec des CMI comprises entre 2.25 et 43.75 µg/mL. En troisième position, on trouve l'extrait de PLT7 qui a présenté des CMI's allant de 1.15 à 75µg /mL, à l'exception d'*E. faecalis* 2 qui était plus résistante (150 µg/mL). Enfin, l'extrait de PLF5 où les valeurs des CMI étaient comprises entre 10.94 et 87.5 µg/mL par contre *E. faecalis* 4 était plus résistante (175 µg /mL). Parmi les extraits qui étaient actifs contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, JOR22 était le plus efficace (11.72 à 187.5 µg /mL) alors que la bactérie *E. faecalis* 3 était la plus résistante (1500 µg /mL), suivi par l'extrait de l'isolat PLR9 où les CMI obtenues étaient comprises entre 312.5 et 1250 µg /mL.

Selon Tagousop et al. (2018), un extrait est considéré comme hautement actif si la CMI < 100 µg/mL; significativement actif lorsque 100 ≤ CMI ≤ 512 µg/mL; modérément actif lorsque 512 < CMI ≤ 2048 µg/mL; faiblement actif si CMI > 2048 µg/mL et non actif lorsque CMI > 10,000 µg/mL. Les valeurs des CMI obtenues variaient en fonction de l'extrait fongique et de l'espèce pathogène. En se basant sur cette classification, tous les extraits étaient hautement actifs à significativement actifs, à l'exception des extraits de JOR22 et de PLR9 qui étaient modérément actif contre certaines bactéries multirésistantes à Gram négatif.

Les CMI obtenus par l'extrait de PLT8 sont comparables à ceux de certains composés purifiés obtenus à partir de certains genres appartenant à la famille des *Cucurbitariaceae*, comme *Seltsamia galinsogisoli* et *Pyrenocheta cava*. Zhang et al. (2019) ont isolé neuf composés chimiques à partir *S. galinsogisoli*, tous ces composés ont montré une activité antibactérienne. Cependant, les composés 2, 5 et 1 présentaient l'activité la plus élevée contre *S. aureus* avec des valeurs de CMI de 25, 32 et 75 µg/mL, respectivement. Les résultats de l'extrait de PLT8 obtenus contre les quatre différentes souches de *S. aureus* (sensibles et multirésistantes) (10.9 à 21.88 µg/mL) sont meilleurs que ceux obtenus avec le composé 1 et sont en accord avec ceux des composés 2 et 5. Les résultats de l'extrait de PLT8 sont également plus efficaces que le macrosphélide A (4) isolé à partir de *P. cava*, qui a une valeur de CMI de 75 µg/mL contre *S. aureus* mais aucune activité contre le SARM (Kellogg et al., 2016).

Une étude précédente sur l'activité antifongique et antibactérienne de l'extrait de *P. griseofulvum* contre les levures et les bactéries sans β-lactamase a rapporté des valeurs de CMI de 500, 500, 125, 125 et 250 µg/mL contre *C. albicans* 10231, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 respectivement, tandis que *K. pneumoniae* RSKK 574 était complètement résistante (Heydari et al., 2019). Dans cette étude, l'activité antibactérienne de l'extrait de *P. griseofulvum* JOR22 contre les mêmes souches bactériennes était plus efficace, avec des valeurs des CMI plus basses, *S. aureus* 1 (46.88 µg/mL), *B. subtilis* (93.75 µg/mL), *E. coli* 1 (46.88 µg/mL), *P. aeruginosa* 1 (187.5 µg/mL), cet extrait a montré également une activité contre *K. pneumoniae* 1 (46.88 µg/mL), tandis que la valeur de la CMI enregistrée contre *C. albicans* était plus élevée (800 µg/mL). De plus, Il faut bien noter que l'extrait de cette espèce était actif contre plusieurs espèces multirésistantes y compris celles produisant des β-lactamases et des souches résistantes à la vancomycine ou à la méticilline.

Les valeurs de la CMI de l'extrait de *A. neobridgeri* PLR9 sont meilleurs que celles obtenues dans une étude précédente dans laquelle, l'extrait d'*Aspergillus* sp., a montré des valeurs de CMI variant de 500 à 4000 µg/mL (Leong et al., 2018). Cependant, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus avec les extraits de *Aspergillus chevalieri* (62.5 à 500 µg/mL) et de *Aspergillus niger* (62.5 à 1000 µg/mL) (Heydari et al., 2019).

L'isolat JOR26 de l'ordre des diaporthales a présenté une activité très forte contre les bactéries à Gram positif et les champignons dermatophytes, par contre les bactéries à Gram négatif et *Candida albicans* étaient résistantes. En comparant nos résultats par rapport à ceux des genres *Diaporthe/Phomopsis*, les plus couramment isolés comme endophytes dans cet ordre, et qui sont aussi connus par leur potentiel antimicrobien ; on trouve que les résultats des

CMI (2.9 à 23.125 µg/mL) de l'extrait de JOR26 étaient relativement plus efficace. Sauf que dans certains cas, où les extraits ou les molécules purifiées de ces deux genres étaient également actifs contre les bactéries à Gram négatif, par exemple, l'extrait de *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720 a montré une activité antifongique et antibactérienne avec des CMI de 65.80 µg/mL contre SARM et de 148.79 µg/mL contre *Candida albicans*, tandis que *E. coli* et *P. aeruginosa* étaient plus résistantes (Ferreira et al., 2017b). L'extrait brut de *Diaporthe* sp. MFLUCC15-1131 a montré une activité antimicrobienne à large spectre contre tous les agents pathogènes testés avec des CMI allant de 3.91 à 250 mg/mL contre les bactéries et à 62.50 mg/mL contre les champignons. Il a été suggéré que cette activité significative pouvait être attribuée à la présence d'une concentration élevée d'eugénol ou à la présence d'autres constituants, tels que le myristaldéhyde, l'acide laurique, l'acide caprylique, qui peuvent également être corrélés à l'activité antimicrobienne observée (Tanapichatsakul et al., 2019). La cytosporone D (93) du champignon endophyte CR146 (*Diaporthe* sp.) présente une activité antibactérienne contre *S. aureus*, *E. faecalis* et *E. coli* avec des CMI de 8.8 et 64 µg/mL respectivement. L'acide 3-hydroxypropionique (3-HPA) (66) isolé de l'endophyte du mangrove *Diaporthe phaseolorum* a été actif contre *S. aureus* et *Salmonella typhi* à une CMI de 64 µg/mL (Deshmukh et al., 2014).

Le dicerandrol C (3) a été isolé à partir de la souche C81 de *Phomopsis longicolla*, des algues rouges *Bostrychia radicans* avait une bonne activité antimicrobienne contre *S. aureus* (ATCC 6538) et *S. saprophyticus* (ATCC 15305) avec des CMI de 1 et 2 µg/mL respectivement. Au contraire, les espèces à Gram négatif étaient résistantes à ce composé (Erbert et al., 2012). Un nouveau composé bioactif, nommé imino méthylfurane (1) a été récemment purifié à partir de l'extrait de *Phomopsis / Diaporthe theae*, le composé purifié a montré une activité antimicrobienne élevée contre *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* présentant des CMI très faibles de 1.25 µg/mL (Jayanthi et al., 2018). Jouda et al. (2016) ont également isolé deux molécules, 18 métoxycytochalasine J (1) et cytochalasine H (2) à partir du champignon *Phomopsis* sp., ces deux composés étaient actifs contre plusieurs bactéries pathogènes, en particulier *Shigella flexneri* avec une CMI égale à 128 µg/mL et *Staphylococcus aureus* avec des CMI de 128 et 256 µg/mL respectivement avec des effets bactéricides.

Sur la base de recherches précédentes et de cette étude, on peut conclure que les espèces de l'ordre Diaporthales présentent une riche source de champignons endophytes produisant des molécules antimicrobiennes. Ainsi, les résultats obtenus suggèrent de manière convaincante que l'isolat JOR26 pourrait être un candidat prometteur pour la découverte de nouveaux antibiotiques.

Il est intéressant de noter que malgré l'utilisation des extraits bruts, les valeurs des CMI obtenues étaient très basses pour certains extraits, et sont comparables à celles obtenues par les extraits et les composés purs mentionnés ci-dessus. Selon Adeoyo et *al.* (2019), la purification et la caractérisation supplémentaires des composés actifs augmentera l'efficacité de l'agent antimicrobien, ce qui montre l'importance des résultats des isolats fongiques de cette étude.

D'un autre côté, le CMB est défini comme la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui entraîne une réduction de la croissance bactérienne de 99,9% par rapport à la croissance du contrôle (Taufiq et *al.*, 2020). Nous pouvons également apprécier l'activité antibactérienne selon le rapport CMB/CMI, l'effet bactéricide des médicaments devrait avoir des valeurs des CMB, pas plus de quatre fois supérieures de leurs valeurs de CMI ( $CMB/CMI \leq 4$ ), tandis que les composés dont les valeurs de CMB sont égales ou huit fois supérieures à leurs valeurs de CMI sont considérés comme des agents bactériostatiques ( $CMB/CMI > 4$ ) (Mogana et *al.*, 2020; Taufiq et *al.*, 2020).

Pour la plupart des extraits, les ratios (CMB/CMI) obtenus contre la plupart des microorganismes d'essai étaient  $\leq 4$ , ce qui indique que les extraits ont un effet bactéricide. Cependant, certaines bactéries étaient plus résistantes, comme les souches *E. faecalis* 2, 3, 4 pour l'extrait de PLF5, *S. aureus* 5 pour les extraits de PLT8 et PLF5, *P. aeruginosa* 3 et *K. pneumoniae* 1, 2 pour l'extrait JOR22 et la plupart des bactéries à Gram négatif pour l'extrait PLR9 où les ratios (CMB/CMI) étaient  $> 4$ , ce qui indique l'effet bactériostatique contre ces bactéries.

Les actions bactériostatiques ou bactéricides des extraits fongiques ont également été confirmées par l'étude de la cinétique de létalité, qui est une approche alternative permettant de caractériser les molécules antimicrobiennes, selon si elles possèdent un effet bactéricide ou bactériostatique (Taufiq et *al.*, 2020). C'est également un outil puissant pour l'obtention d'informations descriptives sur la cinétique de la destruction bactérienne par des agents antimicrobiens, en examinant la vitesse à laquelle différentes concentrations d'un antibiotique tuent les bactéries à différents intervalles de temps. La cinétique de létalité peut être dépendante de la concentration de l'agent antimicrobien, du temps d'exposition ou des deux à la fois (Lai et *al.*, 2016). Généralement, l'effet bactéricide est obtenu avec un pourcentage de létalité de 90% après 6 heures, ce qui équivaut à 99,9% de létalité après 24 heures (Balouiri et *al.*, 2016).

Dans cette étude, la cinétique de létalité était variable, parfois dépendante du temps, parfois de la concentration et parfois du temps et de la concentration en même temps. Cela dépend de l'extrait fongique et de l'espèce ou du groupe bactérien utilisés. La plupart des

extraits ont montré un effet bactéricide contre les bactéries cibles, ceci confirme les résultats obtenus dans la précédente partie (partie CMB). En revanche, un changement de l'effet bactéricide en effet bactériostatique pour les extraits PLT8 et PLF5 a été constaté, ce changement peut être expliqué par le fait que la mise en culture des bactéries cibles en milieu liquide avec agitation leur donne la possibilité de s'adapter avec les nouvelles conditions et éliminé les antibiotiques existants dans les extraits.

Plus l'effet inhibiteur ou létal du médicament est obtenu avec la concentration la plus faible possible et après une période de contact avec l'agent pathogène plus courte, plus le médicament est efficace. Selon cette approche, l'extrait de l'isolat JOR26 était le plus efficace, il avait présenté un effet bactéricide contre les deux espèces bactériennes utilisées *S. aureus* 2 et *E. faecium* 1. Cet effet bactéricide (réduction de la densité bactérienne viable  $\geq 99.99$ ) a été obtenu contre *E. faecium* 1 avec la CMI/2 après 24 heures de contact et 6 heures contre *S. aureus* 2., avec la CMI, après 2 heures de contact pour les deux bactéries et avec la CMIx2 après 45 minutes de contact pour *E. faecium* 1 et 15 minutes pour *S. aureus* 2.

Les agents antimicrobiens à activité bactéricide *in vitro* sont parfois avantageux et préférés aux agents à activité bactériostatique, notamment lors du traitement de certaines maladies infectieuses dangereuses. Par exemple, le traitement de la méningite nécessite l'utilisation d'un agent bactéricide non seulement en raison de la nécessité d'éradiquer l'infection aussi rapidement que possible, mais également en raison de la faible compétence immunologique du système nerveux central. Aussi, l'endocardite infectieuse qui est une maladie assez rare mais souvent grave, nécessite l'utilisation d'un agent bactéricide qui est une solution privilégiée et essentielle. Étant donné que la pénétration des médicaments peut être faible dans l'ostéomyélite en raison d'une diminution de l'apport vasculaire, il peut être judicieux de choisir un agent bactéricide pour le traitement de l'ostéomyélite (Pankey et Sabath 2004). De plus, avec le nombre croissant de patients immunodéprimés, il est important de développer et de découvrir des médicaments bactéricides, plutôt que simplement bactériostatiques, afin de traiter les différentes infections auxquelles ils peuvent être exposés (Górniak et al., 2019).

Dans d'autres cas, pendant le traitement, il est avantageux d'avoir des médicaments à effet bactériostatique plutôt qu'à action bactéricide (Rani et al., 2017). Par exemple, malgré l'effet bactéricide de la pénicilline, la clindamycine à action bactériostatique est maintenant considérée comme une composante majeure du traitement du syndrome du choc toxique provoquée par les staphylocoques et les streptocoque car elle inhibe complètement la production de la toxine-1, les agents bactériostatiques inhibent la synthèse des protéines dans les bactéries au repos à croissance lente, alors qu'elle n'est pas affectée par les  $\beta$ -lactames

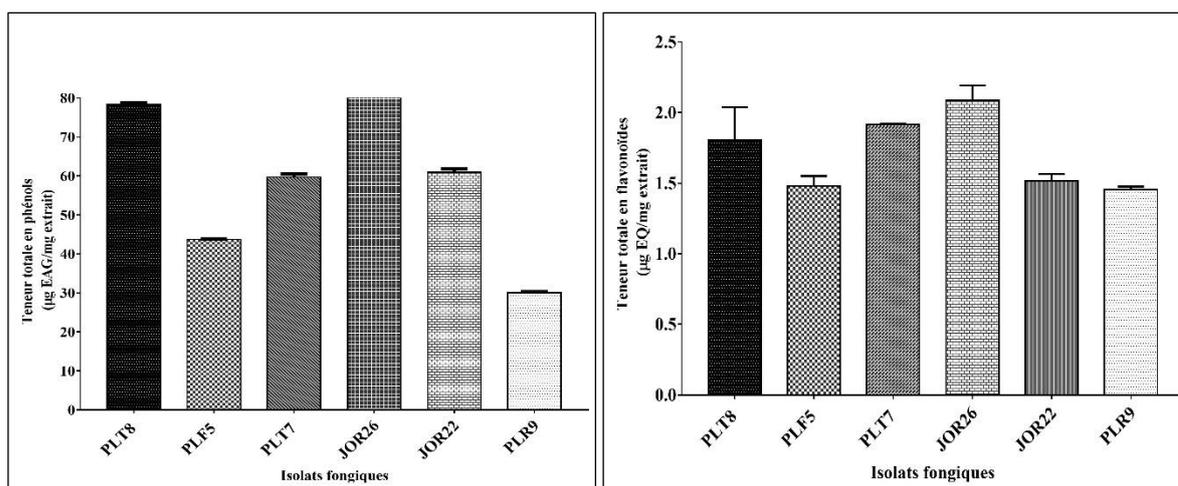
bactéricides comme la pénicilline (Pankey et Sabath 2004). Et comme les agents antimicrobiens bactériostatiques ou fongistatiques n'inhibent que la croissance ou la multiplication des microbes, cela donne au système immunitaire de l'hôte suffisamment de temps pour tuer et éliminer les microbes du système (Boakye 2016).

En conclusion, chacun des deux effets bactéricides et bactériostatiques des médicaments ont des avantages thérapeutiques et des cas particuliers dans lesquels ces médicaments doivent être utilisés. Les extraits des isolats fongiques utilisés dans cette étude ont présenté une activité antimicrobienne intéressante contre de nombreuses souches multirésistantes. Cela suggère que ces isolats sécrètent des antibiotiques différents de ceux auxquels ces germes sont résistants. Selon ces résultats, tous nos isolats pourraient être une source très prometteuse pour la découverte de nouveaux composés antimicrobiens ayant des effets bactéricides ou bactériostatiques.

### III.6. Activité antioxydante

#### III.6.1. Détermination de la teneur phénolique totale et de flavonoïdes

Les TCP ont été évalués selon la méthode de Folin-Ciocalteu. D'après les résultats présentés dans la **figure 50**, les extraits de JOR26 et de PLT8 étaient les plus riches en composés phénoliques avec  $115.88 \pm 0.83$  et  $78.29 \pm 0.46$   $\mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait respectivement, suivi des extraits de JOR22 ( $60.91 \pm 0.88$   $\mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait) et de PLT7 ( $59.69 \pm 0.85$   $\mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait) et enfin les extraits de PLF5 et de PLR9 avec des taux de  $43.70 \pm 0.16$   $\mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait et de  $30.06 \pm 0.52$   $\mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait respectivement.



**Figure 50.** Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits fongiques. (n=3, moyenne  $\pm$ SD).

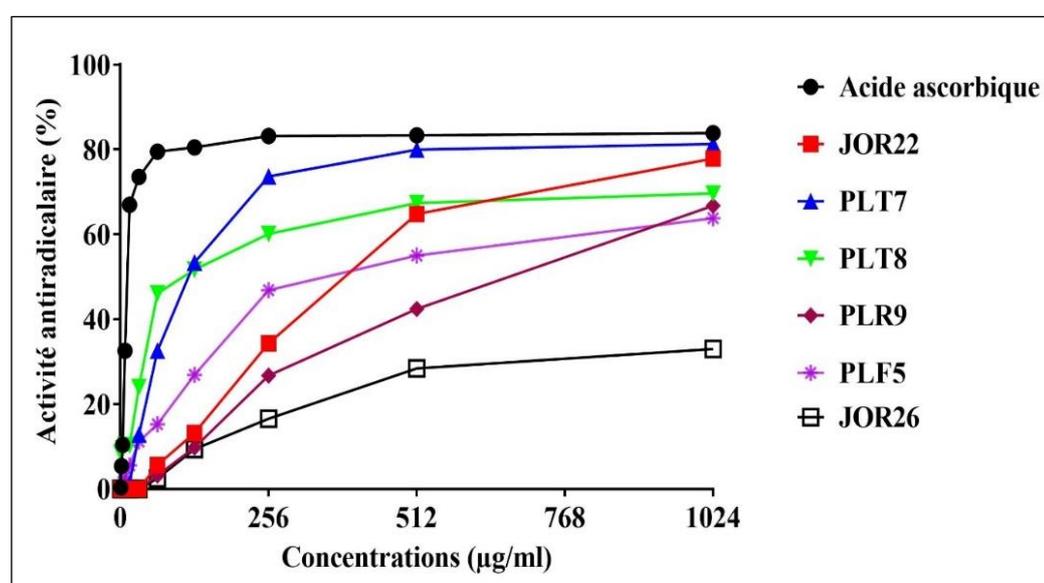
Concernant les flavonoïdes totaux, l'évaluation a été faite selon la technique utilisant le trichlorure d'aluminium. L'extrait le plus riche en flavonoïdes était celui de JOR26 ( $2.08 \pm 0.11 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait) suivi des extraits de PLT7, PLT8 et JOR22 avec des taux de  $1.91 \pm 0.01$ ,  $1.81 \pm 0.24$  et  $1.52 \pm 0.05 \mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait respectivement. Alors que les extraits de PLF5 et de PLR9 étaient ceux contenant le moins de flavonoïdes.

### III.6.2. Activité antioxydante : DPPH, FRAP (TBTZ) et PR ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ )

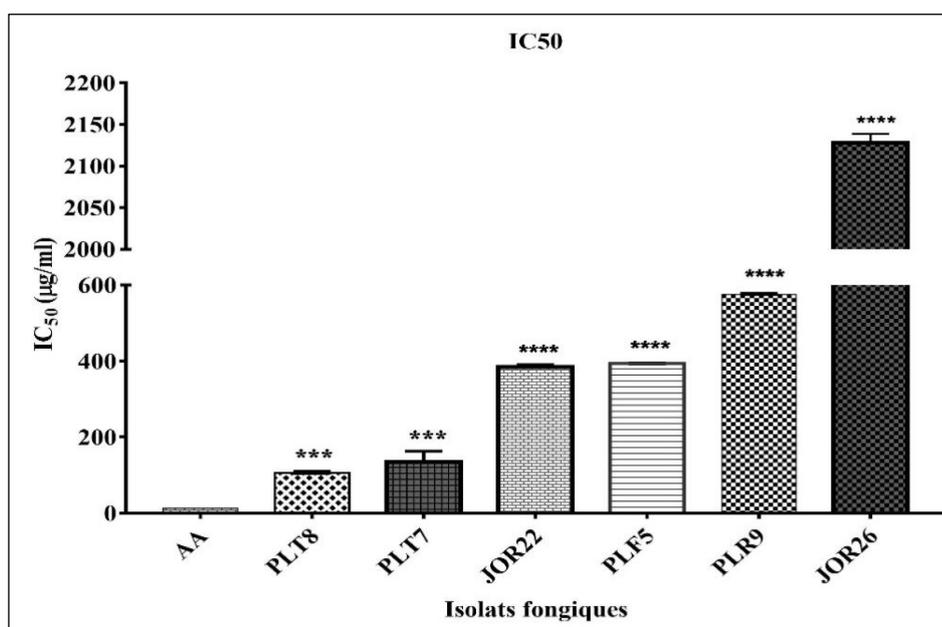
Dans la présente étude, trois techniques ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* des extraits des champignons endophytes. Il s'agit de l'activité de piégeage du radical libre DPPH, ainsi que deux autres tests déterminant le pouvoir réducteur, le test de FRAP (TBTZ) et le test de PR ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ). Ces tests ont été choisis parmi les tests les plus cités dans la littérature.

Les résultats de l'activité antioxydante ont clairement révélé que la capacité antioxydante était différente et variable selon les espèces fongiques et la méthode utilisée.

Pour le radical DPPH, la capacité de piégeage des extraits varie considérablement et elle est concentration dépendante (**figure 51**), avec des valeurs des  $\text{IC}_{50}$  allant de 107.14 à 2128.19  $\mu\text{g/mL}$ . Les extraits de PLT8 et PLT7 ont montré une capacité de piégeage élevée avec des valeurs de  $\text{IC}_{50}$  très faibles de  $107.14 \pm 0.34$  et  $134.74 \pm 58.93 \mu\text{g/mL}$  respectivement. Les extraits de JOR22, PLF5 et PLR9 ont montré quant à eux une activité moyenne où les  $\text{IC}_{50}$  atteignaient les  $384.42 \pm 6.46$ ,  $393.21 \pm 0.24$  et  $575.89 \pm 0.84 \mu\text{g/mL}$  respectivement. D'un autre côté, l'activité la plus faible a été observée avec l'extrait de l'isolat JOR26 ( $2128.19 \pm 2.14 \mu\text{g/mL}$ ) (**figure 52**).



**Figure 51.** Pourcentages d'inhibition du radical DPPH en présence des différentes concentrations des extraits fongiques. (n=3, moyenne  $\pm$ SD).



**Figure 52.** Les concentrations des extraits fongiques et du standard inhibant 50% du radical DPPH. (AA : acide ascorbique). Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3), \*\*\*\* p < 0.0001.

Une forte variabilité entre les extraits a été également observée pour le test FRAP ; l'activité la plus efficace a été enregistrée avec l'extrait de l'isolat PLT7 ( $154.84 \pm 0.45$  mg EAA/g d'extrait), suivi par les extraits de PLT8 ( $66.97 \pm 0.22$  mg EAA/g d'extrait) et de JOR22 ( $51.18 \pm 0.18$  mg EAA/g d'extrait). Les extraits de JOR26, PLT9 et PLF5 venaient en dernier avec  $29.57 \pm 0.08$ ,  $28.80 \pm 0.07$  et  $24.47 \pm 0.04$  mg EAA/g d'extrait respectivement. Le même profil d'activité a été enregistré avec le deuxième test du pouvoir réducteur, où les IC<sub>50</sub> étaient de  $95.61 \pm 0.21$ ,  $58.75 \pm 0.14$ ,  $38.24 \pm 0.06$ ,  $36.92 \pm 0.08$ ,  $30.74 \pm 0.08$  et  $23.12 \pm 0.58$  pour les extraits des isolats PLT7, PLT8, JOR22, JOR26, PLF5 et PLR9 respectivement (**tableau 16**).

**Tableau 16.** Résultats du pouvoir réducteur. (n=3, moyenne  $\pm$ SD).

| Isolats endophytes | FRAP (mg EAA /g Extrait) | PR (mg EAA /g Extrait) |
|--------------------|--------------------------|------------------------|
| PLT8               | $66.97 \pm 0.22$         | $58.75 \pm 0.14$       |
| PLF5               | $24.47 \pm 0.04$         | $30.74 \pm 0.08$       |
| PLT7               | $154.84 \pm 0.45$        | $95.61 \pm 0.21$       |
| JOR26              | $29.57 \pm 0.08$         | $36.92 \pm 0.08$       |
| PLR9               | $28.80 \pm 0.07$         | $23.12 \pm 0.58$       |
| JOR22              | $51.18 \pm 0.18$         | $38.24 \pm 0.06$       |

D'une manière générale et pour la plupart des extraits, les résultats montraient que la capacité antioxydante est liée aux flavonoïdes par un coefficient de corrélation  $R^2 = 0.86$  pour DPPH,  $R^2 = 0.78$  pour le FRAP et  $R^2 = 0.91$  pour PR, tandis que cette corrélation avec les polyphénols totaux s'est révélée être très faible (**tableau 17**). Les extraits les plus riches en flavonoïdes comme ceux de PLT7, PLT8 et JOR22 avaient les activités la plus élevées, par

contre les extraits à faible teneur tels que ceux de PLF5 et PLR9 ont des activités plus faibles. Exceptionnellement, pour l'extrait de JOR26, aucune corrélation n'a été observé entre le TCP, les flavonoïdes et la capacité antioxydante pour la plupart des tests malgré qu'il était le plus riche par ces deux groupes de composés chimiques.

**Tableau 17.** Corrélation entre les activités antioxydantes et le TCP et le taux de flavonoïdes.

|   | TCP  | TF   | PR (K <sub>3</sub> Fe (CN) <sub>6</sub> ) | FRAP (TBTZ) |
|---|------|------|---|-------------|
| RP (K <sub>3</sub> Fe (CN) <sub>6</sub> ) | 0.33 | 0.91 |   |             |
| FRAP (TBTZ)                               | 0.20 | 0.78 | 0.95                                      |             |
| DPPH                                      | 0.67 | 0.86 | 0.61                                      | 0.43        |

Un autre objectif de cette étude est l'évaluation de l'une des propriétés potentiellement bénéfiques des champignons endophytes pour l'homme qui est l'activité antioxydante. Tous les extraits des champignons endophytes sélectionnés ont été criblés pour leur activité antioxydante par des tests DPPH, FRAP et PR.

Le DPPH est un radical libre synthétique stable disponible dans le commerce, qui donne une couleur violette forte dans le méthanol. Ce radical libre peut être réduit en 2,2-diphénylhydrazine DPPH<sub>2</sub> en présence d'une molécule antioxydante externe, ce qui rend la solution de méthanol incolore. Le degré de décoloration du violet est mesuré à 517 nm. Ainsi, le test DPPH est largement utilisé et fournit une évaluation rapide de la capacité des composés à agir comme des piègeurs de radicaux libres ou des donneurs d'hydrogène radicalaires par spectrophotométrie (Veeru et *al.*, 2009; Caicedo et *al.*, 2019).

En ce qui concerne le pouvoir réducteur, ce test est utilisé pour déterminer l'activité antioxydante en mesurant la réduction ou la capacité de don d'électrons de l'antioxydant au radical libre qui est le réactif FRAP. À faible pH, et en présence de l'antioxydant, le complexe formé tripyridyl-triazine ferrique (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) est réduit en forme ferreuse (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) qui donne une couleur violet-bleu et peut être mesuré à 593 nm. La couleur est assombrie par l'augmentation de la capacité de donation d'électrons de l'antioxydant (Banothu et *al.*, 2017; Aouam et *al.*, 2019). Pour le test PR, Les substances ayant un potentiel de réduction, réagissent avec le ferricyanure de potassium pour former le ferrocyanure de potassium, qui réagit à son tour avec le chlorure ferrique pour donner lieu à un complexe qui a une absorption maximale à 700 nm (Jayanthi et Lalitha, 2011).

Dans cette étude, tous les extraits ont montré une activité antioxydante à des degrés divers. Les trois extraits fongiques PLT7, PLT8 et JOR22 se sont avérés être les plus efficaces

en présentant une activité antioxydante *in vitro* dans les diverses méthodes utilisées. Cependant, les extraits restants JOR26, PLF5 et PLR9 ont montré un spectre d'activité étroit.

Nos résultats sont en accord avec des études antérieures, qui ont rapporté le potentiel antioxydant de différentes espèces de champignons endophytes isolées à partir de différents hôtes. Parmi les quatre espèces de champignons lignicoles : *Meripilus giganteus*, *Agrocybe aegerita*, *Fomes fomentarius* et *Xylaria polymorpha*, l'activité antioxydante la plus élevée a été notée avec l'extrait de *F. fomentarius* (IC<sub>50</sub> = 10.7 mg/mL dans le test du DPPH ; 136.6 mg EAA/g de poids sec dans le test du FRAP) (Karaman et al., 2014). Les champignons endophytes *Aspergillus flavus* et *Fusarium oxysporum* isolés à partir de la plante *Viscum album* L. ont montré un bon potentiel antioxydant dans différents tests antioxydants avec des valeurs IC<sub>50</sub> dans le test DPPH de 127.9 µg/mL et 129.3 µg/mL respectivement, alors que les valeurs du pouvoir réducteur étaient pour *Aspergillus flavus* de 133.21 µg et pour *Fusarium oxysporum* de 132.2 µg de EAA de Fe<sup>2+</sup>/mg de lectine respectivement (Sadananda 2014).

La faible activité antioxydante du test DPPH a également été observée chez certains extraits de champignons endophytes membres de Diaporthales isolés de *Costus spiralis*, comme *Phomopsis* sp. CEP4 et *Diaporthe* sp. CED3 avec des valeurs IC<sub>50</sub> de 1425.16 ± 2.10 et 1375.96 ± 2.01 µg/mL respectivement, ce qui est conforme aux résultats obtenus par l'extrait de l'isolat JOR26 (Marson Ascêncio et al., 2014). Dans l'étude de (Das et al., 2017), les extraits bruts des endophytes *Bipolaris specifera*, *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus terreus*, *Nectria haematococca* et *Fusarium chlamydosporum* isolés de *Zingiber nimmonii* ont montré une capacité antioxydante potentiellement élevée, où les valeurs du pouvoir réducteur variaient de 68.0 ± 2.2 à 110.4 ± 1.1 mg AA/g d'extrait sec, et les valeurs IC<sub>50</sub> pour le test DPPH variaient de 133.4 ± 5.3 à 1057.2 ± 82.3 µg/mL, ces résultats sont également très similaires aux résultats de notre étude.

De plus, dans une autre étude, parmi les 154 isolats de champignons endophytes isolés de *Distylium chinense*, 99 ont montré une activité antioxydante significative (Duan et al., 2019). 36% des extraits de champignons endophytes isolés à partir *Eugenia jambolana* Lam. présentaient une puissante activité antioxydante. Les isolats *Chaetomium* sp. *Aspergillus* sp., *Aspergillus peyronelii* et *Aspergillus niger* ont montré la capacité antioxydante la plus élevée (Yadav et al., 2014).

Plusieurs autres études ont montré que les champignons endophytes des plantes médicinales avaient des valeurs élevées d'antioxydants naturels, par exemple, les endophytes *Alternaria alternata* SaF-2, *Fusarium proliferatum* SaR-2, *Schizophyllum commune* SaR-3 et

*Trametes hirsuta* SaR-6 isolés de *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba (Li et al., 2015). *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* à partir *Crotalaria pallida* (Govindappa, Bharath, et al., 2011). Également les isolats *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Trichoderma* sp. à partir *Tabebuia argentea* Bur. & K. Sch. (Govindappa et al., 2013).

Une corrélation élevée entre les propriétés antioxydantes et les taux des flavonoïdes dans les tests DPPH ( $R^2 = 0.86$ ), FRAP ( $R^2 = 0.78$ ) et PR ( $R^2 = 0.91$ ), et une corrélation plus faible entre la capacité antioxydante et le TCP dans le test DPPH ( $R^2 = 0.67$ ), FRAP ( $R^2 = 0.20$ ) et PR ( $R^2 = 0.33$ ) ont été obtenu, indiquant que les flavonoïdes peuvent être les principaux contributeurs aux propriétés antioxydantes de ces extraits fongiques.

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires polyphénoliques de faible poids moléculaire ayant une structure benzo- $\gamma$ -pyrone commune et montrant d'énormes activités biologiques et pharmacologiques dans les systèmes biologiques (Hameed et al., 2017). Les flavonoïdes des extraits de plantes se sont révélés posséder des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires dans diverses études (Govindappa et al., 2011). La fonction la plus importante des flavonoïdes est les propriétés antioxydantes, ils se sont révélés être des capteurs très efficaces de la plupart des types de molécules oxydantes, y compris l'oxygène singulet et divers radicaux libres (Ghasemzadeh et al., 2012). Les flavonoïdes des extraits de champignons filamenteux, y compris les endophytes, se sont révélés également posséder des propriétés antioxydantes dans diverses études, avec une corrélation linéaire entre la teneur en flavonoïdes et l'activité antioxydante (Govindappa et al., 2011; Govindappa et al., 2013; Hameed et al., 2017).

Nous avons observé également que la corrélation est faible entre le DPPH et les deux tests de la réduction de fer ;  $R^2 = 0.61$  pour DPPH-PR et  $R^2 = 0.43$  pour DPPH-FRAP, ceci peut être expliqué par le fait que les molécules qui agissent sur le DPPH et la réduction du fer ne sont pas les mêmes. Par contre ; il y a une forte liaison entre le FRAP et PR ( $R^2 = 0.95$ ), ce qui suggère que ces deux méthodes utilisent des mécanismes d'action similaires et que les composés responsables des activités exprimées dans ces tests sont des composés similaires (Karaman et al., 2014).

Une exception faite avec l'extrait brut de JOR26 dont les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes étaient supérieures à celles des extraits des autres isolats, alors que sa capacité antioxydante était modérée pour le FRAP et PR et très faible pour le DPPH. Ceci renforce l'idée que la qualité des molécules au sein de l'extrait est parfois un facteur déterminant. De nombreux rapports suggèrent une grande variation entre différents composés

phénoliques dans leur efficacité en tant qu'antioxydants, ce qui pourrait éventuellement être soutenu par le fait que l'activité antioxydante peut dépendre non seulement de la concentration, mais également de la chimie des molécules et de la nature de l'interaction (Balasundram *et al.*, 2006). De plus, et sur la base des résultats obtenus, nous suggérons que l'activité antioxydante modérée de l'extrait de JOR26 n'était pas limitée à la teneur en composés phénoliques ou en flavonoïdes, elle peut également être due à la présence d'autres métabolites secondaires antioxydants, tels que les caroténoïdes, les huiles volatiles, vitamines, lignanes et alcaloïdes (Bouyahya *et al.*, 2018).

Actuellement, la demande d'antioxydants naturels provenant de champignons endophytes a augmenté parallèlement à la constatation que les antioxydants naturels ont moins d'effets secondaires sur la santé humaine que les substances synthétisées artificiellement (Duan *et al.*, 2019). Sur la base de tous nos résultats mentionnés ci-dessus, il est établi que la plupart des extraits fongiques ont montré un bon potentiel d'activité antioxydante. Ces résultats suggèrent que les champignons endophytes sont une riche source d'antioxydants et de métabolites secondaires, qui pourraient être utilisés dans le développement de nouveaux nutraceutiques et de médicaments antioxydants naturels. Cependant, d'autres études sont recommandées pour purifier et caractériser la structure des constituants biologiquement actifs.

### III.7. Evaluation de la production du L-asparaginase

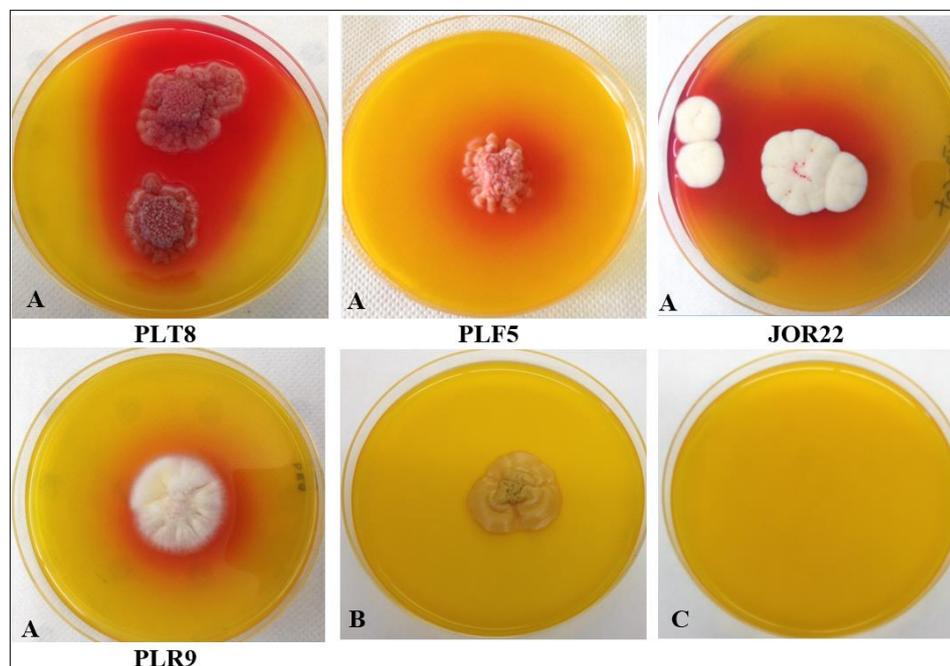
**Tableau 18.** Evaluation qualitative et quantitative de la production du L-asparaginase. (n=2, moyenne  $\pm$ SD).

| Les isolats endophytes | Indice enzymatique | Activité enzymatique (UI/mL) |
|------------------------|--------------------|------------------------------|
| <b>PLT8</b>            | 1.53 $\pm$ 0.34    | 128.11 $\pm$ 4.75            |
| <b>PLF5</b>            | 0.64 $\pm$ 0.07    | 43.69 $\pm$ 0.06             |
| <b>PLT7</b>            | N-A                | N-A                          |
| <b>JOR26</b>           | N-A                | N-A                          |
| <b>PLR9</b>            | 2.02 $\pm$ 0.35    | 180.84 $\pm$ 7.15            |
| <b>JOR22</b>           | 1.18 $\pm$ 0.26    | 258.04 $\pm$ 8.98            |

**N-A** : Non actif.

Le dépistage préliminaire de l'activité asparaginase des isolats endophytes a été déterminé par un test sur boîtes de Petri (**figure 53**). Parmi les six isolats testés par cette méthode, quatre ont été trouvés producteurs de L-asparaginase avec un indice enzymatique compris entre 1.53 $\pm$ 0.34 et 2.02 $\pm$ 0.35. Ces quatre isolats ont été ensuite sélectionnés pour évaluer quantitativement leur production de L-asparaginase après fermentation en milieu liquide.

Comme le montre le **tableau 18**, les endophytes JOR22 et PLR9 étaient les meilleurs producteurs de L-asparaginase avec  $258.04 \pm 8.98$  et  $180.84 \pm 7.15$  UI mL<sup>-1</sup> respectivement, suivi par l'isolat PLT8 qui présentait une activité de  $128.11 \pm 4.75$  UI mL<sup>-1</sup>, alors que l'isolat PLT5 a montré l'activité la plus faible ( $43.69 \pm 0.06$  UI mL<sup>-1</sup>).



**Figure 53.** Evaluation qualitative de la production de L-asparaginase en milieu gélosé. **A)** Un changement de couleur dans le milieu (jaune à rose) autour de la colonie indique la production de l'enzyme. **B)** Isolat non producteur. **C)** Contrôle négatif.

La chimiothérapie est l'un des principaux modes de traitement du cancer. C'est le processus d'utilisation de médicaments anticancéreux pour empêcher les cellules de se diviser et de se multiplier. Cependant, il existe peu de médicaments chimiothérapeutiques curatifs en raison de leur forte toxicité, de leur non-sélectivité, de nombreux effets secondaires et d'une faible activité (Abbas Ahmed 2015). Près de 60% des médicaments approuvés pour le traitement du cancer sont d'origine naturelle. Parmi ces derniers, les plus importants et utilisés, sont les enzymes thérapeutiques comme L-asparaginase (L-asparagine aminohydrolase, E. C. 3.5.1.1). Cette enzyme est un composant important dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique chez l'enfant, elle catalyse l'hydrolyse de l'asparagine et de la glutamine en acide aspartique et en ammoniac. Cette conversion provoque la privation d'asparagine dans le plasma sanguin et induit la mort des cellules malignes, car et contrairement aux cellules normales, elles ne sont pas capables de synthétiser l'asparagine en raison de la faible expression ou de l'absence du gène de la L-asparagine synthétase. Par conséquent, les niveaux réduits d'asparagine inhibent la synthèse des protéines dans les cellules leucémiques (Battiston Loureiro et *al.*, 2012; Souza et *al.*, 2017).

La L-asparaginase offre également une application potentielle dans la technologie alimentaire, elle permettrait de réduire la quantité d'asparagine libre dans les matériaux de départ en raison de sa capacité d'hydrolyse de l'asparagine en aspartate et en ammoniac, de sorte que le risque de formation d'un acrylamide potentiellement cancérigène et neurotoxique dans un grand nombre de produits alimentaires et de boissons préparés à des températures supérieures à 100 °C est diminué (Bedaiwy et al., 2016 ; Orabi et al., 2019).

L-asparaginase a été trouvée dans de nombreux organismes tels que le sérum de cobaye et de rongeurs, le foie de poulet, les levures, les champignons, les sources végétales et un certain nombre de bactéries comme *Erwinia carotovora* et *E. coli* (Bedaiwy et al., 2016). Cependant, il a été rapporté qu'une large gamme d'autres micro-organismes tels que les levures et les moisissures comme les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sécrètent cette enzyme avec moins d'effets indésirables que les microorganismes procaryotes (Bedaiwy et al., 2016 ; Cachumba et al., 2016; El-Hadi et al., 2017).

Plusieurs espèces fongiques endophytes sont signalées comme une bonne source de cette enzyme thérapeutique en particulier les membres des genres *Fusarium*, *Plectosphaerella*, *Stemphylium*, *Septoria*, *Alternaria*, *Didymella*, *Phoma*, *Chaetosphaeronema*, *Sarocladium*, *Nemania*, *Epicoccum* et *Cladosporium* (Caruso et al., 2020).

Les résultats obtenus dans cette étude sont généralement comparables à ceux rapportés précédemment, en particulier les isolats JOR22, PLR9 et PLT8 qui ont montré des niveaux très élevés de production de L-asparaginase.

L'endophyte *Aspergillus* sp. ALAA-2000 a montré une activité L-asparaginase maximale de 30,64 U/ml (Abbas Ahmed 2015). Parmi les quatre souches isolées du sol, *Aspergillus* sp. C7 a un indice enzymatique de 1,57 et une activité L-asparaginase de 33,59 U/mL (Doriya et Kumar 2016). L'endophyte *Talaromyces pinophilus* isolé des rhizomes de *Curcuma amada* a montré une activité enzymatique maximale de 20,3 U/mL dans le milieu liquide optimisé (Krishnapura et Belur 2020). *Lasiodiplodia theobromae* isolé à partir de *Teucrium polium* a enregistré l'activité la plus élevée de 152.58 U/mL (Balbool et Abdel-azeem 2020). Dans l'étude réalisée par Bhosale et As-Suhbani (2019), *Fusarium solani* isolé de *Curcuma longa* a montré l'activité enzymatique la plus élevée par rapport aux autres isolats fongiques (619,102 U/mL), suivi par *F. oxysporum* (514,532 U/mL), *Penicillium* sp. (307,114 U/mL), *Aspergillus* sp. (216,847 U/mL) et *Alternaria* sp. (149,057 U/ml). Il a été également trouvé que les espèces *Fusarium solani* (El-Hadi et al., 2017) et *Penicillium* sp. ASN4 avaient montré une activité enzymatique de 121 U/mL (Sanjotha et Manawadi 2017).

Notre étude indique clairement l'importance des espèces endophytes fongiques, en particulier celles appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, qui pourraient être une bonne et puissante source alternative pour la production de l'enzyme anticancéreuse L'asparaginase utilisée dans le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë.

### **III.8. Évaluation de l'effet cytotoxique et antiprolifératif**

L'activité cytotoxique des extraits d'acétate d'éthyle a été initialement testée contre la lignée HepG2. L'extrait de JOR22 a montré une activité cytotoxique très efficace avec une CC<sub>50</sub> de 0.1 µg/mL, très proche de celle obtenue par le témoin positif (doxorubicine) (CC<sub>50</sub>=0.11 µg/mL). Concernant les extraits de PLR9 et PLT7, leurs activités cytotoxiques étaient presque les mêmes et variaient aux alentours de 5.5 µg/mL. En comparant avec les résultats des autres extraits, ceux de PLF5 et de PLT8, avaient montré l'activité la plus faible avec des CC<sub>50</sub> de 27.8 et de 28.4 µg/mL respectivement. Pour l'extrait de JOR26, aucune activité cytotoxique n'a pu être détecté même avec la concentration la plus élevée utilisée (CC<sub>50</sub>> 50 µg/mL) (**tableau 19**).

**Tableau 19.** Résultats de la cytotoxicité des extraits fongiques vis-à-vis HepG2.

| <b>Extraits fongiques</b> | <b>CC50 (µg/mL) (HepG2)</b> |
|---------------------------|-----------------------------|
| <b>PLT8</b>               | <b>28.4</b>                 |
| <b>PLF5</b>               | <b>27.8</b>                 |
| <b>PLT7</b>               | <b>5.5</b>                  |
| <b>JOR26</b>              | <b>&gt; 50</b>              |
| <b>JOR22</b>              | <b>0.1</b>                  |
| <b>PLR9</b>               | <b>5.3</b>                  |
| <b>Doxorubicine</b>       | <b>0.11</b>                 |

**Tableau 20.** Résultats de la cytotoxicité des extraits fongiques vis-à-vis des différentes lignées cellulaires.

| <b>Extraits fongiques</b> | <b>CC50 (µg/mL)</b> |                         |              |              |                   |
|---------------------------|---------------------|-------------------------|--------------|--------------|-------------------|
|                           | <b>HaCaT</b>        | <b>Astrocytes 8-D1A</b> | <b>A549</b>  | <b>U251</b>  | <b>MDA-MB 231</b> |
| <b>PLT8</b>               | <b>77.65</b>        | <b>55.53</b>            | <b>/</b>     | <b>/</b>     | <b>/</b>          |
| <b>JOR26</b>              | <b>28.08</b>        | <b>29.65</b>            | <b>/</b>     | <b>/</b>     | <b>/</b>          |
| <b>PLT7</b>               | <b>/</b>            | <b>/</b>                | <b>2.76</b>  | <b>4.77</b>  | <b>9.56</b>       |
| <b>JOR22</b>              | <b>/</b>            | <b>/</b>                | <b>0.74</b>  | <b>1.12</b>  | <b>1.02</b>       |
| <b>PLR9</b>               | <b>/</b>            | <b>/</b>                | <b>12.47</b> | <b>18.61</b> | <b>9.10</b>       |

Puisqu'il est connu que les différentes lignées cellulaires présentent des sensibilités différentes envers les composés cytotoxiques, l'utilisation de plusieurs lignées cellulaires est nécessaire pour la détection des composés cytotoxiques (Santos et al., 2012). Pour cela, l'évaluation de la cytotoxicité et des effets antiprolifératifs des extraits fongiques a été réalisée en utilisant plusieurs lignées cellulaires saines et tumorales. Les isolats JOR22, PLR9 et PLT7

ayant présenté un effet cytotoxique élevé contre HepG2 ont été testés contre des lignées cellulaires tumorales A549, U251 et MDA-MB 231, cependant ceux ayant présenté une très faible toxicité, JOR26 et PLT8 ont été testés contre les lignées cellulaires saines HaCaT et C8-D1A.

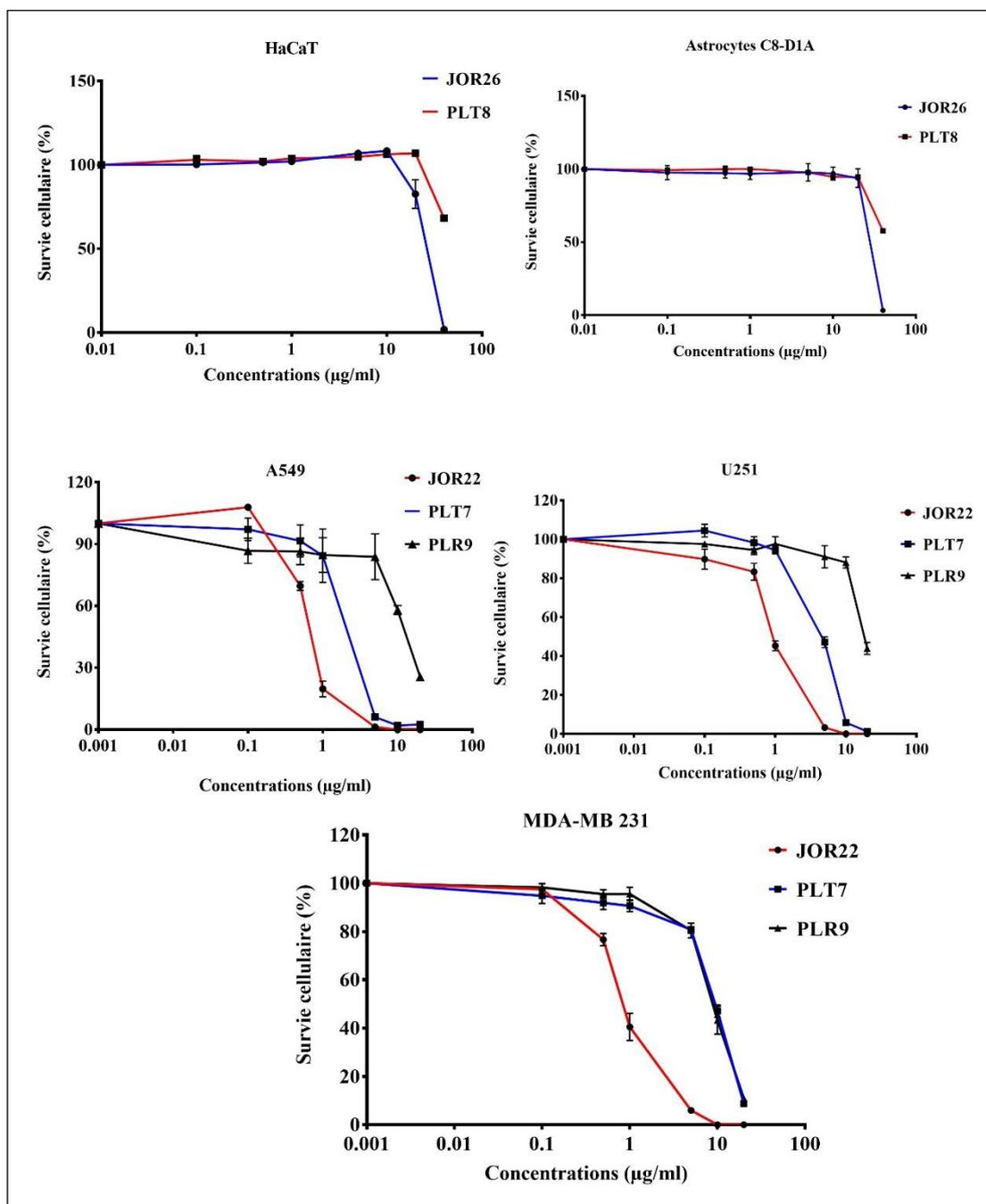
Les résultats des tests cytotoxiques contre les lignées tumorales ont montré que tous les extraits des champignons endophytes inhibaient la prolifération de ces cellules. L'extrait ayant l'activité la plus élevée était l'extrait de JOR22 avec des valeurs de  $CC_{50}$  très basses ; 0.74  $\mu\text{g/mL}$  contre A549, 1.02  $\mu\text{g/mL}$  contre MDA-MB 231 et 1.12  $\mu\text{g/mL}$  contre U251. L'extrait de PLT7 a également montré un effet cytotoxique très fort surtout contre les lignées A549 et U251 avec des  $CC_{50}$  de 2.76 et 4.77  $\mu\text{g/mL}$  respectivement, cependant l'activité antiproliférative contre la lignée MDA-MB 231 était forte (9.56  $\mu\text{g/mL}$ ). Enfin, l'extrait de l'isolat PLR9 était le moins actif ; il a montré une activité anticancéreuse forte vis à vis des deux lignées MDA-MB 231 et A549 où les  $CC_{50}$  étaient de 9.10 et 12.47  $\mu\text{g/mL}$  respectivement, alors que la lignée U251 était moins sensible (18.61  $\mu\text{g/mL}$ ) (**figure 54, tableau 20**).

Concernant les extraits testés contre les lignées saines, un effet cytotoxique très faible a été observé, où les valeurs des  $CC_{50}$  enregistrées pour l'extrait de l'isolat PLT8 étaient de 55.53  $\mu\text{g/mL}$  contre Astrocytes 8-D1A et de 77.65  $\mu\text{g/mL}$  contre HaCaT, alors qu'elles étaient de 28.08 et 29.65  $\mu\text{g/mL}$  contre HaCaT et Astrocytes 8-D1A respectivement pour l'extrait de l'isolat JOR26 (**figure 54, tableau 20**).

La méthode de l'MTT est un test colorimétrique qui repose sur la réduction enzymatique du sel de tétrazolium jaune pâle (MTT), qui forme un cristal de formazan bleu foncé à violet dans les cellules métaboliquement actives, et peut ensuite être dissous et lu par absorbance à 540-570 nm. Cette absorbance est proportionnelle au nombre de cellules vivantes, car seules les cellules vivantes sont capables de cliver le MTT (Santos et *al.*, 2012; Malhão et *al.*, 2019).

Les résultats de cette étude sont en accord avec les résultats antérieurs concernant la cytotoxicité et l'activité antiproliférative de différents champignons endophytes. Concernant l'extrait de PLT8 et d'une manière très intéressante, il a été observé qu'il était plus toxique contre les lignées de cellules cancéreuses HepG2 ( $CC_{50} = 28.4 \mu\text{g/mL}$ ) que contre les cellules normales HaCaT ( $CC_{50} = 77.65 \mu\text{g/mL}$ ) et Astrocytes 8-D1A ( $CC_{50} = 55.53 \mu\text{g/mL}$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux de Fan et *al.* (2019) qui ont également constaté que les extraits bruts des souches 1 et 87 (ordre des Pléosporales) étaient plus cytotoxiques pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. Les  $IC_{50}$  des extraits bruts des souches 1 et 87 étaient respectivement de 47 et 43  $\mu\text{g/mL}$  contre HepG2, 98 et 36  $\mu\text{g/mL}$  contre A549,

49 et 30  $\mu\text{g/mL}$  contre MDA-MB 231, alors que contre les cellules normales HaCaT elles étaient  $>100$  et 60  $\mu\text{g/mL}$  respectivement.



**Figure 54.** Effets Cytotoxique et antiprolifératif sur les lignées saines HaCaT et C8-D1A et les lignées cancéreuses A549, U251 et MDA-MB 231. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

L'isolat JOR26 proposé comme étant une nouvelle espèce appartenant à une nouvelle famille de l'ordre des diaportheales a présenté quant à elle une faible activité anticancéreuse et une faible cytotoxicité contre les cellules normales humaines. Certaines espèces appartenant à cet ordre ont été signalées dans plusieurs études comme source de composés anticancéreux, notamment les genres *Diaporthe* et *Phomopsis* et les taxons apparentés qui sont d'importants

genres trouvés comme endophytes dans la plupart des plantes, et qui sont capables de produire divers composés *in vitro* avec une variété de structures chimiques différentes (Bedi et al., 2018; Duan et al., 2019). Jouda et al. (2016) ont constaté que les trois dérivés connus de la cytochalasine (1, 2, 3) du champignon endophyte *Phomopsis* sp. étaient plus cytotoxiques pour les cellules cancéreuses humaines ( $CL_{50} = 3.66\text{--}35.69 \mu\text{g/mL}$ ) que pour les cellules normales non cancéreuses ( $CL_{50} = 73.88\text{--}129.10 \mu\text{g/mL}$ ). L'extrait fongique de DR46-1 (*Phomopsis* sp.) a présenté une activité anticancéreuse élevée contre la lignée cellulaire IHH4 avec des valeurs des  $IC_{50}$  de  $9.20 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$  (Duan et al., 2019). Parmi les champignons endophytes isolés à partir de *Annona muricata* L., l'extrait de *Phomopsis* sp. Sir-G5 a montré l'activité anticancéreuse la plus élevée contre les cellules MCF-7 avec une  $IC_{50}$  de  $19.20 \mu\text{g/mL}$  (Minarni et al., 2017).

Dans l'étude réalisée par Vasundhara et al., (2017), l'extrait brut de la souche *Diaporthe* sp. T1 isolée à partir de *Taxus baccata* a montré une faible activité cytotoxique contre les lignées cellulaires cancéreuses MCF-7 et HeLa, avec des valeurs des  $IC_{50}$  de 1058 et 1257  $\mu\text{g/mL}$  respectivement. Parmi les six composés isolés à partir du champignon *Diaporthe lithocarpus* A740 testé pour son activité cytotoxique contre les lignées cellulaires tumorales SF-268, MCF-7, HepG-2 et A549, deux nouveaux composés lithocarines B-C (**2-3**) et un composé connu tenellone H (**5**) ont montré une faible activité inhibitrice contre les quatre lignées cellulaires tumorales avec des valeurs des  $IC_{50}$  allant de 30 à 100  $\mu\text{M}$  (Liu et al., 2019). Le champignon endophyte *Diaporthe pseudomangiferae* isolé de *Sabicea cinerea* s'est avéré produire deux composés, le mycoépoxydiène (51) et l'éremofortine F (52). Le composé (51) a présenté une activité cytotoxique contre les lignées cellulaires KB, MDA-MB-435 et MRC5 avec des valeurs des  $IC_{50}$  de 7.5, 17.7 et 15.8  $\mu\text{M}$  respectivement, alors que le composé (52) était actif envers les lignées cellulaires KB et MRC5 avec des valeurs des  $IC_{50}$  de 13.9 et 12.2  $\mu\text{M}$ , respectivement (Mandavid et al., 2015). Le Diaporone A (1) purifié à partir de l'extrait du champignon endophyte *Diaporthe* sp. présentait une faible cytotoxicité contre la lignée cellulaire du carcinome cervical humain (HeLa) avec une valeur de  $IC_{50}$  de 97.4  $\mu\text{M}$  (Guo et al., 2020).

Les données de cette étude ont montré que l'extrait de JOR22 (*P. griseofulvum*) était le plus cytotoxique pour les lignées cellulaires cancéreuses par rapport aux autres extraits (tableau 19 et 20), et présentait une inhibition de 100% de toutes les lignées cellulaires tumorales testées à une concentration de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Des résultats comparables ont été obtenus par la même espèce endophyte *P. griseofulvum* (523) qui a inhibé 100% des cellules tumorales UACC-62, MCF-7 et TK-10 mais à 20  $\mu\text{g/mL}$ . En revanche, l'espèce la plus proche phylogénétiquement de cette espèce, *P. dipodomycicola* (654) s'est avérée moins efficace (Rosa et al., 2010). Les résultats de

notre étude concernant *P. griseofulvum* JOR22 sont significativement plus élevés que ceux d'une étude précédente sur *P. griseofulvum* isolé à partir de *Eudendrium racemosum* contre la lignée cellulaire du cancer du côlon (HCT-116) avec une  $IC_{50}$  de  $19.98 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$  (Heydari et al., 2019).

De nombreuses espèces appartenant au genre *Penicillium* sont capables de produire différents groupes de métabolites secondaires bioactifs naturels (Rosa et al., 2010). *P. griseofulvum* est bien connu par sa production de la griséofulvine ou ses dérivés. Récemment, ils ont commencé à utiliser cette molécule en chimiothérapie du cancer tellement elle a une action antiméiotique et antiproliférative spécifique aux cellules cancéreuses (Peromingo et al., 2019). Ainsi, les fortes activités antifongique et anticancéreuse observées avec l'extrait de *P. griseofulvum* JOR22 indiquent la possibilité de la présence de la griséofulvine ou ses dérivés dans cet extrait.

Plusieurs études ont mentionné l'activité anticancéreuse des extraits de différentes espèces d'*Aspergillus*. Heydari et al. (2019) ont isolé de nombreuses espèces d'*Aspergillus*, dont *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus costaricensis*, ces espèces ont montré une activité cytotoxique importante contre la lignée cellulaire du cancer du côlon HCT-116 avec des  $IC_{50}$  de  $3.13 \pm 0.58$ ,  $4.428 \pm 0.60$  et  $12.03 \pm 1.04 \mu\text{g/mL}$  respectivement. Ces valeurs ne sont pas loin des valeurs obtenues par l'extrait de l'isolat PLR9, qui étaient respectivement de 5.3, 9.10, 12.47 et 18.61  $\mu\text{g/mL}$  contre HepG2, MDA-MB 231, A549 et U251. Cependant, l'extrait de PLR9 était plus efficace que les autres espèces d'*Aspergillus*, *Aspergillus chevalieri* ( $IC_{50} = 32.38 \pm 5.6 \mu\text{g/mL}$ ) et *Aspergillus terreus* ( $IC_{50} = 99.054 \pm 7.36 \mu\text{g/mL}$ ). Dans l'étude de Ghanem et al. (2020), les extraits de *Aspergillus fumigatus* F-993 et de *Aspergillus awamori* FB-133 ont exercé une forte activité anticancéreuse contre la lignée cellulaire cancéreuse du foie HepG2. Les valeurs  $IC_{50}$  obtenues étaient respectivement de 16.88 et 8.60  $\mu\text{g/mL}$ , ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec l'extrait de PLR9.

Les espèces de la section *Aspergillus* sont capables de produire un très grand nombre de composés médicamenteux présentant un large éventail d'activités biologiques, y compris des composés ayant des propriétés anticancéreuses (Visagie et al., 2017; Frisvad et al., 2018). Le taxol fongique par exemple obtenu à partir de *Aspergillus oryzae* a montré un degré modéré d'action cytotoxique *in vitro* contre la lignée cellulaire cancéreuse NCI-H460 avec une  $IC_{50}$  de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Suresh et al., 2020). Dans une autre étude, le même composé purifié à partir de l'extrait du champignon endophyte *Aspergillus terreus* a présenté une cytotoxicité énorme ( $IC_{50} = 0.3 \text{ ng/mL}$ ) vis-à-vis de MCF7-E (cellule cancéreuse du sein) (El-Sayed et al., 2019). Les composés Aspergillines 19, 21 et 22 produits par le champignon endophyte *Aspergillus*

*vesicolor* ont présenté une cytotoxicité modérée contre toutes les lignées cellulaires (NB4, A549, SHSY5Y, PC3, MCF7), avec des valeurs des IC<sub>50</sub> allant de 1.2 à 4.2 mM (Zhou et al., 2014). La fumitrémorgin D 24, purifiée à partir du champignon endophyte *Aspergillus fumigatus*, a montré une faible cytotoxicité contre la lignée cellulaire HepG2, avec une valeur de IC<sub>50</sub> de 47.5 mM (Liang et al., 2015). Ma et al. (2016) ont isolé un nouveau pentapeptide cyclique nommé malformine E **35** à partir du bouillon de culture du champignon endophyte *Aspergillus tamarii*. Le composé présentait une forte activité cytotoxique envers les cellules cancéreuses humaines MCF-7 et A549 avec des valeurs des IC<sub>50</sub> de 0.65 et 2.42 Mm respectivement. Il a également montré une activité modérée sur HepG2 avec une valeur de IC<sub>50</sub> de 36.02 mM.

Les CMI de l'extrait de PLT8 pour toutes les bactéries testées était  $\leq 43.75 \mu\text{g/mL}$ , des valeurs inférieures de celles des CC<sub>50</sub> obtenues contre les cellules humaines non cancéreuses, (77.65  $\mu\text{g/mL}$  contre HaCaT et de 55.53  $\mu\text{g/mL}$  contre les astrocytes 8-D1A). De plus, les valeurs des CC<sub>50</sub> de l'extrait de JOR26 contre les cellules non cancéreuses humaines (28.08  $\mu\text{g/mL}$  contre HaCaT et 29.65  $\mu\text{g/mL}$  contre Astrocytes 8-D1A) étaient supérieures aux valeurs des CMI (CMI  $\leq 23,125 \mu\text{g/mL}$ ) obtenues contre toutes les bactéries testées. Selon Eskandarighadikolai et al. (2015), lors de la détermination de la toxicité des extraits de plantes à l'aide des lignées cellulaires des mammifères, un extrait brut ayant une valeur de IC<sub>50</sub>  $\geq 20 \mu\text{g/mL}$  est considéré comme non toxique ou faiblement toxique. Par conséquent, les résultats de cette étude suggèrent que les composés contenus dans les extraits des isolats PLT8 et JOR26 ayant un pouvoir contre les bactéries pathogènes à des doses plus faibles que celles provoquant la cytotoxicité, pourraient être des candidats solides pour le développement de nouveaux médicaments bactériostatique et bactéricide respectivement afin de faire face au terrible problème de santé mondial des bactéries multirésistantes.

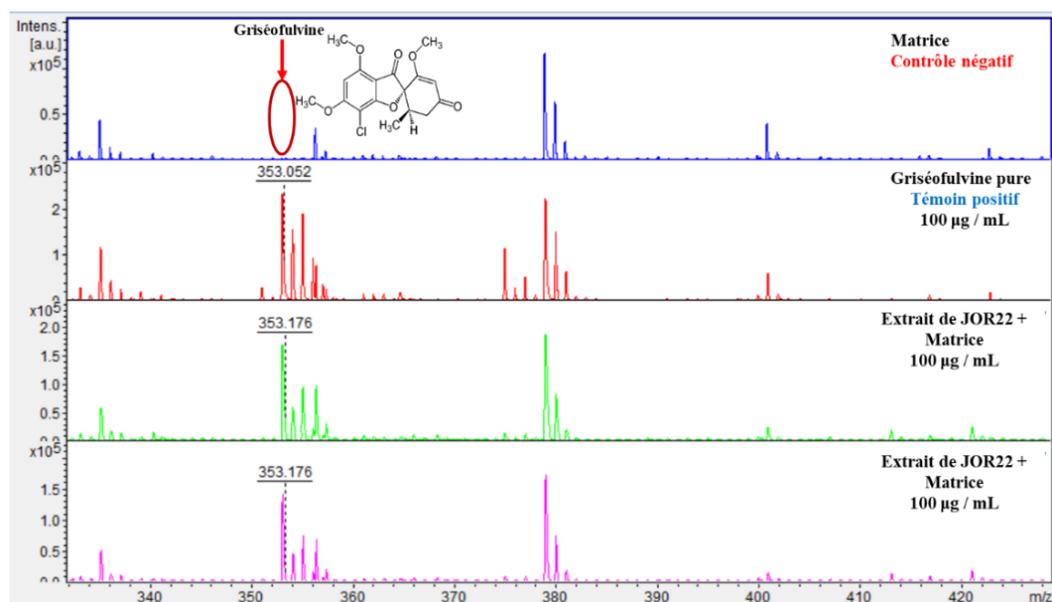
Cependant, et en tenant compte des critères de l'Institut National du Cancer américain concernant la cytotoxicité des composés purs (CL<sub>50</sub>  $< 4 \mu\text{g/mL}$ ) (Jouda et al., 2016), et celle des extraits bruts qui sont considérés comme des agents anticancéreux à forte activité cytotoxique si les valeurs des IC<sub>50</sub> sont inférieures à 30  $\mu\text{g/mL}$  (Minarni et al., 2017). Les résultats obtenus par le test MTT pour les extraits des autres champignons endophytes JOR22, PLT7 et PLR9 ayant des valeurs des CC<sub>50</sub> allant de 0.74 à 18.61 envers les cellules cancéreuses HepG2, A549, U251 et MDA-MB 231, montrent que ces extraits peuvent être classés comme des agents anticancéreux avec une forte activité anticancéreuse.

### III.9. Détection de la griséofulvine par MALDI-TOF MS (Autoflex-speed).

Les analyses de spectrométrie de masse MALDI-TOF ont été effectuées sur le système d'un Autoflex-Speed linear MALDI-TOF MS. Le mode ion-positif linéaire a été utilisé et la détection de la griséofulvine a été testée avec une matrice HCCA.

Le spectre de masse MALDI-TOF de la griséofulvine pure a montré un profil contenant l'ion monoisotopique  $m/z$  353,052,  $[M + H]^+$ . La griséofulvine a été également identifiée dans l'extrait brut de *Penicillium griseofulvum* JOR22 par un pic à  $m/z$  353,176,  $[M + H]^+$ . Les pics ont été trouvés avec une résolution et une pureté de haute qualité dans les deux échantillons. Par comparaison avec la masse de la griséofulvine, le MALDI-TOF MS s'est avéré ici sensible (identification correcte à 100%) pour cette molécule ( $m/z$  353,  $[M + H]^+$ ).

En ce qui concerne la matrice (Contrôle négatif), le résultat de l'autoflex a révélé l'absence du pic spécifique de la griséofulvine à  $m/z$  353. Ceci montre que la présence du pic spécifique à  $m/z$  353 dans les spectres de la griséofulvine pure et de l'extrait brute correspond à la détection de la griséofulvine par l'autoflex (**figure 55**).



**Figure 55.** Spectres de la griséofulvine pure et de l'extrait brut de l'isolat JOR22 obtenus par MALDI-TOF MS. (Les pics représentatifs sont marqués). L'axe vertical montre les intensités relatives des ions et l'axe horizontal montre le rapport masse/charge ( $m/z$ ) ou les masses d'ions (Da).

L'instrumentation de spectrométrie de masse à temps de vol par désorption / ionisation laser assistée par matrice permet une analyse très sensible et rapide à des niveaux femtomoles ou même attomolaires de biomolécules organiques et / ou de poids moléculaire élevés sans leur destruction (Elosta et al., 2007). La technique MALDI-TOF MS est capable de détecter en quelques minutes les isolats fongiques et leurs mycotoxines et les identifier, avec une grande précision en utilisant seulement de très petites quantités d'échantillons par rapport aux

techniques conventionnelles, elle est également utilisée comme alternative aux techniques chromatographiques (Elosta et al., 2007; Sivagnanam et al., 2017; Agriopoulou et al., 2020).

Plusieurs études ont prouvé la capacité du MALDI-TOF MS à identifier et à détecter rapidement les métabolites secondaires bioactifs et les mycotoxines produites par des champignons microscopiques. Elle a été utilisée pour le dépistage rapide des mycotoxines de *Alternaria*, l'Alternariol, l'Alternariol monométhyl éther et la Tentoxine (Sivagnanam et al. 2017), et pour détecter rapidement l'Aflatoxine B1, la Citrinine, le Désoxynivalénol, la Zéaralénone, la toxine T2 et la Griséofulvine (Hleba et al., 2017). Elle a été utilisée pour la détection de la production de peptaibol de différentes espèces de *Trichoderma* (Neuhof et al., 2007; Katoch et al., 2019). Également en 2018, Jerome Jeyakumar et leurs collaborateurs ont utilisé cette technique pour détecter huit mycotoxines ; Fumonisine B1, Fumonisine B2, Désoxynivalénol, Nivalénol, 3-acétyl-désoxynivalénol, 15-acétyldésoxynivalénol, Zéaralénone et Aflatoxine G1 produites par diverses espèces de *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* et *F. oxysporum*) dans des échantillons de canne à sucre infectés. De plus, Fumonisine B1, Fumonisine B2 produits par *F. verticillioides* ont également été détectés par cette méthode (Chang et al., 2016).

Dans l'étude de Petit et al., (2004), un spectromètre de masse de type piège d'ion (ElectroSpray-Ion Trap/Mass Spectrometry, ESI-IT/MS) a été utilisé pour la détection de la griséofulvine dans l'extrait d'une souche marine de *Penicillium waksmanii*. Ils ont détecté cette molécule comme  $[M+H]^+$  à  $m/z$  353. Les auteurs Rundberget et Wilkins, (2002) ont déterminé certains types de mycotoxines produites par *Penicillium* spp., y compris la griséofulvine dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux en utilisant LC-MS et LC-MS-MS, ils ont détecté la griséofulvine également sous la forme  $[M+H]^+$  à  $m/z$  353.

Dans ce test, l'isolat *Penicillium griseofulvum* JOR22 s'est avéré capable de synthétiser de la griséofulvine, ce qui peut expliquer la forte activité antifongique et anticancéreuse obtenue dans les tests précédemment réalisés.

A partir de ces résultats, il est clair qu'il est possible d'analyser et/ou de détecter des mycotoxines par la méthode linéaire du spectromètre de masse MALDI-TOF Autoflex-Speed. Cette méthode est une approche avancée, beaucoup plus rapide et efficace que les techniques de criblage bioactives traditionnelles. Ainsi, la méthode MALDI-TOF MS pourrait offrir la possibilité d'une détection rapide et sensible des mycotoxines ou découvrir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs dans des extraits bruts fongiques, en utilisant une très petite quantité d'échantillon et en très peu de temps.

## *Conclusion et perspectives*

## Conclusion et perspectives

La forte demande de nouvelles substances pour diverses applications humaines, surtout pour le traitement des infections causées par des microbes multirésistants et certaines maladies très répandues telles que le cancer, a conduit à une recherche continue de nouvelles molécules bioactives. Les produits naturels produits par des micro-organismes ont servi de ressources potentielles pour répondre à cette demande importante, car ils sont très efficaces, possèdent une faible toxicité et ont un impact environnemental mineur. Néanmoins, pour une recherche plus efficace des composés bioactifs à l'avenir et afin avoir de nouvelles molécules efficaces, la sélection rationnelle de sources de criblage de haute qualité est essentielle. Dans ce sens, et dans le cadre des travaux de recherche de notre laboratoire, ce travail vise à étudier principalement les champignons endophytes isolés de deux plantes médicinales Algériennes *P. lentiscus* L. et *J. oxycedrus* L. pour les identifier et d'évaluer leurs activités biologiques.

Dans cette étude, tous les échantillons testés ont donné au moins un isolat, le nombre des isolats, les valeurs des taux de colonisation et d'isolement de ces deux plantes étaient significativement plus élevés dans les racines que dans les tiges et les feuilles indiquant que la distribution des champignons endophytes diffère entre les différents tissus et les organes des végétaux.

Après les étapes d'isolement, et de purification, les activités antibactérienne et antifongique des isolats de champignons endophytes de chaque plante ont été dépistées par la technique des cylindres d'agar et celle de la double culture respectivement. Parmi les 126 isolats testés, 33 isolats seulement étaient actifs au moins contre microorganisme pathogène. Parmi ces derniers six étaient les plus actifs à savoir, JOR22 PLT8, PLF5, PLT7, JOR26 et PLR9

L'identification de nos isolats actifs a été réalisée en se basant sur les caractères morphologiques et moléculaires, ce qui a permis de les rattacher aux espèces *Penicillium griseofulvum*, *Aspergillus neobridgeri* et *Micronematobotrys verrucosus* respectivement (isolats JOR22, PLR9 et PLT7). Alors que les souches PLT8 et PLF5 ont été proposées comme nouvelle espèce dans le genre *Neocucurbitaria*. et comme une nouvelle espèce appartenant à une nouvelle famille dans l'ordre des Diaporthales pour l'isolat JOR26.

Dans le cadre de l'optimisation des conditions de production des métabolites bioactifs au niveau des techniques de fermentation et d'extraction. Le MEA était le milieu de culture le plus approprié pour les isolats PLT8, PLF5, JOR22 et PLR9, le PDA pour PLT7, alors que pour l'isolat JOR26 le milieu optimum était le YMEA. Pour le type de fermentation, Les isolats PLT8 et PLF5 ont présenté une activité antibactérienne maximale après culture en milieu solide, les isolats JOR26 et JOR22 après culture en milieu liquide, alors que pour l'isolat PLT7, aucune différence significative n'a été observée entre les deux types de milieu de culture.

Concernant le choix du solvants, l'activité antibactérienne maximale des extraits fongiques bruts a été observée avec les extraits de l'acétate d'éthyle pour la plupart des isolats, à l'exception de l'isolat

PLT7, où aucune différence significative n'a été observée entre l'extrait d'acétate d'éthyle et de dichlorométhane.

La comparaison des moyennes des zones d'inhibition des isolats, montre que les bactéries à Gram positif ont une sensibilité plus grande aux extraits d'acétate d'éthyle. Les extraits des isolats PLT8, PLT7, PLF5 et JOR26 étaient actifs uniquement contre toutes les bactéries à Gram positif, alors que les bactéries à Gram négatif étaient complètement résistantes. Cependant, L'extrait de l'isolat PLR9 s'est révélé avoir une activité antibactérienne importante contre les bactéries à Gram positif et une activité modérée contre les bactéries à Gram négatif. L'extrait de l'isolat JOR22 était quant à lui actif contre toutes les bactéries à Gram positif et négatif. Pour l'activité antifongique, les extraits des isolats PLT8, PLF5 et PLR9 n'ont montré aucune activité, alors que le reste des isolats en particulier JOR22, PLT7 et JOR26 ont montré une activité antifongique importante contre la plupart des dermatophytes filamenteux.

Selon les valeurs des CMI et dans l'ensemble, l'activité antimicrobienne, l'efficacité et la sensibilité dépendaient aussi bien de l'extrait et de l'espèce microbienne pathogène. Tous les extraits étaient hautement actifs à significativement actifs, à l'exception des extraits de JOR22 et de PLR9 qui étaient modérément actifs contre certaines bactéries multirésistantes à Gram négatif. L'étude de la cinétique de létalité des extraits a montré que les isolats JOR26, PLT7, et JOR22 avaient un effet bactéricide contre les deux bactéries testées. Alors que les isolats PLT8 et PLF5 avaient un effet bactériostatique. L'effet de l'extrait de PLR9 était bactéricide contre *E. faecium* 1 et bactériostatique contre *A. baumannii*.

Pour l'activité antioxydante, tous les extraits ont montré une activité antioxydante à des degrés divers. Les trois extraits fongiques PLT7, PLT8 et JOR22 se sont avérés être les plus efficaces en présentant une activité antioxydante *in vitro* dans les diverses méthodes utilisées. Cependant, les extraits restants JOR26, PLF5 et PLR9 ont montré un spectre d'activité étroit. De plus, tous les isolats à l'exception JOR26 PLT ont montré une bonne corrélation entre le taux des flavonoïdes et leur capacité antioxydante.

Les résultats des tests antiprolifératifs contre les lignées tumorales ont montré que l'extrait ayant l'activité la plus élevée contre toutes les lignées était l'extrait de JOR22. L'extrait de PLT7 a également montré un effet cytotoxique très fort surtout contre les lignées A549, U251 et HepG2. Enfin, l'extrait de l'isolat PLR9 était le moins actif. Concernant les extraits de PLT8, PLF5 et JOR26 testés contre les lignées saines, un effet cytotoxique faible a été observé.

Les valeurs des CC<sub>50</sub> des extraits de PLT8 et JOR26 contre les cellules non cancéreuses humaines étaient supérieures aux valeurs des CMI obtenues contre toutes les bactéries testées. Par conséquent, les résultats de cette étude suggèrent que les composés contenus dans les extraits des isolats PLT8 et JOR26 ayant un pouvoir contre les bactéries pathogènes à des doses plus faibles que celles provoquant la cytotoxicité. Alors que les extraits des autres champignons endophytes JOR22, PLT7 et PLR9 peuvent être classés comme des agents anticancéreux avec une forte activité antiproliférative.

Les endophytes JOR22 et PLR9 étaient les meilleurs producteurs de L-asparaginase, suivi par l'isolat PLT8 et en fin l'isolat PLT5 qui a montré l'activité la plus faible. Notre étude indique clairement l'importance des espèces endophytes fongiques, en particulier celles appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, qui pourraient être une bonne et puissante source alternative pour la production de l'enzyme anticancéreuse L-asparaginase utilisée dans le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë.

En utilisant le MALDI-TOF MS, l'isolat *Penicillium griseofulvum* JOR22 s'est avéré capable de synthétiser de la griséofulvine, ce qui peut expliquer la forte activité antifongique et anticancéreuse obtenue lors de cette étude.

Sur la base des activités biologiques intéressantes obtenues par les extraits des isolats de cette étude, nous suggérons de manière convaincante que ces isolats pourraient être des candidats solides et prometteurs pour la découverte et le développement de nouveaux métabolites bioactifs, et encourageant ainsi la poursuite des recherches sur les produits bioactifs qu'ils sécrètent.

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

- L'optimisation de la production des métabolites, par la recherche des meilleures conditions (effets des sources carbonées et azotées, éléments minéraux, aération, pH, etc.) en utilisant des méthodes plus efficaces comme response surface methodology (RSM).
- La poursuite des études sur tous les isolats en purifiant leurs métabolites secondaires bioactifs, en déterminant leurs structures chimiques et leur CMI contre des germes pathogènes multirésistants aux antibiotiques.
- Il serait intéressant d'étendre la recherche des gènes codant pour les PKS et les NRPS à toutes les souches, et de procéder au séquençage de ces gènes afin d'avoir une idée sur les molécules bioactives produites par ces souches.
- Tester le pouvoir de production d'autres métabolites telles que la production des enzymes et les nanoparticules.

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

- Abbas Ahmed MM. 2015. Production, Purification and Characterization of L-Asparaginase from Marine Endophytic *Aspergillus* sp. ALAA-2000 under Submerged and Solid State Fermentation. *J Microb Biochem Technol.* 07:165–172.
- Abiala M, Olayiwola J, Babatunde O, Aiyelaagbe O, Akinyemi S. 2016. Evaluation of therapeutic potentials of plant extracts against poultry bacteria threatening public health. *BMC Complement Altern Med.* 16: 417. Available from: doi: [10.1186/s12906-016-1399-z](https://doi.org/10.1186/s12906-016-1399-z).
- Abidi A, Aissani N, Sebai H, Serairi R, Kourda N, Ben Khamsa S. 2017. Protective Effect of *Pistacia lentiscus* Oil Against Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Oxidative Stress in Rat. *Nutr Cancer.* 69:490–497.
- Adeoyo OR, Pletschke BI, Dames JF. 2019. Molecular identification and antibacterial properties of an ericoid associated mycorrhizal fungus. *BMC Microbiol.* 19:1–8.
- Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Varzakas T. 2020. Advances in analysis and detection of major mycotoxins in foods. *Foods.* 9:1–23.
- Akhter N, Pan C, Liu Y, Shi Y, Wu B. 2018. Isolation and structure determination of a new indene derivative from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* Y-62. *Nat Prod Res.* 23: 1-6.
- Ali Ghasemzadeh. 2012. Flavonoid compounds and their antioxidant activity in extract of some tropical plants. *J Med Plants Res.* 6:2639–2643.
- Al-Rabia MW, Mohamed GA, Ibrahim SRM, Asfour HZ. 2020. Anti-inflammatory ergosterol derivatives from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporum*. *Nat Prod Res.* 0:1–10. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1762185>
- Alurappa R, Bojgowda MRM, Kumar V, Mallesh NK, Chowdappa S. 2014. Characterisation and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander* L. *Nat Prod Res.* 28:2217–2220.
- Alvarez L V., Groenewald JZ, Crous PW. 2016. Revising the *Schizoparmaceae*: *Coniella* and its synonyms *Pilidiella* and *Schizoparme*. *Stud Mycol.* 85:1–34.
- Anindyawati T, Praptiwi. 2019. A study of endophytic fungi *Neofusicoccum ribis* from gandarua (*Bouea macrophylla* griffith) as enzyme inhibitor, antibacterial, and antioxidant. *J Appl Biol Biotechnol.* 7:48–53.
- Aouam I, EL Atki Y, Taleb M, Tarog A, EL Kamari F, Lyoussi B, Abdellaoui A. 2019. Antioxidant capacities and total phenolic contents of *Thymus riararum*. *Mater Today Proc.* 13:579–586.
- Arivudainambi USE, Anand TD, Shanmugaiah V, Karunakaran C, Rajendran A. 2011. Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 61:340–345.
- Aramsirirujwet 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.
- Astuti P, Sudarsono S, Nisak K, Nugroho GW. 2014. Endophytic fungi isolated from *Coleus amboinicus* Lour exhibited antimicrobial activity. *Adv Pharm Bull.* 4:599–605.
- Atiphasaworn P, Monggoot S, Gentekaki E, Brooks S, Pripdeevech P. 2017. Antibacterial and anti-oxidant constituents of extracts of endophytic fungi isolated from *Ocimum basilicum* var. *thyriflora* leaves. *Curr Microbiol.* 74: 1185-93.
- Attia EZ, Farouk HM, Abdelmohsen UR, El-Katatny MH. 2019. Antimicrobial and extracellular oxidative enzyme activities of endophytic fungi isolated from alfalfa (*Medicago sativa*) assisted by metabolic profiling. *South African J Bot.* 000:4–10. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.003> .

Bahnweg G, Heller W, Stich S, Knappe C, Betz G, Heerdt C, Kehr RD, Ernst D, Langebartels C, Nunn AJ, et al. 2005. Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonina errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biol.* 7:659–669.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99:191–203.

Balbool BA, Abdel-azeem AM. 2020. Diversity of the culturable endophytic fungi producing L-asparaginase in arid Sinai , Egypt. *Ital J Mycol.* 49:8–24.

Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 6:71–79.

Bamisile BS, Dash CK, Akutse KS, Keppanan R, Wang L. 2018. Fungal endophytes: Beyond herbivore management. *Front Microbiol.* 9:1–11.

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. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-2347-x>

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.

Bao X, Roossinck MJ. 2013. Multiplexed interactions: viruses of endophytic fungi. In *Fungal Viruses*, vol 86. Edited by Ghabrial S. *Elsevier*. pp:37-57 *Advances in Virus Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00002-7>.

Battiston Loureiro C, Silva Borges K, Faria Andrade A, Gonzaga Tone L, Said S. 2012. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. *Adv Microbiol.* 02:138–145.

Bedaiwy MY, Awadal OA, Abou-Zeid AM, Hamada HT. 2016. Optimal conditions for production of L -Asparaginase from *Aspergillus tamaris*. *Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.)*. 12, 229–237.

Bedi A, Adholeya A, Deshmukh SK. 2018. Novel Anticancer compounds from Endophytic fungi. *Curr Biotechnol.* 7:168–184.

Bezerra JDP, Nascimento CCF, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Silva-Nogueira EB, Gomes BS, Paiva LM, Souza-Motta CM. 2015. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. *Braz J Microbiol.* 46: 49-57.

Bhalkar BN, Patil SM, Govindwar SP. 2016. Camptothecine production by mixed fermentation of two endophytic fungi from *Nothapodytes nimmoniana*. *Fungal Biol.* 120:873–883.

Bhosale H, As-Suhbani AE. 2019. Screening of fungal endophytes isolated from medicinal plants for glutaminase free L-asparaginase activity. *J Exp Biol Agric Sci.* 7:396–402.

Bills GF, Gloer JB. 2016. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiol Spectrum* 4(6): FUNK-0009- 2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016.

Boakye YD. 2016. Anti-infective Properties and Time-Kill Kinetics of *Phyllanthus muellerianus* and its Major Constituent, Geraniin. *Med Chem (Los Angeles)*. 6: 095-104.

Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. 2002. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem.* 3:619–627.

Botton B, Breton A., Fevre M., Guy P.H., Iarpent J.P., Sanglier J.J., Vayssier V. and Veau,P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles. Importance Industrielle. *Masson*. pp. 20-191.

Boutemine IM, Amri M, Amir ZC, Fitting C, Mecherara-Idjeri S, Layaida K, Sennoun N, Berkane

- S, Cavaillon JM, Touil-Boukoffa C. 2018. Gastro-protective, therapeutic and anti-inflammatory activities of *Pistacia lentiscus* L. fatty oil against ethanol-induced gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol.* 224:273–282.
- Bouyahya A, Benjouad A, Dakka N, Bakri Y. 2018. Correlation between the phenol content and antioxidant efficacy of *Myrtus Communis* (L.) Leaf Extracts. *J. Nutr. Food Lipid Sci.* 1, 6–14.
- 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.
- Cachumba JJM, Antunes FAF, Peres GFD, Brumano LP, Santos JC Dos, Da Silva SS. 2016. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian J Microbiol.* 47:77–85.
- Caicedo NH, Davalos AF, Puente PA, Rodríguez AY, Caicedo PA. 2019. Antioxidant activity of exo-metabolites produced by *Fusarium oxysporum*: An endophytic fungus isolated from leaves of *Otoba gracilipes*. *Microbiologyopen.* 8:1–7.
- Campos FF, Junior PAS, Romanha AJ, Araújo MSS, Siqueira EP, Resende JM, Alves TMA, Martins-Filho OA, Dos Santos VL, Rosa CA, Zani CL, Cota BB. 2015. Bioactive endophytic fungi Isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *fusarium* sp. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110: 65-74.
- Cao F, Meng ZH, Mu X, Yue YF, Zhu HJ. 2019. Absolute Configuration of Bioactive Azaphilones from the Marine-Derived Fungus *Pleosporales* sp. CF09-1. *J Nat Prod.* 82:386–392.
- Cao F, Yang JK, Liu YF, Zhu HJ, Wang CY. 2016. Pleosporalone A, the first azaphilone characterized with aromatic A-ring from a marine-derived *Pleosporales* sp. fungus. *Nat Prod Res.* 30:2448–2452.
- Caruso G, Abdelhamid M, Kalisz A, Sekara A. 2020. Linking endophytic fungi to medicinal plants therapeutic activity. A case study on Asteraceae. *Agriculture.* 10:286. Available from : <https://doi.org/10.3390/agriculture10070286> .
- Chang S, Carneiro-Leão MP, de Oliveira BF, Souza-Motta C, Lima N, Santos C, de Oliveira NT. 2016. Polyphasic approach including MALDI-TOF MS/MS analysis for identification and characterisation of *Fusarium verticillioides* in Brazilian corn kernels. *Toxins (Basel).* 8:1–13.
- Charousová I, Medo J, Hleba L, Císarová M, Javoreková S. 2019. Antimicrobial activity of actinomycetes and characterization of actinomycin-producing strain KRG-1 isolated from Karoo, South Africa. *Brazilian J Pharm Sci.* 55:1–11.
- 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.* 14:1–18.
- Chauhan NM, Gutama AD, Aysa A. 2019. Endophytic fungal diversity isolated from different agro-ecosystem of Enset (*Ensete ventericosum*) in Gedeo zone, SNNPRS, Ethiopia. *BMC Microbiol.* 19:1–10.
- Chen S, Liu Z, Liu H, Long Y, Chen D, Lu Y, She Z. 2017. Lasiodiplactone A, a novel lactone from the mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* ZJ-HQ1. *Org Biomol Chem.* 15:6338–6341.
- Chen Y, Sun LT, Yang HX, Li ZH, Liu JK, Ai HL, Wang GK, Feng T. 2020. Depsidones and diaryl ethers from potato endophytic fungus *Boeremia exigua*. *Fitoterapia.* 141:104483. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104483> .
- Cheng K, Wei Z, Pu S, Xiang M, Yan A, Zhang Y, Wang X. 2018. Diversity of endophytic fungi of *Paeonia lactiflora* Pallas and screening for fungal paeoniflorin producers. *FEMS Microbiol Lett.* 365.

- Chepkirui C, Stadler M. 2017. The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. *Mycol Prog*. 16:477–494.
- Chowdhury S, Lata R, Kharwar RN, Gond SK. 2019. Microbial Endophytes of Maize Seeds and Their Application in Crop Improvements. In: Seed Endophytes. Verma S, White, Jr J. (eds). *Springer, Cham*. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10504-4_21).
- Christian NS, Whitaker BK, Clay K. 2017. A novel framework for decoding fungal endophyte diversity. (Chapter 5). In: The Fungal Community: its Organization and Role in the Ecosystem (fourth ed.), John Dighton, James F. White (Eds.). *CRC Press Taylor & Francis Group*. pp: 63–78.
- Cota BB, Tunes LG, Maia DNB, Ramos JP, De Oliveira DM, Kohlhoff M, Alves TM de A, Souza-Fagundes EM, Campos FF, Zani CL. 2018. Leishmanicidal compounds of *Nectria pseudotrichia*, an endophytic fungus isolated from the plant *Caesalpinia echinata* (Brazilwood). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 113:102–110.
- da Silva IP, Brissow E, Kellner Filho LC, Senabio J, de Siqueira KA, Vandresen Filho S, Damasceno JL, Mendes SA, Tavares DC, Magalhães LG, et al. 2017. Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*-F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *World J Microbiol Biotechnol*. 33: :62. Available from: DOI: [10.1007/s11274-017-2228-3](https://doi.org/10.1007/s11274-017-2228-3).
- Dalinova A, Chisty L, Kochura D, Garnyuk V, Petrova M, Prokofieva D, Yurchenko A, Dubovik V, Ivanov A, Smirnov S, et al. 2020. Isolation and bioactivity of secondary metabolites from solid culture of the fungus, *Alternaria sonchi*. *Biomolecules*. 10:1–18.
- Das M, Prakash HS, Nalini MS. 2017. Antioxidative properties of phenolic compounds isolated from the fungal endophytes of *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell. *Front Biol (Beijing)*. 12:151–162.
- Dávila MF, Chaves-acuña W, Yánez J, Biológicas EDC, Universidad P, Biología E De, Rica UDC, Pedro S, José S, Rica C. 2018. Fungal communities isolated from *Symptomatic naranjilla* (*Solanum quitoense* Lam .) leaves in the Ecuadorian Amazon region Comunidades. *Rev Ecuat Med Cienc Biol*.39 :39–49.
- De Amorim MR, Hilário F, Dos Santos FM, Batista JM, Bauab TM, Araújo AR, Carlos IZ, Vilegas W, Dos Santos LC. 2019. New benzaldehyde and benzopyran compounds from the endophytic fungus *Paraphaeosphaeria* spF03 and their antimicrobial and cytotoxic activities. *Planta Med*. 85:957–964.
- de Gruyter J, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous PW. 2010. Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. *Mycologia*. 102:1066–1081.
- de Medeiros AG, Savi DC, Mitra P, Shaaban KA, Jha AK, Thorson JS, Rohr J, Glienke C. 2018. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. *Folia Microbiol (Praha)*. 63:499–505.
- de Vries S, von Dahlen JK, Schnake A, Ginschel S, Schulz B, Rose LE. 2018. Broad-spectrum inhibition of *Phytophthora infestans* by fungal endophytes. *FEMS Microbiol Ecol*. 94: fiy037. Available from: DOI: [10.1093/femsec/fiy037](https://doi.org/10.1093/femsec/fiy037).
- 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, Li C, Luo D, Teng P, Guo Z, Tu X, Zou K, Gong D. 2017. A new cinnamic acid derivative from plant-derived endophytic fungus *Pyronema* sp. *Nat Prod Res*. 31:2413–2419.
- Descy J, Meex C, Melin P, Hayette MP, Huynen P, De Mol P. 2010. Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. *Rev Med Lièg*. 65: 29-34
- Deshidi R, Devari S, Kushwaha M, Gupta AP, Sharma R, Chib R, Khan IA, Jaglan S, Shah BA. 2017. Isolation and Quantification of Alternariols from Endophytic Fungus, *Alternaria alternata*: LC-

ESI-MS/MS Analysis. *ChemistrySelect*. 2:364–368.

Deshmukh SK, Gupta MK, Prakash V, Saxena S. 2018. Endophytic fungi: A source of potential antifungal compounds. *J Fungi*. 4:77. Available from: <https://doi.org/10.3390/jof4030077> .

Deshmukh SK, Verekar SA, Bhawe S V. 2014. Endophytic fungi: A reservoir of antibacterials. *Front Microbiol*. 5:1–43.

Devaraju R, Satish S. 2011. Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian J Exp Biol Sci*. 2: 75-79.

Dhayanithy G, Subban K, Chelliah J. 2019. Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*. *BMC Microbiol*. 19:1–14.

Dob T, Dahmane D, Chelghoum C. 2006. Essential oil composition of *Juniperus oxycedrus* growing in Algeria. *Pharm Biol*. 44:1–6.

Dolatabad HK, Javan-Nikkhah M, Shier WT. 2017. Evaluation of antifungal, phosphate solubilisation, and siderophore and chitinase release activities of endophytic fungi from *Pistacia vera*. *Mycol Prog*. 16:777–790.

Doriya K, Kumar DS. 2016. Isolation and screening of l-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3 *Biotech*. 6. 239. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0544-1> .

D'Souza MA, 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.

Du W, Yao Z, Li J, Sun C, Xia J, Wang B, Shi D, Ren L. 2020. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Securinega suffruticosa* in the Yellow River Delta. *PLoS One*. 15: e0229589. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229589> .

Du Z, Hyde KD, Yang Q, Liang YM, Tian CM. 2017. *Melansporellaceae*: A novel family of *Diaporthales* (Ascomycota). *Phytotaxa*. 305:191–200.

Duan X, Xu F, Qin D, Gao T, Shen W, Zuo S, Yu B, Xu J, Peng Y, Dong J. 2019. Diversity and bioactivities of fungal endophytes from *Distylium chinense*, a rare waterlogging tolerant plant endemic to the Three Gorges Reservoir. *BMC Microbiol*. 19:1–14.

Dufresne P. 2018. Identification des champignons d'importance médicale. *Laboratoire de santé publique. Québec*. 56 p.

Dulay RMR, Ray K, Hou CT. 2015. Optimization of liquid culture conditions of Philippine wild edible mushrooms as potential source of bioactive lipids. *Biocatal Agric Biotechnol*. 4:409–415.

Egan JM, Kaur A, Raja HA, Kellogg JJ, Oberlies NH, Cech NB. 2016. Antimicrobial fungal endophytes from the botanical medicine goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *Phytochem Lett*. 17:219–225.

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.

El-Hadi A, El-Refai H, Shafei M, Zaki R, Mostafa H. 2017. Statistical optimization of L-asparaginase production by using *Fusarium solani*. *Egypt Pharm J*. 16: 16-23.

El-Hawary SS, Moawad AS, Bahr HS, Abdelmohsen UR, Mohammed R. 2020. Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. *RSC Adv*. 10:22058–22079.

Elosta S, Gajdošová D, Hégrová B, Havel J. 2007. MALDI TOF mass spectrometry of selected mycotoxins in barley. *J Appl Biomed*. 5:39–47.

El-Sayed ASA, El Sayed MT, Nada HS, Hassan AE, Yousef EK. 2019. Production and Characterization of Taxol as Anticancer Agent from *Aspergillus terreus*. *J Pure Appl Microbiol*. 13:2055–2063.

- Eo J, Lee B, Eom A. 2015. First Report of Three Species of Endophytic Fungi Isolated from Needle Leaves of Conifers in Korea. *Korean J Mycol.* 43:272–276.
- Erbert C, Lopes AA, Yokoya NS, Furtado NAJC, Conti R, Pupo MT, Lopes JLC, Deboni HM. 2012. Antibacterial compound from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from the tropical red seaweed *Bostrychia radicans*. *Bot Mar.* 55:435–440.
- Eskandarighadikolaii S, Cruz T, Bungihan M. 2015. Antioxidant properties of fungal endophytes associated with the three medicinal plants *Gliricidia sepium*, *Canna indica* and *Gardenia jasminoides*. *J Sci Res Reports.* 6:217–226.
- Ezzat SM, El-Sayed EA, Abou EL-Hawa MI, Ismaiel AA. 2007. Morphological and ultrastructural studies for the biological action of penicillic acid on some bacterial species. *Res J Microbiol.* 2: 303-14.
- Fadel H, Benayache F, Chalchat JC, Figueredo G, Chalard P, Hazmoune H, Benayache S. 2019. Essential oil constituents of *Juniperus oxycedrus* L. and *Cupressus sempervirens* L. (*Cupressaceae*) growing in Aures region of Algeria. *Nat Prod Res.* 0:1–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1687473>
- Fadji AE, Babalola OO. 2020. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Front Bioeng Biotechnol.* 8:1–20.
- Fan B, Dewapriya P, Li F, Blümel M, Tasdemir D. 2020. Pyrenosetins A-C, new decalinoylspirotetramic acid derivatives isolated by bioactivity-based molecular networking from the seaweed-derived fungus *Pyrenochaetopsis* sp. FVE-001. *Mar Drugs.* 18:47; Available from: <https://doi.org/10.3390/md18010047> .
- Fan B, Parrot D, Blümel M, Labes A, Tasdemir D. 2019. Influence of OSMAC-based cultivation in metabolome and anticancer activity of fungi associated with the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Mar Drugs.* 17 :67; Available from: <https://doi.org/10.3390/md17010067> .
- Fan Y, Gao L, Chang P, Li Z. 2020. Endophytic fungal community in grape is correlated to foliar age and domestication. *Ann Microbiol.* 70:4–11.
- Fathallah N, Raafat MM, Issa MY, Abdel-Aziz MM, Bishr M, Abdelkawy MA, Salama O. 2019. Bio-guided fractionation of prenylated benzaldehyde derivatives as potent antimicrobial and antibiofilm from *Ammi majus* l. fruits-associated *Aspergillus amstelodami*. *Molecules.* 24. :4118. Available from <https://10.3390/molecules24224118> .
- Fatima N, Mukhtar U, Ihsan-UI-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. <https://10.5812/jjm.29978> .
- Feng L, Wang J, Liu S, Zhang XJ, Bi QR, Hu YY, Wang Z, Tan NH. 2019. Colletopeptides A-D, Anti-inflammatory Cyclic Tridepsipeptides from the plant endophytic fungus *Colletotrichum* sp. S8. *J Nat Prod.* 82:1434–1441.
- Ferreira MC, Cantrell CL, Wedge DE, Gonçalves VN, Jacob MR, Khan S, Rosa CA, Rosa LH. 2017a. Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands. *Biochem Syst Ecol.* 71:163–169.
- Ferreira MC, Cantrell CL, Wedge DE, Gonçalves VN, Jacob MR, Khan S, Rosa CA, Rosa LH. 2017b. Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 112:692–697.
- Ferreira MC, de Assis JCS, Rosa LH. 2020. Diversity of endophytic fungi associated with *Carapichea ipecacuanha* from a native fragment of the Atlantic Rain Forest. *South African J Bot.* 000:1–5. Available from <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.031> .
- Frisvad JC, Møller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. 2018. Safety of the fungal workhorses

of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102:9481–9515.

Gasong BT, Tjandrawinata RR. 2016. Production of secondary metabolite E2.2 from *Phaleria macrocarpa* endophytic fungus. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 6:881–885.

Gerchman Y, Inbar M. 2011. Distinct antimicrobial activities in aphid galls on *Pistacia atlantica*. *Plant Signal Behav*. 6:2008–2012.

Ghanem KZ, Mahran MZ, Ramadan MM, Ghanem HZ, Fadel M, Mahmoud MH. 2020. A comparative study on flavour components and therapeutic properties of unfermented and fermented defatted soybean meal extract. *Sci Rep*. 10:1–7.

Ghareeb MA, Hamed MM, Saad AM, Abdel-Aziz MS, Hamed AA, Refahy LA. 2019. Bioactive secondary metabolites from the locally isolated terrestrial fungus, *Penicillium* sp. SAM16-EGY. *Phcog Res*. 11:162-70.

Gherbawy YA, Elhariry HM. 2014. Molecular Characterization of Endophytic Fungi Associated with High-Altitude *Juniperus* Trees and Their Antimicrobial Activities. *Life Sci J*. 11:19–30.

Gherbawy YA, Elhariry HM. 2016. Endophytic fungi associated with high-altitude *Juniperus* trees and their antimicrobial activities. *Plant Biosyst*. 150:131–140.

Gombodorj S, Yang MH, Shang ZC, Liu RH, Li TX, Yin GP, Kong LY. 2017. New phenalenone derivatives from *Pinellia ternate* tubers derived *Aspergillus* sp. *Fitoterapia* 120: 72-78.

Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev*. 18: 241–272.

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*. 8:1–12.

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 (Aligarh)*. 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 Radicals Antioxidants*. 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. *Am J Plant Sci*. 04:1641–1652.

Govindappa M, Naga Sravya S, Poojashri MN, Sadananda TS, Chandrappa CP, Santoyo G, Sharanappa P, Anil Kumar N V. 2011. Antimicrobial, antioxidant and *in vitro* anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *J Med Plant Res*. 5:5718–5729.

Grijseels S, Nielsen JC, Nielsen J, Larsen TO, Frisvad JC, Nielsen KF, Frandsen RJN, Workman M. 2017. Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. *Fungal Biol Biotechnol*. 4:1–12.

Guo L, Lin J, Niu S, Liu S, Liu L. 2020. Pestalotiones A–D: four new secondary metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis Theae*. *Molecules*. 25, 470. Available from: doi: [10.3390/molecules25030470](https://doi.org/10.3390/molecules25030470).

Guo L, Niu S, Chen S, Liu L. 2020. Diaporone A, a new antibacterial secondary metabolite from the plant endophytic fungus *Diaporthe* sp. *J Antibiot (Tokyo)*. 73:116–119.

Gupta S, Chaturvedi P, Kulkarni MG, Van Staden J. 2020. A critical review on exploiting the

- pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. *Biotechnol Adv.* 39:107462. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107462>.
- 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 TNT, Lee SY, Hidayat A, Terhem R, Faridah-Hanum I, Mohamed R. 2018. Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, *Rhizophora mucronata*, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, *Fusarium solani*. *Front Microbiol.* 9: 1707.
- Hanène M, Ameur E, Larbi KM, Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Marongiu B, Farhat F, Chemli R. 2012. Chemical composition of the essential oils of the berries of *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *rufescens* (L. K.) and *Juniperus oxycedrus* L. ssp. *macrocarpa* (S. & m.) Ball. and their antioxidant activities. *Nat Prod Res.* 26:810–820.
- 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.
- Harwoko H, Daletos G, Stuhldreier F, Lee J, Wesselborg S, Feldbrügge M, Müller WEG, Kalscheuer R, Ancheeva E, Proksch P. 2019. Dithiodiketopiperazine derivatives from endophytic fungi *Trichoderma harzianum* and *Epicoccum nigrum*. *Nat Prod Res.* 0:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1627348>.
- Hateet RR. 2017. Isolation and identification of three bioactive compounds from endophytic fungus *Trichoderma* sp. *J Al-Nahrain Univ.* 20:108–113.
- Heydari H, Koc A, Simsek D, Gozcelioglu B, Altanlar N, Konuklugil B. 2019. Isolation, identification and bioactivity screening of Turkish marine-derived fungi. *Farmacia.* 67:780–788.
- Hleba L, Císarová M, Shariati MA, Tancinová D. 2017. Detection of mycotoxins using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 7:181–185.
- Houbraken J, Visagie CM, Meijer M, Frisvad JC, Busby PE, Pitt JI, Seifert KA, Louis-Seize G, Demirel R, Yilmaz N, Jacobs KB, Christensen M, Samson RA. 2014. A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Stud Mycol.* 78: 373-451.
- Huang Z, Cai X, Shao C, She Z, Xia X, Chen Y, Yang J, Zhou S, Lin Y. 2008. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry.* 69:1604–1608.
- Ibrahim M, Sieber TN, Schlegel M. 2017. Communities of fungal endophytes in leaves of *Fraxinus ornus* are highly diverse. *Fungal Ecol.* 29:10–19.
- Ibrahim SRM, Abdallah HM, Elkhayat ES, Al Musayeib NM, Asfour HZ, Zayed MF, Mohamed GA. 2018. Fusaripeptide A: new antifungal and anti-malarial cyclodepsipeptide from the endophytic fungus *Fusarium* sp. *J Asian Nat Prod Res.* 20:75–85.
- Ibrahim SRM, Elkhayat ES, Mohamed GAA, Fat'hi SM, Ross SA. 2016. Fusarithioamide A, a new antimicrobial and cytotoxic benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium*. *Biochem Biophys Res Commun.* 479:211–216.
- Ibrahim SRM, Mohamed GA, Al Haidari RA, Zayed MF, El- Kholly AA, Elkhayat ES, Ross SA. Fusarithioamide B, 2018. A new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. *Bioorg Med Chem.* 26: 786-90.
- Ikram M, Ali N, Jan G, Guljan F, Khan N. 2020. Endophytic fungal diversity and their interaction with plants for agriculture sustainability under stressful condition. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 11: 115

– 123.

Jayanthi G, Arun R, Ramachandran R, Karthikeyan K, Muthumary J. 2018. Production , isolation and structural elucidation of a novel antimicrobial metabolite from the endophytic fungus , *Phomopsis / Diaporthe theae*. **Int J Pharm Biol Sci**.8:8–26.

Jayanthi P. et Lalitha P. 2011. Ruducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **Int J Pharm Pharm Sci**. 3:126-128.

Jens C. Frisvad, J. Mick Frank, Jos A.M.P. Houbraken, Angelina F.A. Kuijpers and Robert A. Samson. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section Circumdati. **Stud Mycol**. 50: 23–43.

Jerome Jeyakumar JM, Zhang M, Thiruvengadam M. 2018. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-ESI-MS/MS, and MALDI-TOF MS in *Fusarium* species-infected sugarcane. **Microb Pathog**. 123:98–110.

Jiang CS, Zhou ZF, Yang XH, Lan LF, Gu YC, Ye BP, Guo YW. 2018. Antibacterial sorbicillin and diketopiperazines from the endogenous fungus *Penicillium* sp. GD6 associated Chinese mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. **Chin J Nat Med**. 16:358–365.

Jouda JB, Tamokou J de D, Mbazona CD, Douala-Meli C, Sarkar P, Bag PK, Wandji J. 2016. Antibacterial and cytotoxic cytochalasins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. harbored in *Garcinia kola* (Heckel) nut. **BMC Complement Altern Med**. 16:1–9.

Jouda JB, Tamokou J de D, Mbazona CD, Sarkar P, Bag PK, Wandji J. 2016. Anticancer and antibacterial secondary metabolites from the endophytic fungus *Penicillium* sp. CAM64 against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. **Afr Health Sci**. 16:734–743.

Kaaniche F, Hamed A, Abdel-Razek AS, Wibberg D, Abdissa N, El Euch IZ, Allouche N, Mellouli L, Shaaban M, Sewald N. 2018. Bioactive secondary metabolites from new endophytic fungus *Curvularia* sp. isolated from *Rauwolfia macrophylla*. **PLoS One**. 14:1–12.

Kajevska I, Rusevska K, Karadelev M. 2013. The family *Pyronemataceae* (Pezizales, ascomycota) in the republic of macedonia. **ResearchgateNet**. 15:11–22.

Kalyani P, Geetha S, Hemalatha KPJ. 2016. Optimization of cultural conditions for improved production and bioactive metabolites by *Aspergillus niger* (Mttc-961). **EJPMR**. 3: 255-60.

Kamal N, Viegelmann C V., Clements CJ, Edrada-Ebel RA. 2017. Metabolomics-guided isolation of anti-trypanosomal metabolites from the endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Planta Med**. 83:565–573.

Kamat S, Kumari M, Taritla S, Jayabaskaran C. 2020. Endophytic Fungi of Marine Alga From Konkan Coast, India—A Rich Source of Bioactive Material. **Front Mar Sci**. 7:31. Available from: [doi: 10.3389/fmars.2020.00031](https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00031).

Kamil FH, Saeed EE, El-Tarabily KA, AbuQamar SF. 2018. Biological control of mango dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* using streptomycete and non-streptomycete actinobacteria in the United Arab Emirates. **Front Microbiol**. 9:1–19.

Karaman M, Stahl M, Vulić J, Vesić M, Čanadanović-Brunet J. 2014. Wild-growing lignicolous mushroom species as sources of novel agents with antioxidative and antibacterial potentials. **Int J Food Sci Nutr**. 65:311–319.

Katoch M, Singh D, Kapoor KK, Vishwakarma RA. 2019. *Trichoderma lixii* (IIIM-B4), an endophyte of *Bacopa monnieri* L. producing peptaibols. **BMC Microbiol**. 19:1–10.

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.

Kellogg JJ, Todd DA, Egan JM, Raja HA, Oberlies NH, Kvalheim OM, Cech NB. 2016. Biochemometrics for Natural Products Research: Comparison of Data Analysis Approaches and

Application to Identification of Bioactive Compounds. *J Nat Prod.* 79:376–386.

Keral N, Shivashankar M, Manmohan MS. 2019. Evaluation of cultural conditions on the growth of marine fungi and their antimicrobial activity. *Res. J. Life Sci. Bioinform. Pharm. Chem. Sci.* 5:307–319.

Khiralla A, 2015. Etudes phytochimique, cytotoxique et antibactérienne de champignons endophytes issus de plantes médicinales du Soudan. Thèse De Doctorat. *Université de Lorraine.*

Kim H, You YH, Yoon H, Seo Y, Kim YE, Choo YS, Lee IJ, Shin JH, Kim JG. 2014. Culturable fungal endophytes isolated from the roots of coastal plants inhabiting Korean east coast. *Mycobiology.* 42:100–108.

Knight V, Sanglier JJ, DiTullio D, Braccili S, Bonner P, Waters J, Hughes D, Zhang L. 2003. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62:446–458.

Kowalski T, Kehr R. 1992. Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. *Sydowia.* 44:137–168.

KP K. 2017. Biodiversity of Endophytic Fungi from *Mukia maderespatana* (L) M. Roem - A First Report. *J Bacteriol Mycol Open Access.* 4:109–113.

Krishnapura PR, Belur PD. 2020. L-asparaginase production using solid-state fermentation by an endophytic *Talaromyces pinophilus* isolated from rhizomes of *Curcuma amada*. *J Pure Appl Microbiol.* 14:307–318.

Kumar S, Kaushik N, Proksch P. 2013. Identification of antifungal principle in the solvent extract of an endophytic fungus *Chaetomium globosum* from *Withania somnifera*. *Springerplus.* 2:1–10.

Kumar S, Kaushik N. 2013. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PLoS One.* 8. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056202>

Kumari M, Taritla S, Sharma A, Jayabaskaran C. 2018. Antiproliferative and antioxidative bioactive compounds in extracts of marine-derived endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. *Front Microbiol.* 9:1–12.

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.

Kusari S, Spiteller M. 2012. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: Progress, Challenges and Opportunities. In: Metabolomics, Ute Roessner (ed), ISBN: 978-953-51-0046-1, *InTech.* pp, 364 .Available from: <http://www.intechopen.com/books/metabolomics>

Kwaśna H, Szewczyk W, Behnke-Borowczyk J. 2016. Fungal root endophytes of *Quercus robur* subjected to flooding. *For Pathol.* 46:35–46.

Lai D, Mao Z, Zhou Z, Zhao S, Xue M, Dai J, Zhou L, Li D. 2020. New chlamydosporol derivatives from the endophytic fungus *Pleosporales* sp. Sigrf05 and their cytotoxic and antimicrobial activities. *Sci Rep.* 10:1–9.

Lai KH, Darah I, Wong CT, Afifah S, Lim SH. 2016. In vitro antibacterial activity and cytotoxicity of lagerstroemia speciosa bark extract. *Indian J Pharm Sci.* 78:273–277.

Laich F, Fierro F, Martín JF. 2002. Production of penicillin by fungi growing on food products: Identification of a complete penicillin gene cluster in *Penicillium griseofulvum* and a truncated cluster in *Penicillium verrucosum*. *Appl Environ Microbiol.* 68:1211–1219.

Leong CR, Arifah A, Mansur B, Rashid SA, Ang SN, Tan WN, Tong WY, Ibrahim D. 2018. Antimicrobial activity of *Aspergillus* sp. IBRL MP15 CCL, an endophytic fungus isolated from *Swietenia macrophylla* leaf against human pathogens. *Malays J Microbiol.* 14: 49-54.

- Li C, Sarotti AM, Wu X, Yang B, Turkson J, Chen Y, Liu Q, Cao S. 2019. An unusual benzoisoquinoline-9-one derivative and other related compounds with antiproliferative activity from *Hawaiian endophytic fungus Peyronellaea* sp. FT431. **Molecules**. 24:1–11.
- Li JL, Sun X, Zheng Y, Lü PP, Wang YL, Guo LD. 2020. Diversity and community of culturable endophytic fungi from stems and roots of desert halophytes in northwest China. **MycoKeys**. 62:75–95.
- Li YL, Xin XM, Chang ZY, Shi RJ, Miao ZM, Ding J, Hao GP. 2015. The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* bge.f. *alba* are a potential source of natural antioxidants. **Bot Stud**. 56. Available from : doi: [10.1186/s40529-015-0086-6](https://doi.org/10.1186/s40529-015-0086-6).
- Li ZX, Wang XF, Ren GW, Yuan XL, Deng N, Ji GX, Li W, Zhang P. 2018. Prenylated diphenyl ethers from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus tennesseensis*. **Molecules**. 23: 2368. Available from: DOI: [10.3390/molecules23092368](https://doi.org/10.3390/molecules23092368).
- Liang Z, Zhang T, Zhang X, Zhang J, Zhao C. 2015. An alkaloid and a steroid from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Molecules**. 20:1424–1433.
- Liu F, Tian L, Chen G, Zhang LH, Liu B, Zhang W, Bai J, Hua H, Wang HF, Pei YH. 2017. Two new compounds from a marine-derived *Penicillium griseofulvum* T21-03. **J Asian Nat Prod Res**. 19:678–683.
- Liu H, Chen Y, Li H, Li S, Tan H, Liu Z, Li D, Liu Hongxin, Zhang W. 2019. Four new metabolites from the endophytic fungus *Diaporthe lithocarpus* A740. **Fitoterapia**. 137:5–10.
- Liu P, Zhang D, Shi R, Yang Z, Zhao F, Tian Y. 2019. Antimicrobial potential of endophytic fungi from *Astragalus chinensis*. **3 Biotech**. 9:1–9.
- Liu R, Zhang Hong, Li H, An Z, Zhou F. 2016. Isolation of Secondary Metabolites of Endophytic Fungus *Penicillium griseofulvum* from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and Identification of Strain. **Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formulae**. 22:25-29.
- Liu WC, Gong T, Zhu P. 2016. Advances in exploring alternative Taxol sources. **RSC Adv**. 6:48800–48809.
- Liu Z, Tan H, Chen K, Chen Y, Zhang Wenge, Chen S, Liu H, Zhang Weimin. 2019. Rhizophols A and B, antioxidant and axially chiral benzophenones from the endophytic fungus: *Cytospora rhizophorae*. **Org Biomol Chem**. 17:10009–10012.
- Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. **Food Chem**. 105:572–578.
- 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.
- Ma YM, Liang XA, Zhang HC, Liu R. 2016. Cytotoxic and Antibiotic Cyclic Pentapeptide from an Endophytic *Aspergillus tamarii* of *Ficus carica*. **J Agric Food Chem**. 64:3789–3793.
- Ma YM, Ma CC, Li T, Wang J. 2016. A new furan derivative from an endophytic *Aspergillus flavus* of *Cephalotaxus fortunei*. **Nat Prod Res**. 30: 79-84.
- 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.
- Malhão F, Ramos AA, Buttachon S, Dethoup T, Kijjoa A, Rocha E. 2019. Cytotoxic and antiproliferative effects of Preussin, a Hydroxypyrrolidine derivative from the marine Sponge-associated fungus *Aspergillus candidus* KUFA 0062, in a panel of breast cancer cell lines and using 2D and 3D cultures. **Mar Drugs**. 17: 448. Available : doi: [10.3390/md17080448](https://doi.org/10.3390/md17080448) .
- Malik A, Ardalani H, Anam S, McNair LM, Kromphardt KJK, Frandsen RJN, Franzyk H, Staerk D, Kongstad KT. 2020. Antidiabetic xanthenes with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities from an endophytic *Penicillium canescens*. **Fitoterapia**. 142:104522.

- Mandavid H, Rodrigues AMS, Espindola LS, Eparvier V, Stien D. 2015. Secondary metabolites isolated from the amazonian endophytic fungus *Diaporthe* sp. SNB-GSS10. **J Nat Prod.** 78:1735–1739.
- Mane RS, Paarakh PM, Vedamurthy AB. 2018. Brief Review on Fungal Endophytes. **Int J Second Metab.** 5:288–303.
- Manzotti A, Bergna A, Burow M, Jørgensen HJL, Cernava T, Berg G, Collinge DB, Jensen B. 2020. Insights into the community structure and lifestyle of the fungal root endophytes of tomato by combining amplicon sequencing and isolation approaches with phytohormone profiling. **FEMS Microbiol Ecol.** 96: fiae052. Available from <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae052>.
- 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. Available from <https://doi.org/10.1155/2014/190543>.
- Martín JA, Witzell J, Blumenstein K, Rozpedowska E, Helander M, Sieber TN, Gil L. 2013. Resistance to Dutch Elm Disease Reduces Presence of Xylem Endophytic Fungi in Elms (*Ulmus* spp.). **PLoS One.** 8: e56987. Available from : DOI: [10.1371/journal.pone.0056987](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056987)
- McCarthy MW, Denning DW, Walsh TJ. 2017. Future research priorities in fungal resistance. **J Infect Dis.** 216:S484–S492.
- Medini H, Manongiu B, Aicha N, Chekir-Ghedira L, Harzalla-Skhiri F, Khouja ML. 2013. Chemical and antibacterial polymorphism of *Juniperus oxycedrus* ssp. *Oxycedrus* and *juniperus oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (*Cupressaceae*) leaf essential oils from Tunisia. **J Chem.** 2013. Available from <https://doi.org/10.1155/2013/389252>.
- Mefteh F Ben, Daoud A, Bouket AC, Thissera B, Kadri Y, Cherif-Silini H, Eshelli M, Alenezi FN, Vallat A, Oszako T, Kadri A, Ros-García JM, Rateb ME, Gharsallah N, Belbahri L. 2018. Date palm trees root-derived endophytes as fungal cell factories for diverse bioactive metabolites. **Int J Mol Sci.** 19: 1986. Available from: DOI: [10.3390/ijms19071986](https://doi.org/10.3390/ijms19071986).
- 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.
- Mehenni C, Atmani-Kilani D, Dumarçay S, Perrin D, Gérardin P, Atmani D. 2016. Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. **J Food Drug Anal.** 24:653–669.
- Menu E. 2019. Etude épidémiologique portant sur la détection moléculaire d'un panel de dix parasites gastrointestinaux, A marseille. Thèse De Doctorat. **Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie.**
- Mezni F, Shili S, Ben Ali N, Larbi Khouja M, Khaldi A, Maaroufi A. 2016. Evaluation of *Pistacia lentiscus* seed oil and phenolic compounds for in vitro antiproliferative effects against BHK21 cells. **Pharm Biol.** 54:747–751.
- Minarni, Artika IM, Julistiono H, Bermawie 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.
- Mishra M, Prasad R, Varma A. 2015. Endophytic fungi: Biodiversity and functions. **Int J Pharm Bio Sci.** 6:18–36.
- Mogana R, Adhikari A, Tzar MN, Ramliza R, Wiart C. 2020. Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* miq. Against bacterial clinical isolates. **BMC Complement Med Ther.** 20:1–11.

- Mohamad OAA, Li L, Ma JB, Hatab S, Xu L, Guo JW, Rasulov BA, Liu YH, Hedlund BP, Li WJ. 2018. Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*. *Front Microbiol.* 9:1–14.
- Monggoot S, Pichaitam T, Tanapichatsakul C, Pripdeevech P. 2018. Antibacterial potential of secondary metabolites produced by *Aspergillus* sp., an endophyte of *Mitrephora wangii*. *Arch Microbiol.* 200: 951-59.
- Mookherjee A, Singh S, Maiti MK. 2018. Quorum sensing inhibitors: can endophytes be prospective sources?. *Arch Microbiol.* 200:355–369.
- Moretti A and Susca A. 2017. Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols; Eds.; *New York, NY : Humana Press : Springer*. Volume 1542. pp.383. Available from: DOI 10.1007/978-1-4939-6707-0.
- Moricca S, Innocenti G, Ragazzi A. 2018. Epidemiological Investigations Shed Light on the Ecological Role of the Endophyte *Phomopsis quercina* in Mediterranean Oak Forests. In: Endophytes of Forest Trees. Forestry Sciences, Pirttilä A, Frank A. (eds). vol 86. pp: 207-227. *Springer, Cham*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-89833-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-89833-9_10).
- Mrid R Ben, Bouchmaa N, Bouargalne Y, Ramdan B, Karrouchi K, Kabach I, Karbane M El, Idir A, Ziad A, Nhiri M. 2019. Phytochemical Characterization, Antioxidant and In Vitro Cytotoxic Activity Evaluation of *Juniperus oxycedrus* Subsp. *Oxycedrus* Needles and Berries. *Molecules.* 24: 502. Available from : doi: [10.3390/molecules24030502](https://doi.org/10.3390/molecules24030502).
- Mu'azzam KAAR, Taufiq MMJ, Darah, I. 2015. Isolation and screening of antibacterial activity of endophytic fungi isolates from *Ocimum citriodorum* Vis. Leaves. *Aust J Basic Appl Sci.* 9:155–161.
- Murali M, Mahendra C, Hema P, Rajashekar N, Nataraju A, Sudarshana MS, Amruthesh KN. 2017. Molecular profiling and bioactive potential of an endophytic fungus *Aspergillus sulphureus* isolated from *Sida acuta*: A medicinal plant. *Pharm Biol.* 55: 1623-30.
- Mutai C, Bii C, Vagias C, Abatis D, Roussis V. 2009. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *J Ethnopharmacol.* 123:143–148.
- Naouar MS, Mekki LZ, Charfi L, Boubaker J, Filali A. 2016. Preventive and curative effect of *Pistacia lentiscus* oil in experimental colitis. *Biomed Pharmacother.* 83:577–583.
- Neuhof T, Dieckmann R, Druzhinina IS, Kubicek CP, von Döhren H. 2007. Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma/Hypocrea*: Can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures?. *Microbiology.* 153:3417–3437.
- Nguyen HT, Yu NH, Jeon SJ, Lee HW, Bae CH, Yeo JH, Lee HB, Kim IS, Park HW, Kim JC. 2016. Antibacterial activities of penicillic acid isolated from *Aspergillus persii* against various plant pathogenic bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 62: 488- 93.
- Nguyen LTT, Jang JY, Kim TY, Yu NH, Park AR, Lee S, Bae CH, Yeo JH, Hur JS, Park HW, Kim JC. 2018. Nematicidal activity of verrucarins A and roridin A isolated from *Myrothecium verrucaria* against *Meloidogyne incognita*. *Pestic Biochem Physiol.* 148:133–143.
- Noor A, Gunasekaran S, Vijayalakshmi MA. 2018. Article in Pharmacognosy Research · October 2017. *Pharmacognosy Res.* 10:24–30.
- Nurunnabi TR, Sabrin F, Sharif DI, Nahar L, Sohrab MH, Sarker SD, Rahman SMM, Billah MM. 2020. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala* (Buch.-Ham) from the Sundarbans mangrove forest. *Adv Tradit Med.* Available from: <https://doi.org/10.1007/s13596-019-00422-9>.
- Omeje EO, Ahomafor, JE, Onyekaba TU, Moniuro PO, Nneka I, Onyeloni S, Chime C, Eboka JC. 2017. Endophytic fungi as alternative and reliable sources for potent anticancer agents. In: Natural Products and Cancer Drug Discovery, Badria, FA (ed). *IntechOpen*. Pp: 52-60.

- Opong-Danquah E, Budnicka P, Blümel M, Tasdemir D. 2020. Design of fungal co-cultivation based on comparative metabolomics and bioactivity for discovery of marine fungal agrochemicals. *Mar Drugs*. 18:73. Available from: <https://doi.org/10.3390/md18020073>.
- Orabi HM, El-Fakharany EM, Abdelkhalek ES, Sidkey NM. 2019. L-Asparaginase and L-glutaminase: Sources, production, and applications in medicine and industry. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*. 9:179–190.
- Orole O.O., Adejumo T.O. 2009. Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* 3: 969–973.
- 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*. 23:1–11.
- Padalia H, Chanda S. 2015. Antimicrobial efficacy of different solvent extracts of *Tagetes erecta* L. Flower, Alone and in Combination with Antibiotics. *Appl Microbiol open access*. 1:1–10.
- Palanichamy P, Krishnamoorthy G, Kannan S, Marudhamuthu M. 2018. Bioactive potential of secondary metabolites derived from medicinal plant endophytes. *Egypt J Basic Appl Sci*. 5:303–312.
- Pang X, Zhao JY, Fang XM, Zhang T, Zhang DW, Liu HY, Su J, Cen S, Yu LY. 2017. Metabolites from the plant endophytic fungus *Aspergillus* sp. CPCC 400735 and their Anti-HIV activities. *J Nat Prod*. 80:2595–2601.
- Pankey GA, Sabath LD. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 38:864–870.
- Pansanit A, Pripdeevech P. 2018. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Arthrinium* sp. MFLUCC16-1053 isolated from *Zingiber cassumunar*. *Mycology*. 9:264–272.
- 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.
- Paudel B, Bhattarai K, Bhattarai HD. 2018. Antimicrobial and antioxidant activities of two polyketides from lichen-endophytic fungus *Preussia* sp. *Z Naturforsch C J Biosci*. 73:161–163.
- Pelaez F, Cabello A, Platas G, Díez MT, Del Val AG, Basilio A, Martín I, Vicente F, Bills GF, Giacobbe RA, et al. 2000. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Syst Appl Microbiol*. 23:333–343.
- Pelleteret P, Crovadore J, Cochard B, Pasche S, Bovigny PY, Chablais R, Lefort F. 2017. Urban London plane tree dieback linked to fungi in the *Botryosphaeriaceae*. *Urban For Urban Green*. 22:74–83.
- Peng X, Duan F, He Y, Gao Y, Chen J, Chang J, Ruan H. 2020. Ergocytochalasin A, a polycyclic merocytochalasan from an endophytic fungus *Phoma multirostrata* XJ-2-1. *Org Biomol Chem*. 18:4056–4062.
- Perim MC, Borges JDC, da Silva EML, Araújo TAS, da Silva ACO, da Silva VC, Carreiro SC, Cunha AF, Pranchevicius MCDS. 2019. *In vitro* antibacterial and time-kill assay of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark on multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot lesions. *Nat Prod Res*. 33 2383-88.
- Peromingo B, Sulyok M, Lemmens M, Rodríguez A, Rodríguez M. 2019. Diffusion of mycotoxins and secondary metabolites in dry-cured meat products. *Food Control*. 101:144–150.
- Petersen, L.E., Marnier, M., Labes, A., Tasdemir, D., 2019. Rapid metabolome and bioactivity profiling of fungi associated with the leaf and rhizosphere of the baltic seagrass *Zostera marina*. *Mar. Drugs* 17:419. Available from: <https://doi.org/10.3390/md17070419>.

- Petit KE, Mondeguer F, Roquebert MF, Biard JF, Pouchus Y F. 2004. Detection of griseofulvin in a marine strain of *Penicillium waksmanii* by ion trap mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. 58 :59-65.
- Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O. 1993. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat Toxins*. 1:185-196.
- Pitt J. I. and Hocking A. D. 1985. Fungi and food spoilage. *Academic press Inc*. Sydney. Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montréal, Tokyo. pp. 414.
- Prabakaran JJ, Devi NN, Femina W. 2012. Antibiogram pattern of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Centella asiatica*. 5:205-207.
- Pradeep FS, Begam MS, Palaniswamy M, Pradeep B V. 2013. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. *World Appl Sci J*. 22:70-77.
- Praptiwi, Fathoni A, Ilyas M. 2020. Diversity of endophytic fungi from *Vernonia amygdalina*, their phenolic and flavonoid contents and bioactivities. *Biodiversitas*. 21:436-441.
- 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.
- Qi C, Gao W, Wang J, Liu M, Zhang J, Chen C, Hu Z, Xue Y, Li D, Zhang Q, Zhu H, Zhang Y. 2018. Terrusnolides A-D, new butenolides with anti-inflammatory activities from an endophytic *Aspergillus* from *Tripterygium wilfordii*. *Fitoterapia*. 130: 134-39.
- Qu HR, Yang WW, Zhang XQ, Lu ZH, Deng ZS, Guo ZY, Cao F, Zou K, Proksch P. 2020. Antibacterial bisabolane sesquiterpenoids and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Phomopsis prunorum*. *Phytochem Lett*. 37:1-4.
- Quy T, Xuan T. 2019. Xanthine oxidase inhibitory potential, antioxidant and antibacterial activities of *Cordyceps militaris* (L.) Link Fruiting Body. *Medicines*. 6:20. Available from: doi: [10.3390/medicines6010020](https://doi.org/10.3390/medicines6010020).
- Ragazzi A, Moricca S, Capretti P, Dellavalle I, Mancini F, Turco E. 2001. Endophytic fungi in *Quercus cerris*: Isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected. *Phytopathol Mediterr*. 40:165-171.
- Rahmawati N, Sunarya S, Rumindatul A. 2018. Exploration of potential bioactive compounds of endophytic microbial culture isolated from gall rust sengon (*Falcataria Moluccana*) Barneby & J. W Grimes. *Jpsr. November*. 10:156-169.
- 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.
- Rajamani T, Suryanarayanan TS, Murali TS, Thirunavukkarasu N. 2018. Distribution and diversity of foliar endophytic fungi in the mangroves of Andaman Islands, India. *Fungal Ecol*. 36:109-116.
- Rakholiya KD, Kaneria MJ, Chanda SV. 2015. *In vitro* assessment of novel antimicrobial from methanol extracts of matured seed kernel and leaf of *Mangifera indica* L. (Kesar Mango) for inhibition of *Pseudomonas* spp. and their synergistic potential. *Am J Drug Disc Dev*. 5: 13-23.
- Rakshith D, Santosh P, Satish S. 2013. Isolation and characterization of antimicrobial metabolite producing endophytic *Phomopsis* sp. from *Ficus pumila* Linn. (*Moraceae*). *Int J Chem Anal Sci*. 4:156-160.
- Ramos HP, Braun GH, Pupo MT, Said S. 2010. Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immersa*. *Brazilian Arch Biol Technol*. 53:629-632.

- Rana KL, Kour D, Kaur T, Devi R, Negi C, Yadav AN, Yadav N, Singh K, Saxena AK. 2020. Endophytic fungi from medicinal plants: biodiversity and biotechnological applications. In: Microbial Endophytes, Functional Biology and Applications, Ajay K and Radhakrishnan EK (eds) . *Elsevier B.V.* pp:273-305. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00011-9>.
- Rana KL, Kour D, Sheikh I, Yadav N, Yadav AN, Kumar V, Singh BP, Dhaliwal HS, Saxena AK. 2019. Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications. In: Advances in Endophytic Fungal Research. Fungal Biology, Singh B. (eds). *Springer, Cham*. pp: 105-144. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-03589-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-03589-1_6) .
- Rani R, Sharma D, Chaturvedi M, Parkash Yadav J. 2017. Antibacterial activity of twenty different endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* and Time Kill Assay. *Clin Microbiol Open Access*. 06. 280. Available from: DOI: [10.4172/2327-5073.1000280](https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000280).
- Rather RA, Srinivasan V, Anwar M. 2018. Seasonal deviation effects foliar endophyte assemblage and diversity in *Asparagus racemosus* and *Hemidesmus indicus*. *BMC Ecol*. 18:1–11.
- Ratnam J, Syed JI, Singh SK. 2014. Comparative study on production of Penicillin by *Penicillium Notatum* and *Penicillium Chrysogenum* & its Antimicrobial Property. *IJBTT*. 4:28–30.
- Ratnaweera PB, de Silva ED. 2017. Endophytic fungi: A remarkable source of biologically active secondary metabolites. In: Endophytes: Crop productivity and protection. Sustainable development and biodiversity, Maheshwari D, Annapurna K. (eds). *Springer, Cham*. Vol 16. pp:191-212.
- Riga R, Happyana N, Quentmeier A, Zammarelli C, Kayser O, Hakim EH. 2019. Secondary metabolites from *Diaporthe lithocarpus* isolated from *Artocarpus heterophyllus*. *Nat Prod Res*. 0:1–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1672685> .
- Rodrigo AR, Atilon V de A, Renildo M da C, Clarice MC. 2018. Antibacterial activity of endophytic fungi from the medicinal plant *Uncaria tomentosa* (Willd.) *DC. J Med Plants Res*. 12:179–185.
- Roma-Marzio F, Najar B, Alessandri J, Pistelli L, Peruzzi L. 2017. Taxonomy of prickly juniper (*Juniperus oxycedrus* group): A phytochemical–morphometric combined approach at the contact zone of two cryptospecies. *Phytochemistry*. 141:48–60.
- 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. *Braz. J. Microbiol*. 41: 420–430.
- Rossmann AY, Farr DF, Castlebury LA. 2007. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience*. 48:135–144.
- Rukachaisirikul V, Chingpha S, Saetang P, Phongpaichit S, Jungstittiwong S, Hadsadee S, Sakayaroj J, Preedanon S, Temkitthawon P, Ingkaninan K. 2019. Depsidones and a dihydroxanthone from the endophytic fungi *Simplicillium lanosoniveum* (J.F.H. Beyma) Zare & W. Gams PSU-H168 and PSU-H261. *Fitoterapia*. 138:104286. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104286> .
- Rundberget T and Wilkins AL. 2002. Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 964:189-197.
- Sadananda T. 2014. *In vitro* Antioxidant activity of lectin from different endophytic fungi of *Viscum album* L. *Br J Pharm Res*. 4:626–643.
- Sadrati N, Daoud H, Zerroug A, Dahamna S, Bouharati S. 2013. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). *J Plant Prot Res*. 53: 129-36.
- Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM, Frisvad JC. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Stud Mycol*. 50: 45-61.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, et al. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus

*Aspergillus*. *Stud Mycol*. 78:141–173.

Sana T, Siddiqui BS, Shahzad S, Farooq AD, Siddiqui F, Sattar S, Begum S. 2018. Antiproliferative Activity and Characterization of Metabolites of *Aspergillus nidulans* : An Endophytic Fungus from *Nyctanthes arbor-tristis* Linn. Against Three Human Cancer Cell Lines. *Med Chem (Los Angeles)*. **15**: 352 – 359.

Sanjotha G, Manawadi SI. 2017. Isolation, screening, optimization and production of anti-tumor L-asparaginase by fungi from karwar coastal region. *Res J Recent Sci*. 6:1–7.

Santos SN, Ferraris FK, De Souza AO, Henriques MDG, Melo IS. 2012. Endophytic fungi from *Combretum leprosum* with potential anticancer and antifungal activity. *Symbiosis*. 58:109–117.

Sarasan M, Puthumana J, Job N, Han J, Lee JS, Philip R. 2017. Marine algicolous endophytic fungi-a promising drug resource of the era. *J Microbiol Biotechnol*. 27:1039–1052.

Schlegel M, Dubach V, von Buol L, Sieber TN. 2016. Effects of endophytic fungi on the ash dieback pathogen. *FEMS Microbiol Ecol*. 92:1–8.

Schoch CL, Shoemaker RA, Seifert KA, Hambleton S, Spatafora W, Crous PW, Mycologia S, Phylogeny A, Fungi K, Hypha D, et al. 2006. A Multigene Phylogeny of the Dothideomycetes Using Four Nuclear Loci. *Mycologia*. 98: 1041-1052.

Schulz B, Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycol Res*. 109:661–686.

Sebola TE, Uche-Okerefor NC, Tapfuma KI, Mekuto L, Green E, Mavumengwana V. 2019. Evaluating antibacterial and anticancer activity of crude extracts of bacterial endophytes from *Crinum macowanii* Baker bulbs. *Microbiologyopen*. 8:1–10.

Senanayake IC, Crous PW, Groenewald JZ, Maharachchikumbura SSN, Jeewon R, Phillips AJL, Bhat JD, Perera RH, Li QR, Li WJ, et al. 2017. Families of Diaporthales based on morphological and phylogenetic evidence. *Stud Mycol*. 86:217–296.

Seng P, Drancourt M, Gouret 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: 543-51.

Sewelam N, Abo-Kassem EA, Sobhy S ien, Dowidar S. 2017. Roles of Calcium and ABA in Alleviating Drought Stress Effects on *Triticum aestivum* L . Plants. *Egypt J Experimental Biol*. 13:423–438.

Shahid MG, Nadeem M. 2015. Screening of *Penicillium* species and optimisation of culture conditions for the production of ergot alkaloids using surface culture fermentation process. *Pakistan J Sci Ind Res Ser B Biol Sci*. 58:23–29.

Shahzad R, Khan AL, Bilal S, Asaf S, Lee IJ. 2018. What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Front Plant Sci*. 9:1–10.

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: 210.

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 lebbek*. *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: Pharmaceuticals from Microbes, Pandey A. (eds). *Springer International Publishing*. pp: 121-153.

Shiono, Y. 2006. Anthracobic acids A and B, two polyketides, produced by an endophytic fungus *Anthracobia* sp. *Chem. Biodiversity*. 3: 217-223.

Sibero MT, Radjasa OK, Sabdono A, Trianto A, Triningsih DW, Hutagaol ID. 2018. Antibacterial

activity of Indonesian sponge associated fungi against clinical pathogenic multidrug resistant bacteria. *J Appl Pharm Sci.* 8:088–094.

Singh D, Rathod V, Singh AK, Joshi R, Nagaratna H, Avinash B. 2015. Antibacterial activity and phytochemical analysis of the crude extracts of endophytic fungus, *Alternaria* sp. from the medicinal plant *Euphorbia hirta* (L). *Int J Green Chem Bioproc.* 5: 14-20.

Singh M, Kumar A, Singh R, Pandey KD. 2017. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech.* 7:1–14.

Singh P, Sharma A, Bordoloi M, Nandi SP. 2020. Molecular identification of endophytic fungi isolated from medicinal plant. *Biointerface Res Appl Chem.* 10:6436–6443.

Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi CKM. 2017. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Front Microbiol.* 7 :2087. Available from: doi: [10.3389/fmicb.2016.02087](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087).

Siqueira JP, Sutton DA, Gené J, García D, Wiederhold N, Peterson SW, Guarro J. 2017. Multilocus phylogeny and antifungal susceptibility of *Aspergillus* section Circumdati from clinical samples and description of *A. pseudosclerotiorum* sp. Nov. *J Clin Microbiol.* 55: 947-58.

Sivagnanam K, Komatsu E, Rampitsch C, Perreault H, Gräfenhan T. 2017. Rapid screening of *Alternaria* mycotoxins using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Sci Food Agric.* 97:357–361.

Soares BA, Rosa LH, da Silva JFM, Pimenta RS. 2017. A review of bioactive compounds produced by endophytic fungi associated with medicinal plants. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat., Belém,* 12:331–352.

Souza PM, de Freitas MM, Cardoso SL, Pessoa A, Guerra ENS, Magalhães PO. 2017. Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 120:194–202.

Sridhar K.R. (2019). Diversity, Ecology, and Significance of Fungal Endophytes. In: Endophytes and Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry. Jha S. (eds). *Springer, Cham.* pp: 61-100. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76900-4\\_5-2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76900-4_5-2)

Srividya S., Adarshana T., Deepika V.B., Kajingailu G., Nilanjan D. 2012. *Streptomyces* sp. 9p as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. *Eur. J. Exp. Biol.* 2 (1): 163–173.

Stefanovic O, Radojevic I, Vasic S, Comic LJ. 2012. Antibacterial activity of naturally occurring compounds from selected plants. In: Antimicrobial Agents. Bobbarala V, (eds). 1st ed. Rijeka: InTech. pp: 1-24.

Stone JK, Polishook JD, White JF. 2004. Endophytic Fungi. In Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods (pp. 241-270). *Elsevier Inc.* <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50015-5>.

Strobel GA. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* 5:535–544.

Suarez S, Nassif X, Ferroni A. 2015. Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathol Biol.* 63:43–52.

Sun X, Guo LD. 2010. *Micronematobotrys*, a new genus and its phylogenetic placement based on rDNA sequence analyses. *Mycol Prog.* 9:567–574.

Suresh G, Kokila D, Suresh TC, Kumaran S, Velmurugan P, Vedhanayakisri KA, Sivakumar S, Ravi AV. 2020. Mycosynthesis of anticancer drug taxol by *Aspergillus oryzae*, an endophyte of *Tarenna asiatica*, characterization, and its activity against a human lung cancer cell line. *Biocatal Agric Biotechnol.* 24 : 101525. Available from : <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101525>.

Suzuki T, Arieftha NR, Koseki T, Furuno H, Kwon E, Momma H, Harneti D, Maharani R, Supratman U, Kimura K ichi, Shiono Y. 2019. New polyketides, paralactonic acids A–E produced by *Paraconiothyrium* sp. SW-B-1, an endophytic fungus associated with a seaweed, *Chondrus ocellatus*

Holmes. *Fitoterapia*. 132:75–81.

Tagousop CN, Tamokou JDD, Ekom SE, Ngnokam D, Voutquenne-Nazabadioko L. 2018. Antimicrobial activities of flavonoid glycosides from *Graptophyllum grandulosum* and their mechanism of antibacterial action. *BMC Complement Altern Med*. 18:1–10.

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, Fang PH, Ni JC, Gao F, Chen QJ. 2017. Metabolites produced by an endophytic *Phomopsis* sp. and Their anti-TMV activity. *Molecules*. 22: 2073. Available from: doi: [10.3390/molecules22122073](https://doi.org/10.3390/molecules22122073).

Tanapichatsakul C, Khruengsai S, Monggoot S, Pripdeevech P. 2019. Production of eugenol from fungal endophytes *Neopestalotiopsis* sp. and *Diaporthe* sp. isolated from *Cinnamomum loureiroi* leaves. *PeerJ*. 2019:1–21.

Tanapichatsakul C, Monggoot S, Gentekaki E, Pripdeevech P. 2018. Antibacterial and antioxidant metabolites of *Diaporthe* spp. Isolated from flowers of *Melodorum fruticosum*. *Curr Microbiol*. 75: 476–83.

Tata CM, Ndinteh D, Nkeh-Chungag BN, Oyedeji OO, Sewani-Rusike CR. 2020. Fractionation and bioassay-guided isolation of antihypertensive components of *Senecio serratuloides*. *Cogent Med*. 7. Available from: <https://doi.org/10.1080/2331205X.2020.1716447>.

Taufiq M, Jalil M, Ibrahim D, Syakirah N, Suhaimi M. 2020. Time-kill study and morphological changes of *Proteus mirabilis* cells exposed to ethyl acetate crude extract of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* IBRL OS-64. *Malaysian J Microbiol*. 16:219–228.

Teimoori-Boghsani Y, Ganjeali A, Cernava T, Müller H, Asili J, Berg G. 2020. Endophytic fungi of native *Salvia abrotanoides* plants reveal high taxonomic diversity and unique profiles of secondary metabolites. *Front Microbiol*. 10:3013. Available from: doi: [10.3389/fmicb.2019.03013](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03013).

Teixeira TR, Dos Santos GS, Armstrong L, Colepiccolo P, Deboni HM. 2019. Antitumor potential of seaweed derived-endophytic fungi. *Antibiotics*. 8:1–24.

Teponno RB, Noumeur SR, Helaly SE, Hüttel S, Harzallah D, Stadler M. 2017. Furanones and anthranilic acid derivatives from the endophytic fungus *Dendrothyrium variisporum*. *Molecules*. 22:1–12.

Terhonen E, Blumenstein K, Kovalchuk A, Asiegbu FO. 2019. Forest tree microbiomes and associated fungal endophytes: Functional roles and impact on forest health. *Forests*. 10:1–32.

Tešanović K, Pejin B, Šibul F, Matavulj M, Rašeta M, Janjušević L, Karaman M. 2017. A comparative overview of antioxidative properties and phenolic profiles of different fungal origins: fruiting bodies and submerged cultures of *Coprinus comatus* and *Coprinellus truncorum*. *J Food Sci Technol*. 54:430–438.

Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S., Vijayakumar, R., 2018. An introductory chapter: Secondary metabolites. In: *Secondary metabolites - sources and applications*. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.79766>.

Thomas L V., Yu S, Ingram RE, Refdahl C, Elsser D, Delves-Broughton J. 2002. Ascopyrone P, a novel antibacterial derived from fungi. *J Appl Microbiol*. 93:697–705.

Tiwari K. 2014. The Future Products: Endophytic Fungal Metabolites. *J Biodiversity, Bioprospecting Dev*. 02:1–7.

Toghueo RMK, Sahal D, Boyom FF. 2020. Recent advances in inducing endophytic fungal specialized metabolites using small molecule elicitors including epigenetic modifiers. *Phytochemistry*. 174: 112338. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112338>.

Toh YF, Yew SM, Chan CL, Na SL, Lee KW, Hoh CC, Yee WY, Ng KP, Kuan CS. 2016. Genome anatomy of *pyrenochaeta unguishominis* UM 256, a multidrug resistant strain isolated from skin scraping. *PLoS One*. 11:1–23.

Tong W. 2014. Antimicrobial Activity of *Phomopsis* sp. ED2 Residing in Medicinal Plant *Orthosiphon stamineus* Benth. *Annu Res Rev Biol*. 4:1490–1501.

Tonial Fabiana, Charise D Bertol, Beatriz HLN Sales Maia, Josiane AG Figueiredo, Kielli CF Guerra, Chirlei Glienke. 2019. Secondary Metabolite Produced by *Diaporthe terebinthifolli* LGMF658 – Bioactivity and Chemical Structure Relationship. *Curr Bioact Compd*. DOI: [10.2174/1573407215666191108092008](https://doi.org/10.2174/1573407215666191108092008).

Unterseher M, Reiher A, Finstermeier K, Otto P, Morawetz W. 2007. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycol Prog*. 6:201–212.

Uzma F, Murthy N, Srinivas C. 2016. Optimization of physiological conditions for L-asparaginase production by endophytic fungi (*Fusarium solani*) isolated from *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. F & Thomson. *Eur J Exp Biol*. 6:37–45.

Valente S, Cometto A, Piombo E, Meloni GR, Ballester AR, González-Candelas L, Spadaro D. 2020. Elaborated regulation of griseofulvin biosynthesis in *Penicillium griseofulvum* and its role on conidiation and virulence. *Int J Food Microbiol*. 328: 108687. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108687>.

Valenzuela-Lopez N, Cano-Lira JF, Stchigel AM, Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Guarro J. 2019. *Neocucurbitaria keratinophila*: An emerging opportunistic fungus causing superficial mycosis in Spain. *Med Mycol*. 57:733–738.

Varga J, Baranyi N, Chandrasekaran M, Vágvölgyi C, Kocsubé S. 2015. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. *Acta Biol Szeged*. 59: 151-67

Vasundhara M, Baranwal M, Sivaramaiah N, Kumar A. 2017. Isolation and characterization of trichalasin-producing endophytic fungus from *Taxus baccata*. *Ann Microbiol* 67:255–261.

Veeru P, Kishor MP, Meenakshi M. 2009. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *J Med Plants Res*. 3:608–612.

Verkley GJM, Gené J, Guarro J, Pérez-Santonja JJ, Rodríguez AE, Colom MF, Alio JL, Ferrer C. 2010. *Pyrenochaeta keratinophila* sp. nov., aislado de una infección ocular en España. *Rev Iberoam Micol*. 27:22–24.

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.

Visagie CM, Houbraken J, Rodrigues C, Silva Pereira C, Dijksterhuis J, Seifert KA, Jacobs K, Samson RA. 2013. Five new *Penicillium* species in section sclerotiora: A tribute to the Dutch Royal family. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi*. 31:42–62.

Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Kocsubé S, Yilmaz N, Fotedar R, Seifert KA, Frisvad JC, Samson RA. 2014. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section Circumdati). *Stud Mycol*. 78: 1-61.

Visagie CM, Yilmaz N, Renaud JB, Sumarah MW, Hubka V, Frisvad JC, Chen AJ, Meijer M, Seifert KA. 2017. A survey of xerophilic *Aspergillus* from indoor environment, including descriptions of two new section *Aspergillus* species producing eurotium-like sexual states. *MycKeys*. 19:1–30.

Wanasinghe DN, Phookamsak R, Jeewon R, Li WJ, Hyde KD, Jones EBG, Camporesi E, Promputtha I. 2017. A family level rDNA based phylogeny of *Fucurbitariaceae* and *Fenestellaceae* with descriptions of new *Fenestella* species and *Neocucurbitaria* gen. nov. *Mycosphere*. 8:397–414.

Wang A, Li P, Zhang X, Han P, Lai D, Zhou L. 2018. Two new anisic acid derivatives from

endophytic fungus *Rhizopycnis vagum* Nitaf22 and their antibacterial activity. *Molecules*. 23:2–7.

Wang FW, Jiao RH, Cheng AB, Tan SH, Song YC. 2007. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J Microbiol Biotechnol*. 23:79–83.

Wang JF, Liang R, Liao SR, Yang B, Tu ZC, Lin XP, Wang BG, Liu Y. 2017. Vaccinols J–S, ten new salicyloid derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Pestalotiopsis vaccinii*. *Fitoterapia*. 120:164–170.

Wang P, Cui Y, Cai CH, Kong FD, Chen HQ, Zhou LM, Song XM, Mei WL, Dai HF. 2018. A new cytochalasin derivative from the mangrove-derived endophytic fungus *Xylaria* sp. HNWSW-2. *J Asian Nat Prod Res*. 20:1002–1007.

Wang Y, Zeng QG, Zhang Z Bin, Yan RM, Wang LY, Zhu D. 2011. Isolation and characterization of endophytic huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 38:1267–1278.

Wemheuer B, Thomas T, Wemheuer F. 2019. Fungal endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes. *Microorganisms*. 7:1–24.

Wu SH, Chen YW, Shao SC, Wang LD, Li ZY, Yang LY, Li SL, Huang R. 2008. Ten-membered lactones from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus of *Azadirachta indica*. *J Nat Prod*. 71:731–734.

Wu X, Pang XJ, Xu LL, Zhao T, Long XY, Zhang QY, Qin HL, Yang DF, Yang XL. 2018. Two new alkylated furan derivatives with antifungal and antibacterial activities from the plant endophytic fungus *Emericella* sp. XL029. *Nat Prod Res*. 32:2625–2631.

Wu Y, Chen Y, Huang X, Pan Y, Liu Z, Yan T, Cao W, She Z. 2018.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors: Diphenyl ethers and phenolic bisabolene sesquiterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus flavus* QQSG-3. *Mar Drugs*. 16: 307. Available from: doi: [10.3390/md16090307](https://doi.org/10.3390/md16090307).

Xiang L, Gong S, Yang L, Hao J, Xue MF, Zeng FS, Zhang XJ, Shi WQ, Wang H, Yu D. 2016. Biocontrol potential of endophytic fungi in medicinal plants from Wuhan Botanical Garden in China. *Biol Control*. 94:47–55.

Xiao J, Hu JY, Sun HD, Zhao X, Zhong WT, Duan DZ, Wang L, Wang XL. 2018. Sinopestalotiellides A–D, cytotoxic diphenyl ether derivatives from plant endophytic fungus *Pestalotiopsis palmarum*. *Bioorganic Med Chem Lett*. 28:515–518.

Xu X, Shao M, Yin C, Mao Z, Shi J, Yu X, Wang Y, Sun F, Zhang Y. 2020. Diversity, Bacterial Symbionts, and Antimicrobial Potential of Termite-Associated Fungi. *Front Microbiol*. 11:1–8.

Xu Y, Wang C, Liu H, Zhu G, Fu P, Wang L, Zhu W. 2018. Meroterpenoids and isocoumarinoids from a *Myrothecium* fungus associated with *Apocynum venetum*. *Mar Drugs*. 16:1–13.

Yadav M, Yadav A, Kumar S, Yadav JP. 2016. Spatial and seasonal influences on culturable endophytic mycobiota associated with different tissues of *Eugenia jambolana* Lam. and their antibacterial activity against MDR strains. *BMC Microbiol*. 16: 44

Yadav M, Yadav A, Yadav JP. 2014. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pac J Trop Med*. 7:S256–S261.

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.

Yan Z, Huang C, Guo H, Zheng S, He J, Lin J, Long Y. 2020. Isobenzofuranone monomer and dimer derivatives from the mangrove endophytic fungus *Epicoccum nigrum* SCNU-F0002 possess  $\alpha$ -

glucosidase inhibitory and antioxidant activity. *Bioorg Chem.* 94:103407.

Yang G, Li P, Meng L, Xv K, Dong F, Qiu Y, He L, Lin L. 2018. Diversity and communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geoh herbs and non-geoh herbs), and their biosynthetic potential analysis. *Brazilian J Microbiol.* 49:47–58.

Yang JK, Zhang B, Gao T, Yang MY, Zhao GZ, Zhu HJ, Liu L, Cao F. 2018. A pair of enantiomeric 5-oxabicyclic[4.3.0]lactam derivatives and one new polyketide from the marine-derived fungus *Penicillium griseofulvum*. *Nat Prod Res.* 32:2366–2369.

Yang SQ, Li XM, Xu GM, Li X, An CY, Wang BG. 2018. Antibacterial anthraquinone derivatives isolated from a mangrove derived endophytic fungus *Aspergillus nidulans* by ethanol stress strategy. *J Antibiot (Tokyo).* 71: 778-84.

Yao YQ, Lan F, Qiao YM, Wei JG, Huang RS, Li LB. 2017. Endophytic fungi harbored in the root of *Sophora tonkinensis* Gapnep: Diversity and biocontrol potential against phytopathogens. *Microbiologyopen.* 6:1–17.

Youssef DTA, Alahdal AM. 2018. Cytotoxic and antimicrobial compounds from the marine-derived fungus, *Penicillium* species. *Molecules.* 23:1–8.

Yu H, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W, Sun P, Qin L. 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res.* 165:437–449.

Yu N, He L, Liu N, Wang Y, Xu H, Liu D. 2014. Antimicrobial action of an endophytic fungi from *Sophor flavescens* and structure identification of its active constituent. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 28: 327-32.

Yuan Z. L., Zhang C. L., Lin F. C. and Kubicek C. P. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulate*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 1642-1652.

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. *Afr J Microbiol Res.* 12: 1056-66.

Zhang H, Deng Z, Guo Z, Peng Y, Huang N, He H, Tu X, Zou K. 2015. Effect of culture conditions on metabolite production of *Xylaria* sp. *Molecules.* 20:7940–7950.

Zhang TY, Wu YY, Zhang MY, Cheng J, Dube B, Yu HJ, Zhang YX. 2019. New antimicrobial compounds produced by *Seltsamia galinsogisoli* sp. nov., isolated from *Galinsoga parviflora* as potential inhibitors of FtsZ. *Sci Rep.* 9:1–11.

Zhao JT, Ma DH, Luo M, Wang W, Zhao CJ, Zu YG, Fu YJ, Wink M. 2014. In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. *Food Res Int.* 56:243–251.

Zhao M, Guo D Le, Liu GH, Fu X, Gu YC, Ding LS, Zhou Y. 2020. Antifungal Halogenated Cyclopentenones from the endophytic fungus *Saccharicola bicolor* of *Bergenia purpurascens* by the One Strain-Many Compounds Strategy. *J Agric Food Chem.* 68:185–192.

Zhao T, Xu LL, Zhang Y, Lin ZH, Xia T, Yang DF, Chen YM, Yang XL. 2019. Three new  $\alpha$ -pyrone derivatives from the plant endophytic fungus *Penicillium ochrochloronthe* and their antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities. *J Asian Nat Prod Res.* 21:851–858.

Zhao X, Zhang Y, Shi J, Liu Y, Lu Y, Lian Z. 2019. Biosynthesis of antibacterial compound against multidrug resistant foodborne pathogens by *Phomopsis* sp. XP-8. *Food Control.* 95:223–231.

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.

Zhou J, Diao X, Wang T, Chen G, Lin Q, Yang X, Xu J. 2018. Phylogenetic diversity and antioxidant activities of culturable fungal endophytes associated with the mangrove species *Rhizophora*

stylosa and *R. mucronata* in the South China Sea. *PLoS One*. 13:e0197359. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0197359>

Zhou M, Miao MM, Du G, Li XN, Shang SZ, Zhao W, Liu ZH, Yang GY, Che CT, Hu QF, Gao XM. 2014. Aspergillines A-E, highly oxygenated hexacyclic indole-tetrahydrofuran-tetramic acid derivatives from *Aspergillus versicolor*. *Org Lett*. 16:5016–5019.

Zohary M. A. 1952. Monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine J Bot Jerusalem Ser*. 5: 187-228.

# *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)

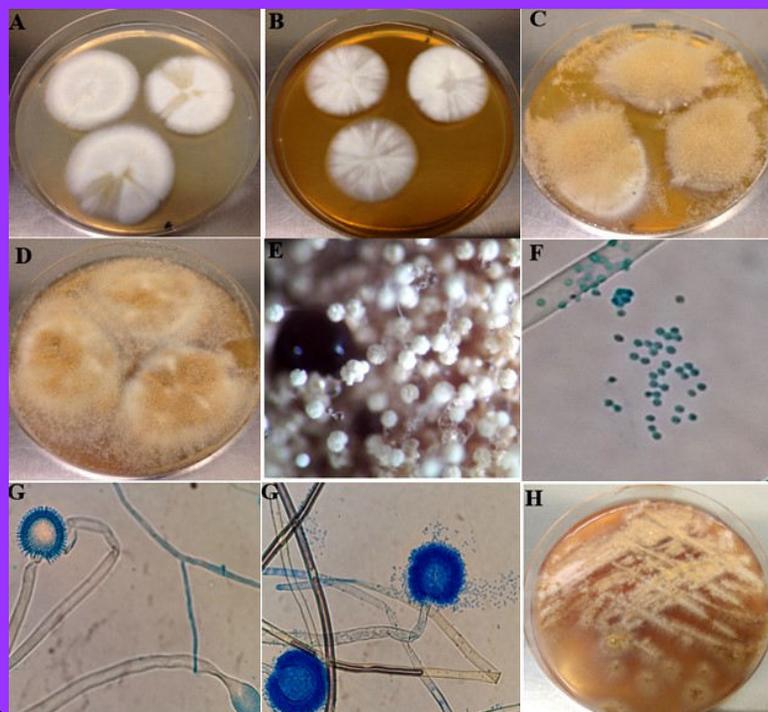
|                   |      |
|-------------------|------|
| Extrait de levure | 3 g  |
| Extrait de malt   | 3 g  |
| Dextrose          | 10 g |
| Peptone           | 5 g  |
| Agar              | 15 g |
| Eau distillée     | 1L   |
| pH 6.2 ± 0.2      |      |

### Modified Czapek Dox's agar (MCD)

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Glucose                              | 2 g     |
| L-asparagine                         | 10 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1.52 g  |
| KCl                                  | 0.52 g  |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O  | 0.52 g  |
| CuNO <sub>3</sub> 3H <sub>2</sub> O  | 0.001 g |
| ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O | 0.001 g |
| FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O | 0.001 g |
| Agar                                 | 20 g    |
| Rouge de phénol (2.5%)               | 0.3 ml  |
| Eau distillée                        | 1L      |
| pH 6.2                               |         |

### Yeast extract sucrose agar (YES)

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| Yeast extract                   | 4 g   |
| Sucrose                         | 20 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1 g   |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0.5 g |
| Agar                            | 15 g  |
| Eau distillée                   | 1L    |
| pH 6.2 +/- 0.2                  |       |



BJP

Bangladesh Journal of Pharmacology

Research Article

Antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Aspergillus neobridgeri* isolated from *Pistacia lentiscus* against multi-drug resistant bacteria

## Antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Aspergillus neobridgeri* isolated from *Pistacia lentiscus* against multi-drug resistant bacteria

Nouari Sadrati<sup>1</sup>, Amina Zerroug<sup>1</sup>, Rasime Demirel<sup>2</sup>, Sabrina Bakli<sup>1</sup> and Daoud Harzallah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas Sétif 1, 19000, Sétif, Algeria; <sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, Eskişehir Technical University, Eskişehir, Turkey.

| Article Info  | Abstract  |
|---|---|
| <p>Received: 26 April 2019<br/>           Accepted: 22 July 2020<br/>           Available Online: 23 July 2020<br/>           DOI: 10.3329/bjp.v15i3.40923</p> <p>Cite this article:<br/>           Sadrati N, Zerroug A, Demirel R, Bakli S, Harzallah D. Antimicrobial activity of secondary metabolites produced by <i>Aspergillus neobridgeri</i> isolated from <i>Pistacia lentiscus</i> against multi-drug resistant bacteria. Bangladesh J Pharmacol. 2020; 15: 82-95.</p> | <p>The <i>in vitro</i> antibacterial activity of the endophytic fungus <i>Aspergillus neobridgeri</i> PLR9 (isolated from the plant <i>Pistacia lentiscus</i>) against a wide range of tested bacteria were studied. The maximum inhibitory activity was found on malt extract agar medium with a mean inhibitory zone of 11.3 mm (<math>p &lt; 0.05</math>). The ethyl acetate extract showed a significant inhibitory zone of 13.4 mm (<math>p &lt; 0.05</math>), followed by dichloromethane 9.1 mm. Whereas, <i>n</i>-hexane extract showed no activity. The largest inhibition zones were observed against <i>Staphylococcus aureus</i> 3, <i>S. aureus</i> 5 and <i>Escherichia coli</i> 1 with 21.0 mm of diameter. The MIC's were ranged between 312.5 and 1,250 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>. The MBC's were <math>\leq 2500</math> <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> for most Gram positive bacteria and <math>\geq 2500</math> <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> for most Gram negative bacteria. Time kill assay study against the <i>Enterococcus faecium</i> showed a bactericidal effect at 4x MIC and bacteriostatic against <i>Acinetobacter baumannii</i> at different concentrations. Moreover, it is the first report, PLR9 isolated as endophyte and studied for their antimicrobial activity.</p> |

### Introduction

Endophytic fungi are present in all plant species studied so far and they can be found in the internal tissues of roots, stems, leaves, flowers, fruits or seeds (Tanapichatsakul et al., 2018). They received habitat and nutrients from their hosts and protect their hosts chemically from browsers, insects, biotic and abiotic stresses and improve plant growth of their host (Ibrahim et al., 2018; Malhadas et al., 2017).

Endophytes produce bioactive compounds similar to those in the host plant (Yu et al., 2014). In addition, novel chemical skeletons of secondary metabolites have antimicrobial, antiparasitic, cytotoxic, anti-inflammatory, antitumor, antioxidant and neuroprotective activities (Malhadas et al., 2017).

Due to their ability to produce of a wide range biologically active compounds and their ability to inhibit several pathogens in the plant, animal and human; endophytes from medicinal plants are becoming more interesting to be explored and are considered a promising resource for new bioactive compounds (Atiphasa-worn et al., 2017).

Several studies have shown the ability of different species of endophytic fungi to inhibit pathogenic microorganisms, for example; *Aspergillus terreus* and *Aspergillus tubingensis* (Yadav et al., 2016), *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 (de Medeiros et al., 2018), *Phomopsis prunorum* (Qu et al., 2020), *P. griseofulvum* TPL25 (Luo et al., 2015), *Alternaria* GFAV15 (Yadav et al., 2020), *Alternariatenuissima* OE7 (Chatterjee et al., 2019) and *Trichoderma koningiopsis* QA-3 (Shi et al., 2020).



Among 16 fungal strains isolated from the *Erigeron canadensis*, the ethyl acetate extract of strains NPR003 and NPR005 showed the strongest antifungal inhibitory effects (Bai et al., 2017). Bai et al. (2019) isolated six endophytic fungal strains from *Rumexmadaio*, strains L1 and R1 belonged to the *Colletotrichum* and *Fusarium* genera respectively had stronger inhibitory effects on *Staphylococcus aureus*, and the R1 isolate was the source of two known antimicrobial agents dibutylphthalate and beauvericin. Another known metabolite named resorcinol type of lipid (compound 1) was purified from extract of the endophytic fungus *Chaetomium cupreum* isolated from the ornamental plant *Mussaenda luteola*. This compound showed significant antibacterial against *Mycobacterium* with MIC of 6.3 µg/mL, and also exhibited a strong inhibition against both *E. coli* (ATCC 25922) as well as *S. aureus* (ATCC 25923) (Shylaja et al., 2018). The endophytic fungi *Aspergillus terreus* and *Trichoderma virens* associated with Sri Lankan plants have the capacity to produce the compounds butyrolactone I and 9-epiviridol respectively. Both compounds exhibited MIC values in the range 128-256 µg/mL against Gram positive *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* (Ratnaweera et al., 2018).

The species of *Pistacia lentiscus* belong to the family Anacardiaceae composed of more than eleven species. Fruits and leaves parts of *P. lentiscus* tree are commonly used in traditional Algerian medicine for the treatment of eczema, paralysis, diarrhea throat infection, jaundice and asthma. The plant oil is used for the treatment of small wounds, burns, coughs and erythema, respiratory problems of allergic origin and ulcers.

The leaf extracts of *P. lentiscus*, and *P. atlantica* have good antifungal activity and low antibacterial activity (Benhammou et al., 2008).

Endophytic fungi of the plant *P. lentiscus* are not yet studied for their antimicrobial activity. For these reasons, this paper is focused on the screening of antimicrobial activity of bioactive secondary metabolites produced by endophytic fungus PLR9 isolated from *P. lentiscus*.

## Materials and Methods

### Sampling of *P. lentiscus*

The fresh leaf, stem and root of *P. lentiscus* were collected from the Mansoura mountain located in the east of Bordj Bou Arreridj (36.052538 N, 4.491563 E), Algeria in March 2014. The identification of the plant was carried out in the Botanic Laboratory, Farhat Abbas University. The plant samples were kept in a sealed plastic bag and returned to the laboratory on the same day and the isolation of the endophytic fungi commenced within 24 hours of the collection of plant samples (Zerroug et al., 2018).

### Isolation and preservation of endophytic fungus PLR9

The fungus PLR9 was isolated as a symptomless endophyte from the *P. lentiscus*. The plant samples were washed with running tap water, allowed to dry at room temperature. Before surface sterilization, the plant material was cut into small pieces (approximately 3 cm). The sample fragments were successively surface sterilized by immersion into 70% ethanol (1 min) and 2% sodium hypochlorite (3 min), 70% ethanol for 30 sec and then finally rinsed with sterilized distilled water three times for 2 min. The roots were aseptically placed on the petri dishes containing solid culture medium potato dextrose agar supplemented with penicillin (30 mg/L) and gentamicin (30 mg/L) to suppress the bacterial growth and incubated at 28°C until the outgrowth of endophytic fungi was discerned. Emergent fungi were isolated and inoculated into the fresh potato dextrose agar antibiotic-free medium and incubated at 28°C for 7 days. This step was repeated several times until the pure endophytic fungal stain with uniform colony was obtained. The water washing from the surface-sterilized samples showed no microbial growth on the potato dextrose agar after 10 days of incubation under the same condition. The isolate was maintained by a periodic transfer onto the potato dextrose agar at 4°C for short-term preservation and in sterile distilled water containing 30% v/v of glycerol for long-term preservation (Campos et al., 2015).

### Morphological characteristics

The fungus PLR9 was identified initially based on the colony morphology inoculated onto the malt extract agar and potato dextrose agar media and incubated at 28°C for 10 days, after that all characteristics macroscopic and microscopic were noted. The microscopic identification of fungus was carried out by the lactophenol staining technique (Arevalo et al., 2009).

### DNA extraction, PCR amplification and sequencing

The PLR9 isolate was inoculated onto the malt extract agar and incubated at 28°C for 5 days. Genomic DNA was extracted after that using the ultraclean microbial DNA isolation kit (MoBio, USA) as described in the manufacturer's protocol, and then the extracted DNA was stored at -20°C. Standard gene regions ITS, BenA and calmodulin were used for molecular identification. ITS region was amplified using primers V9G, 5'-TTACGT-CCCTGCCCTTGTGA-3' (forward) and LS266, 5'-GCATTCCCAAACAACCTCGACTC-3' (reverse), while BenA region was amplified using the primers Bt2a-F 5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3' (forward) and Bt2b-R 5'-ACCCTCAGTGTAGTGA-CCCTTGGC-3' (reverse), for the calmodulin the primers CMD5-F 5'-CCGAGTACAAGGARGCCTTC-3' and CMD6-R 5'-CCGATRGAGGTCATRACGTGG-3' were used. Polymerase chain reactions (PCR) were performed using Veriti 96-well thermal cycler (Applied Bio-

systems, USA). The final reaction volume that used was 25  $\mu$ L, which containing 1  $\mu$ L of genomic DAN, 2.5  $\mu$ L of 2.5  $\mu$ M forward and reverse primers, 2.5  $\mu$ L of Taq buffer + KCl-MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 2.5  $\mu$ L of 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 2  $\mu$ L of 2.5 mM dNP mix, 0.25 of 5 U/ $\mu$ L Taq DNA polymerase (Fermentas), and 11.75  $\mu$ L of sterile deionized water. The thermal cycler program for ITS was as follows: start step of 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C annealing temperature, and 1 min at 72°C, followed by a final extension of 7 min at 72°C.  $\beta$ -Tubulin and calmodulin, the thermocycling conditions for amplifications had an initial denaturing step of 94°C for 10 min, 36 cycles of 94°C for 5 sec, 58°C ( $\beta$ -tubulin) and 56°C (calmodulin) for 45°C, 72°C for 1 min, followed by a final elongation step at 72°C for 7 min (Visagie et al., 2013; Demirel, 2016).

The PCR products were separated by electrophoresis and then purified and sequenced. The ITS locus was sequenced using V9G, LS266, ITS1-5' TCCGTAGGTG-AACCTGCGG-3' and ITS4-5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', while  $\beta$ -tubulin and calmodulin were sequenced using the same primers as those for the PCR amplification. Sequencing reactions were performed in an automated DNA Sequencer CEQ 8000 Genetic Analyses System.

#### Phylogenetic analysis

The ITS,  $\beta$ -tubulin and calmodulin gene sequences were disposed into GeneBank Data Library with the accession numbers (MK600510), (MK680531) and (MK680532) respectively. Thereafter, consensus sequence data of the three loci were blasted against the NCBI GeneBank database. A sequence dataset was created for each locus using newly generated sequences and those loaded from GeneBank. For phylogenetic analysis, the multiple sequence alignment was carried out using MUSCLE software in the MEGA 7 package, followed by manual adjustments. Maximum likelihood analyses were applied to all individual and combined ITS,  $\beta$ -tubulin and calmodulin alignment using MEGA 7 with the Tamurai-Nei model. Support of the internal branches of the trees was assessed by the bootstrap method with 1000 replications. The phylogram is rooted in the *Aspergillus flavus* CBS 100927 (Visagie et al. 2013; Houbraken et al., 2014; Siqueira et al., 2017).

#### Optimization of optimal culture medium for the production of antimicrobial substances

To optimize the production of antibiotics, five culture media recommended were tested: malt extract agar, potato dextrose agar, Sabouraud dextrose agar, yeast extract sucrose agar and yeast extract malt extract agar. The antimicrobial activity test was carried out by the agar cylinder technique described above against *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella typhimurium* ATCC

13311, *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, *B. cereus* ATCC 49452 and one yeast *C. albicans* ATCC 1024. After collecting the results, a comparison of the inhibition zone averages was made to determine the best production medium that was used in the next fermentation (Devaraju and Satish, 2011).

#### Fermentation and crude extracts preparation

The crude extracts of endophytic fungus were obtained using the modified method of Sharma et al. (2016). The mycelial agar plugs with 1 cm in diameter were excised from the periphery of 7-days-old PLR9 culture, and the two plugs were inoculated into 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of malt extract broth medium selected in the previous step. The flasks were incubated at 28°C for 21 days with periodical shaking at 150 rpm. After the complete growth, the cultures were taken out and filtered through sterile cheesecloth to separate the mycelial mass from the fermented broth. The resulting filtrates were extracted three times by sequential solvent extraction procedure using three solvents with different polarity: *n*-hexane, dichloromethane and ethyl acetate. An equal volume of solvents was added to the filtrate, and the flask that contains the mixture was placed on the shaker for 2 hours to allow complete extraction. The filtrate and the solvents were taken in a separation funnel and then kept for one hour till the two immiscible layers formed. Then, the organic layer was recovered and evaporated in a rotavapor ((R-215, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). The fungal extracts were then dissolved in dimethyl sulfoxide, passed through 0.22  $\mu$ m filtration membrane and kept at 4°C.

#### Choice of the best solvent for extraction

In order to determine the best solvent for extraction which was used in the following steps: the obtained extracts in the solvents (ethyl acetate, dichloromethane and *n*-hexane) were tested for their antimicrobial activities. The obtained results were then processed statistically. The antimicrobial activity was performed using wells diffusion method against 8 bacteria, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. freundii* ATCC 8090, *S. typhimurium* ATCC 13311, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 49452, methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 43300, *B. cereus* ATCC 49452 and one yeast *C. albicans* ATCC 1024. Each bacterial strain was grown in plate count agar at 37°C for 18-24 hours to obtain a freshly grown pure culture. Some colonies from each bacterium were suspended in 0.8% NaCl and were mixed for 15 sec to ensure homogeneity. The turbidity was adjusted to match of a 0.5 MacFarland standard to have optical density of 0.08-0.1 at 625 nm corresponding to  $1 \times 10^8$  CFU/mL using a spectrophotometer (Jenway 7310, Cole-Parmer). The bacterial suspension was swabbed with a sterile cotton swab evenly in the plate in which 30  $\mu$ L of sterilized

**Box 1: Agar plug diffusion assay****Principle**

Antimicrobial activity was screened for its inhibitory zone by the agar plug diffusion method.

**Requirements**

Microorganism [endophytic fungus (PLR9); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 49452) and yeast *Candida albicans* (ATCC 1024)]; Potato dextrose agar; Mueller-Hinton agar medium; Sabouraud agar medium;

**Procedure**

*Step 1:* Fungus was grown on the surface of potato dextrose agar in petri dishes at 28°C for 14 days, 6 mm diameter of actively growing fungal culture discs from potato dextrose

agar plates were cut using a sterile cork borer and placed on the surface of the Mueller-Hinton agar medium seeded with test bacteria and Sabouraud agar medium seeded with yeast.

*Step 2:* These plates were sealed with parafilm and kept in a refrigerator at 4°C for 4 hours to complete diffusion of antimicrobial compounds.

*Step 3:* The petri dishes were incubated at 37°C four 24 hours for bacteria and 72 hours for yeast.

*Step 4:* After incubation time, antimicrobial activity was determined by the presence of inhibition zones around the endophytic fungus plug and was measured in mm.

**References**

Astuti et al., 2014

**References (video)**

Martí et al., 2018; Merah et al., 2018; Qaralleh, 2018; Semerci et al., 2020

fungal extract was loaded. Dimethyl sulfoxide was used as a negative control. Petri dishes were incubated at 37°C for 24 hours and the diameters of the clear inhibition zones surrounding the holes were measured with a ruler and recorded in mm (Abiala et al., 2016; Meftteh et al., 2018).

**Large-scale fermentation and semi-purification**

After the selection of ethyl acetate as the best solvent for extraction, the preparation of the semi-purified ethyl acetate extract was carried out in a similar manner as that was used in the above step. But before concentrating, the ethyl acetate fraction was washed with an equal volume of water to remove the remaining polar constituents and salts. The dried ethyl acetate extract was further partitioned between *n*-hexane and 90% methanol (1:1) to remove fatty acids and other non-polar constituents. The remaining 90% methanol phase was concentrated using a rotary evaporator and finally dissolved in dimethyl sulfoxide (Kumar and Kaushik, 2013).

**Antibacterial activity of ethyl acetate extract against multi-drug resistance**

Semi-purified ethyl acetate extract fraction was tested for its ability to inhibit the growth of human pathogenic bacteria using the agar well diffusion assay as described above. A wide range consisting of 25 bacteria were used. Dimethyl sulfoxide was used as a negative control, vancomycin and imipenem as a positive control for Gram positive and Gram negative bacteria respectively (Abiala et al., 2016).

**Minimum inhibitory concentration (MIC)**

The minimum inhibitory concentration of antimicrobial compound, which is identified as the lowest concentration of this compound at which there is no visible growth of bacteria of fungi. MIC values of PLR9 ethyl acetate extract were determined by broth microdilution

technique in 96-well microliter plates with minor modification, following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (Rani et al., 2017). Muller Hinton broth was made and sterilized using an autoclave. 90 µL of sterile Muller Hinton broth was added to each well of the microliter plate followed by the addition of fungal extract in dimethyl sulfoxide (stock solution 5,000 µg/mL dissolved in 1/10<sup>th</sup> diluted dimethyl sulfoxide in sterile Muller Hinton broth) in the first row of the microliter plate. And then, serial dilutions were performed to get final concentrations ranging from 4.9 to 2,500 µg/mL using the micropipette (A1-A10). The test microorganisms were grown in Muller Hinton broth at 37°C for 18-24 hours and adjusted to 0.5 McFarland standard corresponding to the optical density (OD<sub>625</sub> 0.08-0.1). The adjusted cultures were then diluted 100 times in Muller Hinton broth and used as inoculum at a final concentration to approximately 10<sup>5</sup> colony forming units (CFU). Each plate had a negative control contained Muller Hinton broth with test microorganisms in column A11 and blank control to check the sterility consisted only of Muller Hinton broth in the column A12. 1/10<sup>th</sup> diluted DMSO was used as a negative control. The plates were incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, 10 µL of 0.2% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride solution was added to each well and then plates were incubated at 37°C for 1 hour. A visible change of color purple to pink indicated the growth of microorganisms.

**Determination of minimum bactericidal concentration (MBC) and MIC index**

The minimum bactericidal concentration was determined using the results of the MIC assay. The concentrations showing no visible growth of bacteria were identified, 10 µL of the sample from each well was taken and streaking on agar plates to judge the viability. All the plates were then incubated at 37°C for 24 hours, the lowest concentrations of the extract that did

not produce any bacterial growth (prevention the growth of >99.9% microbial cells) on the solid medium were regarded as MBC values for this extract. To determine the efficacy and the effect bactericidal of bacteriostatic on the bacterial growth of ethyl acetate extract, MIC index (MBC/MIC) was calculated. If MBC/MIC is  $\leq 4$ , then it is bactericidal and if MBC/MIC is  $>4$ , then it is bacteriostatic (Rakholiya et al., 2015).

#### Time kill curve studies

Time kill analysis is a method used to measure the change in the number of bacterial colonies in the culture medium upon the addition of the sample over time. The lethal effect of PLR9 extract was performed using time kill assay as described elsewhere (Rani et al., 2017; Perim et al., 2018) with some modifications. Bacterial density of *Enterococcus faecium* 1 and *Acinetobacter baumannii* cultures was adjusted to a 0.5 McFarland standard, after that suspensions were diluted 1/10 time in Muller Hinton broth medium. A volume of 200  $\mu\text{L}$  of bacterial suspension was introduced into 15 mL sterile falcon tubes containing 1800  $\mu\text{L}$  of Muller Hinton broth, with different concentrations of extract fixed at  $1\times$  MIC,  $2\times$  MIC, and  $4\times$  MIC. The final concentration of bacterial suspension yielded was approximately  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Falcon tubes containing 1% dimethyl sulfoxide, bacterial inoculum and Muller Hinton broth without PLR9 extract were used as a positive control. All samples were then incubated at  $37^\circ\text{C}$  in a rotary shaker at 150 rpm. A volume of 100  $\mu\text{L}$  of samples was pipetted out from each tube at 0, 1, 2, 4, 6, 12 and 24 hours, diluted 4 serially and 25  $\mu\text{L}$  of diluted samples were spreaded over freshly prepared Muller Hinton agar and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hours. After the incubation period, the emergent bacterial colonies were counted and compared with those of control. The reduction percentage in the total viable count of CFU was counted using the following formula:

$$\% \text{Reduction} = \frac{\text{Initial count} - \text{Count at } x \text{ interval}}{\text{Initial count}} \times 100$$

The logarithm of the viable counts (CFU/mL) was plotted against time to determine the killing rate. Generally, the bactericidal effect is obtained with a lethality percentage of 90% for 6 hours, which is equivalent to 99.9% ( $\geq 3 \log_{10}$ ) of lethality after 24 hours of incubation, but if the original inoculum is maintained or the reduction less than 99.9% ( $\geq 3 \log_{10}$ ) of the total number of CFU/mL in the original inoculum, the effect is bacteriostatic.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was done by SAS/STAT® 9.2 software. Results of the antibacterial activities analysis were done by the one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls MULTIP-rank test to compare the averages of inhibition zones. The results were

expressed as means  $\pm$  SD. The difference was considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### Isolation and identification of the endophytic fungus

PLR9 colony exhibited a rapid growth on malt extract agar and potato dextrose agar. The colony diameters after 7 days of incubation were 36-38 and 38-40 mm respectively. Mycelium white and no production of spores on both culture media after 7 days of incubation, the colony reversed yellowish to light brownish on potato dextrose agar and brown on malt extract agar. Extensive sporulation with yellowish-brown color was observed after prolonged incubation (since the 8th day of incubation), Conidia were globose and smooth, in short chains and vesicles spathulate. After 7th day, the fungus begins to produce reddish-brownish pigment in both culture media and became brown at the age on malt extract agar. Exudates secretion was observed only on malt extract agar and no sclerotia detected on both culture media (Figure 1).

The sequenced genes (internal transcribed spacer rDNA: 605 pb),  $\beta$ -tubulin (BenA: 520 pb) and calmodulin (CaM: 600 pb) of PLR9 isolate were disposed in GenBank database under accession numbers MK-600510, MK680531 and MK680532 respectively. The BLAST search using GenBank database of the internal transcribed spacer, BenA and calmodulin sequences showed that PLR9 isolate shared 99% similarities with *A. neobridgeri* NRRL 13078.

The aligned data sets of internal transcribed spacer, BenA and calmodulin sequences for 30 strains including, PLR9 isolate and type or reference strains of related species and an out-group, were used for phylogenetic analysis. Maximum likelihood analyses were applied to all individual and combined genes.

Single and combined genes analyses of sequences revealed similar topologies with minor differences in the support values of the internal nodes. The internal transcribed spacer marker was the least informative, being unable to discriminate between closely related species. Maximum likelihood of tree based on the concatenated genes was used for presenting phylogenies (Figure 2), the tree was rooted in *A. flavus* CBS 100927, bootstrap support from 1000 replicates is shown at the nodes. The phylogeny based on the single and combined gene sequences shows that PLR9 is closely related to the species *A. neobridgeri* NRRL 13078 supported by bootstrap values for likelihood (ML > 99%).

Morphological identification allowed to identify PLR9 isolate at the genus level as belonging to the *Aspergillus* genus. The identification at the species level was then

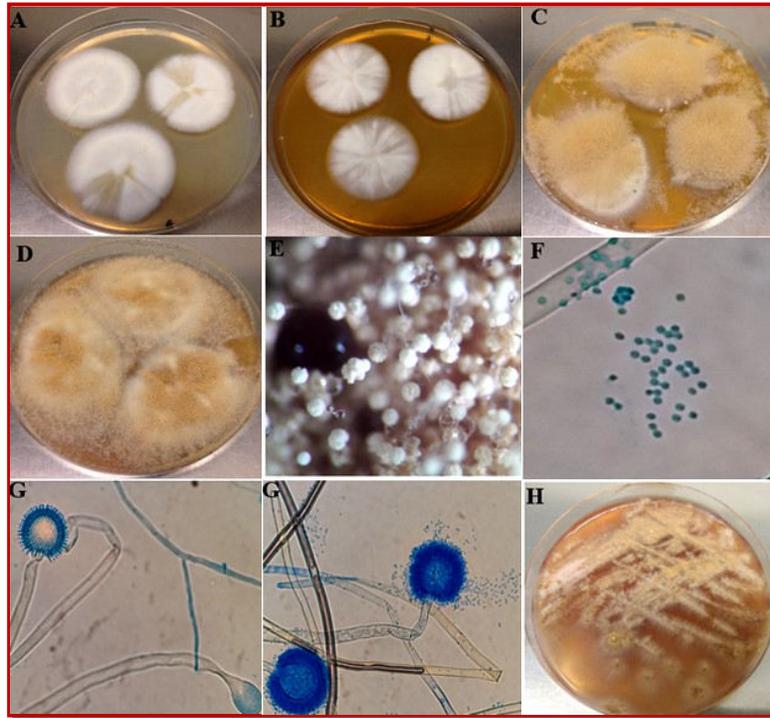


Figure 1: Morphological characteristics of PLR9 isolate: Colony surface on potato dextrose agar (A), malt extract agar (B) after 7 days, potato dextrose agar (C), malt extract agar (D) after 10 days of incubation at 28 °C. Conidiophore + exudates under zoom stereo binocular microscope (E). Conidia (F), Conidiophore, mycelium (G) under microscope, and reddish/brownish pigments production (H)

confirmed by the molecular identification. Based on the morphological and molecular identification, the PLR9 isolate was identified as *A. neobridgeri* belongs to the Circumdati section.

#### *Preliminary antimicrobial screening*

The fungus showed a wide spectrum, inhibiting both Gram positive and Gram negative bacteria. PLR9 isolate exhibited moderate activity against *B. cereus* ATCC 49452 with a zone of inhibition of 10 mm, however, against *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922. The activity was stronger with inhibition zones of 15 and 16 mm respectively. On the other hand, the endophytic isolate showed weak to no ability to inhibit the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *C. albicans* ATCC 1024 tested in this study respectively (Table I).

#### *Choice of optimal culture medium and solvent for the production and extraction of antimicrobial substances*

To improve and select the best culture medium that allows the best production of the molecule bioactives, five culture media were tested; malt extract agar, potato dextrose agar, Sabouraud dextrose agar, yeast extract sucrose agar and yeast extract malt extract agar. The antimicrobial activity test was conducted by the agar cylinder technique. The maximum of the average of inhibition zones (11.3 mm) was recorded in malt extract agar medium and it was significantly higher than the other used media ( $p < 0.05$ ). In the second position, the

potato dextrose agar medium showed an average of inhibition zones of 5.3 mm followed by yeast extract sucrose agar medium with an average of 1.2 mm. While Sabouraud dextrose agar and yeast extract malt extract agar showed the lowest activity (Figure 3).

Based on the preliminary screening of medium selection, only one medium was selected for metabolites production. PLR9 was fermented in malt extract broth and the produced secondary metabolites were extracted using three solvents, ethyl acetate, dichloromethane and *n*-hexane. Crude extract from ethyl acetate has shown the highest mean of inhibition zone of 13.4 mm with a significant difference at  $p < 0.05$ , followed by dichloromethane that had a moderate antibacterial activity of 9.11 mm (Figure 4). The yeast *Candida albicans* is still resistant to both extracts. Whereas, using *n*-hexane extract, no activity had been shown against all the tested microorganisms.

#### *Antibacterial activity of ethyl acetate extract against multidrug-resistant bacteria*

Ethyl acetate crude extract of PLR9 isolate was found to have significant antibacterial activities against Gram positive bacteria followed by moderate activity against Gram negative. The largest inhibition zones were observed against *S. aureus* 3, *S. aureus* 5 and *E. coli* 1 with 21 mm of diameter. In contrast, 9 mm was observed against *K. pneumoniae* 1 and *K. pneumoniae* 2 as the

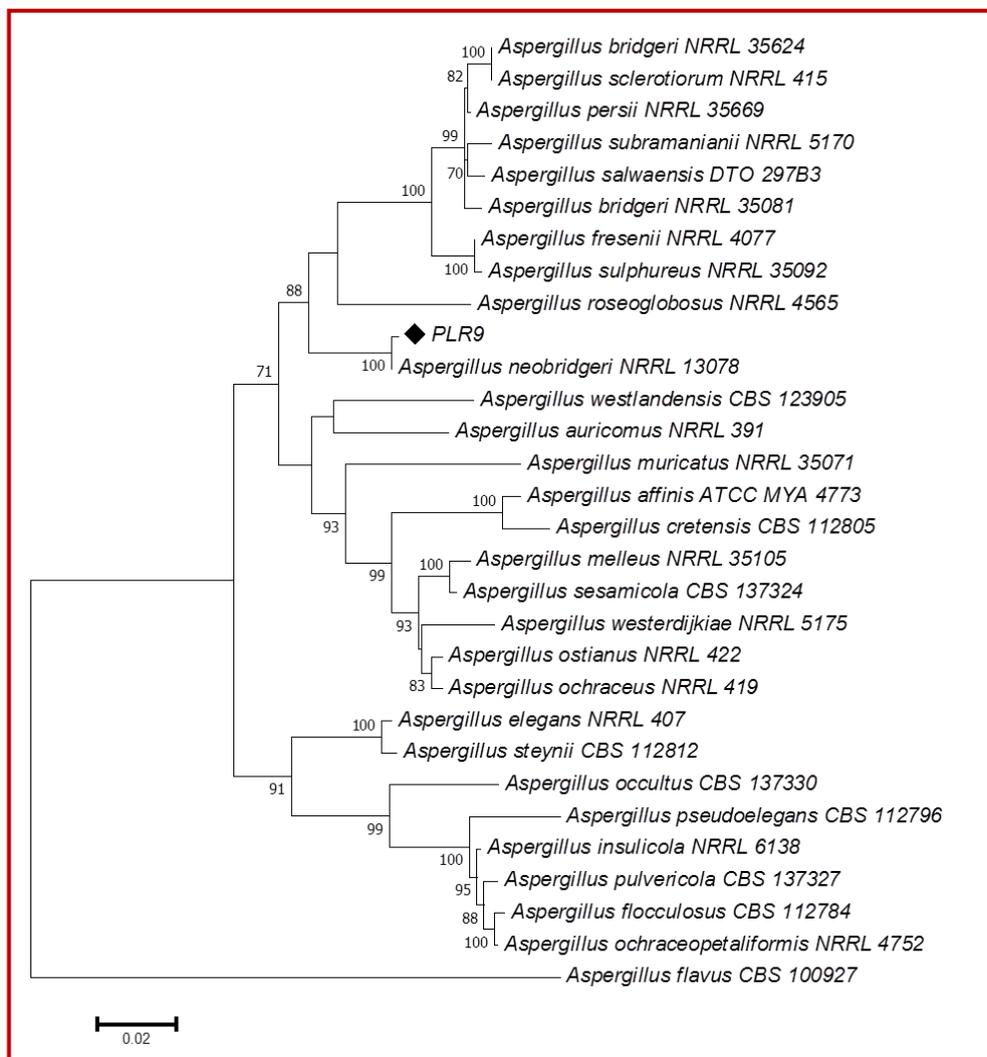


Figure 2: Phylogenetic tree generated by Maximum Likelihood analysis based on the combined alignment of ITS, BenA, and CaM sequences data. The tree is rooted with *A. flavus* CBS 100927. Maximum likelihood bootstrap values MLBS $\geq$ 70 % are given at the nodes

weakest zone. However, the strains *P. aeruginosa* 2 and *P. aeruginosa* 3 are the most resistant bacteria (Table II). The comparison of means of inhibition zones shows that the Gram positive have a greater sensitivity to the ethyl acetate extract (17.96 mm) with respect to that of Gram negative bacteria (11 mm).

The MIC's obtained in this study were ranged between 312.5 and 1250  $\mu$ g/mL. The MBC's were  $\leq$  2500  $\mu$ g/mL for most Gram positive bacteria, but for most Gram negative bacteria were  $\geq$ 2500  $\mu$ g/mL. The MBC/MIC ratio was found always  $\leq$ 4 for all Gram positive bacteria, which showed that the effect of ethyl acetate extract was bactericidal. On other hand, the extract had bacteriostatic effect (MBC/MIC  $\geq$  4) against most Gram negative bacteria, in particular *K. pneumoniae* 1, *K. pneumoniae* 2, *P. aeruginosa* 2 and *P. aeruginosa* 3 which confirms the resistance founded in the precedent part (Table III).

#### Time kill curve studies

Time kill assay was performed over a period of 24 hours with the *E. faecium* 1 and *A. baumannii* being exposed to MIC, 2x MIC and 4x MIC values of ethyl acetate extract of PLR9 isolate. A graph was plotted between the logarithmic number of CFU/mL and time (Figure 5). The bactericidal effect is obtained with a percentage of 99.9% of lethality for 24 hours, but if the original inoculum is maintained or the reduction of less than 99.9% of the total number of CFU/mL in the original inoculum, the effect is bacteriostatic. For *E. faecium* 1, and after 24 hours of contact, time kill assay showed >99.9% of reduction at 4x MIC, but no significant reduction observed at MIC and 2x MIC concentrations. The time kill assay for *A. baumannii*, any reduction was observed at the MIC and 2x MIC concentrations, the maximum reduction noted was 23.7% at 4x MIC value. Therefore, the effect of fungal

| Table I   |                       |
|---|-----------------------|
| Zone of inhibition of endophytic fungi PLR9 against test microorganisms |                       |
| Test microorganism  | Inhibition zones (mm) |
| <i>E. coli</i>  | 16                    |
| <i>P. aeruginosa</i>  | 8                     |
| <i>B. cereus</i>  | 10                    |
| <i>S. aureus</i>  | 15                    |
| <i>C. albicans</i>  | 0                     |

*Aspergillus flavus* QQSG-3 isolated from *Kandelia obobata* (Wu et al., 2018), *Aspergillus* sp. from *Trpterygium wilfordii* (Qi et al., 2018). *Aspergillus nidulans* from *Nyctanthes arbor-tristis* (Sana et al., 2018). Cheng et al. (2018), they are found that the genus *Aspergillus* was among the most dominating endophytic fungi isolated from *Paeonia lactiflora*.

Endophytic fungi have been isolated from almost every plant species (over 400,000) examined to date (Mmbaga et al., 2018). In this study, we used all parts of *P. lentiscus* for isolation of endophytic fungi, but PLR9 isolate was isolated only from roots. *A. neobridgeri* PLR9

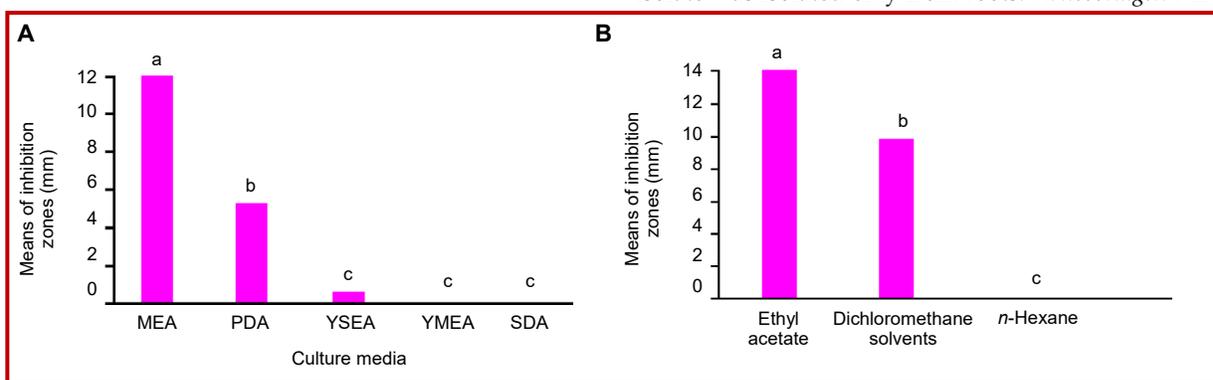


Figure 3: Effect of culture media (A) and solvent used (B) on antibacterial activity of PLR9 isolate, means with the same letter are not significantly different at ( $p < 0.05$ ); MEA (malt extract agar), PDA (potato dextrose agar), YSEA (Yeast extract sucrose agar), YMEA (yeast extract malt extract agar), SDA (Sabouraud dextrose agar); superscript "a, b, c" means with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$

extract at 4x MIC concentration was bactericidal for *E. faecium* 1 and bacteriostatic against *A. baumannii* at all different concentrations, this confirms the resistance of Gram negative bacteria found during the first and second screening and MIC part.

## Discussion

Based on the morphological identification, the PLR9 isolate was identified as *Aspergillus* sp. Phylogenetic analysis of sequence parts of ribosomal RNA, BenA and CaM genes indicated that PLR9 is a member of Circumdati section and very close to the *A. neobridgeri* species supported by bootstrap values for likelihood (ML >99 %).

In all previous studies, *A. neobridgeri* has never been isolated from plants as endophyte. This is the first time, and in this study, where it was isolated from *P. lentiscus*. This species was first characterized in 2004 by Frisvad et al. (2004), it was isolated from soil in Nebraska, U.S.A., and has been described and validated as new species. However, various species of the *Aspergillus* genus have been isolated from different plants. *Aspergillus flavipes* Y-62 from *Suaeda glauca* (Akhter et al., 2018), *Aspergillus tennesseensis* from inner tissue of an unidentified marine alga (Li et al., 2018).

isolate may be of origin from the soil of the rhizospheric part and has some degree of specificity to both plant and the organ (James et al., 2012).

For the choice of the optimum culture medium, the malt extract agar was the best medium allowing the highest production of bioactive secondary metabolites. These results support the finding of Singh et al. (2012) and Kumari et al. (2018) who found malt extract agar as the best medium. On the other hand, Bhagat et al. (2016), (Thamilvanan et al. (2018), Deka and Jha, (2018) and Toghueo et al. (2018) were reported the potato dextrose agar as the best medium for the maximum growth and production of metabolites. Kalyani et al. (2016) found that the maximum growth and metabolite production by *Aspergillus niger* when Sabouraud dextrose agar is used. In the present study, ethyl acetate was found to be the best suitable solvent for maximum extraction of bioactive molecules. Many similar results were reported earlier which correlates with this work. Goutam et al. (2016) reported that among the three organic solvents used, the crude metabolites of *Aspergillus terreus* (JAS-2) extracted using ethyl acetate showed maximum cell inhibition against pathogenic bacteria. Similarly, results reported by Singh et al. (2015) regarding antibacterial activity of the endophytic fungus *Alternaria* sp., crude extract from ethyl acetate

| Table II   |              |                  |                  |
|--|--------------|------------------|------------------|
| Antibacterial evaluation of PLR9 ethyl acetate extract against test bacteria |              |                  |                  |
| Zone of Inhibition (mm)  |              |                  |                  |
| Test microorganisms  | PLR9 extract | Positive control | Negative control |
| <b>Gram positive bacteria</b>  |              | Vancomycin 30    | DMSO             |
| <i>Bacillus cereus</i>   | 16.5 ± 2.1   | 19               | 0                |
| <i>Micrococcus luteus</i>  | 19.5 ± 0.7   | 27               | 0                |
| <i>Microbacterium yannicii</i>   | 16.5 ± 0.7   | 46               | 0                |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 1   | 18.5 ± 0.7   | 20               | 0                |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 2   | 19 ± 0       | 21               | 0                |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 3   | 21 ± 0       | 21               | 0                |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 4   | 19.5 ± 0.7   | 20               | 0                |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 5   | 21 ± 0       | 19               | 0                |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 1   | 17 ± 0       | 19               | 0                |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 2   | 14 ± 0       | 18               | 0                |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 3   | 12 ± 0       | 20               | 0                |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>  | 21 ± 0       | Non-detectable   | 0                |
| <b>Gram negative bacteria</b>  |              | Imipenem 10      | DMSO             |
| <i>Citrobacter freundii</i>  | 16.5 ± 2.1   | 30               | 0                |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>   | 12.5 ± 0.7   | 0                | 0                |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1  | 9.5 ± 0.7    | 24               | 0                |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2  | 0 ± 0        | 0                | 0                |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3  | 0 ± 0        | 0                | 0                |
| <i>Proteus mirabilis</i>   | 18 ± 0       | 0                | 0                |
| <i>Salmonella typhimurium</i>  | 0 ± 0        | 22               | 0                |
| <i>Escherichia coli</i> 1  | 21 ± 1.4     | 30               | 0                |
| <i>Escherichia coli</i> 2  | 16 ± 1.4     | 31               | 0                |
| <i>Escherichia coli</i> 3  | 16 ± 0       | 29               | 0                |
| <i>Escherichia coli</i> 4  | 15.5 ± 0.7   | 21               | 0                |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> 1   | 9 ± 0        | 18               | 0                |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> 2   | 9 ± 0        | 17               | 0                |

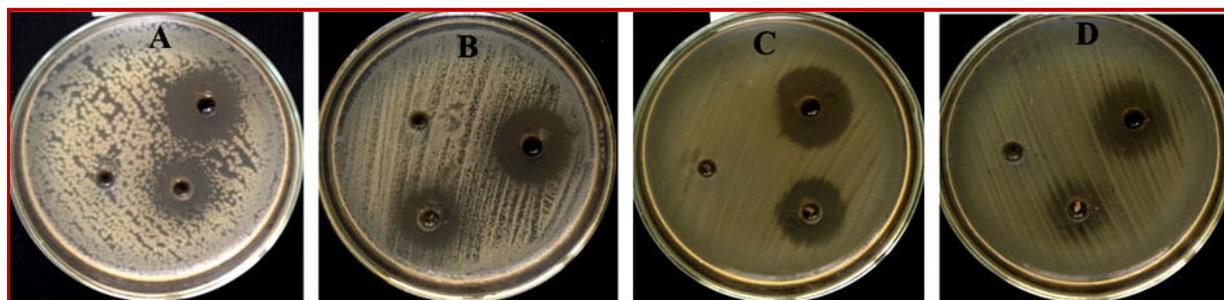


Figure 4: Antibacterial activity of extracts of PLR9 isolate, *B. cereus* (A), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 2 (B), *E. coli* (C) and *C. freundii* (D)

showed very good results compared to other solvents.

The antibacterial activity obtained by plug agar method for the PLR9 isolate may be due to the secretion of diffusible extracellular metabolites in the agar medium,

these compounds having a specific effect against bacteria but no against yeast. This technique is easy and widely used to detect non-volatile compounds produced by microorganisms (Sadrati et al., 2013; Hamzah et al., 2018). It has been clearly reported that the anta-

| Table III  |                                       |                          |         |
|--|---------------------------------------|--------------------------|---------|
| MIC and MBC of ethyl acetate fraction against bacteria |                                       |                          |         |
| Pathogenic bacteria                                    | Ethyl acetate extract of PLR9 isolate |                          |         |
|  | MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )              | MBC ( $\mu\text{g/mL}$ ) | MBC/MIC |
| <b>Gram-positive bacteria</b>                          |                                       |                          |         |
| <i>Bacillus cereus</i>                                 | 312.5                                 | 1250                     | 4       |
| <i>M. luteus</i>                                       | 625                                   | 625                      | 1       |
| <i>Microbacterium yannicii</i>                         | 156.3                                 | 312.5                    | 2       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 1                         | 625                                   | 625                      | 1       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 2                         | 625                                   | 2500                     | 4       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 3                         | 625                                   | 1250                     | 2       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 4                         | 625                                   | 625                      | 1       |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 5                         | 625                                   | 625                      | 1       |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 1                         | 625                                   | 625                      | 1       |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 2                         | 625                                   | 1250                     | 2       |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 3                         | 625                                   | 2500                     | 4       |
| <i>Enterococcus faecalis</i> 4                         | 625                                   | 625                      | 1       |
| <i>Enterococcus faecium</i> 1                          | 625                                   | 2500                     | 4       |
| <i>Enterococcus faecium</i> 2                          | 625                                   | 2500                     | 4       |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>                          | 312.5                                 | 312.5                    | 1       |
| <i>Streptococcus australis</i>                         | 625                                   | 625                      | 1       |
| <b>Gram-negative bacteria</b>                          |                                       |                          |         |
| <i>Citrobacter freundii</i>                            | 312.5                                 | 1250                     | 4       |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                         | 312.5                                 | 1250                     | 4       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1                        | 625                                   | 1250                     | 2       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2                        | 1250                                  | >2500                    | >2      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3                        | 625                                   | >2500                    | >4      |
| <i>Pseudomonas mirabilis</i>                           | 312.5                                 | 2500                     | 8       |
| <i>Salmonella typhimurium</i>                          | 625                                   | >2500                    | >4      |
| <i>Escherichia coli</i> 1                              | 312.5                                 | 1250                     | 4       |
| <i>Escherichia coli</i> 2                              | 312.5                                 | 2500                     | 8       |
| <i>Escherichia coli</i> 3                              | 312.5                                 | 2500                     | 8       |
| <i>Escherichia coli</i> 4                              | 312.5                                 | 1250                     | 4       |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> 1                         | 625                                   | >2500                    | >4      |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> 2                         | 625                                   | >2500                    | >4      |

gonistic properties are largely influenced by the quality of the medium and the type of organisms. The biosynthesis of antibiotic substances was found to be largely influenced, both quantitatively and qualitatively by the composition of the medium (Selvamohan et al., 2016; Abdelghani, 2017). The maximum zone of inhibition that was recorded with malt extract agar medium indicate that their ingredients induced and which may serve as precursors for the biosynthesis of bioactive secondary metabolites by the isolate PLR9. The selection of the suitable solvent system highly depends on the specific nature of the bioactive compound targeted. Different solvents have ability to extract the bioactive compounds from culture broth, where; hexane and diethyl ether to isolate non-polar compounds, while ethyl acetate, dichloromethane, and chloroform were used to extract semi-polar compounds (Djamaan et al., 2018). Ethyl acetate was recognized as the best organic solvent which could be used to extract the fungal bioactive metabolites (Bhagat et al., 2016). These results indicate that the antibacterial bioactive compounds are semi-polar in nature and can be extracted using ethyl acetate and dichloromethane, but none of the antimicrobial compounds present in the non-polar fraction (*n*-hexane).

Ethyl acetate extract of *A. neobridgeri* PLR9 showed significant activity against Gram positive and Gram negative bacteria. No study has been done on the antibacterial activity of *A. neobridgeri* species. However, several works have been reported on the isolation and antibacterial activity of different species of endophytic fungi belonging to the genus *Aspergillus*. The extracts of these fungi were exhibited broad spectrum activity against Gram positive and Gram negative bacteria including multi-drug-resistant strains similarly with the results obtained in the present study. Bezerra et al. (2015) found that the endophytic *Aspergillus ochraceus* exhibited a high range of antibacterial activity, and inhibited the growth of four out of 10 pathogenic bacteria. Six different species of *Aspergillus* were isolated from *Calotropis procera* exhibited a good antibacterial activity against all tested bacteria but it

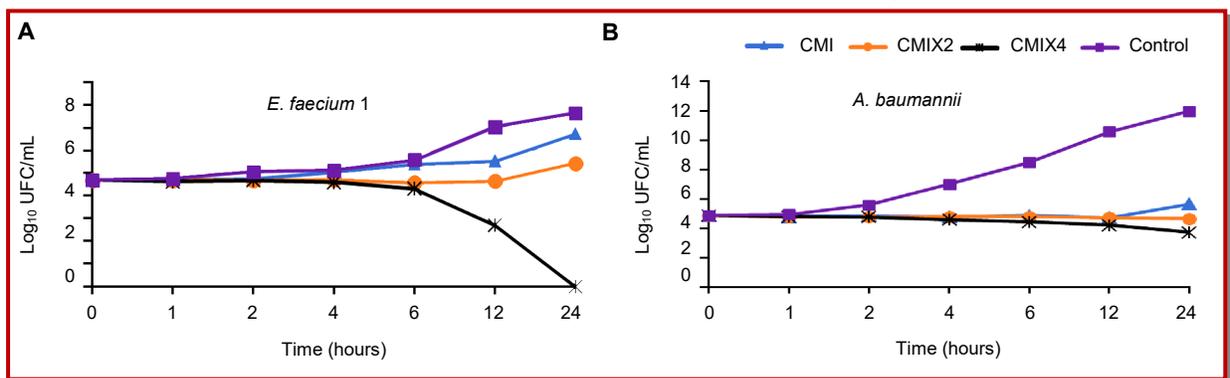


Figure 5: Time kill curve of ethyl acetate crude extract of PLR9 against *E. faecium* 1 (A) and *A. baumannii* (B) at MIC, 2x MIC and 4x MIC

was lower against Gram negative bacteria (Rani et al., 2017; Murali et al., 2017). Yadav et al. (2016) reported that extract of two endophytic fungi *A. terreus* and *A. tubingensis* are able to inhibit the growth of both *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* multi-drug resistant strains. Results of MIC values of the present study are in agreement with those obtained from the previous study of *Aspergillus* sp. extract, where MIC values ranged from 500 to 4000 µg/mL (Leong et al., 2018). The resistance phenomenon of Gram negative bacteria has generally been observed and which results in a bacteriostatic effect of the extracts during the time kill kinetics study, this has been shown by previous studies made on extracts of *A. nomius* (Rani et al., 2017) and those of *A. terreus* MP15 (Yin et al., 2015)

The reason for the different sensitivity between Gram positive and Gram negative bacteria could be ascribed to the morphological and chemical structure differences of their cell wall (Sadrati et al., 2013). Cell wall of Gram negative bacteria have an outer phospholipid membrane, lipopolysaccharide components and periplasmic space. This constitutes makes the cell wall less permeable to lipophilic solutes and provide an addition degree of protection against antibiotics targeting the cell wall (Yin et al., 2015). Whereas, the cell wall of Gram positive bacteria is less complex and can be more susceptible, this due to the presence of only outer peptidoglycan layer which is not an effective permeability barrier, and may facilitate the infiltration of hydrophobic compounds (Zainuddin et al., 2010). *Aspergillus* species are able to synthesize several molecules active against pathogenic bacteria (Ma et al., 2016 ; Gombodorj et al., 2017 ; Monggoot et al. 2018 ; Yang et al. 2018). *A. neobridgeri* and according to the results obtained by Frisvad et al. (2004), Visagie et al. (2014) and Varga et al. (2015) regarding the mycotoxins production using standards, this species has been found able to synthesizing penicillic acids, xanthomegnins, insulicolides, aspochracin and sclerotides. The significant antibacterial activity obtained in the present study may be due to the presence one or more these molecules in the crude extracts especially penicillic acid that which has been found active against bacteria (Ezzat et al., 2007; Varga et al., 2015; Nguyen et al., 2016), or due to other molecules that not yet characterized.

## Conclusion

*A. neobridgeri* PLR9, an endophytic fungus isolated from the plant *P. lentiscus* was able to inhibit the growth of broad number of human pathogenic bacteria.

## Financial Support

Directorate General for Scientific Research and Technologic al Development of Algeria and Mycology Laboratory, Eskişehir Technical University, Eskişehir, Turkey

## Conflict of Interest

Authors declare no conflict of interest

## References

- Abdelghani T. Production of antibacterial and antifungal metabolites by (*S. albobinaceus*) Strain no.10/2 and media optimization. Am Int J Biol. 2017; 5: 1-24.
- Abiala M, Olayiwola J, Babatunde O, Aiyelaagbe O, Akinyemi S. Evaluation of therapeutic potentials of plant extracts against poultry bacteria threatening public health. BMC Complement Altern Med. 2016; 16: 417.
- Akhter N, Pan C, Liu Y, Shi Y, Wu B. Isolation and structure determination of a new indene derivative from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* Y-62. Nat Prod Res. 2018; 23: 1-6.
- Arevalo J, Hidalgo-Diaz L, Martins I, Souza JF, Castro JMC, Carneiro RMDG, Tigano MS. Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. Trop Plant Pathol. 2009; 34: 158-63.
- Astuti P, Sudarsono S, Nisak K, Nugroho GW. Endophytic fungi isolated from *Coleus amboinicus* Lour exhibited antimicrobial activity. Adv Pharm Bull. 2014; 4: 599-605.
- Atiphasaworn P, Monggoot S, Gentekaki E, Brooks S, Pripdeevech P. Antibacterial and anti-oxidant constituents of extracts of endophytic fungi isolated from *Ocimum basilicum* var. *thyrsiflora* leaves. Curr Microbiol. 2017; 74: 1185-93.
- Bai X, Yu R, Li M, Zhang H. Antimicrobial assay of endophytic fungi from *Rumexmadaio* and chemical study of strain RL. Bangladesh J Pharmacol. 2019; 14: 129-35.
- Bai X, Zhou T, Lai T, Li Y, Chai J, Ni J, Zhang H. Isolation and antifungal screening of endophytic fungi from *Erigeron canadensis*. Bangladesh J Pharmacol. 2017; 12: 256-59.
- Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. Afr J Pharm Pharmacol. 2008; 2: 22-28.
- Bezerra JDP, Nascimento CCF, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Silva-Nogueira EB, Gomes BS, Paiva LM, Souza-Motta CM. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. Braz J Microbiol. 2015; 46: 49-57.
- Bhagat J, Kaur A, Kaur R, Yadav AK, Sharma V, Chadha BS. Cholinesterase inhibitor (Altenueene) from an endophytic fungus *Alternaria alternata*: Optimization, purification and characterization. J Appl Microbiol. 2016; 121: 1015-25.
- Campos FF, Junior PAS, Romanha AJ, Araújo MSS, Siqueira EP, Resende JM, Alves TMA, Martins-Filho OA, Dos Santos VL, Rosa CA, Zani CL, Cota BB. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from fusarium sp. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110: 65-74.
- Chatterjee S, Ghosh R, Mandal NC. Inhibition of biofilm- and hyphal- development, two virulent features of *Candida albicans* by secondary metabolites of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* having broad spectrum antifungal potential. Microbiol Res. 2019; 2019.

- Cheng K, Wei Z, Pu S, Xiang M, Yan A, Zhang Y, Wang X. Diversity of endophytic fungi of *Paenonia lactiflora* Pallas and screening for fungal paeoniflorin producers. *FEMS Microbiol Lett.* 2018; 365.
- Deka D, Jha DK. Optimization of culture parameters for improved production of bioactive metabolite by endophytic *Geosmithia pallida* (KU693285) isolated from *Brucea mollis* Wall ex. Kurz, an endangered medicinal plant. *J Pure Appl Microbiol.* 2018; 12: 1205-13.
- de Medeiros AG, Savi DC, Mitra P, Shaaban KA, Jha AK, Thorson JS, Rohr J, Glienke C. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. *Folia Microbiol (Praha).* 2018; 63:499-505.
- Demirel R. Comparison of rDNA regions (ITS, LSU, and SSU) of some *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* spp. *Turk J Bot.* 2016; 40: 576-83.
- Devaraju R, Satish S. Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian J Exp Biol Sci.* 2011; 2: 75-79.
- Djamaan A, Agustien A, Zam SI, Jannah M, Lalfari RS, Aldi Y, Dewi AP, Suci RP. Characterization of biopesticide compounds from *Bacillus subtilis* Aaf2 Uaac 20701 fermentation products. *Int Res J Pharm.* 2018; 9: 47-52.
- Ezzat SM, El-Sayed EA, Abou EL-Hawa MI, Ismaiel AA. Morphological and ultrastructural studies for the biological action of penicillic acid on some bacterial species. *Res J Microbiol.* 2007, 2: 303-14.
- Gombodorj S, Yang MH, Shang ZC, Liu RH, Li TX, Yin GP, Kong LY. New phenalenone derivatives from *Pinellia ternata* tubers derived *Aspergillus* sp. *Fitoterapia* 2017; 120: 72-78.
- Goutam J, Singh S, Kharwar RN, Ramarai V. *In vitro* potential of endophytic fungus *Aspergillus terreus* (JAS-2) associated with *Achyranthus aspera* and study on its culture conditions. *Biol Med (Aligarh).* 2016; 8: 349.
- Hamzah TNT, Lee SY, Hidayat A, Terhem R, Faridah-Hanum I, Mohamed R. Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, *Rhizophora mucronata*, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, *Fusarium solani*. *Front Microbiol.* 2018, 9: 1707.
- Handayani D, Rivai H, Mulyana R, Suharti N, Rasyid R, Hertiani T. Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from mangrove plant *Sonneratia alba* Sm. *J Appl Pharm Sci.* 2018; 8: 49-53.
- Heidarian E, Jafari-Dehkordi E, Valipour P, Ghatreh-Samani K, Ashrafi-Eshkaftaki L. Nephroprotective and anti-inflammatory effects of *Pistacia atlantica* leaf hydroethanolic extract against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Diet Suppl.* 2017; 14: 489-502.
- Houbraken J, Visagie CM, Meijer M, Frisvad JC, Busby PE, Pitt JI, Seifert KA, Louis-Seize G, Demirel R, Yilmaz N, Jacobs KB, Christensen M, Samson RA. A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Stud Mycol.* 2014; 78: 373-451.
- Ibrahim SRM, Mohamed GA, Al Haidari RA, Zayed MF, El-Kholy AA, Elkhayat ES, Ross SA. Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. *Bioorg Med Chem.* 2018; 26: 786-90.
- James AW, Brian CS, Neil JM, Alan CG. Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *J Ecol.* 2012; 100: 1085-92.
- Kalyani P, Geetha S, Hemalatha KPJ. Optimization of cultural conditions for improved production and bioactive metabolites by *Aspergillus niger* (Mttc-961). *EJPMR.* 2016; 3: 255-60.
- Khan MI, Ahhmed A, Shin JH, Baek JS, Kim MY, Kim JD. Green tea seed isolated saponins exerts antibacterial effects against various strains of Gram positive and Gram negative bacteria: A comprehensive study *in vitro* and *in vivo*. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2018; 2018.
- Kumar S, Kaushik N. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PLoS One.* 2013; 2013.
- Kumari M, Taritla S, Sharma A, Jayabaskaran C. Anti-proliferative and anti-oxidative bioactive compounds in extracts of marine-derived endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1777.
- Leong CR, Arifah A, Mansur B, Rashid SA, Ang SN, Tan WN, Tong WY, Ibrahim D. Antimicrobial activity of *Aspergillus* sp. IBRL MP15 CCL, an endophytic fungus isolated from *Sweetenia macrophylla* leaf against human pathogens. *Malays J Microbiol.* 2018; 14: 49-54.
- Li ZX, Wang XF, Ren GW, Yuan XL, Deng N, Ji GX, Li W, Zhang P. Prenylated diphenyl ethers from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus tennesseensis*. *Molecules* 2018; 23: 2368.
- Luo ZP, Lin HY, Ding WB, He HL, Li YZ. Phylogenetic diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Tephrosia purpurea*. *Mycobiology* 2015; 43: 435-43.
- Ma YM, Ma CC, Li T, Wang J. A new furan derivative from an endophytic *Aspergillus flavus* of *Cephalotaxus fortunei*. *Nat Prod Res.* 2016; 30: 79-84.
- Malhadas C, Malheiro R, Pereira JA, Guedes de Pinho P, Baptista P. Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017; 33: 46.
- Martí M, Frígols B, Serrano-Aroca A. Antimicrobial characterization of advanced materials for bioengineering applications. *JoVE.* 2018: e57710.
- Mefteh F Ben, Daoud A, Bouket AC, Thissera B, Kadri Y, Cherif-Silini H, Eshelli M, Alenezi FN, Vallat A, Oszako T, Kadri A, Ros-García JM, Rateb ME, Gharsallah N, Belbahri L. Date palm trees root-derived endophytes as fungal cell factories for diverse bioactive metabolites. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 1986.
- Merah S, Dahmane D, Krimat S, Metidji H, Nouasri A, Lamari L, Dob T. Chemical analysis of phenolic compounds and determination of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of organic extracts of *Pinus coulteri*. *Bangladesh J Pharmacol.* 2018; 13: 120-29.
- Mmbaga MT, Gurung S, Maheshwari A. Screening of plant endophytes as biological control agents against root pathogens of pepper (*Capsicum annum* L.). *J Plant Pathol Microbiol.*

- 2018; 9: 435.
- Mohanraj D, Bharathi S, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Bioprospecting of Actinobacteria from Yelagiri hills with special reference to antibacterial activity. *J Chem Pharm Res.* 2011; 3: 439-46.
- Monggoot S, Pichaitam T, Tanapichatsakul C, Pripdeevech P. Antibacterial potential of secondary metabolites produced by *Aspergillus* sp., an endophyte of *Mitrepheora wangii*. *Arch Microbiol.* 2018; 200: 951-59.
- Murali M, Mahendra C, Hema P, Rajashekar N, Nataraju A, Sudarshana MS, Amruthesh KN. Molecular profiling and bioactive potential of an endophytic fungus *Aspergillus sulphureus* isolated from *Sida acuta*: A medicinal plant. *Pharm Biol.* 2017; 55: 1623-30.
- Nguyen HT, Yu NH, Jeon SJ, Lee HW, Bae CH, Yeo JH, Lee HB, Kim IS, Park HW, Kim JC. Antibacterial activities of penicillic acid isolated from *Aspergillus persii* against various plant pathogenic bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2016; 62: 488-93.
- Perim MC, Borges JDC, da Silva EML, Araújo TAS, da Silva ACM, da Silva VC, Carreiro SC, Cunha AF, Pranchevicius MCDS. *In vitro* antibacterial and time-kill assay of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark on multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot lesions. *Nat Prod Res.* 2019; 33: 2383-88.
- Pretsch A, Nagl M, Schwendinger K, Kreiseder B, Wiederstein M, Pretsch D, Genov M, Hollaus R, Zinssmeister D, Debbab A, Hundesberger H, Eger A, Proksch P, Wiesner C. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* extracts against acne-inducing bacteria. *PLoS ONE.* 2014; 9: e97929.
- Qaralleh H. Chemical composition and antibacterial activity of *Origanum ramonense* essential oil on the  $\beta$ -lactamase and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase urinary tract isolates. *Bangladesh J Pharmacol.* 2018; 13: 280-86.
- Qi C, Gao W, Wang J, Liu M, Zhang J, Chen C, Hu Z, Xue Y, Li D, Zhang Q, Zhu H, Zhang Y. Terrusnolides A-D, new butenolides with anti-inflammatory activities from an endophytic *Aspergillus* from *Tripterygium wilfordii*. *Fitoterapia.* 2018; 130: 134-39.
- Qu HR, Yang WW, Zhang XQ, Lu ZH, Deng ZS, Guo ZY, Cao F, Zou K, Proksch P. Antibacterial bisabolane sesquiterpenoids and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Phomopsis prunorum*. *Phytochem Lett.* 2020; 37: 1-4.
- Rakholiya KD, Kaneria MJ, Chanda SV. *In vitro* assessment of novel antimicrobial from methanol extracts of matured seed kernel and leaf of *Mangifera indica* L. (Kesar Mango) for inhibition of *Pseudomonas* spp. and their synergistic potential. *Am J Drug Disc Dev.* 2015, 5: 13-23.
- Rani R, Sharma D, Chaturvedi M, Yadav JP. Antibacterial activity of twenty different endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* and time kill assay. *Clin Microbiol.* 2017; 6: 280.
- Ratnaweera PB, Walgama RC, Jayasundera KU, Herath SD, Abira S, Williams DE, Andersen RJ, de Silva ED. Antibacterial activities of endophytic fungi isolated from six Sri Lankan plants of the family Cyperaceae. *Bangladesh J Pharmacol.* 2018; 13: 264-72.
- Sadrati N, Daoud H, Zerroug A, Dahamna S, Bouharati S. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). *J Plant Prot Res.* 2013; 53: 129-36.
- Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM, Frisvad JC. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Stud Mycol.* 2004; 50: 45-61.
- Selvamohan T, Parameswaran NK, Felcy SA. Isolation of Actinomycetes from different soils for analysing the antagonistic activity against pathogens. *IJARBS.* 2016; 3: 124-31.
- Semerci AB, İnceçayır D, Mammadova V, Hoş A, Tunç K. Antimicrobial activities of *Allium staticiforme* and *Allium subhirsutum*. *Bangladesh J Pharmacol.* 2020; 15: 19-23.
- Sharma D, Pramanik A, Agrawal PK. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don. *3 Biotech.* 2016; 6: 210.
- Shi XS, Li HL, Li XM, Wang DJ, Li X, Meng LH, Zhou XW, Wang BG. Highly oxygenated polyketides produced by *Trichoderma koningiopsis* QA-3, an endophytic fungus obtained from the fresh roots of the medicinal plant *Artemisia argyi*. *Bioorg Chem.* 2020; 94: 103448.
- Shylaja G, Sasikumar K, Sathiavelu A. Antimycobacterial potential of resorcinol type lipid isolated from *Chaetomium cupreum*, an endophytic fungus from *Mussaenda luteola*. *Bangladesh J Pharmacol.* 2018; 13: 114-19.
- Singh B, Thakur A, Kaur S, Chadha BS, Kaur A. Acetylcholinesterase inhibitory potential and insecticidal activity of an endophytic *Alternaria* sp. from *Ricinus communis*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012; 168: 991-1002.
- Singh D, Rathod V, Singh AK, Joshi R, Nagaratna H, Avinash B. Antibacterial activity and phytochemical analysis of the crude extracts of endophytic fungus, *Alternaria* sp. from the medicinal plant *Euphorbia hirta* (L). *Int J Green Chem Bioproc.* 2015; 5: 14-20.
- Siqueira JP, Sutton DA, Gené J, García D, Wiederhold N, Peterson SW, Guarro J. Multilocus phylogeny and antifungal susceptibility of *Aspergillus* section *Circumdati* from clinical samples and description of *A. pseudosclerotiorum* sp. Nov. *J Clin Microbiol.* 2017; 55: 947-58.
- Smeriglio A, Denaro M, Barreca D, Calderaro A, Bisignano C, Ginestra G, Bellocco E, Trombetta D. *In vitro* evaluation of the antioxidant, cytoprotective, and antimicrobial properties of essential oil from *Pistacia vera* L. variety Bronte Hull. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 1212.
- Tanapichatsakul C, Monggoot S, Gentekaki E, Pripdeevech P. Antibacterial and antioxidant metabolites of *Diaporthe* spp. isolated from flowers of *Melodorum fruticosum*. *Curr Microbiol.* 2018; 75: 476-83.
- Thamilvanan D, Ram Kumar A, Ramesh R, Balakumar BS, Kumaresan S. *In vitro* antibacterial activity of the soil fungal metabolites. *Int Res J Pharm.* 2018; 9: 175-81.
- Toghueo RMK, Sahal D, Zabalgoceazcoa Í, Baker B, Boyom FF. Conditioned media and organic elicitors underpin the pro-

- duction of potent antiplasmodial metabolites by endophytic fungi from Cameroonian medicinal plants. *Parasitol Res.* 2018; 117: 2473-85.
- Varga J, Baranyi N, Chandrasekaran M, Vágvölgyi C, Kocsubé S. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. *Acta Biol Szeged.* 2015; 59: 151-67.
- Visagie CM, Houbraken J, Rodrigues C, Pereira CS, Dijksterhuis J, Seifert KA, Jacobs K, Samson RA. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: A tribute to the Dutch Royal family. *Mol Phylogeny Evol Fungi* 2013; 31: 42-62.
- Visagie CM, Varga J, Houbraken J, Meijer M, Kocsubé S, Yilmaz N, Fotedar R, Seifert KA, Frisvad JC, Samson RA. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Stud Mycol.* 2014; 78: 1-61.
- Wu Y, Chen Y, Huang X, Pan Y, Liu Z, Yan T, Cao W, She Z.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors: Diphenyl ethers and phenolic bisabolane sesquiterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus flavus* QQSG-3. *Mar Drugs.* 2018; 16: 307.
- Yadav M, Yadav A, Kumar S, Yadav JP. Spatial and seasonal influences on culturable endophytic mycobiota associated with different tissues of *Eugenia jambolana* Lam. and their antibacterial activity against MDR strains. *BMC Microbiol.* 2016; 16: 44.
- Yadav V, Singh A, Mathur N, Yadav R. Isolation and characterization of *Alternaria* GFAV15, an endophytic fungus from green fruit of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers from semi-arid region. *S AFR J BOT.* 2020; 2020.
- Yang SQ, Li XM, Xu GM, Li X, An CY, Wang BG. Antibacterial anthraquinone derivatives isolated from a mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus nidulans* by ethanol stress strategy. *J Antibiot (Tokyo).* 2018; 71: 778-84.
- Yin OCJ, Ibrahim D, Lee CC. Bioactive compounds from *Aspergillus terreus* MP15, an endophytic fungus isolated from *Swietenia macrophylla* leaf. *Mal J Med Biol Res.* 2015; 2: 262-72.
- Yu N, He L, Liu N, Wang Y, Xu H, Liu D. Antimicrobial action of an endophytic fungi from *Sophor flavescens* and structure identification of its active constituent. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2014; 28: 327-32.
- Zainuddin N, Alias SA, Lee CW, Ebel R, Othman NA, Mukhtar MR, Awang K. Antimicrobial activities of marine fungi from Malaysia. *Bot Mar.* 2010; 53: 507-13.
- Zerroug A, Sadrati N, Demirel R, Bakli S, Harzallah D. Antibacterial activity of endophytic fungus, *Penicillium griseofulvum* MPR1 isolated from medicinal plant, *Mentha pulegium* L. *Afr J Microbiol Res.* 2018; 12: 1056-66.
- Zohary M. A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine J Bot Jerusalem Ser.* 1952; 5: 187-228.

**Author Info**

Daoud Harzallah (Principal contact)  
e-mail: harzallahdaoud@univ-setif.dz

## المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتعريف الفطريات الداخلية لنوعين نباتيين *Pistacia lentiscus* و *Juniperus oxycedrus* L. لتقييم نشاطها البيولوجي. بعد الاختبار الأولي ووفقاً لشدة التثبيط، طيف النشاط والمظهر المورفولوجي للعزلات، تم اختيار 6 عزلات لمواصلة هذه الدراسة. العزلات PLR9، JOR22 و PLT7 تم تعريفها على أنها تنتمي إلى الأنواع *Aspergillus neobridgeri* و *Penicillium griseofulvum* و *Micronematobotrys verrucosus* على التوالي. كما تم اقتراح كل من السلالات PLT8 و PLF5 كنوع جديد ينتمي إلى جنس *Neocucurbitaria*، في حين تم اقتراح العزلة JOR26 كعائلة جديدة من رتبة Diaporthales. أظهر تحسين ظروف التخمر لرفع الإنتاج والاستخلاص الأمثل للمركبات النشطة بيولوجياً أن الوسط MEA أعطي أفضل إنتاج لكل من العزلات PLR9، JOR22، PLT8 و PLF5، الوسط PDA للعزلة PLT7 و YMEA للعزلة JOR26. المذيب العضوي Ethyle acetate كان هو أفضل مذيب الذي اعطي أحسن استخلاص للمركبات النشطة بيولوجياً لجميع العزلات. كما كان إنتاج الجزيئات النشطة بيولوجياً على الوسط السائل أكثر كفاءة منه على الوسط الصلب للعزلات JOR26، JOR22، PLT7 و PLR9، بينما كان الإنتاج أفضل للعزلات PLT8 و PLF5 بعد التخمر على الوسط الصلب. مستخلصات العزلات PLT8، PLF5، PLT7 و JOR26 كانت فعالة ضد البكتيريا موجبة الجرام فقط، وعلى العكس، مستخلصات العزلات PLR9 و JOR22 كانت نشطة ضد كل من البكتيريا سالبة وموجبة الجرام. بالنسبة للنشاط المضاد للفطريات، مستخلصات العزلات PLT7، JOR22 و JOR26 هي فقط التي كانت نشطة. بناءً على قيم CMI، مستخلصات العزلات JOR26 و PLT8 كانت هي الأكثر فعالية، تليها مستخلصات PLT7 و PLF5 وأخيراً مستخلصات JOR22 و PLR9. أظهرت دراسة الحركية المميّنة للعزلات أن مستخلصات العزلات JOR26 و PLT7 و JOR22 كان لها تأثير قاتل للجراثيم، مستخلصات العزلات PLT8 و PLF5 كان لها تأثير مثبط، بينما تأثير مستخلص PLR9 كان قاتل ضد *E. faecium* 1 ومثبط ضد *A. baumannii*. بالنسبة للنشاط المضاد للأوكسدة، وجد أن المستخلصات الثلاثة لكل من PLT7، JOR22 و PLT8 هي الأكثر فعالية في إظهار النشاط المضاد للأوكسدة مخبرياً باستعمال مختلف الطرق المختبرة. بينما أظهرت المستخلصات المتبقية لكل من JOR26، PLF5 و PLR9 نشاطاً أقل فعالية. أظهرت نتائج الاختبارات المضادة لتكاثر مختلف أنواع الخلايا السرطانية، أن المستخلص الأكثر فعالية ضد جميع أنواع الخلايا كان مستخلص العزلة JOR22، يليه مستخلص العزلة PLT7 وأخيراً مستخلص العزلة PLR9. بينما كان التأثير المضاد للتكاثر ضد HepG2 والتأثير السمي ضد سلالات الخلايا السليمة لكل من مستخلصات العزلات JOR26 و PLT8 ضعيفاً جداً. العزلتان JOR22 و PLR9 كانتا من أفضل منتجي انزيم L-asparaginase، يليهما العزلة PLT8 وأخيراً العزلة PLT5 التي أظهرت نشاطاً أقل. مكنتنا تحليل مستخلص العزلة JOR22 باستخدام تقنية MALDI-TOF MS من إكتشاف إنتاج جزيئة Griséofulvine من طرف هذه الأخيرة.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات الداخلية للنبات، الأنشطة البيولوجية، البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة، *Aspergillus neobridgeri*، *Penicillium griseofulvum*، *Micronematobotrys verrucosus*.

## Abstract

The aim of this study is to isolate and identify of endophytic fungi of two plant species *Juniperus oxycedrus* L. and *Pistacia lentiscus* L. in order to evaluate their biological activities. After the preliminary screening and according to the intensity of inhibition, the spectrum of activity, and the morphotype of the isolates, 6 isolates were selected for further study. The PLR9, JOR22 and PLT7 isolates were identified as belonging to the species, *Aspergillus neobridgeri*, *Penicillium griseofulvum* and *Micronematobotrys verrucosus* respectively. The PLT8 and PLF5 strains have been proposed as a new species belonging to the genus *Neocucurbitaria*, while the JOR26 isolate has been proposed as a new family from the order of Diaporthales. The optimization of certain cultural conditions to improve the production and the maximum extraction of bioactive compounds, showed that the MEA was the best medium giving the best production for the isolates PLR9, JOR22, PLT8 and PLF5, the PDA for the isolate PLT7 and YMEA for the isolate JOR26. Ethyl acetate was the best organic solvent for the maximum extraction of bioactive compounds for all isolates. The production of bioactive molecules on liquid medium was more efficient than that on solid medium for the JOR26, JOR22, PLT7 and PLR9 isolates, while for the PLT8 and PLF5 isolates the production was better after fermentation on solid medium. The extracts of isolates PLT8, PLF5, PLT7 and JOR26 were active only against Gram positive bacteria, unlike the extracts of isolates PLR9 and JOR22 which were active against both groups of bacteria. For antifungal activity, only extracts of isolates PLT7, JOR22 and JOR26 were active. Based on the MIC values, the extracts of isolates JOR26 and PLT8 were the most effective, followed by extracts of PLT7 and PLF5 and finally the extracts of JOR22 and PLR9. The study of the kinetics of the lethality showed that the extracts of the isolates JOR26, PLT7 and JOR22 had a bactericidal effect, those of the isolates PLT8 and PLF5 had a bacteriostatic effect, while the effect of the extract of PLR9 was bactericidal against *E. faecium* 1 and bacteriostatic against *A. baumannii*. For antioxidant activity, the three extracts of PLT7, PLT8 and JOR22 were found to be the most effective in exhibiting antioxidant activity *in vitro* in the various methods used. However, the remaining extracts of JOR26, PLF5 and PLR9 showed the least effective activities. The results of antiproliferative tests against the tumor lines showed that the extract with the highest activity against all lines was that of JOR22, followed by the extract of PLT7 and finally, the extract of PLR9 isolate. However, the antiproliferative effect against HepG2 and cytotoxic against healthy lines of extracts from JOR26 and PLT8 isolates, was very weak. The endophytes JOR22 and PLR9 were the best producers of L-asparaginase, followed by isolate PLT8 and finally isolate PLT5 which showed the lowest activity. The use of MALDI-TOF MS enabled us to detect the production of griseofulvin by isolate JOR22.

**Key words:** Endophytic fungi, biological activities, multidrug resistant bacteria, *Aspergillus neobridgeri*, *Penicillium griseofulvum*, *Micronematobotrys verrucosus*