

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



*Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention de Master en Sciences
Biologiques
Option : Biochimie appliquée*

Thème

**Activité enzymatique et antimicrobienne de trois
champignons endophytes isolés de deux plantes locales**

Réalisé par :

BOUDELAA Anfal Manel et AOUISSI Assia

Soutenu le 12 Juillet devant le jury composé par :

PRESIDENT: Mme. TAKHI Djalila, Maître Assistante A, Département de Biologie

EXAMINATEUR: M^{elle}. Zakhrouf Zohra, Maître Assistante A, Département de Biologie

PROMOTEUR: Mr. Youcef BOUBRIMA, Maître Assistant A, Département de Biologie

CO-PROMOTEUR: M^{elle}. Renane Zohra, Doctorante, Département d'Agronomie

Année universitaire 2020 / 2021

Remerciements

Ce travail est le fruit de la combinaison d'efforts de plusieurs personnes. On remercie tout d'abord le tout puissant qui, par sa grâce nous a permis d'arriver au bout de nos efforts en nous donnant la santé, la force, le courage et en nous faisant entourer des merveilleuses personnes dont on tient à remercier. On remercie :

Notre Directeur de mémoire, Mr. BOUBRIMA YUCEF pour son encadrement sans faille, sa rigueur au travail, ses multiples conseils, ses orientations et sa disponibilité malgré ses multiples occupations ;

C'est avec plaisir qu'on remercie Mme. AMEUR DJAMILLA pour toute l'aide qu'elle nous a apportée.

Je remercie les membres du jury pour le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail

Nous tenons à exprimer également nos profondes reconnaissances à Mme RENANE ZOHRA et aux ingénieurs de laboratoire pédagogique du département de biologie université Ammar Telidji de Laghouat qui ont mis à notre disposition les conditions nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long de la période de recherche.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble des enseignants de l'université de Laghouat qui ont contribué à notre formation

Nous remercions chaleureusement Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'accomplissement de ce travail.

Anfal et Assia

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À mes chers parents qui ont toujours été présents pour me soutenir, veiller à mon éducation et m'encourager à bien travailler dans tous ce que j'entreprends et plus Particulièrement dans mes études. Je leurs suis très reconnaissante. Leur fierté à mon égard Aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

A ma grande sœur Amel qui m'a toujours soutenu et encouragé durant mes années d'études.

A mon adorable petit frères Adel, ainsi qu'à mes chères petites sœurs Lyna, sabrine et Dalal.

A mes très chers grands parents à qui je souhaite une longue vie en Bonne santé

;

A mes tantes mes oncles et toute ma famille.

A toutes les personnes que j'aime et que je respecte.

Boudelaa anfal manel

Dédicaces

A mes parents, et ma grand-mère,

Vos encouragements et vos prières m'ont toujours soutenue et guidé. En ce jour, j'espère réaliser un de vos rêves et être digne de vous. Veuillez trouver, mes très chers parents, ce mémoire est le fruit de votre dévouement ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour. Que Dieu vous garde vous procure santé et longue vie.

A mes frères pour leur soutien permanent et leurs encouragements continus. Ils ont vécu en même temps que moi toutes les étapes de ce mémoire , avec ses joies et ses peines.

Aouissi Assia

Résumé

Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but d'évaluer l'activité enzymatique et antimicrobienne de trois champignons endophytes ASV3, RV3, 8' qui ont été isolés à partir de deux plantes médicinales.

La production des enzymes extracellulaires a été déterminée et recherché pour nos isolats fongiques par la digestion du substrat dissous dans la gélose.

L'évaluation de l'activité enzymatique des champignons endophytes a montré que nos isolats fongiques sont dotés d'activités enzymatiques extracellulaires comprenant (l'amylase, la protéase, la lipase et l'estérase).

L'activité antimicrobienne a été testée sur cinq bactéries pathogènes, trois à Gram négatif *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, et deux à Gram positif : *Bacillus Cereus*, *staphylococcus Aureus* et une levure *Candida albicans*. Par la technique des cylindres d'agar. Parmi les trois isolats fongiques, seul les deux isolats fongiques ASV3 et 8' ont montré une activité antimicrobienne contre les deux bactéries *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* et la souche fongique *Candida albicans*. L'isolat fongique RV3 n'a exprimé aucune activité inhibitrice contre les souches testées.

Mots clés : champignons endophytes, souches bactériennes, souche fongique, activité enzymatique, activité antimicrobienne.

Abstract

The present study aims to evaluate the enzymatic and antimicrobial activity of three endophytic fungi ASV3, RV3, 8' that were isolated from two medicinal plants. The production of extracellular enzymes was determined and investigated for our fungal isolates by digesting the substrate dissolved in agar.

Evaluation of the enzymatic activity of endophytic fungi showed that our fungal isolates are equipped with extracellular enzymatic activities (amylase, protease, lipase and esterase).

Antimicrobial activity was tested on five pathogenic bacteria, three gram-negative: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and two gram-negative: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and a yeast *Candida albicans*. using the agar cylinder technique. Among the three fungal isolates, only the two fungal isolates ASV3 and 8' showed antimicrobial activity against the two bacteria *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* and the fungal strain *Candida albicans*. The fungal isolate RV3 did not show any inhibitory activity against any of the tested strains.

Keywords: endophytic fungi, bacterial strain, fungal strain, enzymatic activity, antimicrobial activity.

ملخص

أجريت هذه الدراسة لتقييم النشاط الأنزيمي و المضاد للميكروبات لثلاث نوابيت فطرية داخلية من اجناس *Alternaria* *Cladosporium* , *Aspergillus sp* التي تم عزلها من نباتات طبية وقد تم تحديد إنتاج الإنزيمات خارج الخلية وذلك بواسطة زرع الفطريات في وسط ملائم وقد أظهرت نتائج التقييم النشاط الأنزيمي للفطريات الداخلية نتيجة ايجابية تمثلت في قدرتها على افراز خارج الخلية بعض الانزيمات الأميلاز و البروتياز و ليباز واستيراز .

وقد تم أيضا الكشف عن النشاط المضاد للميكروبات على البكتيريا المسببة للأمراض، 3 انواع بكتيريا سالبة الغرام *Escherichia*

Bacillus cereus, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa coli*, واخرى بكتيريا موجبة *Staphylococcus aureus* وفطر *Candida albicans* وذلك بوضعها في وسط ملائم. ولقد أظهرت الفطريات ASV3 و 8' و

نتيجة ايجابية ضد كل من البكتيريا *Bacillus cereus* و *Candida albicans* و *Staphylococcus aureus* . بينما الفطر RV3 لم يظهر أي نشاط مثبط للبكتيريا ضد السلالات التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية، السلالات البكتيرية، السلالة الفطرية، نشاط الإنزيم، نشاط مضادات الميكروبات

Listes des abréviations

ATCC American type culture collection.

GYEP Glucose Yeast Extract Peptone.

HE Huiles essentielles

Staph *Staphylococcus aureus*

8' *Alternaria*

ASV3 *Aspergillus sp.*

Bc *Bacillus cereus*

C *Clavicipitaceae*

Ca *Candida albicans*

CFU Colony forming unit

E.c *Escherichia coli*

Gel Gélatine

GN Gélose nutritive

IBMC institut de biologie moléculaire et cellulaire

Keb *Klebsiella pneumoniae*

MH Muller Hinton

Na Cl Chlorure de sodium

PDA Potato Dextrose Agar

Pseudo *Pseudomonas aeruginosa*

RV3 *Cladosporium*

Table des illustrations

Figure 1 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes (Aouarib et Lemsara.,2016).	14
Figure 2 : Abondance des champignons endophytes appartenant à des embranchements divers isolés de différentes plantes (Rana <i>et al.</i> ,2019).....	17
Figure 3 : cycle de vie et mode de transmission verticale et horizontale du champignon endophyte (Saikkonen <i>et al.</i> , 2004).	18
Figure 4 : les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés (Pavithra <i>et al.</i> , 2012)..	20
Figure 5 : Quelques exemples des substances antibactériennes produites par les champignons endophytes (Chemdraw).	26
Figure 6 : Substance antivirales produites pas les champignons endophytes (Chemdraw).....	27
Figure 7 : substance anticancéreuses produites par les champignons (Chemdraw).	28
Figure 8 : représentation des étapes du protocole de l'activité antimicrobienne (Chemdraw).	39
Figure 9 : Le diamètre des zones d'activités (Halo) à T28°	47
Figure 10 : Le diamètre des zones d'activités (Halo) à T30°	47
Figure 11 : activité antimicrobienne des isolats fongiques étudiés sur <i>Bacillus Cereus</i>	52
Figure 12 : activité antimicrobienne des isolats fongique étudiés sur <i>Staphylococcus aureus</i>	52
Figure 13 : activité antimicrobienne des isolats fongiques étudiés sur <i>candida albicans</i>	52

Table des tableaux

Tableau 1 : critères symbiotiques qui caractérisent les classes des champignons endophytes (Rodriguez et al., 2009).	19
Tableau 2 : Description des microorganismes étudiés (Belmechri,2017).	31
Tableau 3 : caractéristiques macroscopiques et microscopiques des trois isolats fongiques	33
Tableau 4 : taxonomie des champignons étudiés.	35
Tableau 5 : les souches bactériennes et la souche fongiques étudiés.	35
Tableau 6 : l'activité amylolytique des trois isolats fongiques.	42
Tableau 7 : l'activité protéolytique des trois isolats fongiques (gélatine)	43
Tableau 8 : l'activité protéolytique des trois isolats fongiques (caséine).....	44
Tableau 9 : l'activité lipolytique des trois isolats fongiques.....	45
Tableau 10 : l'activité estérasique des trois isolats fongiques.....	46
Tableau 11 : l'activité enzymatique des trois isolats fongiques. (+++ : Résultat positif important, ++ : résultat positif faible, + : résultat positif très faible).....	48
Tableau 12 : résultats de l'activité antimicrobienne.	51

Table des matières

Introduction	11
I. Généralités sur les champignons endophytes	14
1. Définition.....	14
2. Biodiversité des champignons endophytes.....	14
3. Mode de reproduction et transmission des endophytes	17
4. Classification des champignons endophytes	18
5. Interaction endophyte-plante hôte	20
6. Importance et rôle des endophytes	21
II. Métabolites secondaires et bio-activité des endophytes	24
1. Métabolites secondaires.....	24
2. Bio activité des endophytes	25
3. Potentialité enzymatique des endophytes.....	28
4. Description des genres endophytes et des microorganismes étudiés.....	29
5. Des microorganismes étudiés.....	30
III. Matériel et méthodes	33
2. Méthodes	36
IV. Résultats et discussion.....	41
3. Discussion de l'activité enzymatique	49
4. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	50
Conclusion.....	55
Références bibliographiques	56
Annexes.....	65

Introduction

Introduction

Depuis qu'elles ont conquis la surface de la terre il y a environ 475 millions d'années, les plantes ont développé de nombreuses stratégies pour faire face aux carences en eau et en nutriments et surtout pour assurer un équilibre à l'environnement. Et l'une de ces stratégies-là plus fascinante et là plus adoptée est l'association symbiotique (**Sirguy *et al.*, 2019**). Plus de 80% des plantes vivent en symbiose avec des microorganismes hétérotrophes appelé les champignons endophytes. Cette relation symbiotique a créé un lien durable et mutuellement bénéfique. Si on considère que l'ensemble de ces échanges en symbiose, on peut également distinguer d'autres modes d'interaction : parasitisme, saprophytisme, endophytisme (**Haddadi et Hamrani, 2017**).

Les champignons endophytes vivent en toute discrétion à l'intérieur de la plante. Elle leurs fournit le gîte et quelques sucreries issus de la photosynthèse, en échange ces microorganismes renforcent la croissance et la résistance de la plante grâce à des nutriments, tels que l'azote et le phosphore, aussi ils fabriquent des myriades de molécules qui fournissent un arsenal chimique à la plante pour qu'elle puisse se défendre contre d'éventuels envahisseurs, tels que, des bactéries nocives et assure une tolérance aux différents types de stress biotique et abiotiques. De ce fait, ils peuvent interagir plus longtemps avec la plante (**Khiralla *et al.*, 2016**). Ils ont également un grand intérêt biotechnologique en raison de leur capacité de synthétiser des composés antibactériens, antiviraux, anticancéreux, antioxydants, antidiabétiques et des immunosuppresseurs (**Pawle *et al.*, 2014**).

Par ailleurs, les endophytes sont connus pour être une ressource importante de diverses classes de métabolites bioactifs (**Abdalla *et al.*, 2020**), qui comprennent des composés qui imitent les métabolites synthétisés par la plante hôte. Par conséquent, la production de ces nouveaux composés est d'une grande importance pharmaceutique, industrielle et agricole, car ces métabolites peuvent être uniques dans leur structure et efficaces contre plusieurs maladies.

Les champignons endophytes peuvent aussi synthétiser une large gamme d'enzymes extracellulaires (pectinases, cellulases, lipases, amylases, laccases et protéinase, etc.), et des produits naturels qui démontrent une variété d'activités biologiques peuvent être utilisés industriellement (**Sopalun *et al.*, 2020**).

L'objectif principal de ce travail consiste à l'étude de l'activité enzymatique et antimicrobienne de quelques champignons endophytes du genre *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus sp* isolés à partir de deux plantes médicinales *Arthrophytum scoparium* et *Astragalus armatus*. Pour ce faire, ce travail comporte deux parties :

- ✓ Une synthèse bibliographique approfondie contenant des informations relatives aux champignons endophytes et leurs potentialités remarquables à produire des molécules d'intérêt thérapeutique.
- ✓ Une partie expérimentale qui traite le matériel et méthodes mettant en évidence l'activité enzymatique et antimicrobienne des isolats fongiques choisis et présente les résultats obtenus et leur discussion

Enfin, notre manuscrit se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

*Généralités sur les
champignons endophytes*

I. Généralités sur les champignons endophytes

1. Définition

Le terme "endophyte" vient du grec étymologiquement signifie « à l'intérieur d'une plante ». Il a été introduit pour la première fois par de Bary en 1866. Ce mot a été utilisé au sens large pour désigner tous les organismes polyphylétiques (bactéries et champignons), qui durant une période de leur vie envahissent les tissus vivants internes de leurs hôtes de manière asymptomatique (**Haddar.,2017**).

La définition la plus souvent utilisée pour décrire les champignons endophytes est celle de Petrini (1991), qui a décrit les endophytes comme étant les microorganismes vivant de façon intra /ou intercellulaire (**figure 1**) pendant tout ou une partie de leur cycle de vie à l'intérieur des tissus des plantes sans provoquer de symptômes d'infection ou une manifestation visible d'une maladie chez l'hôte (**Venieraki et al., 2017**).

L'endophyte et son hôte entretiennent une interaction biologique appelée l'endophytisme cette interaction peut être définie comme étant une association asymptomatique des microorganismes fongiques qui se développent à l'intérieurs des tissus des végétaux (**Brundrett et al., 2006**).

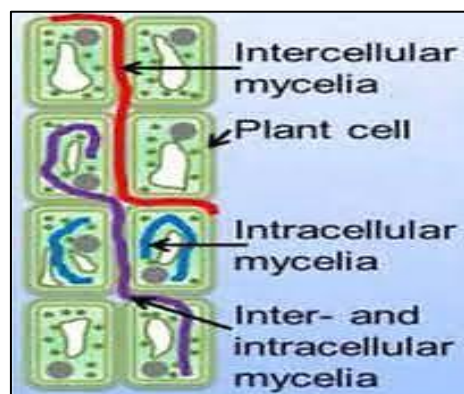


Figure 1 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes (**Aouarib et Lemsara.,2016**).

2. Biodiversité des champignons endophytes

Les endophytes sont omniprésents avec une riche biodiversité, ils ont été trouvés dans toutes les espèces végétales examinées à ce jour. Il n'est pas négligeable que, sur les près de 3.000.000 espèces de plantes qui existent sur la terre, chaque plante est l'hôte d'un ou plusieurs endophytes (**Strobel et Daisy.,2003**). On estime qu'il pourrait y avoir jusqu'à un million d'espèces

d'endophytes différentes. Mais seulement environ 75.000 d'entre elles ont été identifiées Ce qui signifie que la possibilité de trouver des produits naturels nouveaux et ciblés à partir de microorganismes endophytes intéressants parmi des myriades de plantes dans différentes niches et écosystèmes est grande. Certains endophytes sont les synthétiseurs chimiques à l'intérieur de la plante (**Zerroug.,2018**).

Le règne des champignons est scindé en cinq embranchements des Microsporidia, Chytridiomycota, Glomeromycota, Zygomycota et Dikarya (Ascomycota et Basidiomycota) dont une grande majorité des champignons endophytes font partie du phylum Ascomycota (**Manoharachary et al., 2021**) (**figure 2**).

2.1.Microsporidia :

Ce phylum regroupe les parasites unicellulaires des animaux et des protistes avec des mitochondries très réduites (**Manoharachary et al., 2021**).

2.2.Chytridiomycota :

Les champignons de ce phylum sont ubiquitaires avec une distribution mondiale. Ils sont caractérisés par la production des spores mobiles capable de se déplacer dans les phases aqueuses grâce à un seul flagelle (**Manoharachary et al., 2021**).

2.3.Glomeromycota :

Les membres de ce phylum forment des mycorhizes à arbuscules avec les plantes supérieures. et sont capables de se reproduire de manière asexuée (**Manoharachary et al., 2021**).

2.4.Zygomycota :

Les membres de ce phylum sont capables se reproduisent de manière sexuée. Avec des méiospores appelées zygozspores et asexuellement avec des sporangiospores (**Manoharachary et al., 2021**).

2.5.Dikarya :

Les Dikarya sont constitués des Ascomycota et des Basidiomycota.

2.6.Ascomycota :

Constituent le plus grand groupe taxonomique au sein des Eumycota. Ces champignons forment des spores méiotiques appelées ascospores, qui sont enfermées dans une structure spéciale en forme de sac appelée ascus (**Manoharachary et al., 2021**).

2.7.Basidiomycota :

Les champignons de ce groupe sont caractérisés par la production des méiospores appelées basidiospores, la plupart des champignons qui appartient à ce phylum sont connus d'être les principaux agents pathogènes des céréales (**Manoharachary et al., 2021**).

Les champignons qui colonisent les tissus des plantes sont largement influencés par les circonstances environnementales qui entourent les plantes hôtes. Tels que le type et le pH du sol, la salinité et la température, la répartition géographique ...etc. L'âge de la plante hôte influe aussi sur la diversité des champignons endophytes (**Fadhela.,2017**).la variation de ces paramètres à un grand impact sur la diversité de champignons endophytes (**Yadav.,2018**).

Les endophytes semblent être plus divers dans les zones tropicales que dans les zones tempérées ou froides du monde (**Fadhela.,2017**).

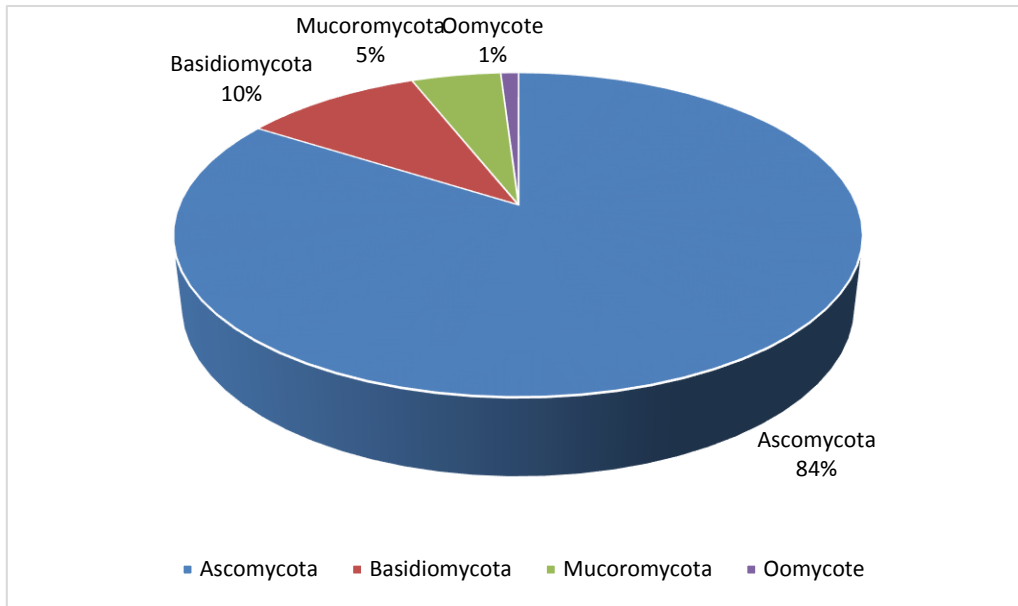


Figure 2 : Abondance des champignons endophytes appartenant à des embranchements divers isolés de différentes plantes (**Rana *et al.*, 2019**).

3. Mode de reproduction et transmission des endophytes

Pour atteindre leur hôte, les champignons endophytes s'aident de deux modes de transmissions différentes verticale et horizontale dont La plupart peuvent se multiplier par les deux types de reproduction (sexuée et asexuée) (**Figure 3**).

- La transmission verticale des champignons endophytes correspond à une reproduction asexuée les hyphes des champignons sont transmis à leur progénitures via des graines. C'est le principal mode de transmission.
- La transmission horizontale se déroule entre plante de la même espèce ou d'espèces différentes ou tout simplement à partir de l'environnement externe via les spores sexuées ou asexuées (**Sopalun *et al.*, 2020**).

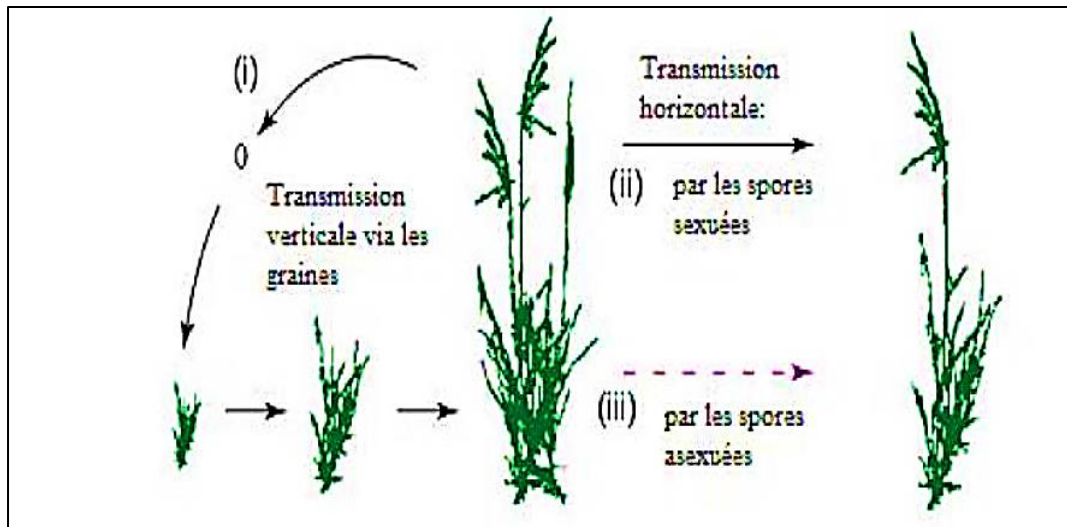


Figure 3: cycle de vie et mode de transmission verticale et horizontale du champignon endophyte (*Saikkonen et al., 2004*).

4. Classification des champignons endophytes

Selon **Rodriguez et al., (2009)**, Les champignons endophytes peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur taxonomie, leur fonction écologique et de leur localisation dans les tissus de l'hôte (**Figure 4**). Le groupe des Clavicipitaceae (C-endophytes) qui infectent certaines graminées et les non clavicipitaceae (NC-endophytes) qui sont prédominants avec les espèces vasculaires et non vasculaires.

4.1. Clavicipitaceae C-endophytes (Class 1)

Incluent des espèces vivantes symbiotiques associées aux insectes et aux champignons ces endophytes se trouvent généralement à l'intérieur des bourgeons et rhizomes. Ex : *Epichloé* et *Balansia*,

Les endophytes de classe 1 augmentent la biomasse des plantes, confèrent une tolérance à la sécheresse et produisent des substances chimiques toxiques contre les envahisseurs.

4.2. Non Clavicipitaceae (NC-endophytes)

Se sont champignons très divers qui représentent trois groupes fonctionnels 2, 3 et 4.

4.2.1. Classe 2 :

Les endophytes de la classe 2 comprennent une diversité d'espèces, ils font parties de l'embranchement Dikarya (Ascomycota ou Basidiomycota). Ces endophytes colonisent les racines, les tiges et les feuilles, ils sont capables de former des infections étendues dans les plantes. Leur transmission est verticale.

4.2.2. Classe 3 :

Les endophytes de classe 3 sont distingués sur la base de leur présence principalement ou exclusivement dans les tissus aériens et les bourgeons. Ils sont également membres de l'embranchement Dikarya (Ascomycota ou Basidiomycota). Les endophytes de cette classe se reproduisent la production des spores sexuée et asexuée. Leur transmission est horizontale.

4.2.3. Casse 4 :

Les endophytes de classe 4 sont principalement les champignons *ascomycètes conidiales* ou stériles qui forment des structures mélanisées telles que des hyphes inter et intracellulaires et des micro sclérotés dans les racines. Leur transmission strictement horizontale.

Tableau 1 : critères symbiotiques qui caractérisent les classes des champignons endophytes (Rodriguez *et al.*, 2009).

Critères	Clavicipitaceae	Non-Clavicipitaceae		
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Classe d'hôte	Limitée	Vaste	Vaste	Vaste
Tissu(s) colonisé (s)	Pousses et rhizome	Pousses, racines et rhizome	Pousses	Racines
Colonisation dans la plante	Extensive	Extensive	Limitée	Extensive
Biodiversité au niveau de la plante	Basse	Basse	Elevée	Inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Verticale et horizontale	Horizontale	Horizontale
Avantages sur la forme de la plante (Fitness)*	NHA	NHA et HA	NHA	NHA

Non adapté à l'habitat (NHA) : Les avantages tels que la tolérance à la sécheresse et l'amélioration de la croissance sont communs aux endophytes, quel que soit leur habitat d'origine. Adapté à l'habitat (HA) : les avantages résultent de la spécificité de l'habitat telles que le pH, la température et la salinité.

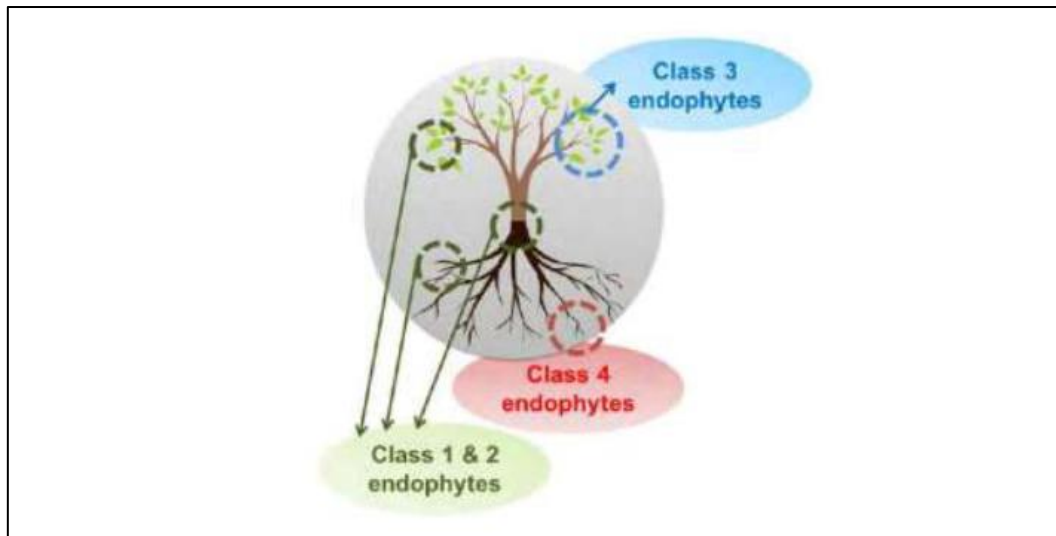


Figure 4: les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés (Pavithra *et al.*, 2012).

5. Interaction endophyte-plante hôte

Les plantes sont naturellement associées avec les micro-organismes de manières diverses. Ces associations sont considéré comme un phénomène écologique (Kulkarni *et al.*, 2014).

Les endophytes entretiennent des relations symbiotiques ou mutualistes avec leur hôte, en raison de leur nature asymptomatique, mais parfois ils peuvent se transformer en saprophytes agressifs ou en pathogènes opportunistes (Kulkarni *et al.*, 2014).

Les relations symbiotiques peuvent être soit obligatoires, c'est-à-dire nécessaires à la survie d'au moins un des organismes impliqués, soit facultatives, lorsque la relation est bénéfique mais pas essentielle à la survie des organismes en interaction (Kulkarni *et al.*, 2014).

Les endophytes peuvent devenir des agents pathogènes des plantes, en fonction du stade de développement de l'hôte et de l'endophyte, des facteurs environnementaux, et les réponses de défense de l'hôte.

L'interaction mutuelle entre les endophytes et les plantes hôtes peut influencer la formation de certains des composés bioactifs ayant des propriétés médicinales, qui peuvent être utilisés par l'homme. Et d'autres impliqués dans la défense de la plante contre les insectes et les herbivores. (Sharma *et al.*, 2020).

La colonisation endophytique peut également améliorer la capacité d'adaptation écologique de l'hôte en améliorant la tolérance aux stress biotiques et abiotiques. Elle joue un rôle important dans la croissance de la plante et augmente la résistance aux agents pathogènes et améliore la production agricole. De plus Les champignons endophytes ont un impact profond sur les plantes

car ils leur permettent de s'adapter aux différents environnements et cela peut augmenter la diversité des endophytes (Kulkarni *et al.*, 2014).

6. Importance et rôle des endophytes

6.1 Importance des endophytes

Les champignons endophytes confèrent à la plante la capacité de résister aux stress biotiques et abiotiques et l'amélioration de l'assimilation des nutriments nécessaires à la croissance de cette dernière (Miral.,2018).

6.2 Rôle physiologique

6.2.1 Les champignons endophytes un puissant agent de lutte biologique

Le stress biotique pourrait être le résultat de la compétition interspécifique, parasites invertébrés, herbivores, les maladies causées par des agents phytopathogènes (Liarzi et Ezra, 2014). Il a été constaté que ces champignons améliorent la tolérance de leurs plantes hôtes (Arnold et Herre, 2003 ; Vega, 2008 ; Rodriguez, 2009). Ces auteurs

- Ont mentionné que les extraits de graines de la fétuque élevée *Festuca arundinacea* infectées par des endophytes inhibent la germination de *Trifolium* spp.
- De même le nombre de trèfle blanc *Trifolium repens* a diminué dans les pâturages dominés par autres plantes infectées par des champignons endophytes (Sutherland et Hoglund, 1989).

6.2.2 Contribution dans la protection contre les parasites invertébrés

6.2.2.1 Protection contre les nématodes

Le champignon endophyte de la tomate *Fusarium oxysporum* souche 162 induit la résistance systématique contre le nématode *R. similis* dans la banane par application combinée avec le champignon *Paecilomyces lilacinus* souche 251 et la bactérie *Bacillus firmus* (Mendoza et Sikora, 2009).

6.2.3 Protection contre les insectes ravageurs

Des études ont mentionné que les métabolites secondaires des champignons endophytes tels que les alcaloïdes contribuent à la toxicité des insectes l'ergovaline et les janthitremes (Siegel *et al.*, 2002).

6.2.4 Contribution dans la protection contre les agents phytopathogènes

Plusieurs mécanismes sont utilisés par les endophytes pour la protection de leurs plantes hôtes contre les agents phytopathogènes (Hanada *et al.*, 2010).

Les champignons endophytes peuvent induire la résistance systémique de leurs plantes hôtes contre les agents pathogènes après avoir pénétré activement et coloniser ces derniers, favorisant la synthèse de composés biologiquement actifs ou provoquant des changements dans la morphologie et / ou la physiologie végétale (**Hanada *et al.*, 2010**).

Métabolites secondaires et bio activité des endophytes

II.Métabolites secondaires et bio-activité des endophytes

1. Métabolites secondaires

Les produits du métabolisme secondaire sont en très grand nombre (**Harmann,2007**). Ils sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces produits, à structure chimique souvent complexe sont très dispersés et très différents selon les espèces. Les produits naturels des endophytes fongiques ont un large spectre d'activité biologique et peuvent être regroupés en plusieurs catégories : alcaloïdes, stéroïdes, terpénoïdes, isocoumarines, quinones, phénylpropanoïdes et lignanes, phénols et acides phénoliques. (**Zhang et al., 2006 ; Elfita et al., 2012 ; Lee et al., 2014 et Shukla et al., 2014**).

❖ Alcaloïdes

- Les alcaloïdes sont des produits naturels qui contiennent de l'azote, habituellement comme étant un élément d'un système cyclique.
- Les alcaloïdes étant en grande majorité des amines, ils sont très facilement oxydés à l'air en *N*-oxydes, ce qui facilite leur dégradation.
- C'est pourquoi ils sont conservés le plus souvent sous forme de sels plus stables (tartrates, citrates, sulfates ou chlorhydrates).
- Ce sont des solides cristallisés sauf la nicotine et la coniine.

❖ Stéroïdes

- Les stéroïdes sont une importante catégorie de lipides, présents dans le règne animal et végétal (le cholestérol, les vitamines, les hormones sexuelles: œstrogène et progestérone, testostérone et androstérone) (**Elhouiti f.,2021**).

❖ Terpénoïdes

Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière primaire végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition) (**Elhouiti f.,2021**).

- ❖ **Les composés phénoliques** : (isocoumarines, quinones, phénylpropanoïdes et lignanes, phénols et acides phénoliques) :

Les composés phénoliques sont des dérivés aromatiques hydroxylés non azotés dont les cycles aromatiques sont issus du métabolisme de l'acide shikimique et/ou de celui d'un polyacétate (**Benarousse k.,2020**).

2. Bio activité des endophytes

Les champignons endophytes sont considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (**Tan et Zou, 2001 ;Strobel et al., 2004**), produisant le plus grand nombre de métabolites secondaires par rapport aux autres catégories de microorganismes (**Zhang et al., 2006**), ainsi qu'une grande diversité structurale comprenant des alcaloïdes (amines, amides...), peptides, stéroïdes, terpénoïdes, phénols, quinones, composés aliphatiques, flavonoïdes etc. (**Yu et al., 2010**). Ces substances naturelles produites par les champignons endophytes possèdent un large spectre d'activité biologique (**Zhang et al.,2006**), comprenant des composés antibiotiques, antifongiques, antiviraux, immunosuppresseurs, agents anticancéreux, antioxydants, insecticides et autres substances biologiquement actives (**Strobel et Daisy, 2003;Strobel et al., 2004**).

- **Activité antibactérienne :**

La fréquence croissante des souches pathogènes multirésistantes a limité l'effet d'un traitement antimicrobien traditionnel, ce qui implique le besoin de nouveaux agents thérapeutiques contre les maladies infectieuses (**Strobel et Daisy, 2003 ;Larsen et al. 2005**). Guanacastepenes dont Guanacastepene A (**Figure 5**), représentent une très grande diversité de diterpénoïdes, ils sont produits par un champignon endophyte, et ont démontré une activité prononcée contre les souches résistantes de *Staphylococcus aureus* (**Brady et al, 2001**).

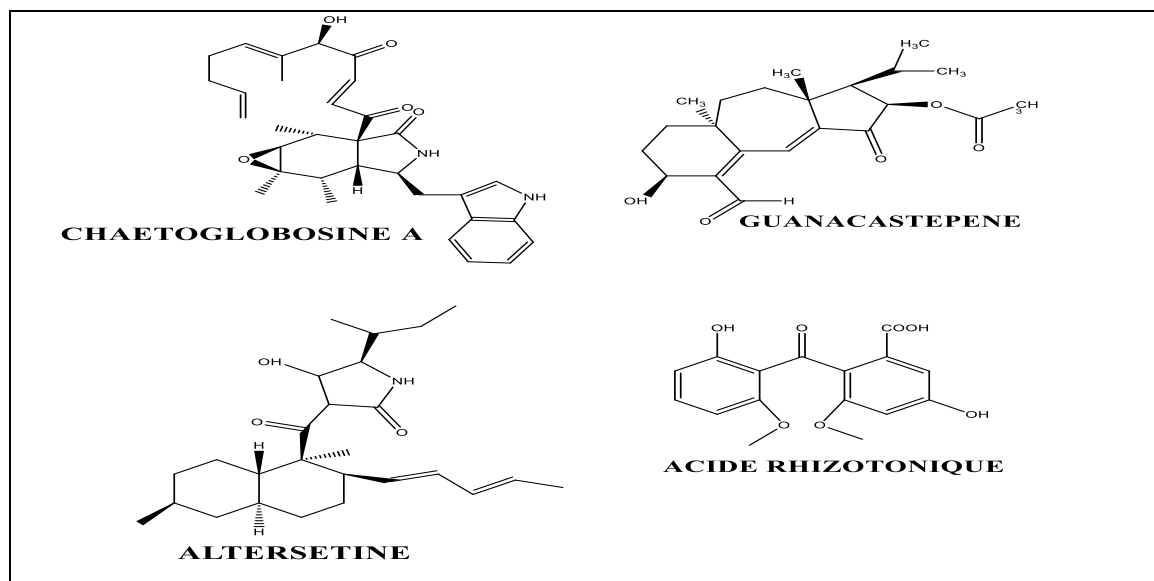


Figure 5: Quelques exemples des substances antibactériennes produites par les champignons endophytes (Chemdraw).

- **Activité antifongique**

Les infections fongiques sont devenues un problème de plus en plus difficile, il est donc nécessaire de trouver de nouvelles substances antifongiques pour lutter contre des maladies (virus du sida et le nombre accru de greffés) (Strobel., 2002). Le cryptocandin, et ses dérivés sont mis à l'étude pour lutter contre certain nombre de maladies fongiques de la peau et des ongles (Strobel *et al.*, 2004).

- **Activité antivirale**

Autre raison, l'émergence de résistance aux médicaments, et de l'épidémie du VIH ainsi que les infections opportunistes associées à cette dernière, il y a xanthoviridicats E et F(Figure 6) qui inhibent la réaction de clivage de l'intégrase du VIH-1, il a été produit par l'endophyte *Penicilium chrysogenum* (Singh *et al.*, 2003).

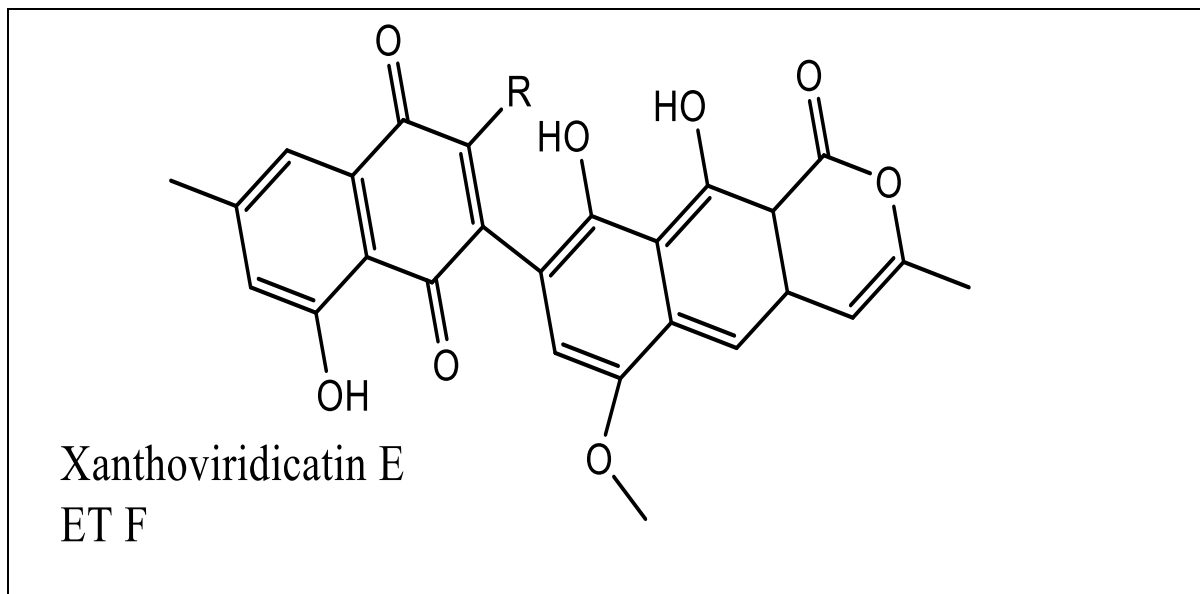


Figure 6: Substance antivirales produites pas les champignons endophytes (Chemdraw).

- **Activité anticancéreuse**

Les médicaments anticancéreux présentent une toxicité non spécifique à la prolifération des cellules normales avec des effets secondaires ; de nombreux produits naturels de plantes ou de microorganismes ont été identifiés en tant qu'agents anticancéreux récemment les endophytes (**Pimentel et al., 2011**).

Le premier médicament anticancéreux produit par les champignons endophytes est le taxol un diterpénoïde qui empêche la dépolymérisation des molécules de tubuline au cours des processus de division cellulaire ce qui réduit ou interrompt leur croissance et leur propagation (**Schiff et Horwitz.,1980**). Isolé initialement de l'écorce de l'arbre *Taxus brevifolia* et se trouvant dans toutes les espèces d'ifs du monde, ce qui a poussé à le chercher dans les champignons endophytes de ces ifs ; et il a été démontré que l'endophyte *Taxomyces andreanae* isolé de *Taxus brevifolia* le produisait.

Le taxol (**Figure 7**) a été trouvé dans un certain nombre de différents genres de champignons endophytes, soit associés ou non aux ifs tels que *P. microspora* (**Strobel et al., 1993**).

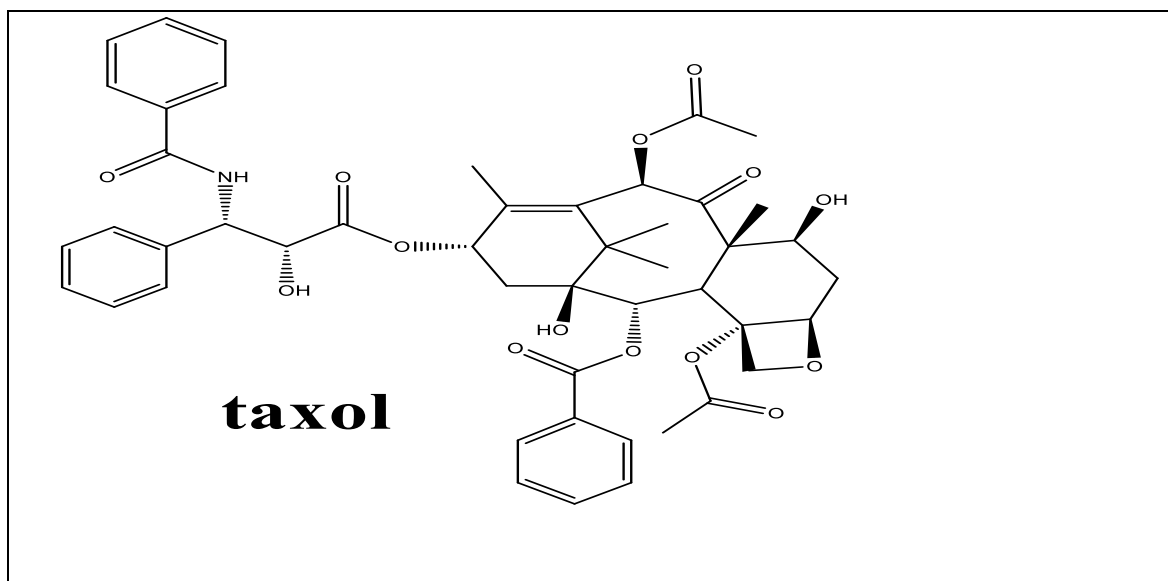


Figure 7: substance anticancéreuse produites par les champignons (Chemdraw).

3. Potentialité enzymatique des endophytes

Les champignons endophytes ont la capacité de produire une large gamme d'enzymes extracellulaires tel que la pectinase , cellulase , lipase ,amylase ,laccase et protéinase. qui jouent un rôle important dans la biodégradation et l'hydrolyse (Sunitha *et al.*,2013), la production de ces enzymes peut être impliquée dans la stratégie de résistance de la plante hôte aux microorganismes ou dans l'amélioration de la nutrition de la plante.(Alberto *et al.*,2016). Les enzymes extracellulaires sécrétées par les champignons endophytes sont d'une grande importance dans les industries biotechnologiques, pharmaceutiques et agro-alimentaires (Mishra *et al.*,2019).

il existe quelques enzymes pertinentes qu'on a examiné dans notre étude. On parle de l'amylase, protéase, lipase et estérase.

- **Protéase :** Les protéases représentent deux tiers des besoins mondiaux en enzymes industrielles. Elles ont une application, notamment dans les processus industriels de biorestauration, les industries pharmaceutiques et alimentaires, Les protéases sont utilisées dans des contextes cliniques, notamment à des fins thérapeutiques, par exemple dans le traitement du diabète. Ces enzymes peuvent être trouvées dans différents organismes, y compris les animaux, les plantes et les micro-organismes, en particulier les champignons (Alberto *et al.*,2016)

- **Amylase** : L'amylase (α -amylases, β -amylases et glucoamylases) représente l'un des groupes d'enzymes les plus importants dans le domaine de la biotechnologie. Une variété d'industries alimentaires, chimiques, détergents, textiles, utilisent des enzymes amylolytiques microbiennes pour convertir l'amidon en différentes solutions sucrées. Plusieurs types d'enzymes sont impliqués dans la dégradation de l'amidon principalement. Les glucoamylases sont courantes chez les champignons, et *Aspergillus ssp.* et *Rhizopus sp.* sont souvent utilisés comme sources d'amylases industrielles (Corrêa *et al.*, 2014).
- **Lipase** : La lipase EC (3.1.1.3) sont des enzymes hydrolytiques qui *in vivo* rompent la liaison ester du triacylglycérol, en libérant des acides gras libres et du glycérol. La lipase microbienne est généralement obtenue à partir de certaines espèces de bactéries et de champignons filamenteux. Cette enzyme présente un potentiel exceptionnel d'utilisation dans les bioprocédés Par exemple, ils sont très stables dans les solvants organiques, ne nécessitent pas de cofacteurs et peuvent agir sur une grande variété de substrats (Corrêa *et al.*, 2014).
- **Estérase** : les estérases (EC. 3.1.1.1 - carboxylestérases) sont largement répandues chez les animaux, les plantes et les micro-organismes, les champignons plus particulièrement. Les estérases catalysent la rupture et la formation des ligands esters. Leur action se limite généralement aux acides gras à chaîne courte solubles dans l'eau. De nombreuses estérases sont commercialisées et utilisées pour la synthèse des composés optiquement actifs de lipides et de détergents.

4. Description des genres endophytes et des microorganismes étudiés

4.1. *Aspergillus ssp*

La première découverte des champignons endophyte *Aspergillus sp* par Nees en 1916, Ce genre contient environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement , génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990 ; Roquebert, 1998). Il est classé parmi les *deutéromycètes Dematiaceae*. Taxonomie basé sur nombreuses classifications.

Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses tel que : *L'Aspergillus flavus* qui peut contribuer de manière significative à différents problèmes de santé associés à la qualité de l'air intérieur. Il peut également causer des pathologies diverses chez l'homme,

incluant des allergies, de l'asthme, une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (**Larone et al., 1987**).

4.2. *Alternaria*

Est un genre comportant approximativement 50 espèces. Il est classé parmi les Dothideomycetes

Alternaria. Est connu mondialement à la fois comme organisme phytopathogène courant et comme allergène aéroporté ; plus particulièrement, l'*A. alternata* est reconnu comme l'espèce aéroallergène type, et, dans une majorité de cas, les problèmes de santé chez les humains et les animaux ont été associés à cette espèce.

Les composants d'*Alternaria* sont reconnus comme étant des allergènes puissants. L'abondance relativement grande des conidies d'*Alternaria* dans l'air extérieur et la prévalence de ce mycète dans les maisons contaminées en font l'une des sources d'allergènes fongiques les plus importantes (**EMLAB et al., 2007**).

l'*Alternaria* a été associé à la maladie nommée poumon du fermier (**do Pico, G et al., 1976**).

4.3. *Cladosporium sp*

Le genre *Cladosporium* est l'un des mycètes environnementaux les plus communs trouvés dans le monde entier (**EMLAB et al., 2007**). Le *C. herbarum* et le *C. cladosporioides* sont les espèces les plus souvent trouvées dans l'environnement; ce sont aussi des espèces communes du milieu intérieur parfois associées à des problèmes de santé (**Flannigan et al., 2002**).

Le genre *Cladosporium* comporte plus de 40 espèces nommées officiellement (Patterson., et al 2009). et 180 souches inscrites dans la banque internationale de données du consortium Universel Protéine Resource (**UniProt Consortium., 2009**).

Les espèces de *Cladosporium* se développent de façon optimale à une température ambiante variant de 18 à 28 °C (**Gravesen et al., 1990**).

Aucun symptôme particulier d'irritation ou d'inflammation n'a été attribué spécifiquement aux espèces de *Cladosporium*.

5. Description des microorganismes étudiés :

Les bactéries sont des organismes microscopiques unicellulaires qui vivent dans divers environnements, ces organismes peuvent vivre dans le sol, l'océan et l'intestin humain. Les bactéries peuvent être classifiées selon deux Gram : Gram + ou Gram - (**Tableau 2**).

Tableau 2: Description des microorganismes étudiés (Belmechri.,2017).

Microorganisme	Gram	Définition	Habitat	Infections hospitalières
<i>E.coli</i>	Gram-	Sont des bacilles forme non sporulée mobile grâce aux flagelles longuer 2à6µm, largeur 1,1à1, 5µm.	Matière fécales Aliments contamines Eau usées	Infection urinaires, et respiratoire Plaies septicémies
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-	Sont des bacilles, 5à3µm de long Largeur 0,5à 0,8µm Mobile à une ciliature type polaire mono-triche	Sol eau plantes voies respiratoire ...	Infection pulmonaire, urinaires....
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	Gram-	Famille des entérobactéries	Matières fécales aériennes supérieur aliments contaminé	Infection pulmonaire, urinaires ...
<i>Staphylooccus aureus</i>	Gram +	Sont des coccidiamètre 0,8-1µm	Peaux chevaux périnée poussières et l'air aliments contaminer	Infection cutanées plaies abcès
<i>Bacillus cereus</i>	Gram +	Constitué de bactéries sporulées et tellurique, ubiquitaire	Sol, l'eau, lait(en poudre)....	Intoxication alimentaire
<i>Condida albicans</i>	Levure	Sont unicellulaire origine de la condidose disséminée	Bouche, tractus gastro-intestinal ...	/

Matériels et méthodes


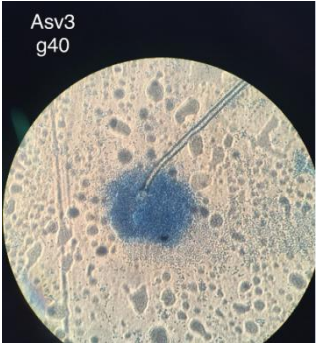
III. Matériel et méthodes


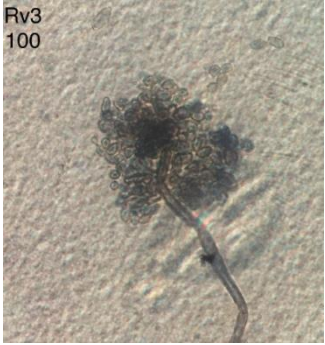

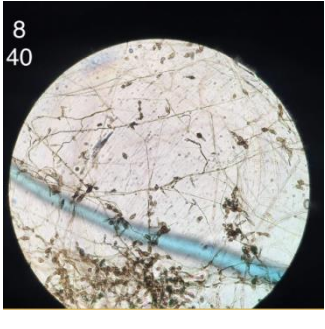
1. Matériels

1.1 Présentation des champignons étudiés

Trois isolats endophytes issus de deux plantes médicinales locales *Astragalus armatus* et *Arthrophytum scoparium* ont fait l'objet de notre étude. Les trois isolats *Aspergillus sp*, *C. cladosporioides*, *Alternaria alternata* ont été cultivés sur milieu PDA à 28°C. Les caractéristiques de chaque isolat et sa taxonomie sont représentées dans (tableau 3) et (tableau4).

Tableau 3: caractéristiques macroscopiques et microscopiques des trois isolats fongiques

Isolats fongiques	Observation macroscopique et microscopique	Description
<i>Aspergillus sp</i>	 <p>Macroscopique</p>  <p>microscopique</p>	<p>Il représente une croissance rapide sur le milieu de culture PDA. La majorité poussent à 22- 25°C ; les espèces thermophiles se développent à 37-40°C, parfois jusqu'à 57°C. Ils forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. Les colonies prennent des teintes caractéristiques, brunes, vertes, jaune ou noires selon les espèces et peuvent synthétiser des toxines tel que les aflatoxines, ochratoxine A, fumagiline, l'acide helvolique, la gliotoxine, les dérivés quinoniques et des alcaloïdes (Tabuc,2007).</p>

<p><i>C.cladosporiode</i> (Suspect)</p>	 <p>macroscopique</p>  <p>microscopique</p>	<p>Ils ont une croissance lente à modérément rapide sur tous les milieux de mycologie. Ils ne sont pas inhibés par le cycloheximide. Ils ne poussent généralement qu'à 20-25 °C, Les colonies ont une texture veloutée ou floconneuse, parfois poudreuse. La couleur va du vert olive au brun noir très foncé, et le revers est brun noir. Les hyphes septés sont pigmentés. Ils produisent des conidiospores (encore plus foncés) et forment de longues chaînes acropètes, ramifiées, réalisant des arbuscules fragiles. Ils synthétisent des toxines (Tabuc.,2007).</p>
<p><i>Alternaria alternata</i></p>	 <p>macroscopique</p>  <p>microscopique</p>	<p>Les colonies apparaissent noires et duveteuses et présentent une texture épaisse, thalles brun-noir, veloutés, portant des spores de reproduction asexuée produites en grosses quantités, rugueuses et sombres, de forme ovale, elliptique et présentent des stries longitudinales et transversales, parfois, une excroissance verruqueuse à l'extrémité des chaînes de spores. Ce genre résiste à la sécheresse (Thomma.,2003). Les espèces d'<i>Alternaria</i> produisent des toxines tel que l'alternariol, l'alternariole monométhyle éther, altenuene, altertoxins I, II, III, tenuazonic acid et bien d'autres métabolites toxiques (Ostry., 2008).</p>

D'après NCBI nos trois isolats suivent la taxonomie du **tableau 4** :

Tableau 4: taxonomie des champignons étudiés.

	ASV3	RV3	8'
Règne	Fungi	Fungi	Fungi
Phylum	Ascomycota	Ascomycota	<i>Ascomycota</i>
Classe	Euascmycetes (Eurotiomycetes)	Dothideomycetes	<i>Euascmycetes (ou Dothideomycetes)</i>
Ordre	Eurotiales	Capnodiales	<i>Pleosporales</i>
Famille	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Davidiellaceae</i>	<i>Pleosporaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Alternaria</i>
Espèce	<i>Aspergillus sp</i>	<i>C.cladosporiode</i>	<i>Alternaria alternata</i>

1.2. Présentation des microorganismes étudiés

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de références ; constitués de Cinq bactéries pathogènes, trois à Gram négatif, deux à Gram positif et une levure (**Tableau 5**) :

Tableau 5 : les souches bactériennes et la souche fongiques étudiés.

Microorganismes	Souches bactériennes	Gram	Code
Bactéries	<i>Bacillus cereus</i>	Positif	ATCC 25921
	<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 6538
	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 8739
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		(IBMC) Strasbourg
Levure	<i>Candida albicans</i>		CIP 444

1.3. Milieux de cultures utilisés

- Le repiquage des champignons endophytes a été effectué sur un milieu (PDA) (voir annexe).
- La culture des bactéries a nécessité l'utilisation de la gélose nutritive (GN) (voir annexe).
- L'évaluation de l'activité enzymatique a nécessité l'utilisation du milieu Glucose Yeast Extract Peptone (GYP) et le milieu Peptone Agar (voir annexe).
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne a nécessité l'utilisation du milieu (MH) Muller Hinton Agar (voir annexe).

1.4. Appareillage

- Autoclave manuelle.
- Étuve à 28°C et 30°C et 37°C (MEMMERT)
- Agitateur vibrant vortex.

- Spectrophotomètre (BIOCHROM Libra S6).
- Agitateur magnétique chauffant
- Stérilisateur (MELAG).
- Becs bunsen.
- Balance.
- Pied à coulisse.

1.5. Verreries et autres matériels

- Verreries : erlenmeyers, béchers, éprouvettes graduées, fiole jaugées, tubes à essais, entonnoir, flacons en verre.
- Autres matériels : boîtes de pétris en plastique, micropipettes, pipettes pasteurs, écouvillon, cuves, gants, bavettes, marqueur, briquet.

1.6. Produits et réactifs

- Sels : chlorure de sodium (NaCl), chlorure de calcium (CaCl₂).
- Réactifs colorés : Lugol.
- Autres produits : agar (LIOFILCHEM), amidon, gélatine, caséine, glucose, extrait de levure, peptone (TM MEDIA), tween 20, tween 80 (SIGMA-ALDRICH), eau distillée.

2. Méthodes

2.1. Activité enzymatique

Notre expérimentation s'intéresse à mettre en évidence les enzymes extracellulaires (amylase, lipase, protéase, estérase) par la digestion des substrats dissous dans des boîtes de gélose après l'inoculation des champignons endophytes et incubation pendant 4-5 jours. La zone de l'activité enzymatique entourant la colonie fongique a été mesurée.

- **L'activité amylolytique**

L'activité amylolytique a été évaluée par l'inoculation des champignons endophytes sur un milieu GYP (Glucose Yeast Extract Peptone Agar) additionné de 2% d'amidon. Après 3-5 jours d'incubation à 28°C et 30°C, les boîtes ont été inondées avec le réactif Lugol (pour mettre en évidence la zone d'hydrolyse de l'amidon). L'apparition d'une zone claire formée autour de la colonie a été considérée comme positive pour la production d'amylase (**Sunitha, et al., 2013**).

- **L'activité protéolytique**

- **Dégradation de la gélatine**

L'activité protéolytique a été évalué par l'inoculation des champignons endophytes sur un milieu GYP (Glucose Yeast Extract Peptone Agar) additionné de 0.4% de la gélatine. Après 3-5 jours d'incubation à 28°C et 30°C. la zone claire formée autour de la colonie indique la présence de la protéase (Sunitha *et al.*, 2013).

- **Dégradation de la caséine**

L'activité protéolytique a été évalué en cultivant les champignons endophytes sur un milieu GYP (Glucose Yeast Extract Peptone Agar) auquel on a ajouté 7ml du lait écrémé stérilisé. Après 3 à 7 jours d'incubation à 28°C et 30°C. L'apparition d'une zone claire entourant la colonie était considérée comme positive pour la protéase (Sunitha *et al.*, 2013).

- **L'activité lipolytique**

Les champignons endophytes ont été cultivés sur un milieu peptone agar, additionné de 1% du tween 20 stérilisé séparément, après 5 jours d'incubation à 28°C et 30°C, une apparition d'une zone claire de la colonie active a indiqué la présence de l'activité lipolytique (Devi *et al.*, 2012).

- **L'activité estérasique**

L'activité estérasique a été mise en évidence par l'inoculation des champignons endophytes sur le milieu peptone agar additionné de 1% du tween 80. Après 5 jours d'incubation à 28°C et 30°C. L'apparition de la zone claire entourant la colonie a été considérée comme positive pour l'estérase (Devi *et al.*, 2012).

2.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

- **Protocole expérimentale**

À fin de déterminer l'activité antimicrobienne de nos isolats fongiques, vis-à-vis de cinq bactéries pathogènes (trois à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (IBMC Strasbourg) et deux à Gram positif : *Bacillus Cereus* (ATCC 25921), *Staphylococcus Aureus* (ATCC 6538) et une levure *Candida albicans* (CIP 444), on a utilisé la méthode de cylindre d'agar.

Chaque bactérie a été ensemencé en stries sur un milieu de gélose nutritive (GN) et ont été incubés pendant 24h à 37°C. Afin d'obtenir des colonies isolées. A l'aide d'un écouvillon, nous avons sélectionné les colonies bien isolées, on les a revivifiés dans des tubes à essais contenant de l'eau physiologique stérile. Les suspensions bactériennes doivent être bien homogénéisé et leur turbidité doit être ajustée entre 0.08 à 0.1 mesurée à 625nm pour obtenir une suspension de charge 10^8 CFU/ml. Ensuite à l'aide d'un écouvillon stérile on a étalé l'inoculum sur toute la surface des boîtes de Pétri contenant la gélose Muller Hinton (MH).

Le prélèvement de trois cylindres d'agar a été effectué à l'aide d'une pipette pasteur stérile à partir d'une culture de champignon endophyte sur PDA, puis ont été déposé sur la gélose MH préalablement inoculée par les bactéries cibles, et finalement incubés pendant 24 heures à une température de 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition apparus autour des cylindres d'agar ont été mesurés en millimètres (**figure 8**).

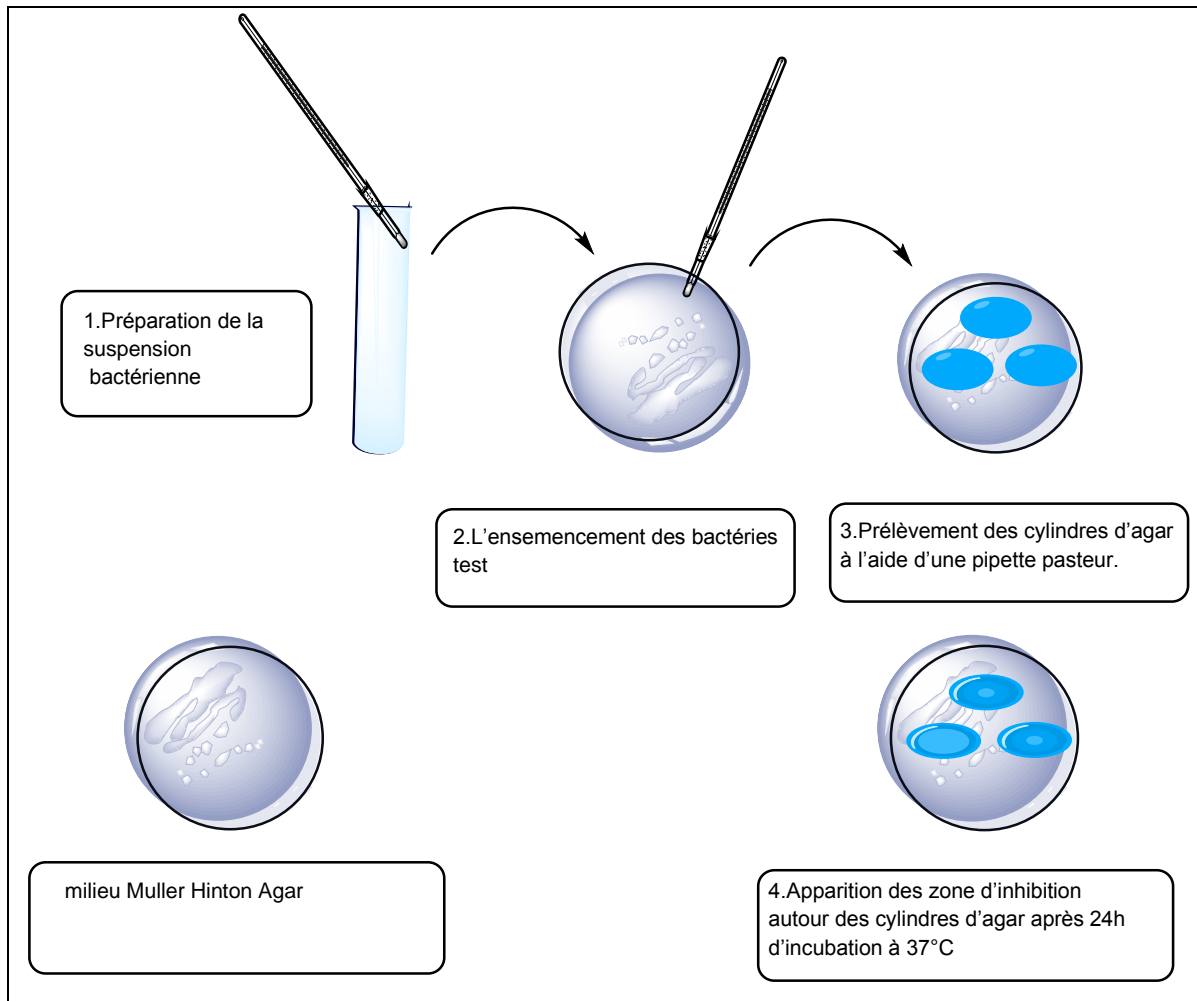


Figure 8: représentation des étapes du protocole de l'activité antimicrobienne (Chemdraw).

Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion

1. Résultats de l'activité enzymatique

La production de quatre enzymes extracellulaire (amylase, protéase, lipase, estérase) par nos trois isolats fongiques a été déterminé par la digestion des substrats dissouts dans des boites de gélose après l'inoculation des champignons endophytes et incubation pendant 4-5 jours de l'activité enzymatique entourant la colonie fongiques a été mesurée (Sunitha *et al.*, 2013).

6.2.5 Activité amylolytique

Tous les isolats fongiques ont montré un résultat positif pour l'activité amylolytique. Ce résultat est traduit par l'apparition des zones claires autour des colonies correspondant à l'hydrolyse d'amidon (**Tableau 6**).

▪ Activité protéolytique

L'activité protéolytique de nos isolats fongique sur deux protéines gélatine et caséine a été mise en évidence par l'apparition d'un halo clair autour des colonies cela indique que tous les isolats fongiques produisent des protéases qui sont impliqué dans la dégradation de la gélatine et la caséine (**Tableau 7**) et (**Tableau 8**).

▪ Activité lipolytique

Les résultats obtenus ont montré un résultat positif pour l'activité lipolytique qui se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies des isolats fongiques testées, une production des cristaux a été également remarquée (**Tableau 9**).

▪ Activité estérasique

Les résultats obtenus ont révélé une activité estérasique des trois isolats fongiques d'endophytes qui sont traduit par l'apparition d'un halo opaque autour des colonies ceux qui indique la dégradation des lipides (**Tableau 10**).

Tableau 6: l'activité amylolytique des trois isolats fongiques.


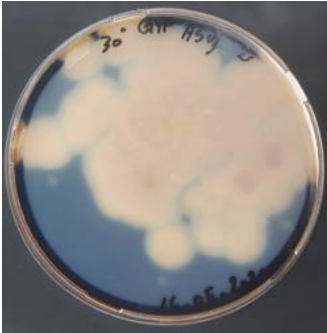

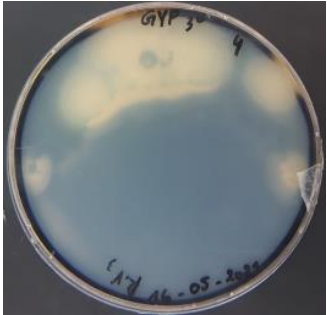
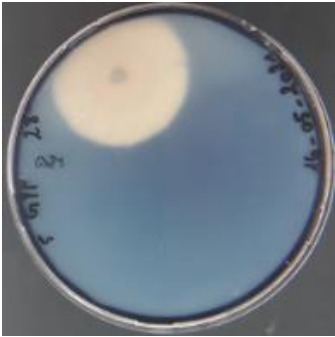
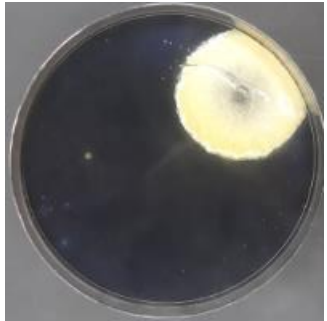
Isolats	Résultat à 28°C	Résultat à 30°C
Asv3		
Rv3		
8°		

Tableau 7: l'activité protéolytique des trois isolats fongiques (gélatine) .




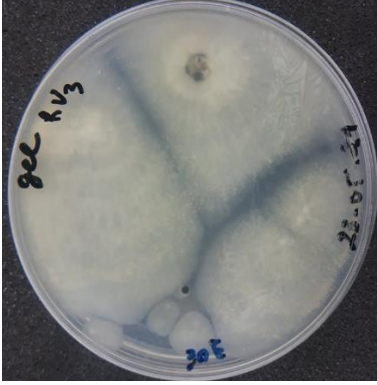
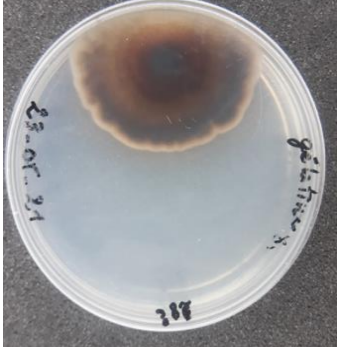
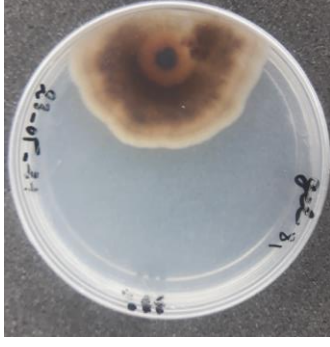
Isolats	Résultat à 28°C	Résultat à 30°C
Asv3		
Rv3		
8'		

Tableau 8: l'activité protéolytique des trois isolats fongiques (caséine).



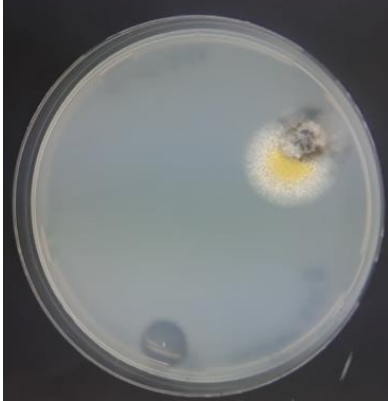



Isolats	Résultat à 28°C	Résultat à 30°C
ASV3		
RV3		
8'		

Tableau 9: l'activité lipolytique des trois isolats fongiques.

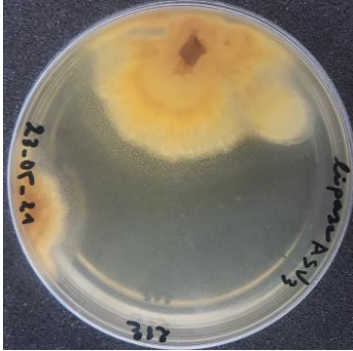

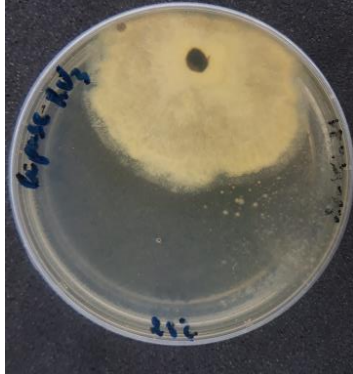
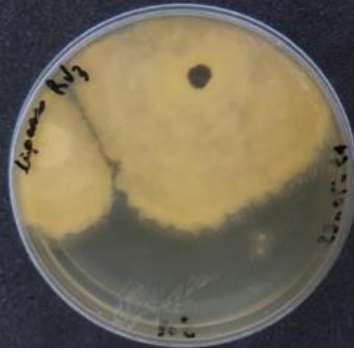
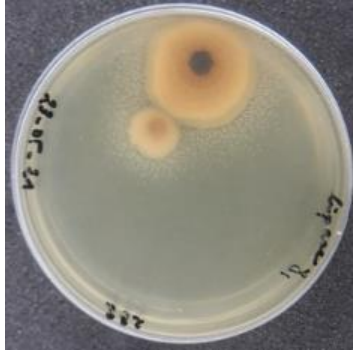
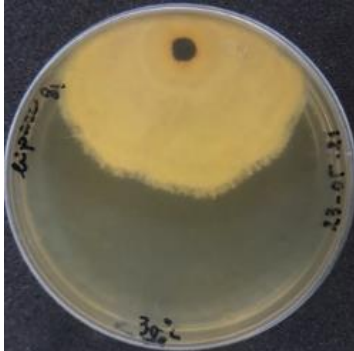
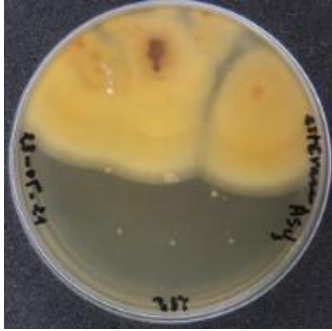
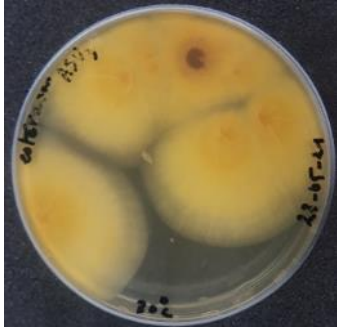
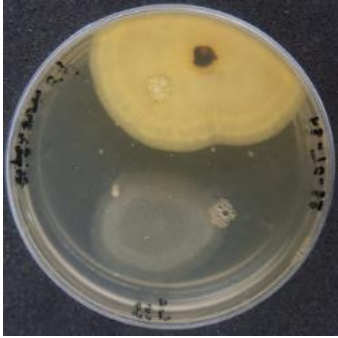
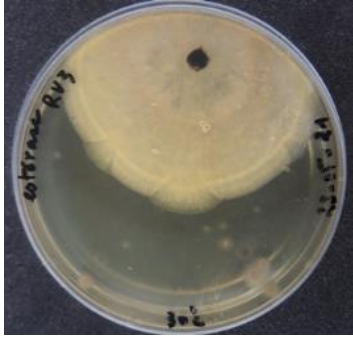

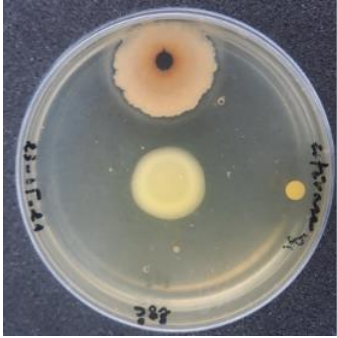
Isolats	Résultat à 28°C	Résultat à 30°C
Asv3		
Rv3		
8'		

Tableau 10: l'activité estérasique des trois isolats fongiques.

Isolats	Résultat à 28°C	Résultat à 30°C
Asv3		
RV3		
8'		

▪ **Effet de la température sur l'activité enzymatique**

Les deux histogrammes de la (**figure 9**) et (**figure 10**) représentent l'effet de la température sur l'activité enzymatique de nos trois isolats fongiques (*Aspergillus ssp*, *Cladosporium*, *Alternaria*) selon deux températures 28°C et 30°C et les différents milieux cités ci-dessus. La croissance et la production des enzymes ont été déterminées par la mesure de diamètre des zones d'activités (Halo).

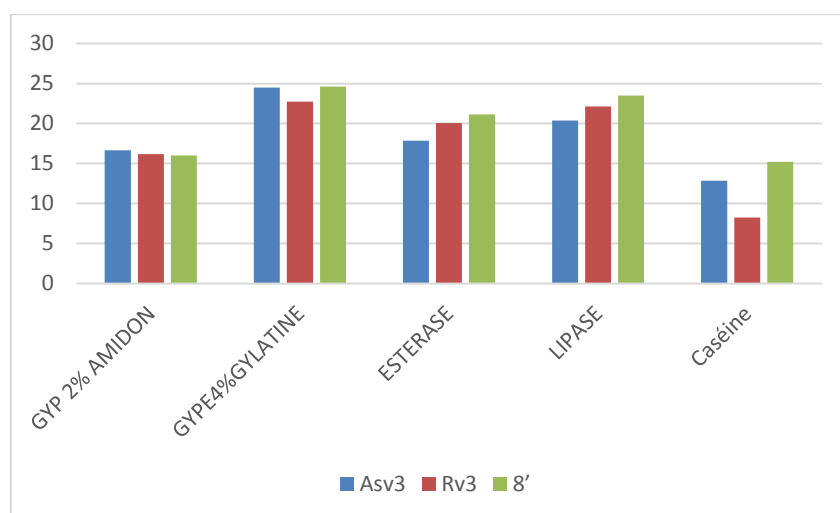


Figure 9: Le diamètre des zones d'activités (Halo) à T28°.

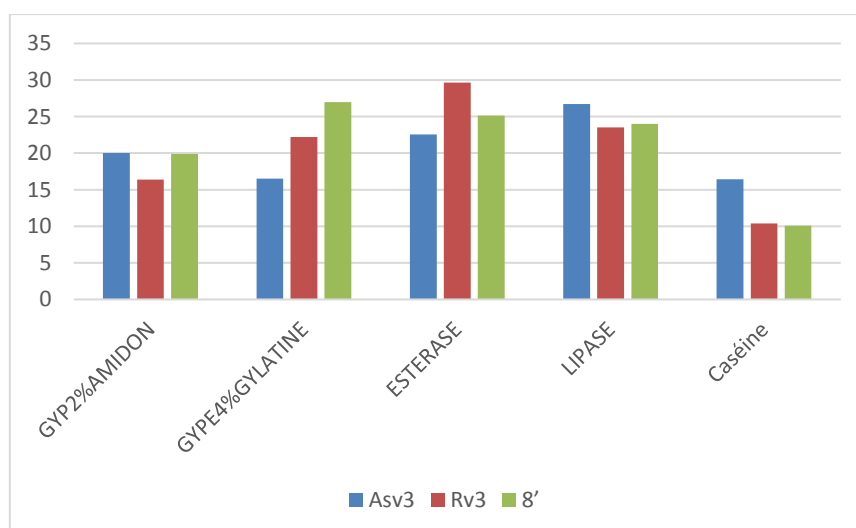


Figure 10: Le diamètre des zones d'activités (Halo) à T30°.

▪ **Résultat :**

- **L'activité amylolytique (milieu GYP + amidon) :** A 28°C les trois isolats fongiques *Aspergillus* ASV3 *Cladosporium* RV3 et *Alternaria* 8' ont montré une faible croissance avec des zones d'activités qui varient entre (16 mm à 17 mm). A 30°C les deux isolats *Cladosporium* et *Alternaria* ont montré une augmentation de croissance avec des zones d'activités supérieures à 20 mm, par contre l'*Aspergillus* est resté constant.
- **L'activité protéolytique :**
 - **Gélatine :** A 28°C les trois isolats fongiques ont montré des zones d'activités importantes de 20 mm. A 30 °C l'*Aspergillus* ssp a montré la zone d'activité la plus faible (16mm).

- **Caséine** : A 30° C l'*Aspergillus* a montré une zone d'activité maximale (16mm) par rapport aux isolats fongiques *Cladosporium* et *Alternaria* qui ont présenté une faible croissance avec des zones d'activité de 10mm. A 28°C l'isolat *Cladosporium* a présenté une faible croissance avec une zone d'activité de 10mm en revanche l'*Alternaria* a montré une zone d'activité maximale de 15mm.
- **L'activité estérasique** : A 30°C les trois isolats fongiques ont présenté une croissance importante de (20mm). A 28°C on a observé une diminution de la croissance de l'*Aspergillus* avec une zone d'activité de (17mm)
- **L'activité lipolytique** : les trois isolats fongiques ont montré une croissance maximale avec des zones d'activité importantes (20 mm) à 28°C et 30°C. La température optimale pour les enzymes (amylase, lipase, estérase) produites par les trois isolats fongique ASV3, RV3, 8' était de 30°C. La température idéale pour la production de la protéase était à 28°C.

D'après les observations ci-dessus, on peut déduire, d'une manière générale, que l'augmentation de la température d'incubation de 28 à 30°C a favorisé la croissance de nos isolats fongiques ainsi que le taux de production d'enzymes. Cet effet est récapitulé dans le tableau suivant (**tableau 11**) selon la sensibilité de chaque activité :

Tableau 11: l'activité enzymatique des trois isolats fongiques. (+++ : Résultat positif important, ++ : résultat positif faible, + : résultat positif très faible)

Activités Enzymatique	ISOLATS	T28C°	T30C°
Amylolytique	ASV3	++	+++
	RV3	++	++
	8'	+	++
Protéolytique	ASV3	++	++
	RV3	+	+
	8'	+	+
Lipolytique	ASV3	++	+++
	RV3	++	++
	8'	+	++
Estérasique	ASV3	++	+++

3. Discussion de l'activité enzymatique

Notre expérimentation mettant en évidence l'activité enzymatique de trois nos isolats fongiques *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* a révélé que la plupart de ces derniers sont capable de produire des enzymes extracellulaires comme l'amylase, protéase (impliqué dans la dégradation de la gélatine et la caséine), lipase, estérase.

Les résultats obtenus se sont avérés positifs pour l'activité amylolytique et lipolytique (**tableaux 5 et 8**), nos trois isolats fongiques ont produit l'amylase et ceci est dû à leur capacité de dégradé l'amidon. En revanche l'activité lipolytique a montré que tous les isolats fongiques ont produit la lipase. Selon **Desire et al., (2014)**, la production de ces deux enzymes (amylase et lipase) a montré que les champignons endophytes utilisent l'amidon qui est une source organique de carbone et les lipides comme source d'énergie.

Concernant la dégradation de la caséine et la gélatine, nos trois isolats fongiques semblent être capables de produire de la protéase. L'isolat *Aspergillus* sp a montré une activité protéolytique plus élevée par rapport au *Cladosporium* et *Alternaria*. La protéase est une enzyme qui effectue une protéolyse, c'est-à-dire qui entame le catabolisme des protéines en hydrolysant les liaisons peptidiques qui relient les acides aminés entre eux dans la chaîne polypeptidique formant la protéine (**Jain et al., 2012**).

Nos échantillons *Aspergillus* *Cladosporium* sp et *Alternaria* semblent avoir une activité estérasique, qui est impliquée dans la dépolymérisation des acides gras et des lipides.

L'effet de température sur l'activité enzymatique de nos trois isolats fongiques qui est représenté sur la (**figure 9 et 10**) a montré que la température idéale de la production enzymatique est de 30°C. Cela a été observé beaucoup plus avec le genre *Aspergillus*. Selon Différentes études, la température est l'une des principaux facteurs affectant le taux de croissance (**Bhattacharyya et al., 2011**).

Selon les travaux de **Choi et al. (2005)**, la production d'enzymes extracellulaires par les endophytes peut être impliquée dans la stratégie de résistance de la plante hôte contre les phytopathogènes. Parmi les souches étudiées, celles appartenant au genre *Aspergillus*, ont également les activités enzymatiques recherchées. Plusieurs endophytes du genre *Aspergillus* ont été signalés comme étant une source d'enzymes amylase, lipase et protéase (**MARIA et al., 2005**).

Il est à signaler que la production des enzymes diffère selon les champignons et répond souvent aux exigences de son habitat. Cela peut être dû aux nombreux facteurs variables chez l'hôte en fonction de l'âge, des facteurs environnementaux, tels que les conditions climatiques et l'emplacement géographique qui peuvent influencer la biologie des champignons. (Sunitha *et al.*,2013).

D'après la littérature, les enzymes issus des champignons endophytes gagnent une importance dans l'agriculture, l'industrie et la santé humaine. Car elles sont souvent plus stables (à haute température et à un pH extrême) que les enzymes dérivées des plantes et des animaux. Les enzymes fongiques sont très utiles dans la fabrication d'aliments, de boissons, de confiseries, de textiles et de cuir et contribuent à simplifier la transformation des matières premières (Maria *et al.*, 2005).

4. Résultats de l'activité antimicrobienne

Dans la présente étude, les trois isolats fongiques ont été dépistés pour leur pouvoir antimicrobien suivant la technique des cylindres d'agar. Les isolats ont montré une activité antimicrobienne plus au moins importante. Les zones d'inhibition autour des cylindres fongiques ont été mesurées après 24h d'incubation. Les résultats sont représentés dans le (Tableau 12) ci-dessous.

➤ Bactéries Gram positif

L'activité antimicrobienne de nos isolats fongiques contre les souches bactériennes à Gram positif a été beaucoup plus remarquable sur les deux espèces *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* dont les plus grandes zones d'inhibitions observés sont celles de *Staphylococcus aureus* (10.46mm) (Figure 12) et *Bacillus cereus* (8.5mm) (Figure 11) en présence de *Aspergillus ssp* ASV3.

Parmi les trois isolats fongiques étudiés *Cladosporium* RV3 et *Alternaria* 8' n'ont montré aucune activité inhibitrice envers *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

➤ Bactéries Gram négatif

L'activité antimicrobienne de nos isolats fongique a été également testée sur trois souches bactériennes à Gram négatif *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Ces derniers se sont avérés résistants car aucune zone d'inhibition n'a été remarquée.

➤ **Activité antifongique**

L'activité antimicrobienne de nos isolats fongiques a également été testée sur une levure *Candida albicans*. Parmi les trois isolats fongiques l'*Alternaria* 8' a pu montrer un effet antimicrobien contre la souche fongique *Candida albicans* qui se traduit par une zone d'inhibition moyennement importante (13.90mm) (**Figure13**). En revanche les deux isolats fongiques *Aspergillus ssp* ASV3 et *Cladosporium* RV3 ont montré aucune zone d'inhibition.

Tableau 12: résultats de l'activité antimicrobienne.

Champignons Endophytes	Zones d'inhibition en (mm)					
	Bactéries Gram positif		Bactéries Gram négatif			Souche fongique
	Bc	Staph	E.c	Keb	Pseudo	C.a
ASV3	8.5	10.46	0	0	0	0
RV3	0	0	0	0	0	0
8'	0	0	0	0	0	13.90

0 = absence de l'activité antimicrobienne.

Ci-dessous quelques photos représentant l'activité antimicrobienne vis-à-vis des deux souches *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* et de la levure *Candida albicans*.



Figure 11: activité antimicrobienne des isolats fongiques étudiés sur *Bacillus Cereus*.



Figure 12: activité antimicrobienne des isolats fongique étudiés sur *Staphylococcus aureus*



Figure 13: activité antimicrobienne des isolats fongiques étudiés sur *candida albicans*.

4. Discussion de l'activité antimicrobienne

Dans notre étude l'activité antimicrobienne de nos trois isolats fongiques a été évalué par la méthode des cylindres d'agar contre cinq souches bactériennes deux à Gram positif, trois à gram négatif et une levure *candida albicans*.

Parmi les champignons endophytes étudiés, l'isolat *Aspergillus sp* ASV3 a montré une activité antimicrobienne contre *staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* et l'isolat *Alternaria 8'* a eu une activité sur *candida albicans*. Cela peut révéler l'énorme potentiel de production de composés bioactifs avec des propriétés antimicrobiennes par les champignons endophyte (Santos et al., 2015). En revanche l'endophyte du genre *Cladosporium* RV3 n'a

pas montré une activité contre les souches testées. Cela peut être expliqué par le fait que les métabolites secondaires produites par ce champignon n'ont aucun effet sur les souches bactériennes testés (**Karaoui, 2017**).

Le champignon endophyte ASV3 du genre *Aspergillus ssp* semble avoir une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positifs plus importante que celle contre les bactéries à Gram négative. Selon **Amina et al., (2017)**, ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que ces deux groupes de micro-organismes diffèrent morphologiquement, parce que les bactéries Gram négatif possèdent une membrane externe polysaccharidique portant les composants structurels du lipopolysaccharide ce qui rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries Gram-positives, qui sont plus sensibles car elles ne possèdent qu'une couche externe de peptidoglycane qui ne constitue pas une barrière de perméabilité efficace.

D'après **Kumar et al., (2014)**, les endophytes sont censés mettre en œuvre un mécanisme de résistance pour surmonter l'invasion et inhiber les microorganismes nocifs qui peuvent causer des maladies pour les végétaux, animaux et même pour l'homme en produisant une grande variété de molécules bioactives ayant une activité antimicrobienne.

Les champignons endophytes présentent une grande diversité d'adaptation microbienne, et sont une bonne source d'étude et de recherche de nouveaux médicaments pour la médecine, l'industrie et l'agriculture (**Santos et al., 2015**).

Conclusion

Conclusion

Les champignons endophytes sont des micro-organismes présents dans les tissus vivants de diverses plantes en établissant une relation mutuelle sans provoquer de symptômes d'infection. Ces champignons sont considérés comme une source riche de métabolites bioactifs qui ont un potentiel important utilisé en médecine, en agriculture et en industrie.

L'objectif fixé de cette étude est l'évaluation de l'activité enzymatique de trois champignons endophytes *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus ssp* isolées de deux plantes médicinales ainsi que leur pouvoir antimicrobien.

D'après nos résultats expérimentaux, l'évaluation de l'activité enzymatique a montré que les champignons endophytes testés sont capables de synthétiser une large gamme d'enzymes tels que (l'amylase, protéase, lipase, estérase) et ceci est dû à leur capacité de dégrader l'amidon, la gélatine, la caséine et les lipides, respectivement c.-à-d. Démontrent une variété d'activité biologique.

Concernant l'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos trois champignons endophytes vis-à-vis de cinq bactéries pathogènes dont trois à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et deux à Gram positif : *Bacillus Cereus*, *staphylococcus Aureus* et une levure *candida albicans*, un pouvoir antimicrobien remarquable envers au moins une souche de ce dernier a été observé.

En perspective, notre étude n'est qu'une étape préliminaire pour des études ultérieures, plus approfondies et plus accomplies dont nous suggérons les points suivants :

- L'optimisation de la production enzymatique par ces champignons endophytes
- La Recherche de l'activité antimicrobienne des endophytes sur d'autres souches pathogènes.
- Tester d'autres activités biologiques telles que l'activité antioxydante.

Références bibliographiques

A

- **Abdalla, M. A., Aro, A. O., Gado, D., Passari, A. K., Mishra, V. K., Singh, B. P., & McGaw, L. J. (2020).** Isolation of endophytic fungi from South African plants, and screening for their antimicrobial and extracellular enzymatic activities and presence of type I polyketide synthases. *South African Journal of Botany*, 134, 336-342.
- **Arnold A.E., & Herre E.A., 2003b.** Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao*(*Malvaceae*). *Mycologia.*, **95**:388-398.
- **Ahmad F., Ahmad I., Aquil F., Khan M. S. et Hayat S., 2008.** Diversity and potential of non-symbiotic diazotrophic bacteria in promoting plant growth. In: Plant- Bacteria Interactions (Ahmad, I., Pichtel, J. and Hayat, S.), ed., 81-82.
- **Alves M. H., Takaki G. M. C., Porto A. L. F. and Milanez A. I.** Screening of *Mucor* spp. For the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002; **33**: 325-330.;(2018-2019)thèse de mémoire etude de l'activité antimicrobienne et enzymatique des endophytes isolés d'arthrophytume scoparium.
- **Amina, B., Sana, G., Atef, J., Laid, D., & Noredine, K. C. (2017).** Antibacterial activity of *Aspergillus* isolated from different Algerian ecosystems. *African Journal of Biotechnology*, 16(32), 1699-1704.
- **Alberto, R. N., Costa, A. T., Polonio, J. C., Santos, M. S., Rhoden, S. A., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. (2016).** Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. *Genet Mol Res*, 15(4), gmr15049016.
- **AOUARIB K. et LEMSARA R. (2016).** Etude des activités antimicrobienne et enzymatique des champignons endophytes isolés à partir d'*Artemisia absinthium*. Diplôme de Master Académique, Université KASDI Merbah, Ouargla, Algérie.

B

- **Bara R. A., Ilka Z., Daowan L., Weihan L., Debbab A., Brötz-Oesterelt H. et Proksch P., 2013.** New Natural Product from *Botryosphaeria australis*, an

Endophyte from Mangrove *Avicennia marina*. *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology*, 8 (3): 139-145 94.

- **Bacon C. W. et Hill N. S., 1996.** Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. In: Redkin, S.C. and Carris, L.M. (eds) *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*. APS Press, St Paul, Minnesota, 155-178.
- **Brundrett, M. C. (2006).** Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In *Microbial root endophytes* (pp. 281-298). Springer, Berlin, Heidelberg.
- **Belmecheri nassima hiba .,2017 .**Activité antimicrobienne des extraits phénoliques de trois plantes médicinales de l'Atlas algérien (page29-32).
- **(Benarousse k.,2020.** Cours de Métabolites secondaire, p2-5)

C

- **Corrêa, R. C. G., Rhoden, S. A., Mota, T. R., Azevedo, J. L., Pamphile, J. A., de Souza, C. G. M., ... & Peralta, R. M. (2014).** Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(10), 1467-1478.
- **Choi YW, Hodgkiss IJ and Hyde KD (2005).** Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *International J.Agric. Technol.* 1: 55-66.

D

- **Devi, N. N., Prabakaran, J. J., & Wahab, F. (2012).** Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), S1280-S1284.
- **Desire, M. H., Bernard, F., Forsah, M. R., Assang, C. T., & Denis, O. N. (2014).** Enzymes and qualitative phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Lantana camara* Linn. Leaves. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 2(06), 1-6.
- **DoPico, G. A., Reddan, W. G., Chmelik, F., Peters, M. E., Reed, C. E., and Rankin, J. (1976).** The value of precipitating antibodies in screening for hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis.* 113[4], 451-455.

E

EMLAB. (2007). Environmental Microbiology Laboratory, Inc. (EMLab): An index of some commonly encountered fungal genera.. Al-Doory, Y and Domson, JF. (1984). Mould allergy. Lea & Febiger.

- **Ernst M., Mendgen K. W. et Wirsal S. G. R., 2003.** Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. *Mol. Plant–Microbe Interact.*, 16: 580-587.

F

- **FADHELA, M. M. (2017).** *Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.)* (Doctoral dissertation, ENSA).
- **Flannigan, B., Samson, R. A., and Miller, J. D. (2002).** Microorganisms in home and indoor work environments: diversity, health impacts, investigation and control. -504 p. CRC Press.

G

- **Gravesen, S., Frisvad, J. C., and Samson, RA. (1994).** Microfungi. 1st edition, -168 p. Copenhagen, Munksgaard.

H

- **Harman G. E., 2007.** Overview of Mechanisms and Uses of Trichoderma spp., *Phytopathology*, 96 (2): 190-1
- **Haddar-Chehrit, H. (2017).** *Contribution à l'identification des mycoendophytes racinaires de l'Oléastre (Olea europaea ssp sylvestris) de Tizi-Rached (Tizi-Ouzou)* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- **Haddadi, M., & Hamrani, T. (2017).** *Activités amylolytiques et protéolytiques de certains champignons endophytes foliaires issus de l'ortie (Urtica dioïca L.)* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

J

- **Joseph, B., & Priya, R. M. (2011).** Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in. *American Journal of biochemistry and Molecular biology*, 1(3), 291-309.

K

- **Khiralla, A. (2015).** *Phytochemical study, cytotoxic and antibacterial potentialities of endophytic fungi from medicinal plants from Sudan* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- **Kulkarni, N., Dalal, J., & Bodhankar, M. (2014).** Microbial Endophytes: Ecology and Biological Interactions. *International Journal of Research in Agricultural Sciences*, 1(5), 2348-3997.
- **Kumar, S., Aharwal, R. P., Shukla, H., Rajak, R. C., & Sandhu, S. S. (2014).** Endophytic fungi: as a source of antimicrobials bioactive compounds. *World J Pharm Pharm Sci*, 3(2), 1179-1197.
- **Kirkpatrick T. L., 2000.** Endophyte effects on reproduction of a root-knot nematode (*Meloidogyne marylandi*) and osmotic adjustment in tall fescue. *Grass Forage Sci.*, 55: 166-172. **Languereau-Leman F., 2002.** La tolérance aux métaux lourds d'*Arrhenatherum elatius* (L.) Beauv. ex J. & C. Presl.; influence des endophytes racinaires fongiques sur le développement végétatif et la bioaccumulation. *Acta Botanica Gallica*, 149 (1): 123-127.

L

- **Lisboa, H. C. F., Biasetto, C. R., Medeiros, J. B. D., Araújo, Â. R., Silva, D. H. S., Teles, H. L., & Trevisan, H. C. (2013).** Endophytic fungi producing of esterases: evaluation in vitro of the enzymatic activity using pH indicator. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 923-926.
- **Liarzi O., & Ezra D., 2014.** Endophyte-Mediated Biocontrol of Herbaceous and Nonherbaceous Plants. *Advances in Endophytic Research.*, 18:335-356.

- **Loguercio L.L., & Pereira J.O., 2010.** Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and bio-control of black-pod disease. *Fungal Biology.*, 114:901-910
- **Liu C. H., Zou W. X., Lu H. et Tan R. X., 2001.** Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*, 88: 277-282.
- **Larone, D H. (1987).** Medically important fungi. A guide to identification. 2nd edition, -230 p. New York - Amsterdam - London, Elsevier Science Publishing Co., Inc.

M

- **Manoharachary, C., & Deshaboina, N. (2021).** Biodiversity, taxonomy and plant disease diagnostics of plant pathogenic fungi from India. *Indian Phytopathology*, 1-11
- **Malhadas, C., Malheiro, R., Pereira, J. A., de Pinho, P. G., & Baptista, P. (2017).** Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 46.
- **Mishra, R., Kushveer, J. S., Revanthbabu, P., & Sarma, V. V. (2019).** Endophytic fungi and their enzymatic potential. In *Advances in Endophytic Fungal Research* (pp. 283-337). Springer, Cham.
- **Miral A., 2018. Helichrysumitalicumet ses micomycetes endophytes :** Diversité et biotransformations. Université Toulouse III Paul Sabatier. 1-132.
- **Mendoza A.R., & Sikora R.A., 2009.** Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. *Biocontrol.*, **54**:263-272.
- **Maria G. L., Sridhar K. R. and Raviraja N. S.** Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology* 2005; **1**: 67-80.

O

- **Obledo E. N., Barragan-Barragan L. B., Gutierrez-Gonzalez P., Ramirez-Hernandez B. C., Ramirez J. J. et Rodriguez-Garay B., 2003.** Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 74: 237-241.

P

- **Patterson, T. F., McGinnis, M. R., and ed. (2009).** The fungi :description. Site Doctor Fungus . Mycoses Study Group.
- **Prathyusha, P., Sri, A. B. R., & Prasad, K. S. (2015).** Diversity and enzymatic activity of foliar endophytic fungi isolated from medicinal plants of Indian dry deciduous forest. *Der Pharmacia Lettre*, 7(8), 244-251.
- **Pawle, G., & Singh, S. K. (2014).** Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of *Nigrospora* isolated from living fossil *Ginkgo biloba*. *Curr Res Environ Appl Mycol*, 4(1), 1-9.

R

- **Rana, K. L., Kour, D., Sheikh, I., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, V., ... & Saxena, A. K. (2019).** Biodiversity of endophytic fungi from diverse niches and their biotechnological applications. *Advances in endophytic fungal research*, 105-144.
- **Rodriguez R. J., White J. F., Arnold A. E. et Redman R. S., 2009.** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182 (2): 314-330.
- **Rodriguez R. et Redman R., 2008.** More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 59 (5): 1109-1114
- **Redman R. S., Ranson J. C. et Rodriguez R. J., 1999.** Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 12: 969-975.

- **Redman R. S., Dunigan D. D. et Rodriguez R. J., 2001.** Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader ? *New Phytologist*, 151: 705-716.

S

- **Singh L. P., Gill S. S. et Tuteja N., 2011.** Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (2): 175-191.
- **Sieber T. N., 2002.** Fungal root endophytes. In: *Plant Roots: The Hidden Half*, 3rd ed., rev. and expanded (Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (eds, New York, Basel: Marcel Dekker, 887-917.
- **Sutherland B.L., &Hoglund J.H., 1989.** Effect of ryegrass containing the endophyte (*Acremonium lolii*) on the performance of associated white clover and subsequent crops. *Proceeding of New Zeland Grassland Association.*, **50**:265-269.
- **Sunitha, V. H., Nirmala Devi, D., & Srinivas, C. (2013).** Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, 9(1), 1-9.
- **Santos, I. P. D., Silva, L. C. N. D., Silva, M. V. D., Araújo, J. M. D., Cavalcanti, M. D. S., & Lima, V. L. D. M. (2015).** Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). *Frontiers in microbiology*, 6, 350.
- **Sharma, A., Malhotra, B., Kharkwal, H., Kulkarni, G. T., & Kaushik, N. (2020).** Therapeutic agents from endophytes harbored in Asian medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19, 691-720.
- **Sopalun, K., & Iamtham, S. (2020).** Isolation and screening of extracellular enzymatic activity of endophytic fungi isolated from Thai orchids. *South African Journal of Botany*, 134, 273-279.
- **Sirguey, C., & Blaudez, D. (2019, November).** Effet des champignons endophytes sur le potentiel de phytoextraction de *Noccaea caerulea* (Projet Endoextract). In *4ème Rencontres Nationales de la Recherche sur les Sites et Sols Pollués 2019* (pp. 5-9).

- **Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., & Gopalan, V. (2012).** Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity*, 54(1), 19-30.
- **STROBEL. G, DAISY B, CASTILLO. U AND HARPER. J, (2004)-** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67: pp 257-268.
- **STROBEL. G. A, (2002).** Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*.22: pp315-333.
- **Elhouiti f.,2021** .cours les huilles esentielles .p 2-25).

T

- **Tan R. X. et Zou W. Z., 2001.** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 448-459.

U

- **UniProt Consortium. (2009).** Taxonomy : fungi metazoa group. Site de UniProt . 4-6-2009.

V

- **Vega F.E., Posada F., Aime M.C.,Ripoll M.P., Infante F., &Rehner S.A., 2008.** Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control.*, 46:72-82
- **Vázquez-de-Aldana B. R., García-Criado B, Zabalgoceazcoa I. et García-Ciudad G., 1999.** Influence of fungal endophyte infection on nutrient element content of tall fescue. *J. Plant Nutr.*, 22, 163-176. **Elmi A. A., West C. P., Robbins R. T. et**
- **Venieraki, A., Dimou, M., & Katinakis, P. (2017).** Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. *Hellenic Plant Protection Journal*, 10(2), 51-66.

Y

- **Yadav, A. N. (2018).** Biodiversity and biotechnological applications of host-specific endophytic fungi for sustainable agriculture and allied sectors. *Acta Sci Microbiol*, 1(5), 01-05.

Z

- **Zerroug, A. (2018).** *Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de retama raetam Forssk* (Doctoral dissertation).
- **Zhang H. W., Song Y. C. et Tan R. X., 2006.** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports.*, 23: 753-771.

Annexes

Milieu PDA

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

Glucose yeast extract peptone GYP + Amidon

Glucose.....	1g
Extrait de levure	0.1g
Peptone	0.5g
Agar.....	16g
Amidon.....	2%
Eau distillée.....	1000ml

Glucose yeast extract peptone GYP+ gélatine

Glucose.....	1g
Extrait de levure	0.1g
Peptone	0.5g
Agar.....	16g
Gélatine.....	4%
Eau distillée.....	1000ml

Glucose yeast extract peptone GYP + caséine

Glucose.....	1g
Extrait de levure	0.1g
Peptone	0.5g
Agar.....	16g
Lait écrémé	7ml
Eau distillée.....	200ml

Milieu estérasique

Peptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Dichlorure de calcium hydrolyse	0.1g
Agar.....	16g
Tween20.....	1%

Eau distillée1000ml

Milieu lipolytique

Peptone.....10g

Chlorure de sodium.....5g

Dichlorure de calcium hydrolyse0.1g

Agar.....16g

Tween80.....1%

Eau distillé1000ml

Milieu Muller Hinton Agar

Agar16g

MH Broth2.....38g

Eau distillé1000ml

Milieu gélose nutritive

Peptone10g

Chlorure de sodium5g

Agar.....20g

Eau distillé1000ml

Eau physiologique

Nacl.....9 g

Eau distillée.....100ml

