

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Activités antimicrobiennes et enzymatiques de champignons
endophytes isolés d'*Arthrophytum scoparium***

Présenté par
BENTIRECHE Meriême

Membres de jury :

Président	Mr ZERROUKI Mohamed Hocine	MAA
Examineur	Mr BERRAMDANE Tayeb	MAA
Encadreur	Mr BOUBRIMA Youcef	MAA
Co-encadreur	Melle RENANE Zohra	/

Année Universitaire 2018/2019

Résumé

Résumé

Notre étude vise à tester l'activité antimicrobienne et enzymatique de certains champignons endophytes isolés à partir d'*Arthrophytum scoparium*, une plante médicinale collectée de la région de Laghouat.

L'activité antimicrobienne a été effectuée sur trois bactéries Gram positif *Bacillus cereus* ATCC 25921, *Bacillus subtilis* ATCC 10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, et trois bactéries Gram négatif, *Klebsiella pneumoniae* IBMC Strasbourg, *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et sur une levure pathogène (*Candida albicans* CIP 444) par la technique des cylindres d'agar. Nos champignons étudiés présentent au moins une activité antimicrobienne au contact de l'un des microorganismes testés.

La production d'enzymes extracellulaires (l'amylase, la protéase, lipase, cellulase et l'estérase) a été recherchée et déterminée pour nos isolats fongiques par la digestion du substrat dissous dans la gélose. La production de ces enzymes diffère selon le type de milieu de culture et le type de champignons mise en évidence.

Mots clés : champignons endophytes , *Arthrophytum scoparium*, activité antimicrobienne, activité enzymatique , *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* , *Klebsiella pneumoniae* , *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط ضد الميكروبي والانزيمي لبعض الفطريات الداخلية والمعزولة من عشبة طبية تتمثل في الرمث التي تم الحصول عليها من منطقة الاغواط.

تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات الفطرية على ثلاث أنواع من بكتيريا موجبة الجرام (*Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) ونوعين من البكتيريا سالبة الجرام (*Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae*) و *Candida albicans* و *Pseudomonas aeruginosa*) وخميرة واحدة ممرضة بواسطة تقنية أسطوانة أقار. كل هذه الفطريات المستعملة اثبتت نشاطا مضادا لبعض الميكروبات الممرضة المستعملة في هذه التجربة.

كشفت هذه الدراسة على ان الفطريات المستعملة لديها انتاج انزيمي خارج خلوي معتبر متمثل في (أميلاز، بروتياز، ليباز، سيليلاز، أستيراز) والذي هو ناتج عن هضم المواد المذابة داخل الوسط الغذائي. إن إنتاج هذه الإنزيمات يختلف من فطر إلى آخر، و يختلف أيضا باختلاف وسط الزرع ونوع الفطر الخاضع للتجربة.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية ، الرمث ، الأنشطة المضادة للميكروبات، الأنشطة الإنزيمي.

Summary

Our study aims to test the antimicrobial and enzymatic activity of certain endophytic fungi isolated from *Arthrophytum scoparium*, a medicinal plant collected from the Laghouat region.

The antimicrobial activity was carried out on three Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus* ATCC 25921, *Bacillus subtilis* ATCC 10876 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538), three Gram-negative bacteria, (*Klebsiella pneumoniae* IBMC Strasbourg, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) and on a pathogenic yeast (*Candida albicans* CIP 444) by the technique of agar cylinders. Our fungi showed at least one antimicrobial activity in contact with one of the microorganisms tested.

The production of extracellular enzymes (amylase, protease, lipase, cellulase and esterase) was investigated and determined for our fungal samples by digestion of the substrate dissolved in the agar. The production of these enzymes differs according to the culture media and the highlighted fungal type.

Key words:

endophytic fungi, *Arthrophytum scoparium*, antimicrobial activity, enzymatic activity, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

Dédicaces

Sur le chemin de la vie, il nous arrive de tomber mais on se lève, aussi tôt on poursuit le parcours et on va de l'avant suivant nos ambitions qui ne cessant de grandir à chaque passage attendant le jour de leur réalisation après tant d'efforts fournis pour ce fait.

Aujourd'hui, je suis ici pour présenter la synthèse de mes aspirations depuis l'instant où j'ai appris à tenir le stylo entre mes mains et comment laisser des traces d'écriture sur le papier. A présent, de beaux souvenirs traversent mon esprit, et une pensée à ceux qui m'ont tant soutenue et aidée, pour leur dédier ce modeste travail : Je remercie tout d'abord **ALLAH**

Je le dédie à mon grand-père **BEN OUMRAN YAHIA CHEREF** " que La miséricorde de Dieu soit sur lui" et mes grandes-mères

Mon cher père, pour tous les sacrifices qu'il a consentis pour mon éducation et m'a donné une bonne vie pour que soit discipliné, qu'ALLAH vous garde, vous comble de santé, et vous donne une longue vie. A mes fiertés, mon espoir, ma raison d'être ma mère en reconnaissance de mon amour et tendresse.

A mes oncles et mes tantes **IBRAHIM, HAFNAOUI, MERZAKA**

A ma sœur, camarade et copine de mon parcours, **DJOUHINA**.

A mon frère et mes sœurs commençant par : **KHALILE –IMANE–DJAMILA** et **KHAOULA** et la perle de notre maison **LINA**, sans oublier le mari de ma sœur **SALMI TAHAR** pour son aide au cours de la réalisation de ce mémoire.

Je le dédie à tous mes camarades et amies.

Je conclus par la prière sur notre cher prophète "El Moustapha" que le salut du Dieu soit sur lui.

BENTIRECHE Meriém

Remerciements

Avant tout, louange à DIEU qui m'a donné la santé, la force et le courage dans la vie et tout au long de mon parcours d'étude.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur **Youcef Boubrima** de m'avoir encadrée durant mon mémoire pour sa disponibilité et son encourageant, pour son aide et ses conseils et pour ses grandes valeurs humaines.

J'adresse un grand remerciement à M^{elle} **Renane Zohra** pour son co-encadrement et son suivi tout au long de la préparation de ce mémoire.

Un grand merci est adressé à M^{elle} **Ameur Djamila** pour ses conseils et pour l'aide pratique qu'elle m'a apporté au laboratoire.

Je remercie les membres de jury d'avoir accepté d'examiner mon mémoire, **Mr Zerrouki Mohamed Hocine** (Président) et **Mr Berramdane Tayeb** (Examineur). Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude.

Au terme de ce travail, qui a été réalisé dans les laboratoires du département de Biologie, je tiens à remercier tous les ingénieurs de laboratoire pour leur accueil et leur patience.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe administrative et enseignante du département de Biologie de l'Université Amar Telidji.

Je souhaite aussi saluer et remercier mes collègues étudiants(es), avec qui j'ai eu le plaisir d'étudier durant ces dernières années.

Enfin, merci à tous ceux qui nous ont m'aidé de près ou de loin à réaliser ce projet de fin d'étude

BENTIRECHE Meriém

Table des Matières

Résumé.....	I
<i>Dédicaces</i>	IV
<i>Remerciements</i>	V
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des Abréviations.....	V
Introduction générale.....	1
Partie bibliographique.....	4
I-Les endophytes.....	5
I-1-Définition et mode de croissance des microorganismes endophytes.....	5
1-2-Diversité des endophytes.....	6
I-3-Mode de reproduction et de transmission.....	7
I-4- Interaction plante hôte-endophyte.....	8
I-5- Conditions de développement des champignons.....	8
I-6-Spécificité de l'hôte.....	9
I-7-Spécificité des tissus.....	10
I-8- Rôles physiologiques.....	11
I-9-Les endophytes source de métabolites bioactifs.....	13
I-10-Description des champignons étudiés.....	16
I-10-1-Le genre <i>Alternaria</i>	16
I-11- Intérêt des Enzymes d'endophytes.....	17
I-13-Description des bactéries étudiées.....	17
Partie Expérimentale.....	20
II- Matériels.....	21
II-1- Matériel biologique.....	21
II-1-1- Endophytes étudiés.....	21
II-1-2- Souches bactériennes testées.....	22
II-2- Méthodes.....	23
II-2-1- Repiquage des souches fongiques :.....	23
II-2-2- Repiquage des souches fongiques dans différents pH :.....	23
II-2-3- Repiquage des souches fongiques dans différentes températures.....	23

II-3-Activité antimicrobienne	23
II-3-1 Protocole expérimental de l'activité antimicrobienne.....	23
II-4-Activité enzymatique	24
II-4-1- Activité amylolytique	24
II-4-2-Activité protéolytique.....	25
II-4-3- Activité cellulolytique.....	25
II-4-4- Activité estérasique	25
II-4-5- Activité lipolytique	25
Résultats et discussion.....	26
III-Résultats et discussions	26
III-1-Résultats de test des facteurs abiotiques.....	26
III -2-Résultats du test de l'activité antibactérienne.....	27
III-2-1 Activité antibactérienne	27
III-2-1-1-Bactérie Gram positif.....	27
III-2-1-2-Bactéries Gram négatif	28
III-2-2-Activité antifongique.....	28
III-3-Discussion de l'activité antibactérienne.....	30
III-4-Résultats de l'activité enzymatique.....	31
III-4-1-Activité protéolytique	31
III-4-2-Activité estérasique	32
III-4-3-Activité lipolytique.....	32
III-4-4-Activité cellulolytique	33
III-5-Discussion de l'activité enzymatique.....	33
Conclusion	35
Références Bibliographiques	37
Annexes.....	47

Liste des figures

Figure 1 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes (Kusari et Spitter., 2011).....	6
Figure 2 : substance Anti oxydante produite par <i>Pestalotopsis microspora</i> (Strobel et al., 2004).....	14
Figure 3 : Quelques substances antifongiques produites par les champignons endophytes : <i>Pestalotopsis microspora</i> et <i>Pestalotopsis jesteri</i> (Lu et al., 2000 ; Li et al., 2001 ; Strobel et al., 2004).....	14
Figure 4 : substance anti-bactérienne et antifongique produite par le champignon <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Zoo et al., 2000)	15
Figure 5 : substance anti-tumorale produite par le champignon <i>Niger</i> IFB-E003 (Gunatilaka et al., 2006).....	15
Figure 6 : Observation macro et microscopique des trois isolats A5, A6 et A8 du genre <i>Alternaria</i> sp.....	21
Figure 7 : Un tapis mycélien troué de cercles représentant le reste des cylindres d'agar de 6mm de diamètre après prélèvement.....	24
Figure 8 : L'effet du pH sur la croissance mycélienne de trois isolats d' <i>Alternaria</i> sp.	26
Figure 9 : L'effet de la température sur la croissance mycélienne de trois isolats d' <i>Alternaria</i>	27
Figure 10 : Activité antimicrobienne des isolats fongiques étudiées sur <i>Candida albicans</i>	29
Figure11 : Activité antimicrobienne des isolats fongiques étudiées sur <i>Bacillus cereus</i>	29
Figure12 : Activité antimicrobienne des isolats fongiques étudiées sur <i>Bacillus subtilis</i>	29
Figure 13 : Activité protéolytique : dégradation de la caséine de l'échantillon fongique (A8).....	31
Figure 14 : Activité protéolytique : dégradation de la gélatine par l'échantillon fongique (A5).....	31
Figure 15 : Activité estérasique des isolats fongiques testés.	32
Figure 16 : Activité lipolytique des isolats fongiques testés.....	32
Figure 17 : Activité cellulolytique des isolats fongiques	33

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques métabolites secondaires isolés à partir des champignons endophytes (Saliba, 2015).....	13
Tableau 2 : origine des souches bactériennes et de la souche fongique.....	22
Tableau 3 : Activité antimicrobienne des isolats fongiques testés sur les souches bactériennes et la levure.	28

Liste des Abréviations

Abréviation	Signification
ATCC	American type culture collection
PDA	Potato Dextrose Agar
GYEP	Glucose Yeast Extract Peptone
MH	Muller Hinton
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Bs	<i>Bacillus sibiricus</i>
Bc	<i>Bacillus cereus</i>
Pa	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>
Ec	<i>Escherichia coli</i>
Ca	<i>Candida Albicans</i>
ATB	Antibiotiques
CFU	colony forming unit
CMC	carboxyméthyl cellulose
T	Température
C°	Degré Celsius
A5	<i>Alternaria 5</i>
A6	<i>Alternaria 6</i>
A8	<i>Alternaria 8</i>
IBMC	institut de biologie moléculaire et cellulaire

Introduction générale

Introduction

Les endophytes sont des microorganismes qui vivent asymptomatiquement à l'intérieur des tissus de la plante hôte (**Petrini, 1991**). Le terme endophyte englobe des bactéries, des algues et des champignons. Ces derniers sont les microorganismes les plus fréquemment isolés en tant qu'endophytes qui peuvent croître de façon intra et/ou intercellulaire dans les tissus internes des plantes, résidant d'une manière asymptomatique ce qui induit que leurs relations avec l'hôte est de l'ordre du mutualisme et de symbiose mais leur biodiversité suggère qu'ils peuvent être également des saprophytes ou des pathogènes opportunistes (**Strobel et al., 2004 ; Hyde et Soyong, 2008 ; Moricca et Ragazzi., 2008 ; Vega et al., 2008 ; Pimentel et al., 2011**).

Dans le cas du mutualisme, par exemple, ils peuvent prévenir la plante hôte des herbivores et des microorganismes pathogènes grâce à leur capacité de produire des molécules biologiquement actives telles que les alcaloïdes, les acides phénoliques, flavonoïdes, les antibiotiques et les enzymes extracellulaires (**Gunatilaka, 2006; Gimenez et al., 2007; Jalgaonwale et al., 2010**); ils peuvent aussi être une source d'éléments minéraux, comme ils peuvent délivrer la plante hôte de l'effet nocif des métaux lourds présents dans le sol (**Schardl, 2004**).

Cependant, l'intérêt biologique de ces endophytes dissociés de leur plante hôte est un autre volet qui reste à explorer. Si les plantes ont longtemps été considérées comme la principale source de molécules bioactives, depuis près d'un demi-siècle, les scientifiques s'intéressent de plus en plus aux champignons qui représentent en effet une source d'inspiration non négligeable dans la quête de nouvelles substances à utilisation potentielle en médecine, en agriculture ou encore en industrie. Des composés ayant des activités antibiotiques, antifongiques, antivirales, antioxydants, anticancéreuses et des composés suppresseurs de l'immunité et autres ont été isolés à partir d'endophytes (**Strobel et Daisy, 2003 ; Strobel et al., 2004 ; Zhang et al., 2006**).

De ce fait, nous nous sommes intéressés à la mise en évidence des activités antimicrobienne et enzymatique de quelques champignons endophytes isolés de *l'Arthrophytum scoparium*; une plante médicinale reconnue pour ses vertus médicales

dues à la présence de molécules propres à la plante ou peut être en symbiose des endophytes qu'elle héberge.

Notre mémoire est subdivisé en deux grandes parties : une partie bibliographique qui rassemble des données théoriques sur les champignons endophytes et leurs substances bioactives ainsi que les souches microbiennes testées. Une partie pratique qui est partagée en deux chapitres : matériel et méthodes puis résultats et discussion. Enfin, le mémoire se termine par une conclusion et une liste de références bibliographiques.

Partie bibliographique

I-Les endophytes

I-1-Définition et mode de croissance des microorganismes endophytes

Littéralement, le mot endophyte est dérivé du grec, «endo» signifie « intérieur » et « phyton » signifie « plante » (**Jalgaonwala et al., 2010**). Le terme endophyte a été utilisé pour la première fois par Debray en 1866 pour décrire les champignons qui colonisent l'intérieur des tissus végétaux, des tiges et des feuilles (**Moricca et Ragazzi., 2008; Mansouri, 2011**). Le terme endophyte englobe des bactéries, des algues et des champignons (**Surendra et al., 2012**).

Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolés en tant qu'endophytes (**Strobel et al., 2004**). Ce sont des champignons qu'ils peuvent croître de façon intra et/ou intercellulaires dans les tissus internes des plantes, sous la couche des cellules épidermiques, résidant d'une manière asymptomatique (**Moricca et Ragazzi., 2008 ; Vega et al., 2008 ; Pimentel et al., 2011**) (**figure 01**). Ils sont omniprésents et ont été isolés de toutes les plantes déjà étudiées, et leurs façons de croître asymptomatiquement dans les tissus de plantes a induit que leurs relations avec l'hôte étaient de l'ordre du mutualisme et de symbiose mais leur biodiversité suggère qu'ils peuvent être également des saprophytes ou des pathogènes opportunistes (**Strobel et al., 2004 ; Hyde et Soyong, 2008**).

Ils ont longtemps pensé que ces champignons n'avaient aucune fonction, ni aucun intérêt. Cependant, dans les dernières décennies, les recherches ont commencé à s'intéresser aux endophytes (**Moricca et Ragazzi, 2008**) qu'ils considèrent maintenant comme des sources de beaucoup de composés d'intérêt, tels que les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticide, etc. (**Maheshwari, 2006**).

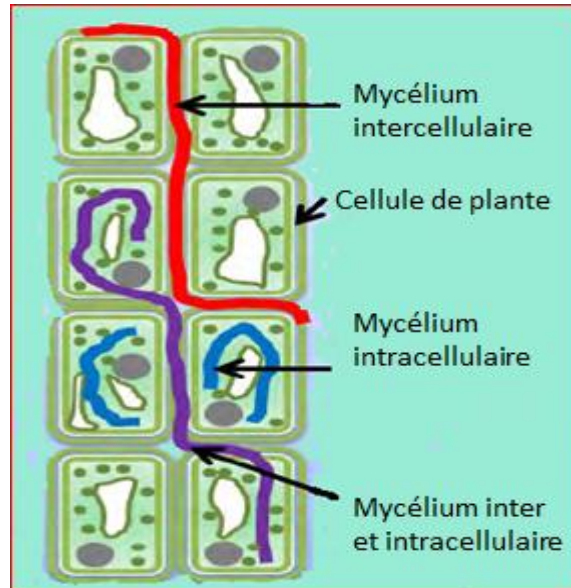


Figure 1 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes (Kusari. S et Spiteller. M., 2011).

1-2-Diversité des endophytes

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

Des estimations récentes (2007) ont démontré que plus de 90% d'espèces de champignons endophytes ne sont pas décrites (Shipunov *et al.*, 2008), et seulement 80.000 à 100.000 espèces ont été décrites en 2008 (Huang *et al.*, 2008). Seulement, l'utilisation de l'identification moléculaire peut faire la distinction entre les cultures stériles isolées au laboratoire ainsi que l'exploration de nouveaux environnements (Zabalgoeazcoa, 2008) telles les forêts tropicales qui pourraient révéler une grande diversité d'endophytes (Saar *et*

al., 2001) et pouvant permettre l'identification de nouvelles espèces (**Zabalgoeazcoa, 2008**).

I-3-Mode de reproduction et de transmission

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction :

- Le premier se fait par la croissance végétative des hyphes qui est complètement interne (**Selosse et Schardl, 2007**); ainsi les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les graines (**Saikkonen et al., 2004a**). Ceci est communément appelé transmission verticale (**Saikkonen et al., 2004b**). Et c'est le principal mode de transmission des champignons endophytes (**Saikkonen et al., 2010**).
- Le second se fait via les spores (**Clay, 1986**). Ce groupe de champignons se transmet horizontalement (**Saikkonen et al., 2004a**), c'est-à-dire le champignon peut être transmis soit par spores sexuées ou asexuées (**Saikkonen et al., 2004b**) pour infecter d'autres plantes (**Arnold et al., 2003; Gallery et al., 2007**).

Etant donné que certains champignons peuvent produire soit des spores sexuées soit asexuées et que la reproduction sexuée nécessite des spores sexuées, elle est donc toujours horizontale, contrairement à la reproduction asexuée qui peut se faire verticalement via les graines ou horizontalement par les spores ou éventuellement les hyphes (**Saikkonen et al., 2004a**).

Epichloë, un champignon endophyte associé aux graminées provoquant une infection systémique peut être transmis soit verticalement, soit sexuellement par des spores (**Saikkonen et al., 1998**). Selon son mode de transmission, son degré d'antagonisme et de mutualisme peut être affecté. Il est plus susceptible d'être antagoniste à l'hôte quand il est transmis horizontalement et plus mutualiste lors de la reproduction verticale (**Saikkonen et al., 1998**). Contrairement à *Neotyphodium*, un autre genre d'endophyte systémique des graminées qui lui, a totalement perdu sa capacité de propagation contagieuse et sa transmission est strictement verticale (**Saikkonen et al., 2004b**). Les graines produites par les graminées verticalement infecté par ces champignons donneront toutes des plantes asymptomatiquement infectées (**Zabalgoeazcoa, 2008**).

I-4- Interaction plante hôte-endophyte

La réaction plante hôte-endophyte est complexe et varie d'un hôte à l'autre et d'un endophyte à l'autre. En effet, les 2 organismes synthétisent des composés qui ne sont pas directement impliqués dans le processus de croissance: les métabolites secondaires (**Saliba, 2015**).

Comme on l'a signalé, la nature de l'interaction entre hôte et endophyte change aussi selon la façon de transmission de ce dernier, elle sera une interaction mutualiste si la transmission est verticale par croissance dans les graines et sera plus hostile si le champignon est transmis horizontalement par les spores (**Saikkonen et al, 1998**), à cause de l'arrêt de production de semences de l'hôte provoqué par l'endophyte antagoniste (**Schardl et al., 2004**).

D'autres endophytes ont été isolés à partir des tissus sains de plantes, ces mêmes champignons sont retrouvés couramment sur des plantes sénescents. Ces endophytes sont considérés comme saprophytes latents, colonisant asymptotiquement des espaces restreints tant que leurs hôtes se développent; dès que ces derniers sont infectés ou décèdent, ces saprophytes se développent et se reproduisent (**Zabalgogezcoa, 2008**).

A l'autre extrémité des interactions il y a les endophytes mutualistes, qui procurent à l'hôte de nombreux avantages, tels la résistance aux stress biotiques provoqué par des herbivores ou des parasites, ou bien abiotiques comme la sécheresse, la salinité... (**Saikkonen et al, 1998**).

I-5- Conditions de développement des champignons

Les champignons sont des organismes aérobies et certains anaérobies, ils ont besoin d'oxygène et leur développement exige la présence d'eau et une source de carbone dans leur environnement puisqu'ils ne peuvent pas effectuer la photosynthèse. La plupart des macro/micronutriments que requièrent les mycètes sont présents en excès dans leur environnement. Les mycètes possèdent des mécanismes spécifiques pour absorber certains nutriments, comme les sucres (glucose ou fructose) ainsi que le phosphore et le fer

qui peuvent être présents en faible quantité. Certains mycètes peuvent demander un apport en vitamines pour leur croissance.

Les éléments chimiques qui forment les parois cellulaires du champignon confèrent une grande rigidité, une longévité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées, de ce fait, les champignons sont donc capables de vivre dans un environnement rude (**Tortora et al., 2003**).

Les champignons sont capables de se développer à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C, cependant certaines espèces sont psychrophiles se développant dans des températures très basses $\leq 15^{\circ}\text{C}$ et à un pH légèrement acide compris entre 3 et 5 (**Botton et al., 1990**).

Les mycètes ne peuvent pas fixer l'azote mais peuvent utiliser le nitrate, l'ammonium et certains acides aminés comme source d'azote. Ils produisent des métabolites secondaires pour les utiliser lorsque leur croissance est freinée par des carences en nutriments ou par un stress (**Nicklin et al., 1999**).

I-6-Spécificité de l'hôte

Des études récentes ont suggéré que les champignons endophytes ne seraient pas spécifiques à l'hôte (**Cohen, 2006**); en général, les communautés endophytes diffèrent significativement entre les espèces d'hôtes, même les hôtes qui sont étroitement liés (**Arnold, 2007; Hoffman et Arnold, 2008**). Cependant, il y a des endophytes qui sont limités à une seule espèce d'hôte.

Les relations des endophytes avec une ou plusieurs plantes peuvent être décrites en termes de spécificité de l'hôte, récurrence de l'hôte, sélectivité de l'hôte et préférence d'hôte (**Cohen, 2006; Zhou et Hyde, 2001**). La première est la relation qui lie le champignon avec un seul hôte ou un groupe mais d'espèce apparentées, et pas avec d'autres plantes indépendantes dans le même habitat (**Huang et al., 2008**). La deuxième, c'est la fréquence ou la prédominance d'un champignon sur une plante ou une gamme de plantes mais peut également se produire, mais rarement sur d'autres plantes dans le même habitat (**Zhou et Hyde, 2001**). Quand un champignon endophyte peut se lier avec deux espèces de plantes apparentées, mais avec une préférence pour l'une d'elle, la relation est

appelé sélectivité de l'hôte. La préférence de l'hôte, quant à elle, est souvent utilisée pour indiquer la dominance ou la survenance unique d'un champignon sur un hôte particulier ; elle est aussi utilisée pour indiquer les différences dans les compositions des communautés fongiques et les fréquences d'isolement des différentes plantes hôtes (**Suryanarayanan et Kumaresan, 2000; Bettucci et al., 2004**).

Certains champignons auraient une large gamme d'hôtes, tels *Alternaria*, *Penicillium* ou *Periformospora*, qui ont des hôtes appartenant à des genres ou des familles différentes de plantes, contrairement à d'autres endophytes, comme par exemple, *Neotyphodium* qui est un champignon endophyte qui a une gamme d'hôtes restreinte, limitée à une ou deux espèces végétales (**Zabalgoeazcoa, 2008**). Nombreuses sont les études qui permettent de dire que les facteurs environnementaux, tels que l'application d'engrais, le stress hydrique et des régimes d'humidité saisonnière, en plus de l'identité de l'espèce de l'hôte, peuvent avoir un effet sur les communautés des champignons endophytes (**Fujimura et al., 2008; Gonthier et al., 2006; Seghers et al., 2004; Suryanarayanan et al., 2002**). L'interaction de ces deux facteurs peut aussi avoir un impact significatif sur la composition endophytique. **Hoffman et Arnold (2008)** ont constaté qu'il y'avait une similitude relativement faible entre les communautés d'endophytes de différentes espèces de la famille de *Cupressaceae* qui se trouvaient dans la même localité, et entre celles de la même espèce hôte dans différentes localités, contrairement à ce qu'ils ont trouvé pour la même espèce hôte dans la même localité où ils ont observé une grande similitude.

I-7-Spécificité des tissus

Beaucoup d'endophytes infectent localement des parties de la plante, se limitant à une petite zone du tissu (**Zabalgoeazcoa, 2008**). Des différences d'assemblage des champignons endophytes ont été trouvés dans les différents tissus de la même espèce végétale, ou même dans les différents tissus d'une plante unique, ceci révèle une spécificité des tissus de certains champignons endophytes (**Collado et al., 2011; Ganley et Newcombe, 2006**). Certains endophytes peuvent être trouvés dans des parties de plantes spécifiques tels les racines, feuilles ou brindilles, tandis que d'autres peuvent infecter plusieurs de ces

pièces, comme les espèces systémiques *Neotyphodium* et *Epichloë* infectant les espaces intercellulaire des feuilles, les tiges reproductives et les graines de leurs hôte ; ils peuvent être isolés à partir de différentes partie de la même plante (**Zabalgozcoa, 2008**).

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

I-8- Rôles physiologiques

Les champignons endophytes reçoivent la nutrition, la protection, et la possibilité de se propager grâce à leurs hôtes (**Clay et Schardl, 2002**), et en retour la plante hôte bénéficie aussi de certains avantages procurés par l'endophyte.

Les plantes sont constamment menacées par une variété d'agents comme les microorganismes, tels que les champignons, bactéries et virus, les herbivores et les insectes. Cependant, les plantes possèdent un vaste arsenal inductible et constitutif de mécanismes de défense contre ses agents, dont les obstacles structurels qui se renforcent rapidement lors du processus d'infection (cire, lignine, cellulose, composés phénoliques et des protéines de la paroi cellulaire) sont le type le plus performants. Les plantes abritant des champignons endophytes sont protégées aussi contre ces agents par la contribution de ces endophytes. Quelque uns des rôles de ces derniers contre ces agents sont mentionnés ci-après :

➤ Protection contre les microorganismes pathogènes :

Plusieurs mécanismes peuvent être utilisés par les endophytes pour inhiber les microorganismes phytopathogènes. Parmi eux, il y a la production d'antibiotiques, la stimulation des mécanismes de défense de l'hôte, la concurrence pour la nourriture ou les sites de colonisation, et le mycoparasitisme (**Cao et al., 2009**).

➤ **Rôles dans la tolérance aux stress abiotiques :**

Plusieurs études ont démontré que les plantes associées à des champignons endophytes ont été plus tolérantes à la sécheresse, la chaleur, la toxicité des métaux et à une salinité élevée (Lewis, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005). Les champignons endophytes des graminées fourragères (Fétuque élevée) augmentent de manière significative la tolérance à la sécheresse de cette espèce (Clay et Schardl, 2002). La teneur en eau des graminées associées à des endophytes était plus élevée que celle des graminées dépourvues d'endophytes (Buck *et al.*, 1997; Elbersen et West, 1996).

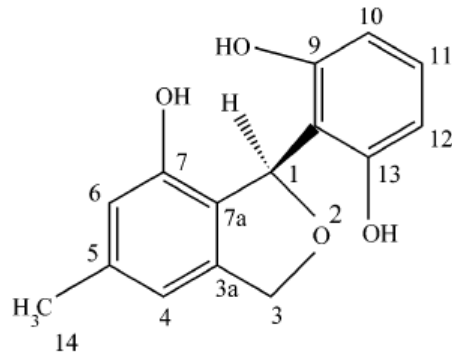
I-9-Les endophytes source de métabolites bioactifs

Les endophytes produisent des substances à utilisation potentielle en médecine, en agriculture ou encore en industrie. Des composés ayant des activités antibiotiques, antimycosiques, antivirales, antioxydants, anticancéreuses et des composés suppresseurs de l'immunité ont été isolés à partir d'endophytes (Strobel et Daisy, 2003 ; Strobel *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2006). Des exemples de métabolites secondaires isolés de champignons endophytes sont cités dans le **tableau n°1 et figures 2, 3 et 4**.

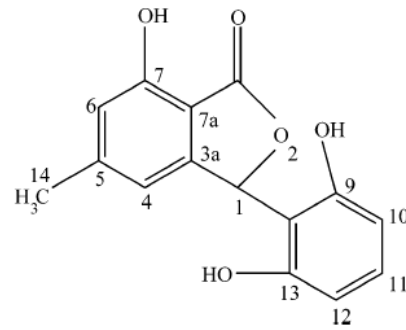
Tableau 1 : Quelques métabolites secondaires isolés à partir des champignons endophytes (Saliba, 2015).

Endophytes	Plantes hôte	Métabolites bioactifs	Activité biologique
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	<i>Ripterigeum wilfordii</i> المُسْتَحْيَة	Cryptocandine A	Antifongique
<i>Pestalotopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i> الإهليلج	Pestacine ⁽¹⁾ Isopestacine ⁽¹⁾	Anti oxydante Antifongique
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Torreya taxifolia</i> جوزة الطيب	Acide ambuique ⁽²⁾ Pestaloside ⁽²⁾ Pestalopyrone Hydroxypestalopyron	Antifongique Antifongique & Phytotoxique
<i>Pestalotiopsis jesteri</i>	<i>Frgraea bodenii</i>	Jestrone ⁽²⁾ Hydroxyjestrone	Antifongique
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Artemisia mongolica</i> الشبج	Acide collétotrique ⁽³⁾	Antibactérienne Antifongique
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Selaginella pallescens</i> كُفْعَان	Pentaketide CR377	Antifongique
<i>Aspergillus fumigatus</i> CY018	<i>Cynodon dactylon</i> الثبيل	Asperfumoide Aspernigrine A Asperginigerine	Antifongique &antitumorale
<i>Niger</i> FB-E003	<i>Cynodon dactylon</i> الثبيل	Rubrofusarine B ⁽⁴⁾	Anti-tumorale

➤ (1): agent Anti oxydant



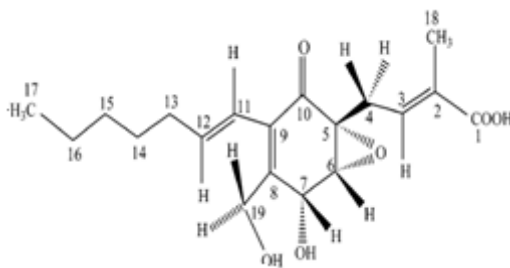
Pestacine



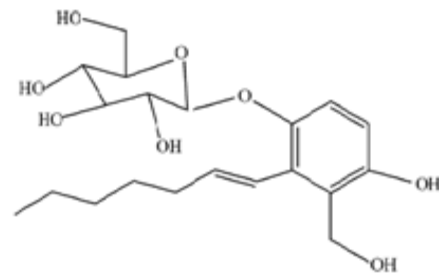
Isopestacine

Figure 2 : substance Anti oxydante produite par *Pestalotopsis microspora* (Strobel *et al.*, 2004)

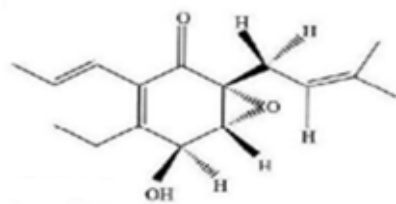
➤ (2): agents antifongiques



Acide ambuique



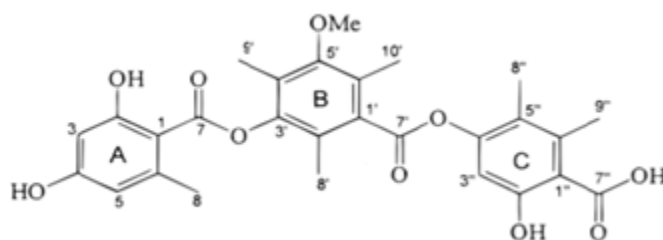
Pestalosite



Jestrone

Figure 3 : Quelques substances antifongiques produites par les champignons endophytes : *Pestalotopsis microspora* et *Pestalotopsis jesteri* (Lu *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2001 ; Strobel *et al.*, 2004).

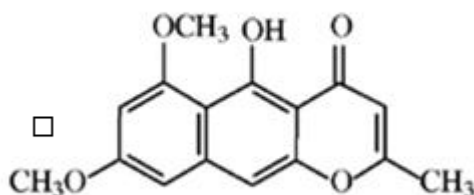
- (3) : agent Antibactérien et antifongique



Acide collétotrique

Figure 4 : substance anti-bactérienne et antifongique produite par le champignon *Colletotrichum gloeosporioides* (Zoo *et al.*, 2000)

- (4) : agent Anti-tumorale



Rubrofusarine B

Figure 5 : substance anti-tumorale produite par le champignon *Niger* IFB-E003 (Gunatilaka *et al.*, 2006)

I-10-Description des champignons étudiés

I-10-1-Le genre *Alternaria*

En 1816, Nees décrit pour la première fois un champignon qu'il nomme *Alternaria tenuis*. Le genre *Alternaria* a, par la suite été décrit par Joly (1964) ; **Neergaard (1981), et Simmons, (1993)**. Il est classé parmi les *Deuteromycetes Dematiaceae*. La complexité taxonomique des *Alternaria* liée à leur diversité et leur hétérogénéité a généré de nombreuses classifications.

L'émergence de la taxonomie moléculaire basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques, a abouti au classement du genre parmi les Ascomycètes au sein de la classe des *Dothideomycètes*. Ils sont phylogénétiquement proches de nombreuses espèces phytopathogènes (comme *Leptosphaeria*, *Venturia*, *Pleospora*, *Phaeosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Cladosporium*, *Pyrenophora*, *Clochliobolus* etc.) (**Calmes, 2011**).

Le genre *Alternaria* regroupe plus de 100 espèces ubiquitaires extrêmement répandues dans les sols, la végétation, l'air ou les aliments (**Simmons, 1993**). Si certaines espèces vivent à l'état saprophyte pouvant occasionnellement être des agents pathogènes opportunistes, d'autres sont responsables de maladies atteignant les plantes et les insectes. Cependant la majorité des espèces du genre *Alternaria* sont des champignons phytopathogènes inféodés à une famille de plantes ou à une plante spécifiquement.

Ils sont généralement présents sur les semences provoquant des manques à la levée ou des fontes de semis. Les jeunes pousses atteintes constituent une source importante d'inoculum primaire pour les plantes matures où tous les organes aériens peuvent être affectés (**Champion, 1997**). La gamme de plantes hôtes concernées par l'alternariose est très variée et certaines espèces peuvent provoquer d'importants dégâts sur des espèces cultivées occasionnant des pertes financières significatives. C'est le cas, par exemple d'*A. triticina* sur les céréales. (**Calmes, 2011**).

I-11- Intérêt des Enzymes d'endophytes

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

Autres études montrent que les endophytes ont d'autres propriétés améliorant l'aptitude de leur plante hôte, par l'augmentation de pouvoir compétitif de la plante, principalement en augmentant l'efficacité de l'utilisation de l'eau. En outre, comme les alcaloïdes d'endophytes sont souvent concentrés dans les semences, ça va prévenir les graines de prédateurs et d'augmenter ainsi la dispersion des graines. (Saikkonen *et al.*, 2010).

I-13-Description des bactéries étudiées

a/ *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif (Percival *et al.* 2004), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm (Steven *et al.* 2004).

L'habitat préférentiel de ces bactéries sont les matières fécales, aliments contaminés et les eaux usées. (Percival *et al.*, 2004).

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont les infections urinaires, plaies septiciémies et les infections respiratoires (Percival *et al.* 2004).

b/ *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 μm . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune

doré (**Percival et al, 2004**) *S. aureus* représente est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée (**Steven. P et al, 2004**).

L'habitat préférentiel de ces bactéries sont Peaux, cheveux, nasopharynx, périnée, poussières, air et les aliments contaminés (**Percival et al., 2004**).

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont les infections cutanées, plaies, brulures, abcès, Ostéites, ostéomyélites, Endocardites, Septicémies, Infection pulmonaires et les intoxications alimentaires.

c/ *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 µm de long et 0.5 à 0.8 µm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche.

P. aeruginosa ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales (**Percival et al., 2004**).

L'habitat préférentiel de ces bactéries sont le sol, l'eau, les plantes, les voies respiratoires, les matières fécales, réfrigérateurs et appareil sanitaires (**Percival et al., 2004**).

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont les Infection pulmonaires et urinaires, Brulures, Plaies et septicémies.

d/ *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est constitué de bactéries sporulées et telluriques, ubiquitaires, sont des bacilles à Gram positif.

Leur habitat préférentiel est dans le sol, l'eau, les poussières, laits (en poudre), les plantes et les matières fécales de l'homme et des animaux.

Les infections hospitalières les plus fréquentes sont Intoxication alimentaires et Septicémies chez les immunodéprimés.

f/ *Klebsiella pneumoniae*

le genre *Klebsiella*, de la famille des entérobactéries, comporte cinq espèces dont l'espèce-type est *Klebsiella pneumoniae* qui est la plus fréquente des bactéries à Gram négatif impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales. L'habitat préférentiel de ces bactéries est les voies aériennes supérieures aliments contaminés. Les infections hospitalières les plus

fréquentes sont les infections pulmonaires et urinaires, plaie et septicémies (**Percival et al. 2004**).

g/ *Candida albicans*

Les levures sont typiquement unicellulaires, quoique très souvent les cellules restent collées les unes aux autres après la division cellulaire (**Fuerst, 1976**).

Candida albicans est la seule levure prise dans notre étude. Elle est principalement à l'origine de la candidose disséminée. C'est un champignon fréquemment retrouvé au niveau de la bouche et du tractus gastro-intestinal de plusieurs personnes normales. Parmi les conditions favorisant une infection à candida, notons le diabète, la grossesse, les antibiotiques, les corticostéroïdes et toute maladie pouvant affecter l'état général d'un individu. La nystatine (Mycostatin) est très efficace dans le contrôle des infections muco-cutanées (**Pieri F., Kirkiacharian S. 1992; Yakhlef, 2009-2010**).

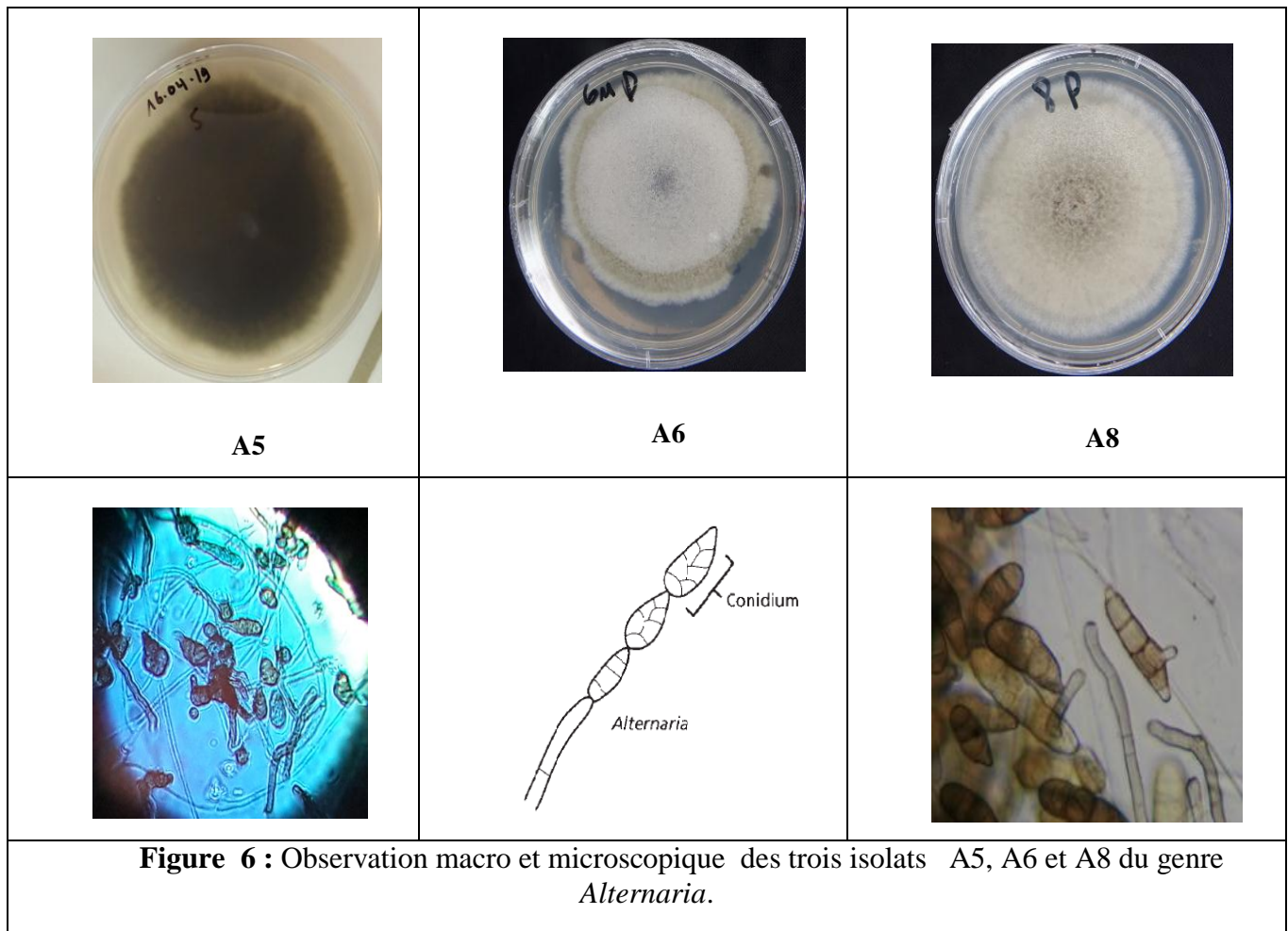
Partie Expérimentale

II- Matériels

II-1- Matériel biologique

II-1-1- Endophytes étudiés

Trois types de champignons endophytes issus des isollements de travaux précédents à partir d'*Arthrophytum scoparium*, conservées sur milieu PDA à 25°C, ont fait l'objet de notre travail.



II-1-2- Souches bactériennes testées

Le matériel microbien est constitué de six bactéries pathogènes : trois bactéries à Gram positif et trois bactéries à Gram négatif, à savoir :

1- *Escherichia Coli* « Ec »

2- *Pseudomonas Aeruginosa* « Pa »

3- *Staphylococcus Aureus* « Sa »

4- *Klebsiella pneumoniae* « Kp »

5- *Bacillus sibtulis* « Bs »

6- *Bacillus Cereus* « Bc »

II-1-3-Souche fongiques testée: Une levure pathogène *Candida albicans*

Le **tableau 2** présente les origines des souches utilisées dans les différents tests antimicrobiens.

Tableau 2 : origine des souches bactériennes et de la souche fongique.

	Souche microbienne	Gram	code
bactérienne	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	ATCC 6538
	<i>Bacillus sibtilus</i>		ATCC 10876
	<i>Bacillus cereus</i>		ATCC 25921
	<i>Escherichia coli</i>	négative	ATCC 8739
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		IBMC Strasbourg
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853
levure	<i>Condida albicans</i>		CIP 444

II-2- Méthodes

II-2-1- Repiquage des isolats fongiques :

A partir d'un tapis mycélien conservé, les isolats ont été repiqués sur milieux PDA; un fragment de la colonie est ensemencé sur la gélose puis les boîtes sont ensuite mises en incubation à 25°C pendant cinq à sept jours.

II-2-2- Repiquage des isolats fongiques dans différents pH :

A partir du tapis mycélien conservée, les isolats ont été repiqués sur un milieu PDA; un fragment de la colonie est ensemencé sur la gélose de pH différents (5, 6, 7, 8, 9). Les boîtes sont ensuite mises en incubation à 25°C et la croissance mycélienne a été évaluée après une semaine par la mesure des diamètres perpendiculaires de chaque colonie.

II-2-3- Repiquage des isolats fongiques dans différentes températures :

A partir du tapis mycélien conservé, les souches ont été repiquées sur un milieu PDA; un fragment de la colonie est ensemencé sur la gélose, les boîtes sont ensuite mises en incubation à des températures différentes (4°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C et à 40°C) et à PH 7 la croissance mycélienne a été évaluée après une semaine par la mesure des diamètres perpendiculaires de chaque colonie.

II-3-Activité antimicrobienne

II-3-1 Protocole expérimental de l'activité antimicrobienne

Dans notre expérience, la réalisation des tests antimicrobiens a été effectuée sur des milieux de cultures de gélose nutritive, de Muller-Hinton Agar et de gélose Sabouraud pour la levure, tout en débutant par la préparation de pré-cultures. Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées et les colonies jeunes obtenues dans les tubes à essai, la suspension microbienne est bien homogénéisée, sa turbidité doit être équivalente à une densité optique comprise entre 0.08 à 0.1 mesurée à 625nm pour obtenir une suspension de charge 10^8 CFU/ml (Digrak *et al.*, 2002). Après cette étape, des boîtes de pétries stériles préalablement coulées et identifiées par des codes, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un écouvillon stérile. Prélever des cylindres d'agar de 6mm de diamètre de culture de champignons de 7 jours sur la gélose PDA (Figure 7). les déposer sur un milieu MH gélosé préalablement ensemencé en surface

avec les bactéries pathogènes et la levure. Les boîtes sont ensuite posées dans le réfrigérateur pendant 2H pour une pré-diffusion, puis incubées dans l'étuve pendant 18 à 24H à 37C°. L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24H d'incubation à 37C°. A la sortie de l'incubation, la lecture des boîtes a été effectuée. Il est à noter que l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo d'inhibition autour du disque qui est relativement circulaire, dont le diamètre est mesuré grâce à un pied à coulisse et exprimé en mm.

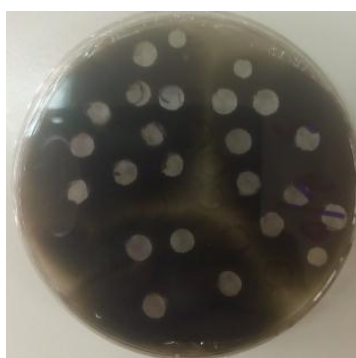


Figure 7 : Un tapis mycélien troué de cercles représentant le reste des cylindres d'agar de 6mm de diamètre après prélèvement.

II-4-Activité enzymatique

La production des enzymes extracellulaires a été recherchée et déterminée pour nos isolats fongiques par la digestion du substrat dissous dans la gélose (**Pavithra et al., 2012; Sunitha et al., 2013**).

II-4-1- Activité amylolytique

La recherche de l'amylase est mise en évidence par la méthode décrite par **Pavithra et al., (2012)**. L'ensemencement des champignons sur le milieu GYP (Glucose yeast extract peptone) additionné de 2% d'amidon soluble. Après incubation à 25°C pendant trois à cinq jours, l'apparition de zone claire entourant la colonie a été considéré comme positive pour l'amylase (**Sunitha et al., 2013**).

II-4-2-Activité protéolytique

a) Activité protéolytique (dégradation de la gélatine)

Pour la recherche de la gélatinase, on a utilisé le milieu GYP (glucose yeast extract peptone), Après 3 à 7 jours d'incubation à 25°C, l'apparition de la zone claire formée autour de la colonie révèle la présence de l'enzyme.

b) Activité protéolytique (dégradation de la caséine)

L'hydrolyse de la caséine est mise en évidence sur un milieu GYP. Après 3 à 7 jours d'incubation à 25°C, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la colonie fongique indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (**Sunitha *et al.*, 2013**).

II-4-3- Activité cellulolytique

La technique la plus évidente serait de faire apparaître la capacité des champignons à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé (CMC-agar) contenant 0.5% de carboxyméthyl cellulose, comme seule source carbonée et d'énergie. Le réactif iodo-ioduré (solution de lugol) ou le réactif rouge Congo sont utilisés pour mettre en évidence la zone d'hydrolyse de la cellulose qui apparaît autour de la colonie.

II-4-4- Activité estérasique

Le milieu de culture utilisé est celui utilisé par Sierra (1957) (**Carrim *et al.*, 2006**). Le pH est ajusté à 7,4. Le milieu estensemencé et incubé à 25°C, Après 3 à 7 jours. La présence d'une activité estérasique s'exprime par un halo opaque autour des colonies.

II-4-5- Activité lipolytique

La détermination de l'activité lipolytique est réalisée de la même manière que l'activité estérasique. Cependant, le tween 80 est remplacé par le tween 20, et le résultat positif se traduit par la présence d'un halo clair autour des colonies (**Carrim *et al.*, 2006**).

Résultats et discussion

III-Résultats et discussions

III-1-Résultats de test des facteurs abiotiques

L'effet de deux facteurs abiotiques (température et pH) sur le milieu le plus compatible à la croissance mycélienne (milieu PDA) des trois isolats du genre *Alternaria* a été mise en évidence. La croissance mycélienne a été évaluée après une semaine par la mesure des diamètres perpendiculaires de chaque colonie. Les résultats, exprimés en mm de diamètre pour chaque niveau de deux facteurs utilisés, représentent la moyenne de trois répétitions pour chaque souche d'*Alternaria* (figures 8 et 9).

a) Facteur pH

L'effet de différents pH sur la croissance des isolats *Alternaria sp* est représenté par la figure 8. Après six jours d'incubation, la meilleure croissance semble avoir lieu à pH 5 pour les trois échantillons A5, A6 et A8. Mais d'une manière générale, la différence de croissance entre l'ensemble des isolats est minime comme le montre les histogrammes. Cela peut être expliqué par la moyenne générale de l'ensemble des diamètres de croissance calculé qui est de 62,71mm. Il ressort, d'après notre expérience, que le milieu de culture à base de pomme de terre PDA est plus adéquat pour la culture de nos échantillons à des pH basiques à neutres (pH 5 et pH 9), ce qui s'accorde avec le travail de GUEYE (2016).

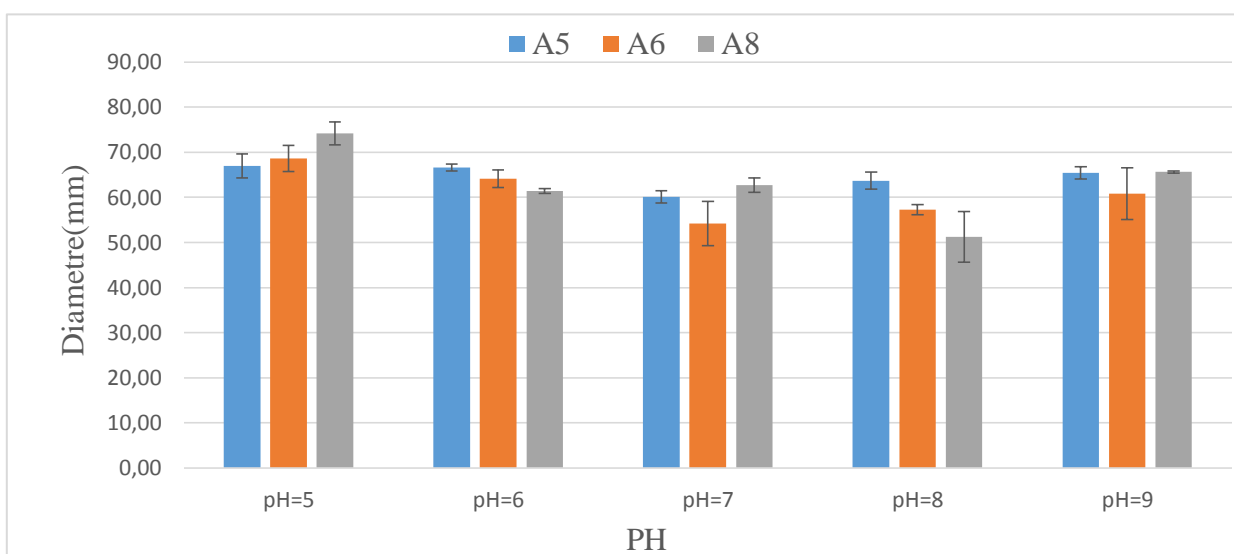


Figure 8 : L'effet du pH sur la croissance mycélienne de trois isolats d' *Alternaria sp*.

b) Facteur Température

L'effet de différentes températures sur la croissance des isolats d' *Alternaria* est représenté dans la **figure 9**. Après six jours d'incubation, la meilleure croissance a été observée entre la température 15°C et 30°C, avec un optimum de croissance à 25 °C et ceci pour les trois isolats. La croissance est ralentie à 4°C et à 40°C pour tous les isolats.

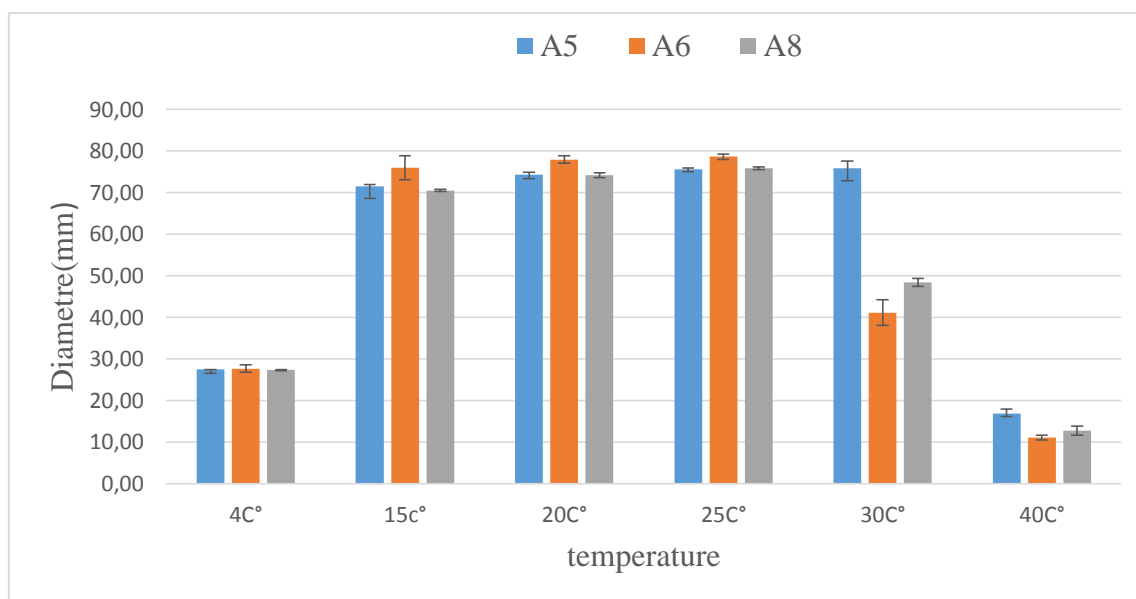


Figure 9 : L'effet de la température sur la croissance mycélienne de trois isolats d' *Alternaria*

III -2-Résultats du test de l'activité antibactérienne

III-2-1 Activité antibactérienne

III-2-1-1-Bactérie Gram positif

Les trois isolats isolées à partir d' *Arthrophytum scoparium* ont été testées par la méthode de Cylindres d'agar contre trois bactéries pathogènes. Ces isolats ont montré une activité antibactérienne plus ou moins importante, les diamètres des zones d'inhibitions moyens mesurées variant entre 0 et 11,5 mm (**tableau 3**).

L'activité des isolats fongiques étudiées sur les bactéries pathogènes Gram positif se fait plus sentir sur les espèces *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. En effet, les plus grande zones d'inhibition constatées sont celles d' *Bacillus subtilis* en présence

de A5 (11mm), A6 (9,73 mm), A8 (10,7 mm), (**Figure 12**) et la bactérie *Bacillus cereus* en présence de A5(11,1mm), A6(9mm) et A8 (9,6mm)(**Figure 11**).

III-2-1-2-Bactéries Gram négatif

L'activité antibactérienne de nos isolats fongiques a également été testée sur trois souches bactériennes de Gram négatif, *E.coli* , *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* (tableau..)

Parmi les isolats fongiques étudiées, A5, A6 et A8 ne présentent aucune activité contre *E. coli* , *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

III-2-2-Activité antifongique

L'activité des isolats fongiques endophytes a également été testée sur une levure, *Candida albicans*.

Les trois isolats fongiques testées (A5, A6 et A8) ont montré une activité contre le *Candida albicans* (**Figure 10**).

Les diamètres des zones d'inhibition de croissance de *Candida albicans* cultivé en présence des différentes isolats fongiques varient entre 8,3 et 9.4 mm; la plus grande zone d'inhibition est observée au contact de l'échantillon A6 (09,4mm) et la petite zone d'inhibition au contact des échantillons A5 et A8 avec un même diamètre d'inhibition (8 mm) (**Figure 10**).

Tableau 3 : Activité antimicrobienne des isolats fongiques testés sur les souches bactériennes et la levure.

Champignon	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Gram négatif			Gram positif		
	Ec	Kp	Pa	Bs	Bc	Sa
A5	résultat négative	résultat négative	résultat négative	11	11,1	résultat négative
A6	résultat négative	résultat négative	résultat négative	9,73	9	résultat négative
A8	résultat négative	résultat négative	résultat négative	10,7	9,6	résultat négative
<i>Candida albicans</i>						
A5	8,3					
A6	9,4					
A8	8,6					

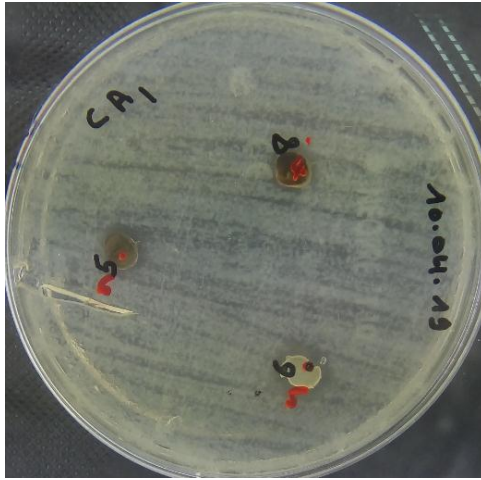


Figure10 : Activité antimicrobienne des isolats fongiques étudiées sur *Candida albicans*

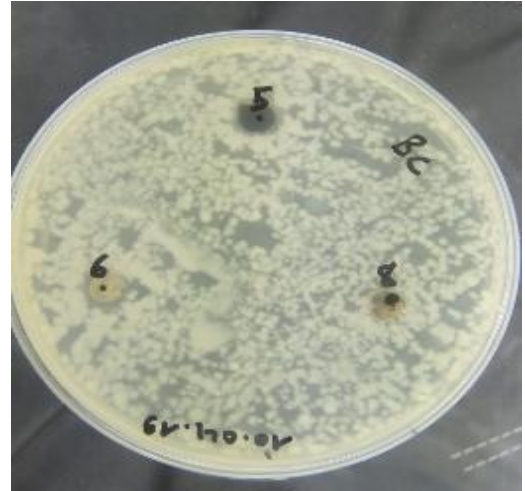


Figure 11 : Activité antimicrobienne des isolats fongiques étudiés sur *Bacillus cereus*



Figure 12 : Activité antimicrobienne des isolts fongiques étudiées sur *Bacillus subtilis*

III-3-Discussion de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne par la méthode de cylindre d'agar de trois isolats fongiques isolées à partir d'*Arthrophytum scoparium* a été recherchée sur trois bactéries Gram positif, trois bactéries Gram négatif, et contre la levure *Candida albicans*.

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

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

Dans notre expérience, les souches à Gram⁺ sont les souches les plus sensibles par rapport aux souches Gram⁻, ce qui s'accorde avec la littérature. Cette sensibilité est due essentiellement à la structure plus simple de la paroi des Gram⁺, reliant la sensibilité des Gram⁺, soit à l'inhibition des enzymes nécessaires à la production de l'énergie dans la cellule bactérienne, soit au changement au niveau de la perméabilité de la cellule et aussi à l'inhibition de la synthèse de l'ARN (**Bousseboua et al., 2005; Cowan, 1999**). Par contre la résistance des Gram⁻ est due principalement à la structure complexe de la paroi des bactéries testées où le peptidoglycane qui est très fin et associé à une enveloppe externe définissant un espace péri-plasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et de lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est généralement pourvu d'une gamme d'enzymes capable de protéger la bactérie en dégradant toute substance toxique pour elle, comme les antibiotiques, les métaux lourds (**Djaballah et Brahim, 2011**).

III-4-Résultats de l'activité enzymatique

La production d'enzymes extracellulaires à partir des isolats fongiques endophytes par la méthode de diffusion radiale en milieu solide a été effectuée par les tests qualitatifs. Ces tests ont permis d'évaluer l'activité de six enzymes produites par nos isolats fongiques à savoir : l'amylase, la protéase, lipase, cellulase et l'estérase.

III-4-1-Activité protéolytique

L'activité protéolytique des isolats fongiques étudiés sur deux protéines, la gélatine et la caséine a aussi été mise en évidence par la présence d'un halo clair autour de la colonie, comme l'indique les **Figure13** pour la dégradation de la caséine et et la **Figure14** pour la dégradation de la gélatine.



Halo clair

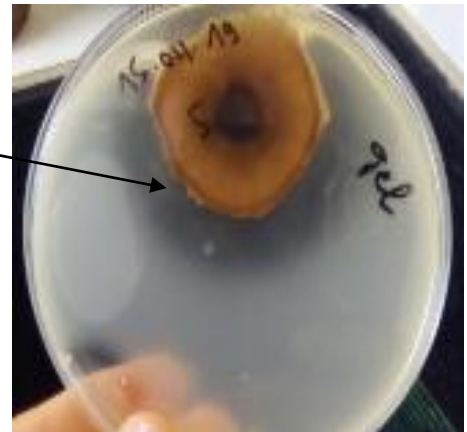
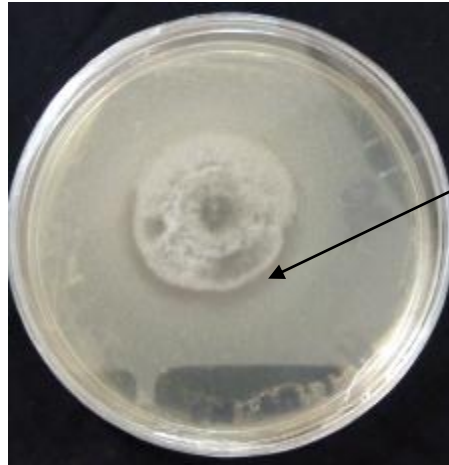


Figure 13 : Activité protéolytique : dégradation de la caséine de l'échantillon fongique (A8)

Figure 14 : Activité protéolytique : dégradation de la gélatine par l'échantillon fongique (A5)

III-4-2-Activité estérasique

Les résultats obtenus révèlent une activité estérasique de nos échantillons endophytes traduite par la dégradation de lipide qui se manifeste par un halo opaque autour de la colonie (Photo 8).

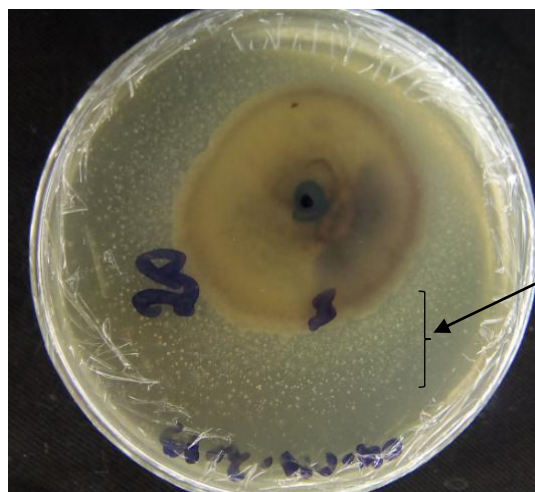


Halo opaque

Figure 15 : Activité estérasique des isolats fongiques testés

III-4-3-Activité lipolytique

Le résultat positif de l'activité lipolytique est traduit par la production de cristaux autour des différentes colonies des isolats testés.



La production de cristaux

Figure 16 : Activité lipolytique des isolats fongiques testés.

III-4-4-Activité cellulolytique

Le réactif rouge Congo est utilisé pour mettre en évidence la zone d'hydrolyse de la cellulose qui apparaît autour de la colonie (**photo 10** (flèche noire)) et ceci pour les trois isolats testés.



Figure 17 : Activité cellulolytique des isolats fongiques

III-5-Discussion de l'activité enzymatique

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

Les activités amylolytique, protéolytique cellulolytiques lipolytique et estérasique mises en évidence chez toutes les isolats fongiques testées pourrait être due à la capacité de ce genre à produire plus d'enzymes extracellulaires telles que l'amylase, cellulase, lipase, la protéase et l'estérase.

Selon les travaux de **Choi *et al.*, (2005)**, **Sunitha *et al.* (2013)** et **Selim *et al.*(2012)**, les champignons endophytes sont parmi les microorganismes qui produisent des hydrolases extracellulaires pour résister à l'invasion des pathogènes et pour assurer la nutrition de l'hôte. Ces enzymes sont essentielles au système métabolique de ces

champignons endophytes car elles leur permettent d'envahir et de coloniser les tissus végétaux.

La capacité de tous les isolats à dégrader l'amidon pourrait être expliquée par le fait que l'amidon est la source organique de carbone la plus abondante dans l'environnement (**Selim *et al.*, 2012**). Le potentiel amylolytique de ces champignons endophytes peut les aider à dégrader l'amidon qui est disponible lors de la sénescence de la plante (**Sunitha *et al.*., 2013**)

Les activités enzymatiques mises en évidence chez les isolats fongiques endophytes testées sont aussi trouvées chez les pathogènes. En revanche, la connaissance du rôle fonctionnel des endophytes nécessite la connaissance du substrat utilisé par ces derniers et les enzymes qu'ils produisent (**Carrol *et al.*, 1983**). S'ils sont des parasites ou des pathogènes latents, ils produiraient des protéases et des pectinases, mais s'ils sont des mutualistes, ils produiraient des mannases, des cellulases et des xylanases (**Brett, 1990 b, Reddy *et al.*,1996; Pointing, 1999**). **Maccheroni *et al.*, (2004)** rapportent que la présence de l'amylase et de lipase chez les endophytes n'est pas synonyme d'activité. En effet, l'amylase de ces endophytes n'est pas active à pH alcalin mais l'amidon est dégradé par cette enzyme à un pH neutre à acide. La lipase n'est pas produite à pH acide mais elle est secrétée à un pH neutre à alcalin. Ces enzymes interviennent dans la dégradation des tissus végétaux sénescents ou la décomposition des tissus morts des plantes (**Sun *et al.*, 2011**). Cet aspect met en évidence l'intérêt écologique de ces endophytes.

Conclusion

Conclusion

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

La présente étude a été effectuée dans le but de rechercher des activités antimicrobiennes et enzymatiques des champignons endophytes isolés d'une plante médicinale *Arthrophytum scoparium*.

Les résultats obtenus montrent que parmi les champignons endophytes étudiés ceux appartenant au genre *Alternaria*, présentent une activité antibactérienne sur les bactéries pathogènes Gram positif (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) et les bactéries Gram négatif (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) testées et une activité antifongique sur une levure pathogène (*Candida albicans*). Cette activité pourrait être due à l'action des mycotoxines ou des antibiotiques produits, conduisant à l'inhibition de la division cellulaire, du transport du glucose, à la perturbation du passage d'eau et des ions par la création de canaux au niveau de la membrane plasmique et à l'inhibition de la synthèse de certains composés de structure.

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

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

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

Références Bibliographiques

1. **Arnold A. E., Mejia L. C., Kylo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E. A;** 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 100: 15649-15654.
2. **Arnold A. E;** 2007. Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges and frontiers. Fungal Biology Reviews 2007; 21: 51-66.
3. **Bettucci L., Simeto S., Alonso R. and Lupo S;** 2004. Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of *Myrtaceae* in Uruguay. Sydowia; 56: 8-23.
4. **Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthir S, Larpent JP, Gay PH, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y, Veau P;** 1990. Moisissures Utiles et Nuisible Importance Industrielle (2nd Edn). Masson: Paris ; Milan; Barcelone; Mexico; 512.
5. **Bousseboua H ;** 2005. Eléments de Microbiologie. Edition campus club. Pages 213-215.
6. **Brett.C.T;** 1990b. Cell wall degradation. In: Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls. Eds., C.T. Brett and K. Waldron. Unwin Hyman, London, and pp: 169-179.
7. **Buck G. W., West C. P. and Elbersen H. W;** 1997. Endophytes effect on drought tolerance in diverse *Festuca* species. In: Bacon C. W. and Hill N. S. (eds). *Neotyphodium/Grass* interactions. Plenum Press, NewYork; pp. 141-143.
8. **Calmes, B ;** 2011.Réponses adaptatives d'*Alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors del'interaction avec les brassicacées : Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-Stransférases.Thèse de doctorat Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale Ecole Doctorale VENAM.
9. **Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Dai Y. and Wang X;** 2009. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology*; **59**: 584-592.
10. **Carrim, A. J. I., Barbosa, E. C., & Vieira, J. D. G ;**2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham.(Carobinha-do-campo). Brazilian Archives of Biology and Technology, 49(3), 353-359.
11. **Carroll. G.C AND Petrini.O;** 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia.*, 75: pp 53-63.
12. **Chabasse ; D ;** 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale. pp 25-27.

13. **Champion R** ; 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. Éditions Quae, 405 p.
14. **Choi. Y. W, Hodgkiss. I. J AND Hyde. K. D**; 2005. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. Journal of Agricultural Technology.1: pp 55-66.
15. **Clay K. and Schardl C**;2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*; 160 Suppl 4: S99-S127.
16. **Clay K**;1986. Grass endophytes. In: Fokkenna N. J. and Van Den Heuvel J. (eds). Microbiology of the phyllosphere, Cambridge, UK: Cambridge University Press; pp. 188-204.
17. **Cohen S. D**; 2006. Host selectivity and genetic variation of *Discula umbrinella* isolates from two oak species: analyses of intergenic spacer region sequences of ribosomal DNA. *Microbial Ecology*; 52: 463-469.
18. **Collado J., Platas G. and Pelaez F**; 2011. Identification of an endophytic *Nodulisporium sp* from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by DNAr sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. *Mycologia*; 93: 875-886.
19. **Cowan, M.M**; 1999. Plants products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*12, 564–582.
20. **Dagrak. Bagci and M.hakki Alma**; 2002. Antibiotique action of seed lipids from five trees species grown in turkey, pharmaceutical biology, 5pp.
21. **Djaballah, Z et Brahim, F** ; 2011. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait polyphénolique de *Tamarix gallica*.L. Ingénieur d'état : Université de Djelfa P 68
22. **Elbersen H. W. and West C. P**; 1996. Growth and water relations of field-grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Sciences* 1996; **51**: 333-342.
23. **Fernandes M. R. V., Costa e Silva T. A., Pfenning L. H., Da Costa-Neto C. M., Heinrich T. A., De Alencar S. M., De Lima M. A. and kegaki M**; 2009. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*; 45: 678-685.

24. **Frohlich J., Hyde K. D. and Petrini O;** 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research*; 104: 1202-1212.
25. **Fuerst F;** 1976. *Microbiologie Clinique*. Ed HRW Québec. 507 p.
26. **Fujimura K. E., Egger K. N. and Henry G. H;** 2008. The effect of experimental warming on the root-associated fungal community of *Salix arctica*. *International Society for Microbial Ecology Journal*; 2: 105-114.
27. **Gallery R. E., Dalling J. W. and Arnold A. E;** 2007. Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with *Cecropia*. *Ecology* 2007; 88: 582-588.
28. **Ganley R. J. and Newcombe G;** 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research*; 110: 318-327.
29. **Gimenez, C., Cabrera, R., Reina, M., & Gonzalez-Coloma, A;** 2007. Fungal endophytes and their role in plant protection. *Current Organic Chemistry*, 11(8), 707-720.
30. **Gonthier P., Gennaro M. and Nicolotti G;** 2006. Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity* ; 21: 69-80.
31. **Gueye, N., Ndiaye, M. A. F., Sarr, B., Sy, D. S., & Diop, T. A;** 2016. Influence in vitro de divers facteurs abiotiques (température, pH, salinité) sur la croissance mycélienne de trois souches locales de *Trichoderma sp.* *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(2), 769-778.
32. **Guillemette t ;** 2003. Contribution à l'étude du déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène d'*Alternaria brassicae*, l'agent du black spot des *crucifères*. These de doctorates. Université d'Angers, Angers, 195 p.
33. **Gunatilaka, A. L;** 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of natural products*, 69(3), 509-526.
34. **Hammerschmidt R;** 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*; 37: 285-306.
35. **Hoffman M. T. and Arnold A. E;** 2008. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research*; 112: 331-344.

36. **Huang W. Y., Cai Y. Z., Hyde K. D., Corke H;** 2008. and Sun M. Biodiversity of endophytic fungi with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*; 33: 61-75.
37. **Hyde K. D. and Soy tong K;** 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*; 33: pp 163-173.
38. **Jalgaonwala R. E., Mohite B. V. AND Mahajan R. T;** 2010. Evaluation of endophytes for their antimicrobial activity from indigenous medicinal plants belonging to north Maharashtra region India. *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research*.1: pp 136-141.
39. **Kusari.s, Spitteller. M;** 2011. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Nat Prod Rep*. 28: pp 1203-1207.
40. **Lawrie J., Down V. M.et greaves M. P;** 2000. Factors Influencing the Efficacy of the Potential Microbial Herbicide *Alternaria alternata* (Fr.) *Keissler* on *Amaranthus retroflexus* (L.). *Biocontrol Science and technology* 10: 81-87.
41. **Lewis G. C;**2004. Effect of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Annals of Applied Biology*; **144**: 53-63.
42. **Li J. Y., Strobel G. A., Harper J. K., Lobkovsky E. and Cllardy J;**2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Organic letters*; **2**: 767-770.
43. **Li, J. Y., Harper, J. K., Grant, D. M., Tombe, B. O., Bashyal, B., Hess, W. M., & Strobel, G;** **2001**. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry*, *56*(5), 463-468
44. **Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J., & Tan, R. X;** **2000**. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant science*, *151*(1), 67-73.
45. **Maccheroni. J.R, W, Araújo.W.L AND Azevedo.J.L;** 2004. Ambient pH - Regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Sci. Agric.* *61*(3): pp 298-302.
46. **Maheshwari. R;** 2006. What is an endophytic fungus? *Current Science*.*90*: p 1039.

47. **Mansouri A**; 2011. Les champignons endophytes chez le blé dur (*Triticum durum*. Desf): occurrence et rôle dans la tolérance au stress hydrique. Pp : 17-22.
48. **Maria. G. L, Settdftg. K. R AND Raviraja. N. S**; 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. Journal of Agricultural Technology. 1: pp 67-80.
49. **Moricca. S AND Ragazzi. A**; 2008. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. Phytopathology 98: pp 380-386.
50. **Neerdaard, P**; 1981. Risk for the EPPO Region from seeds borne pathogens. EPPO Bull.11, 207-212.
51. **Nehl D. ET Brown J** ; 2000. Biological control of the *Noogoora* burr complex with *Alternaria zinniae*: environmental conditions favouring disease. Australasian Plant Pathology 29: 71- 80.
52. **Nicklin J., Graeme -Cook K., Paget T., Killington R**; 1999. Essetiel en microbiologie. (edn). Berti. Paris.
53. **Osborn A. E., Qi X., Townsend B. And Qin B**; 2003. Dissecting plant secondary metabolism constitutive chemical defences in cereals. New Phytologist; 159: 101-108.
54. **Osborn A. E**; 1999. Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. Fungal Genet Biol ; 26: 163-168.
55. **Oses R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E. and Rodriguez J**; 2008 .Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. Fungal Diversity; 33: 77-86.
56. **Pavithra, N., Sathish, L., & Ananda, K**; 2012. Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS), 16(16), 2014.
57. **Percival, R M Chalmers, M Embrey, P R Hunter, J. sellwood, P. Wyn-Jones**; 2004. Microbiology of *aterborne Diseasesatrck*. ISBN 0-12-551570-7.
58. **Pieri F., Kirkiacharian S**; 1992. Pharmacologie et Thérapeutique, 2ème édition Marketing. Paris. 443 p.
59. **Petrini, O**;1991. Fungal endophytes of tree leaves. In Microbial ecology of leaves (pp. 179-197). Springer, New York, NY.

60. **Pimentel. M. R, Molina. G, Dionisio. A. P, Marostica. Junior. M. R AND Pastore. G. M;** 2011. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int*.
61. **Pimentel. M. R, Molina. G, Dionisio. A. P, Marostica. Junior. M. R AND Pastore. G. M;** 2011. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int*.
62. **Pointing.S.B;** 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by *tropical fungi*. *Fungal Divers*, 2: 17-33.
63. **Reddy. P.V, Lam.C.K AND F.C. Belanger.F.C;** 1996. Mutulastic fungal endophytes express a proteinase that is homologues to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant. Physiol.*, 111: pp 1209-1218.
64. **Rodriguez R. J., Redman R. S. and Henson J. M;** 2004. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Migration and Adaptation Strategies for Global Change*; **9**: 261-272.
65. **Rotem J;**1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity. APS Press, 344 p.
66. **Saar D. E., Polans N. O., Sorensen P. D. and Duvall M. R. Angiosperm** 2001. DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter*; 19: 249-260.
67. **Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M. and Sullivan T. J;**1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*; 29: 319-343.
68. **Saikkonen K., Helander M. and Faeth S. H;** 2004a. Fungal endophytes: hich- hikers of the green world. In: Gillings M. and Holmes A. J.(eds). *Plant microbiology*. Garland Science ; pp. 81-101.
69. **Saikkonen, K., Wäli, P. R., & Helander, M;** 2010. Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PloS one*, 5(6), e11395.Saikkonen K., Wali P., Helander M. and Faeth S. H;2004b. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*; 9: 275-280.

70. **Saliba S**; 2015. Nouvelle approches biotechnologiques pour l'obtention d'alcaloïdes : culture in vitro de *Leucojum aestivum* L et isolement d'endopytes bactériens d'*Amaryllidaceae*. Thèse de doctorat. Université de Lorraine.
71. **Schardl, C. L., Leuchtman, A., & Spiering, M. J**; 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 315-340.
72. **Seghers D., Wittebolle L., Top E. M., Verstraete W. and Sicilian S. D**;2004. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology* ; 70: 1475-1482.
73. **Selim.K.A, Elbeih.A, Abdel-rahman.T.M, El-diwany.A.I**; 2012. Biology of Endophytic Fungi.
74. **Selosse M. A. and Schardl C. L**; 2007. Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist*; 173: 452-458.
75. **Shabana Y. M., Charudattan R. ET Elwakil M. A**;1995. Evaluation of *Alternaria eichhorniae* as a Bioherbicide for Waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*) in *Greenhouse Trials*. *Biological Control* 5: 136-144.
76. **Shipunov A., Newcombe G., Raghavendra A. K. H. and Anderson C. L**; 2008. Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. *American Journal of Botany*; 95: 1096-1108.
77. **Simmons E. G**; 1992. *Alternaria* taxonomy: status, viewpoint, challenge. In: chelkowski j. et visconti a. (Eds). *Alternaria: biology, plant diseases, and metabolites*. Elsevier, Amsterdam, 1-35.
78. **Simmons, G.G**; 1993. *Alternaria* themes and variation (63-72). *Mycotaxon* 48, 109-140.
79. **Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane.S. and Peter W.J**;2004. *Microbiology of Waterborne Diseases*. Ed Elsevier Academic Press. Pp71-132.
80. **Stone J. K, White J. F., Jr. and Polishook J. D**;2004. Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills G and Foster M. (eds). *Measuring and Monitoring Biodiversity of fungi*. Inventory and monitoring methods, Elsevier Academic Press, Boston, MA; pp. 241-270.
81. **Strobel G. and Daisy B**; 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 67: 491-502.
82. **Strobel. G, Daisy B, Castillo. U and Harper. J**; 2004 . Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67: pp 257-268.

83. **Sun. X, Guo.L.D and Hyde.K.D;** 2011. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Divers.* 47: pp 85-95.
84. **unitha. V.H., D. Nirmala.D. Srinivas.C;** 2013. Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants.9 (1): pp 01-09.
85. **Surendra K. Gond • Ashish Mishra • Vijay K. Sharma • Satish K. Verma • Jitendra Kumar • Ravindra N. Kharwar • Anuj Kumar (2012).** Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycoscience*, 53(2), 113-121.
86. **Suryanarayanan T. S., Murali T. S. and Venkatesan G;**2002. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany* 2002; 80: 818-826.
87. **Suryanarayanan T. S. and Kumaresan V;** 2000. Endophytic fungi of some halophytes from an *estuarine mangrove forest*. *Mycological Research*; 104: 1465-1467.
88. **Tan. R. X AND Zou.W. X;** 2001..Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports.* 18: pp 448-459.
89. **Thomma B. P. H. J;**2003. *Alternaria spp.:* from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4: 225–236.
90. **Tortorat J., Funk B.F., Case Ch.I;** **2003.** Introduction à la microbiologie. (edn). ISBN. Canada.
91. **VanEtten H., Temporini E. and Wasmann C;**2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*; 59: 83-93.
92. **Vega. F. E, Posada. F, Aime. M. C, Ripoll. M. P, Infante. F AND Rehner. S. A;**2008.Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control.* 46: 72-82.
93. **Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., von W. D., Franken P. and Kogel K. H;** 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 102: 13386-13391.

94. **Yakhlef Ghania ;** (2009-2010). Thèse de mémoire master Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris*L. Et *Laurus nobilis*L. Université el hadj lakhdar –Batna.
95. **Zabalgogezcoa I;** 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. Spanish, Journal of Agricultural Research; 6: 138-146.
96. **Zhang H. W., Song Y. C. and Tan R. X;**2006. Biology and chemistry of endophytes. Natural Product Reports; 23: 753-771.
97. **Zhou D. and Hyde K. D;** 2001. Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. Mycological Research; 105: 1449-1457.
98. **Zou, W. X., Meng, J. C., Lu, H., Chen, G. X., Shi, G. X., Zhang, T. Y., & Tan, R. X;** 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. Journal of Natural Products, 63(11), 1529-1530.

Annexes

Annexe 01

Composition des milieux de culture :

Potato dextrose agar (PDA)

Pomme de terre épluchées et coupées.....200 g

Glucose.....20 g

Agar.....15 g

Eau distillée.....1000 ml

pH = 5.6

Gélose nutritive (GN):

Peptone.....10 g

Extrait de levure.....5 g

NaCl.....5 g

Agar.....20g

Eau distillée.....1000ml

pH = 7,2

Sabouraud dextrose agar (SDA)

Dextrose.....40 g

Peptone.....10 g

Agar.....15 g

Eau distillée.....1000 ml

pH = 5.6

Glucose yeast extract peptone (GYP)

Glucose.....1 g

Extrait de levure.....0.1g

Peptone.....0.5g

Agar.....16 g

Eau distillée.....1000 ml

pH= 6

Glucose yeast extract peptone (GYP) + Gélatine

Glucose yeast extract peptone (GYP).....1000 ml
Gélatine.....4g

Glucose yeast extract peptone (GYP) + Caséine

Glucose yeast extract peptone (GYP).....1000 ml
Caséine... ..15ml

Peptone agar medium (PAM) + Tween 80

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

Peptone agar medium (PAM) + Tween 20

Peptone agar medium (PAM).....1000 ml
Tween 20.....1 ml

Annexe 2

Solutions et réactifs

NaOH

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

HCl

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

Lugol

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

Eau physiologique

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

Rouge congon

Rouge congon.....	0,2%
L'eau distille.....	100ml

Annexe 03

Tableau: Description et pouvoir pathogène des souches testées

Groupe de germes	Espèces	Habitat préférentiel	Infections hospitalières les plus fréquentes
Bacillus gram (-)	Escherichia coli « Ec »	Matières fécales aliments contaminés eaux usées	<ul style="list-style-type: none"> • Infection urinaires • Plaies • Septicémies • Infection respiratoires • Infection pulmonaires et urinaires
	Pseudomonas Aeruginosa « Pa »	Sol, eau, plantes voies respiratoires matières fécales réfrigérateurs appareil sanitaires	<ul style="list-style-type: none"> • Brulures • Plaies • septicémies • Infection pulmonaires et urinaires
	Klebsiella pneumoniae « Kp »	Matières fécales voies aériennes supérieures aliments contaminés	<ul style="list-style-type: none"> • Plaie • Septicémies
Bacillus gram (+)	Bacillus cereus « Bc »	Sol, poussières eaux aliments, laits (en poudre) Sol,	<ul style="list-style-type: none"> • Intoxication alimentaires • Septicémies chez les immunodéprimés
Cocci gram (+)	Staphylococcus aureus « Sa »	Peaux, cheveux Nasopharynx	<ul style="list-style-type: none"> • Infection cutanées, plaies, brulures, abcès
		Périnée	<ul style="list-style-type: none"> • Ostéites, ostéomyélites
		Poussières, air	<ul style="list-style-type: none"> • Septicémies
Levure	Candida Albicans « Ca »	Aliments contaminés Tube digestif	<ul style="list-style-type: none"> • Infection pulmonaires • Intoxication alimentaires • Septicémies et infection viscérales • Candidose superficielles

Annexe 04

Schéma de la paroi d'une bactérie Gram négatif / Gram Positif

