

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعد دحلب البليدة (1)
Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

Thème

**Extraction et identification des métabolites secondaires synthétisés
par quelques genres de champignons (*Penicillium* et *Fusarium*)**

Présenté par :

Soutenu le : 02/07/20224

- CHABOUR Chaima
- IBRIR Amina
- ZOUBIRI Zineb Ibtissem

Devant le jury :

Mme Zerouti K.	MCB /USDB1	Présidente
Mme Lounaci L.	MCB/USDB1	Examinatrice
Mme Mohamed Mahmoud F.	MCA/USDB1	Promotrice

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

D'abord nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné courage, santé, souffle et patience pour accomplir ce travail.

En second lieu nous tenons à remercier **Dr MOHAMED MAHMOUD**, notre chère promotrice, nous vous remercions pour nous avoir fait bénéficier de l'étendue de vos connaissances. Vos compétences professionnelles, votre expertise ainsi que votre gentillesse nous ont guidées tout au long de ce travail.

Au **Dr ZEROUTI**, notre chef de jury, vous nous faites un grand honneur en faisant partie du jury.

Au **Dr LOUNACI** notre examinatrice, nous sommes honorées que vous ayez accepté de juger cette thèse, nous vous remercions très chaleureusement.

Nous tenons aussi à témoigner toute notre gratitude aux personnels du laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agro Biologiques spécialement **Mme Selma**.

Aux personnels du laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Koléa spécialement **M. Mohamed**.

Aux personnels du laboratoire d'analyse chimique du département de génie des procédés spécialement **Mme Ait Messbah** et **Mme Zahira**.

Nous vous remercions de nous avoir accueillis durant cette période de l'étude et d'avoir mis à notre disposition tous les moyens nécessaires à l'accomplissement de ce travail. Votre aide et vos conseils étaient énormément appréciés.

Nous remercions **M. Abderrahmane** responsable de magasin de faculté des sciences de la nature et de la vie, et **M. Tahar** responsable de magasin de faculté de chimie.

On remercie toute personne qui a participé de près ou de loin à l'exécution de ce modeste travail.

Merci

Dédicace

A l'homme de ma vie, mon exemple, mon soutien moral, ma source de joie et la lumière de mes jours la source de mes efforts, la flamme de mon cœur

A mon très cher père **HASSEN**

À mon ange dans la vie qui m'a embrassée avec son cœur avant ses mains, et qui a soulagé mes difficultés par ses prières, à la femme qui a fait de moi une fille ambitieuse, à celle qui a été ma mère, ma sœur, et mon guide constant.

A ma très chère maman **SIHAM**

MES PARENTES ; je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance, que Dieu vous garde en bonne santé.

À la source de ma force, à ceux que j'ai renforcés de mes bras, Je vous souhaite une heureuse vie et un bel avenir.

Mes très chers frères **CHAMSEDDIN** et **MOHAMED**

A inspireurs de mon succès, à ceux qui ont dessiné un sourire sur mon visage dans les moments difficiles, à ceux qui m'ont rappelé ma force et ma capacité, à ceux qui croient en ma bravoure, aux bougies qui éclairent toujours mon chemin.

Mes amis

CHAHRAZED, AMINA, IBTISSEM, FATIHA, CHAIMA, RADIA et **RACHIDA**

À ma force et à mon mur **MA FAMILLE.**

Enfin, je veux me remercier. Je veux me remercier d'avoir cru en moi. Je veux me remercier d'avoir accompli tout ce travail difficile. Je veux me remercier de n'avoir jamais abandonné, d'avoir toujours essayé d'en faire plus, que ce soit bien ou mal. Je veux me remercier d'être simplement moi-même en tout temps.

Chaima.

Dédicace

Tout d'abord, je tiens à remercier **DIÉU** le Tout-Puissant, pour m'avoir accordé la force, le courage et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce modeste travail. Sa bonté et sa miséricorde m'ont accompagnée tout au long de mon parcours.

Je tiens à dédier cet humble travail à :

A ma tendre mère **ZAKIA** et mon très cher père **ABDE KARIM**

qui ont été une source inépuisable d'amour, de soutien et d'encouragement tout au long de ma vie. Ils ont cru en moi dès le début et m'ont donné les moyens d'accomplir mes rêves. Je suis honorée de les avoir comme parents et j'espère leur apporter toujours plus de fierté

Ma sœur **ZINEB** et mes frères **MOHAMED** et **LOAE**

pour leur présence constante, leurs conseils précieux et leur affection indéfectible.

Ma meilleur ami **ALAA**

pour son amitié sincère, son soutien indéfectible et sa joie de vivre contagieuse.

A mon binôme **IBTISSEM** et **CHAIMA**

pour leur collaboration fructueuse et leur esprit d'équipe exemplaire.

A Tout ceux qui m'aiment et que j'aime.

Enfin, je me remercie pour ma force et ma persévérance. Je n'ai jamais abandonné, même lorsque les choses étaient difficiles. J'ai toujours trouvé le courage de me relever et de continuer à avancer. Je me remercie pour ma créativité et mon imagination. Je me remercie pour ma gentillesse et ma compassion. Je me remercie pour tout ce que je suis.

Amina.

Dédicace

A mes chères parents **MALIA** et **MOUHAMMED** que dieu vous protégés et vous procure santé.

A la prunelle de mes yeux, a celle qui a cru en mes capacités et m'encouragé ; à celle qui m'a inondé de ses prières ; à la rose de ma vie ma très chère **Maman** je t'aime tellement.

A mon héros, à celui qui me donne toute la confiance et l'encourage ; à mon épaule ferme et mon soutien dans la vie **mon Papa** que dieu te protège et te fasse une couronne sur ma tête je t'aime.

A mon bras droit mon grand frère **OUSSAMA** et Mon petit frère **ABD EL NOUR** et ma sœur **IMANE**

A toute ma famille et mes amis surtout **AMINA** et **CHAIMA**

Et à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin pour ce travail.

Enfin, je veux me remercier. Je veux me remercier d'avoir cru en moi. Je veux me remercier de n'avoir jamais abandonné, je suis fière de mes choix, même ceux qui n'ont pas toujours été les bons. Ils ont fait de moi qui je suis aujourd'hui.

Merci

Zineb Ibtissem.

Résumé

Devant la grande variété des champignons endophytes et leur capacité sous-estimée à produire plusieurs molécules bioactives, cette étude s'intéresse à l'extraction et l'identification des métabolites secondaires synthétisés par quelques genres de champignons (*Penicillium* et *Fusarium*) qui sont connus par la production des composants bioactives.

La présente étude met en évidence la présence de ces composant bioactive, ainsi la détection de l'activités antibactériennes de ces champignons en présence de deux Bactéries Multi-Résistantes BMR (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*), et leur effet antagoniste *in vitro*, contre un champignon phytopathogène tellurique (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*) qui cause la maladie du bayoud sur le palmier dattier, par des techniques directes et indirectes, ainsi que leur effet insecticide à l'égard de *Tuta absoluta* l'agent causale de la mineuse de la tomate. Les métabolites secondaires synthétisés ont été identifiés par l'utilisation de la spectroscopie UV-visible et la chromatographie sur couche mince (CCM).

L'activité antibactérienne de deux souches *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *Fusarium oxysporum* (TRR 12 P3) a montré que *F. oxysporum* a une activité antibactérienne plus importante que *Penicillium* sp. avec une zone d'inhibition maximale de 12 mm. De plus, les souches *Penicillium* sp. et *F.oxysporum*, ont montré également une activité antagoniste contre F.o.a a présenté le taux d'inhibition le plus élevé (72,92%) et leurs extraits donnent des zones d'inhibition allant jusqu'à 19 mm. L'activité insecticide de ces champignons étudiés contre les larves de *T. absoluta* montre que les suspensions fongiques étaient plus efficaces que les filtrats de cultures, avec un taux de mortalité des larves de 81,25%. L'analyse par UV-Visible et CCM a révélé que les deux souches produisent une variété de métabolites secondaires tels que les antibiotiques et les acides gras. *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) produit la pénicilline et l'acide linoléique.

L'effet bénéfique des métabolites secondaires des champignons endophytes (*Penicillium* et *Fusarium*) a été démontré dans cette étude dans le domaine médical et agricole, ouvrant ainsi la voie au développement de biopesticides et de nouvelles molécules thérapeutiques.

Mots clés : Activité antagoniste ; Champignons endophytes ; *Fusarium* ; Métabolites secondaires ; *Penicillium* .

Abstract

Given the wide variety of endophytic fungi and their underestimated capacity to produce multiple bioactive molecules, this study focuses on the extraction and identification of secondary metabolites synthesized by certain fungal genera (*Penicillium* and *Fusarium*) known for producing bioactive compounds.

This study, highlights the presence of these bioactive compounds. It also detects the antibacterial activities of these fungi in the presence of two Multi-Resistant Bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*), and their antagonistic effect *in vitro* against a telluric phytopathogenic fungus (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*) that causes Bayoud disease in date palm, using direct and indirect techniques. Additionally, it examines their insecticidal effect on *Tuta absoluta*, the causal agent of tomato leaf miner. The synthesized secondary metabolites were identified using UV-visible spectroscopy and thin-layer chromatography (TLC).

The antibacterial activity of two strains, *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) and *Fusarium oxysporum* (TRR 12 P3), showed that *F. oxysporum* has a more significant antibacterial activity than *Penicillium* sp., with a maximum inhibition zone of 12 mm. Moreover, *Penicillium* sp. and *F. oxysporum* strains also demonstrated an antagonistic activity against F.o.a, with the highest inhibition rate (72.92%), and their extracts produced inhibition zones up to 19 mm. The insecticidal activity of these fungi studied against *T. absoluta* larvae shows that fungal suspensions were more effective than culture filtrates, with a larval mortality rate of 81.25%. UV-visible and TLC analysis revealed that both strains produce a variety of secondary metabolites such as antibiotics and fatty acids. *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) produces penicillin and linoleic acid.

The beneficial effect of secondary metabolites from endophytic fungi (*Penicillium* and *Fusarium*) has been demonstrated in this study in the medical and agricultural fields, paving the way for the development of biopesticides and new therapeutic molecules.

Keywords: Antagonistic activity; Endophytic fungi; *Fusarium*; *Penicillium*; Secondary metabolites.

المخلص

نظرًا للتنوع الكبير للفطريات الداخلية وقدرتها على إنتاج العديد من الجزيئات النشطة حيويًا، تركز هذه الدراسة على استخلاص وتحديد المستقبلات الثانوية المُصنَّعة من قبل بعض أجناس الفطريات (*Fusarium* و *Penicillium*) المعروفة بإنتاج المكونات النشطة حيويًا.

تُبرز هذه الدراسة وجود هذه المكونات النشطة حيويًا، وكذلك الكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا لهذه الفطريات في وجود نوعين من البكتيريا المقاومة للعديد من المضادات الحيوية (*Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*)، وتأثيرها التضادي في المختبر ضد فطر ممرض للنبات من التربة (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*) الذي يسبب مرض البيوض في نخيل التمر، باستخدام تقنيات مباشرة وغير مباشرة، بالإضافة إلى تأثيرها المبيد للحشرات على *Tuta absoluta*، العامل المسبب لحافرة أوراق الطماطم. تم تحديد المستقبلات الثانوية المُصنَّعة باستخدام مطيافية الأشعة فوق البنفسجية-المرئية وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM).

أظهر النشاط المضاد للبكتيريا لسلاطين، *Penicillium* sp. KHR 25 P4 و *Fusarium oxysporum* TRR 12، أن *F. oxysporum* له نشاط مضاد للبكتيريا أكثر أهمية من *Penicillium* sp. مع منطقة تثبيط قصوى تبلغ 12 مم. علاوة على ذلك، أظهرت سلالات *Penicillium* sp. و *F. oxysporum* أيضًا نشاطًا تضادياً ضد F.o.a، حيث قدمت أعلى معدل تثبيط (72.92%) وأعطت مستخلصاتها مناطق تثبيط تصل إلى 19 مم. يُظهر النشاط المبيد للحشرات لهذه الفطريات المدروسة ضد يرقات *T. absoluta* أن المعلقات الفطرية كانت أكثر فعالية من مرشحات المزارع، مع معدل وفيات لليرقات يبلغ 81.25%. كشف تحليل الأشعة فوق البنفسجية-المرئية و CCM أن كلا السلالتين تنتجان مجموعة متنوعة من المستقبلات الثانوية مثل المضادات الحيوية والأحماض الدهنية. ينتج *Penicillium* sp. KHR 25 P4 البنسلين وحمض اللينوليك.

تم إثبات التأثير المفيد للمستقبلات الثانوية من الفطريات الداخلية (*Fusarium* و *Penicillium*) في هذه الدراسة في المجالات الطبية والزراعية، مما يمهد الطريق لتطوير مبيدات حيوية وجزيئات علاجية جديدة.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية؛ *Fusarium*؛ *Penicillium*؛ المستقبلات الثانوية؛ النشاط التضادي.

Liste des abréviations

NRPS	Non-Ribosomal Peptide Synthetase (Synthases de peptides non ribosomiques)
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
GC	Chromatographie en phase gazeuse
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
MS	Spectrométrie de masse
UV	Ultraviolet
BMR	Bactéries Multi-Résistantes
F.o.a	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedenis</i>
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
NaCl	Chlorure de Sodium
MH	Gélose Mueller-Hinton
Abs	Absent
Rf	Facteur de rétention

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de champignons endophytes, leurs plantes hôtes et leurs métabolites secondaires.	8
Tableau 2 : Rôle fonctionnel des métabolites secondaires des quelques endophytes fongiques.	10
Tableau 3 : Les antibiotiques utilisés pour chaque bactérie.....	22
Tableau 4 : Le rendement des extraits fongiques.....	28
Tableau 5 : Le diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'antibiogramme de <i>S.aureus</i> et <i>P.aeruginosa</i>	32
Tableau 6 : Les zones d'inhibition (en mm) obtenues lors du test de diffusion sur disques des extraits des champignons endophytes testés (phase organique).....	34
Tableau 7 : Récapitulation d'efficacité des différents systèmes de solvants pour la CCM. ...	39

Liste des figures

Figure 1 : Les principes voies des métabolites secondaires	4
Figure 2 : Diversité structurelle des métabolites.....	6
Figure 3 : Rôle des endophytes et applications des métabolites dans différents secteurs.....	9
Figure 4 : Champignons endophytes utilisés. A : <i>Penicillium</i> sp. (KHR 25 P4), B : <i>F.oxysporum</i> (TRR 12 P3).	14
Figure 5 : Bactéries Multi-Résistantes A : <i>S.aureus</i> , B : <i>P.aeruginosa</i>	15
Figure 6 : Champignon pathogène F.o.a.	15
Figure 7 : Les larves de <i>T.absoluta</i> collectées à partir des feuilles de tomate infectées.	16
Figure 8 : Schéma récapitulatif des étapes de fermentation et d'extraction des substances bioactives des champignons par l'acétate d'éthyle et le chloroforme.....	18
Figure 9 : L'extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes. A : Dépôt des disques mycélien de <i>Penicillium</i> sp. et <i>F.oxysporum</i> dans le milieu PDB, B : Flacons déposés dans l'agitateur horizontale. C : Filtration par mèches à gaz. D : Deuxième filtration par papier filtre Watman. E : Centrifugation. F : Extraction avec chloroforme et acétate d'éthyle dans des ampoules à décanter. G : Récupération des deux phases. H : Evaporation du solvant par un évaporateur rotatif (model RS 100-PRO Spain). I : les extraits bruts.....	19
Figure 10 : Ensemencement de la surface de la boite contient le cylindre du champignon antagoniste.....	20
Figure 11 : Technique de diffusion par disques	21
Figure 12 : Technique des puits. A : ensemencement uniformément de toutes la surface du milieu MH, B : Dépôt de 10 µl de filtrat brut dans les puits perforés.....	21
Figure 13 : Méthode de double culture. A : Diagramme du mode de dépôt des endophytes et d'agent pathogène B : Témoin négatif (l'agent pathogène). C : Témoin positif (les endophytes). D : Le dépôt des endophytes et l'agent pathogènes dans la boite de Pétri.....	23
Figure 14 : A : Les traitements fongiques utilisés. B : Boite de 8 larves pulvérisées par un traitement.....	24
Figure 15 : Eppendorf contient les disques des souches fongiques a conservées.....	25
Figure 16 : Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre	25
Figure 17 : Observation macroscopique (A : partie supérieure ; B : partie inférieur) et microscopique (C) de <i>F.oxysporum</i> (TRR 12 P3).....	27
Figure 18 : Observation macroscopique (A : partie supérieure ; B : partie inférieur) et microscopique (C) de <i>Penicillium</i> sp. (KHR 25 P4).....	27
Figure 19 : Des boites de Pétri présentant les résultats de l'activité antagoniste exercée par les deux souches fongiques. (A) : <i>S.aureus</i> , (B) : <i>P.aeruginosa</i>	28
Figure 20 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par <i>Penicillium</i> sp. (KHR 25 P4) et <i>F.oxysporum</i> (TRR 12 P3) contre des souches textées par la technique des cylindra d'agar. .	29
Figure 21 : Des boites de Pétri montrant l'activité antibactérienne des extraits fongiques testées par la technique des disques.	30
Figure 22 : Diamètres des zones d'inhibition déterminés lors de l'utilisation des extraits de <i>Penicillium</i> sp. (KHR 25 P4).....	30
Figure 23 : Diamètres des zones d'inhibition déterminés lors de l'utilisation des extraits de <i>Fusarium oxusporum</i> (TRR 12 P3).....	30

Figure 24 : Des boîtes de Pétri montrant l'activité antibactérienne des filtrats bruts testées par la technique des disques	31
Figure 25 : Des boîtes de Pétri montrant l'effet des filtrats bruts de <i>Penicillium</i> sp. et <i>F.oxysporum</i> par la technique des puits	31
Figure 26 : Des boîtes de Pétri montrant les résultats d'antibiogramme exercés par les deux souches bactériennes. A : <i>P.aeruginosa</i> ; B : <i>S.aureus</i>	32
Figure 27 : Effet d'antagoniste de <i>Penicillium</i> sp. sur la croissance de F.o.a par rapport au témoin A : témoin de <i>Penicillium</i> sp ; B : témoin de F.o.a	33
Figure 28 : Effet de d'antagoniste <i>F.oxysporum</i> sur la croissance de F.o.a par rapport au témoin. A : témoin de <i>F.oxysporum</i> ; B : témoin de F.o.a	33
Figure 29 : Zones d'inhibition (en mm) de chaque extrait fongique obtenues par l'acétate d'éthyle et chloroforme (phase organique) en présence de F.o.a.....	34
Figure 30 : Le taux de mortalité des larves traiter par suspension fongique et filtra de <i>Penicilium</i> sp. (KHR 25 P4) et <i>F.oxysporum</i> (TRR 12 P3)	36
Figure 31 : Les larves de <i>T. absoluta</i> dans différents stades après pulvérisation de la suspension fongique de <i>Penicillium</i> sp. et <i>F. oxysporum</i> A : L'aspect d'une momie, B : Nymphe, C : Adultes.	36
Figure 32 : Les spectres d'absorption des standards. A : Acide myristique. B : Acide oléique. C : Pénicilline.	37
Figure 33 : Les spectres d'absorption des extraits de <i>Penicillium</i> sp. et <i>F.oxysporum</i>	38
Figure 34 : Les spectres d'absorption. A : l'extraits de <i>Penicillium</i> sp. B : l'acide linoléique.	38
Figure 35 : Révélation des chromatogrammes des extraits de <i>Penicillium</i> sp. et <i>F.oxysporum</i> par UV.	40

Table des Matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
CHAPITRE I. Synthèse bibliographique	
I.1 Les métabolites secondaires	3
I.1.1 Biosynthèse des métabolites secondaires	3
I.1.2 Classification des métabolites secondaires	5
I.1.2.1 Alcaloïdes	5
I.1.2.2 Terpénoïdes	5
I.1.2.3 Peptides non ribosomiques	5
I.1.2.4 Polycétides	5
I.1.3 Diversité des métabolites secondaires	6
I.1.3.1 <i>Penicillium</i> sp.	7
I.1.3.2 <i>Fusarium</i> sp.	8
I.2 Techniques analytiques des métabolites secondaires	13
CHAPITRE II. Matériel et Méthodes	
II.1. Matériel	14
II.1.1. Matériel biologique	14
II.1.1.1. Champignons endophytes	14
II.1.1.2. Bactéries Multi-Résistantes (BMR).....	15
II.1.1.3. Champignon phytopathogène	15
II.1.1.4. Les larves de <i>Tuta absoluta</i>	15
II.1.2. Matériel non biologique	16
II.2. Méthodes.....	16
II.2.1. Régénération et purification des souches fongiques	16
II.2.2. Caractérisation macroscopique et microscopique des souches fongiques	16
II.2.2.1. Caractérisation macroscopique	16
II.2.2.2. Caractérisation microscopique	16
II.2.3. Fermentation et extraction des métabolites secondaires	17
II.2.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	19
II.2.4.1. Préparation des suspensions bactériennes	20
II.2.4.2. Technique des cylindres d'agar (confrontation directe)	20
II.2.4.3. Techniques des disques et des puits (confrontation indirecte)	20
II.2.5. Détermination de l'activité antagoniste.....	22
II.2.5.1. Test d'antagonisme <i>in vitro</i> par double culture ou coculture	22
II.2.5.2. Méthode de diffusion des disques	23

II.2.6. Détermination de l'activité antagoniste à l'égard de <i>Tuta absoluta</i>	24
II.2.6.1. Préparation des suspensions fongiques.....	24
II.2.6.2. Inoculation des larves de <i>Tuta absoluta</i> par les champignons testés.....	24
II.2.7. Conservation des souches fongiques	24
II.2.8. Analyse des métabolites secondaires extraits des champignons endophytes.....	25
II.2.8.1. La spectroscopie UV-Visible.....	25
II.2.8.2. La Chromatographie sur Couche Mince.....	26
CHAPITRE III. Résultats et Discussion	
III.1. Résultats.....	27
III.1.1. Caractérisation macroscopique et microscopique des souches fongiques	27
III.1.2. Fermentation et extraction des métabolites secondaires	28
III.1.2.1. Le rendement des extraits fongiques après fermentation	28
III.1.3. Mise en évidence de l'activité antibactériens	28
III.1.3.1. Technique des cylindres d'agar (confrontation directe).....	28
III.1.3.2. Technique des disques.....	29
III.1.3.3. Techniques des puits	31
III.1.3.4. L'antibiogramme	31
III.1.4. Détermination de l'activité antagoniste	32
III.1.4.1. Test d'antagonisme <i>in vitro</i> par double culture ou coculture.....	32
III.1.4.2. Méthode de diffusion des disques	33
III.1.5. Détermination de l'activité antagoniste à l'égard de la mineuse de tomate.....	35
III.1.6. Résultats d'analyse des métabolites secondaires extraits des champignons endophytes	37
III.1.6.1. Spectrophotométrie UV-Visible.....	37
III.1.6.2. Chromatographie sur couche mince	38
III.2. Discussion.....	41
Conclusion.....	44
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

Notre planète est habitée par une multitude d'organismes vivants, dont certains sont pathogènes peuvent causer des maladies chez les humains, les plantes et les animaux. L'émergence et la prolifération de ces pathogènes, qu'ils s'agissent de bactéries, de champignons ou d'insectes, représentent des menaces croissantes pour la santé humaine et l'environnement, affectant négativement l'écosystèmes, la biodiversité et la durabilité des systèmes agricoles.

La santé humaine bénéficie énormément des antibiotiques, ces derniers constituent une modalité thérapeutique efficace utilisée pour la gestion des infections bactériennes dans divers domaines (Halawa et *al.*, 2024). Malheureusement, en raison de leurs utilisations excessives et abusives, l'apparition d'une résistance aux antibiotiques est devenue l'un des dilemmes les plus urgents. Cette résistance est un défi majeur pour le traitement des infections bactériennes plus particulièrement les infections nosocomiales qui peuvent entraîner des complications graves, voire mortelles. L'ensemble des bactéries pathogènes surtout les Bactéries Multi Résistantes (BMR) plus spécialement *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont parmi les principaux responsables de ces infections, ces bactéries sont soit naturellement résistantes aux antibiotiques ou bien ont développé des mécanismes de résistance (Vincenot et *al.*, 2008; Tarnawska et *al.*, 2024).

D'autre part, les rendements des cultures agricoles sont réduits et déstabilisés par les pathogènes et les ravageurs qui affectent également la qualité des produits récoltés, ce qui entraîne des pertes économiques substantielles (Bruce, 2010; Savary et *al.*, 2019). En Algérie, le palmier dattier joue un rôle crucial dans l'écosystème oasien, mais il est principalement touché par l'érosion génétique causée par la maladie du Bayoud. Le champignon *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* est responsable de cette maladie dévastatrice qui se propage de plus en plus et attaque de nombreux cultivars de palmier dattier, en particulier ceux de grande qualité marchande (Bouguedoura et *al.*, 2010). De plus, la tomate est l'une des cultures vivrières les plus cultivées dans notre pays, mais sa productivité est actuellement menacée par l'invasion d'un ravageur dévastateur connu sous le nom de la mineuse de la tomate (*Tuta absoluta*). Ce ravageur provoque une perte importante dans la production allant de 80 % à 100 % lorsqu'il n'est pas géré (Loyani, 2024).

La propagation de ces derniers pathogènes est exacerbée par l'utilisation intensive de produits chimiques synthétiques, tels que les antibiotiques et les pesticides, qui entraînent la

résistance et des effets néfastes sur la santé humaine et l'environnementale. Ce qui nécessite la recherche de nouvelles niches écologiques pour trouver des sources potentielles d'agents bioactifs naturels pour différentes applications biotechnologiques ; ces sources devraient être renouvelables, écologiques et faciles à obtenir (Selim, 2012).

Les champignons endophytes sont considérés comme des bio facteurs microbiens pour la production de nouveaux produits bioactifs présentant un degré élevé de diversité biologique, Certaines genres endophytiques comme *Penicillium* et *Fusarium* sont des sources potentielles de nouveaux produits naturels à exploiter dans l'industrie pharmaceutique, l'agriculture et les applications environnementales (Selim, 2012; Bogas et al., 2022).

Afin de déterminer la nature des métabolites secondaires secrétés par certains endophytes, *Penicillium* et *Fusarium* ont été choisis pour la réalisation de ce travail.

L'objectif de ce dernier est basé sur la recherche et l'extraction des métabolites secondaires de deux champignons endophytes (*Penicillium* et *Fusarium*). La mise en évidence de la présence de ces métabolites a été détectée par l'activité antibactérienne de ces champignons en présence de deux Bactéries Multi-Résistantes (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*), et leur effet antagoniste *in vitro*, contre un champignon phytopathogène tellurique (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*) qui cause la maladie du Bayoud sur le palmier dattier, ainsi que leur effet insecticide à l'égard de *Tuta absoluta* l'agent causale de la mineuse de la tomate. Les souches fongiques étudiées sont connues par leurs synthèses d'une combinaison de métabolites secondaires, il apparaît nécessaire d'utiliser différentes techniques analytiques afin d'identifier les molécules présentes dans le filtrat et l'extrait brut par l'utilisation de la spectroscopie UV-visible et la chromatographie sur couche mince (CCM).

Ce travail est composé de 3 parties essentielles :

- La première partie : Synthèse bibliographique qui résume les différentes informations concernant les métabolites secondaires des champignons endophytes.
- La deuxième partie : Matériel et Méthodes qui explique le matériel et les méthodes utilisées pour mettre en œuvre l'objectif de cette étude.
- Dans la dernière partie résultats et discussion, divers résultats sont présentés en complément de leurs discussions par rapport à d'autres travaux similaires.

On finit ce travail par une conclusion générale et quelques perspectives.

CHAPITRE I.

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I. Synthèse bibliographique

I.1 Les métabolites secondaires

Les produits naturels sont des substances qui sont confinées à partir d'organismes vivants et qui sont également impliquées dans diverses activités biologiques et pharmacologiques. Ces substances sont généralement synthétisées sous la forme de métabolites secondaires (Bruce, 2022).

Les métabolites secondaires sont des composés organiques de faible poids moléculaire, aux structures chimiques variées et compliquées. La production de métabolites secondaires est souvent stimulée par des interactions spécifiques entre les organismes dans des circonstances particulières. Ils sont synthétisés à la fin ou près de la phase stationnaire de la croissance et ne participent pas à la croissance, au développement ou à la reproduction des cellules. Ces métabolites jouent un rôle dans la fonction écologique, ce qui peut accroître la survie des organismes qui les produisent (Abdel-Aziz et *al.*, 2017; Stewart et *al.*, 2021; Nair et *al.*, 2022).

I.1.1 Biosynthèse des métabolites secondaires

La biosynthèse des métabolites secondaires est une étude qui vise à déterminer la succession des réactions par lesquelles la cellule transforme un ou plusieurs métabolites primaires en la molécule finale. Elle porte également sur la détermination des éléments qui régulent ce processus. À l'opposé de la grande diversité des structures chimiques, les réactions biologiques qui participent à la biosynthèse de la plupart des métabolites microbiens secondaires peuvent être regroupées en un nombre restreint de voies de vie (Lancini & Lorenzetti, 1993).

Le métabolisme central est illustré dans la figure 1, où il fournit les précurseurs pour la synthèse de nombreux autres composés. La voie centrale de production d'énergie (voie d'Embden-Meyerhof et cycle de l'acide tricarboxylique) est représentée par la colonne vertébrale du diagramme. De nombreux intermédiaires sont utilisés pour synthétiser d'autres métabolites essentiels ou pour synthétiser une variété de métabolites secondaires spécialisés (Deacon, 2006).

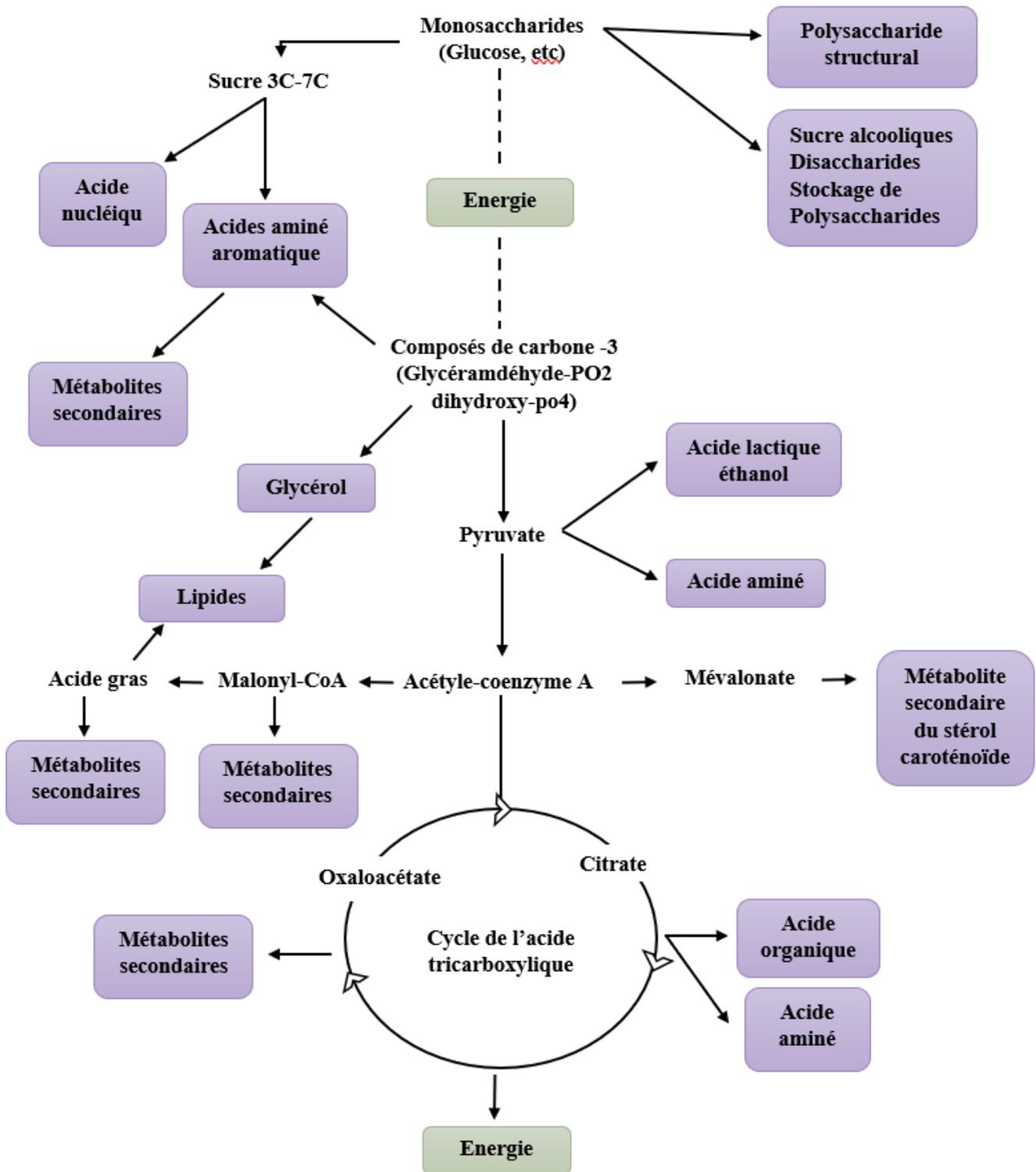


Figure 1 : Les principes voies des métabolites secondaires (Deacon, 2006).

I.1.2 Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés naturels hétérogènes, qui ont une diversité structurale complexe basée sur leurs squelettes carbonés caractéristiques (Abegaz & Kinfe, 2019).

Plus de 214000 métabolites secondaires sont connus et classés en fonction de leur grande variété de structure, de fonction et de biosynthèse. Les métabolites secondaires sont classés en quatre classes principales (Thirumurugan *et al.*, 2018), y compris :

I.1.2.1 Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés fondamentaux contenant au moins une particule d'azote hétérocyclique (Mohiuddin, 2019), ces derniers ont été classés en différentes catégories telles que l'indole, la tropane, la pyridine et la quinoline (Kaur & Arora, 2015).

I.1.2.2 Terpénoïdes

Les terpénoïdes contiennent des atomes d'oxygène qui produisent des groupements d'alcools ou de cétones. Les principaux terpénoïdes fréquemment isolés sont : les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes (Sénéquier-Crozet & Canard, 2016; Thirumurugan *et al.*, 2018).

I.1.2.3 Peptides non ribosomiques

Les peptides non ribosomiques sont synthétisés par des grands complexes enzymatiques multi-domaines qui sont les NRPS (Sénéquier-Crozet & Canard, 2016). Ces métabolites sont considérés comme des antibiotiques, des anticancéreux et des toxines (Tambadou *et al.*, 2014).

I.1.2.4 Polycétides

Les polycétides sont les produits naturels les plus fréquents chez les champignons, leurs structures et leurs fonctions sont très variées, et ils incluent de nombreux médicaments comme la tétracycline et la rapamycine (Shen, 2003; Sénéquier-Crozet & Canard, 2016).

D'autres catégories de métabolites secondaires appartenant à différents groupes structurels sont souvent isolées, telles que : les stéroïdes, les xanthones, les chinones, les phénols, les isocoumarines, les benzopyranones, les tétralones, les perylene, les quinones, les furandions, les depsipeptides, les cytochalasines et les enniatines (Schulz *et al.*, 2002) (Figure 2).

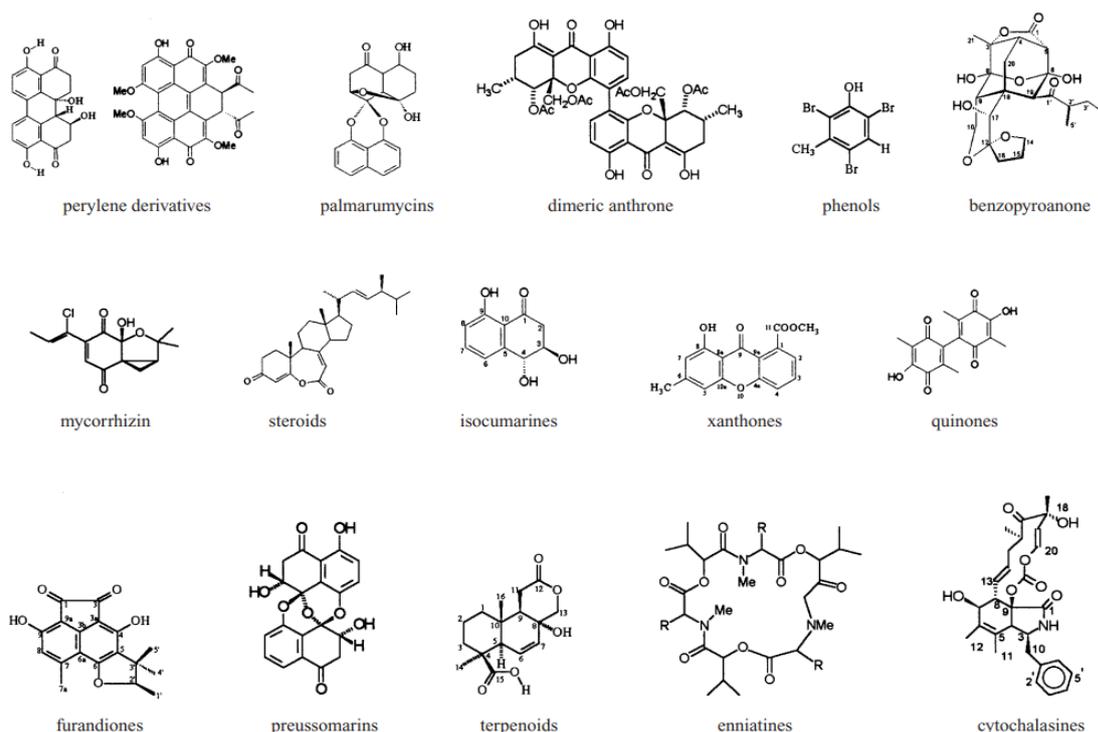


Figure 2 : Diversité structurelle des métabolites (Schulz et *al.*, 2002).

I.1.3 Diversité des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires stéréochimiquement complexes et structurellement divers jouent un rôle important dans les campagnes de découverte de nouveaux produits naturels pharmacophores (Gao et *al.*, 2018). Ces composés biologiques sont également utilisés dans divers secteurs tels que l'agriculture, la santé, les médicaments et l'industrie (Sharma et *al.*, 2023).

Les champignons, les plantes et les bactéries sont les principaux règnes de la vie avec un métabolisme secondaire bien développé. Il y'a environ 33500 métabolites microbiens bioactifs décrits, et environ 47 % de ces 33500 métabolites microbiens sont d'origine fongique.(Bills & Gloer, 2016). Les champignons sont des organismes fascinants qui ont la capacité de produire un large éventail de métabolites secondaires (Calvo et *al.*, 2002), mais seulement 7% de ces organismes ont été étudiés pour la chimie de leurs métabolites secondaires (Kianfé et *al.*, 2023). Les champignons endophytes constituent une source importante de ses métabolites.

Les champignons endophytes ont suscité beaucoup d'intérêt pour la recherche parce qu'ils ont fourni une source de composés bioactifs (Powar et *al.*, 2023) et selon Devi et *al.* (2020), ces champignons sont réputés pour produire une variété étendue de métabolites

secondaires comme des pigments, des antibiotiques, des vitamines, des composés phénoliques et des acides gras (Ebadi et *al.*, 2024) et en raison de leur capacité à produire des protéines extracellulaires, ces champignons sont la principale source d'enzymes industrielles. De nombreuses enzymes sont produites, telles que la glucosamylase, la cellulase, la lipase, la glucose-oxydase, la pectinase, la laccase, la catalase, la phytase et les protéases (Corrêa et *al.*, 2014).

Selon Zabalgogeoazcoa (2008), les champignons endophytes sont une catégorie très diversifiée de champignons, avec environ 1,5 million d'espèces.

D'après Rodriguez et *al.* (2009), les champignons endophytes sont classés en deux groupes : les *Clavicipitaceae* et les Non *Clavicipitaceae* (les classes 2, 3 et 4). Ces derniers sont basés sur la colonisation des tissus, leur diversité *in planta*, les bénéfices pour les plantes hôtes et le mode de transmission du champignon (transmission verticalement par la semence ou horizontalement par dissémination).

La plupart des champignons endophytes sont des *Ascomycota*, mais aussi de certains taxons des *Basidiomycota*, *Zygomycota* et *Oomycota* (Sun & Guo, 2012) et les genres les plus fréquents étaient *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* et *Phomopsis* (Pant et *al.*, 2021) (Tableau 1).

I.1.3.1 *Penicillium* sp.

Penicillium est un genre de champignon filamenteux de l'ancien groupe des deutéromycètes, On distingue les *Penicillium* par leurs conidiophores dressés qui peuvent être ramifiés et se terminent par des phialides. On trouve ces moisissures dans le sol, les végétaux en décomposition, le bois, les produits alimentaires secs, les fruits et légumes (Hautbergue, 2017).

Les espèces de *Penicillium* ont la capacité à générer des composés toxiques tels que les mycotoxines, qui peuvent représenter une menace sérieuse pour la santé humaine et animale à travers le monde, comme la Citrinine synthétisé par *Penicillium citrinum*. Au contraire, ces champignons ont des effets bénéfiques tels que leur utilisation dans les fermentations alimentaires, la fabrication de nombreux composés bioactifs d'intérêt médical (antimicrobiens, immunosuppresseurs) et la production d'enzymes ayant de nombreuses applications industrielles. Plus récemment, certaines espèces peuvent être utilisées comme agents de

biocontrôle contre les pathogènes des plantes ou pour la biorémediation dans les environnements pollués (Torres-Garcia et *al.*, 2022).

I.1.3.2 *Fusarium* sp.

Fusarium est un genre de champignons à la fois saprotrophes et pathogènes pour les plantes, les animaux et les êtres humains (Stępień, 2023). Ce champignon se rencontre dans toutes les régions bioclimatiques du monde, y compris, les sols liés aux plantes, les débris organiques et toutes les parties des plantes, de la racine la plus profonde aux fleurs les plus hautes (Manshor et *al.*, 2012).

Les espèces de *Fusarium* sont parmi les plus prolifiques en termes de production de métabolites secondaires. Certains d'entre eux ont des caractéristiques industrielles, comme l'acide gibbérellique, qui est commercialisé comme un stimulateur de la croissance végétale. En revanche, également de nombreux métabolites secondaires toxiques sont produits par ce genre de champignons et sont à l'origine de maladies chez les plantes, les animaux et l'homme, que l'on désigne généralement sous le nom de fusarioses (Hautbergue, 2017).

Tableau 1 : Exemples de champignons endophytes, leurs plantes hôtes et leurs métabolites secondaires.

Endophytes	Plantes hôtes	Molécules bioactives	Références
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Acer ginnala</i>	Phenol	(Qi et <i>al.</i> , 2009)
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Hypericum perforatum</i>	Hydroxyanthraquinones	(Vigneshwari et <i>al.</i> , 2019)
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	Benzopyrènes	(Vigneshwari et <i>al.</i> , 2019)
<i>Fusarium solani</i>	<i>Taxus celebica</i>	Paclitaxel	(Chakravarthi et <i>al.</i> , 2008)
<i>Periconia</i> sp.	<i>Torreya grandifolia</i>	Taxol	(Li et <i>al.</i> , 1998)
<i>Phyllosticta spinarum</i>	<i>Cupressus</i> sp	Taxol	(Kumaran et <i>al.</i> , 2008)
<i>Trametes hirsuta</i>	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	Aryltetralin lignans	(Puri et <i>al.</i> , 2006)
<i>Penicillium implicatum</i>	<i>Diphylleia sinensis</i>	Podophyllotoxin	(Biswas et <i>al.</i> , 2020)
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Dysosma veitchii</i>	Podophyllotoxin	(Biswas et <i>al.</i> , 2020)
<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Taxus baccata</i>	Taxol	(Strobel et <i>al.</i> , 1996)
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Phoenix dactylifera</i>	Cerebroside	(Mohamed Mahmoud, 2017)
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Phoenix dactylifera</i>	Bassianolide	(Mohamed Mahmoud, 2017)

Selon Owen et Hundley (2004), ces champignons produisent une variété de substances naturelles qui ont une activité biologique variée, telles que des antibiotiques, des antifongiques, des antiviraux, des immunosuppresseurs, des agents anticancéreux, des antioxydants, et des insecticides (Figure 3) (Tableau 2).

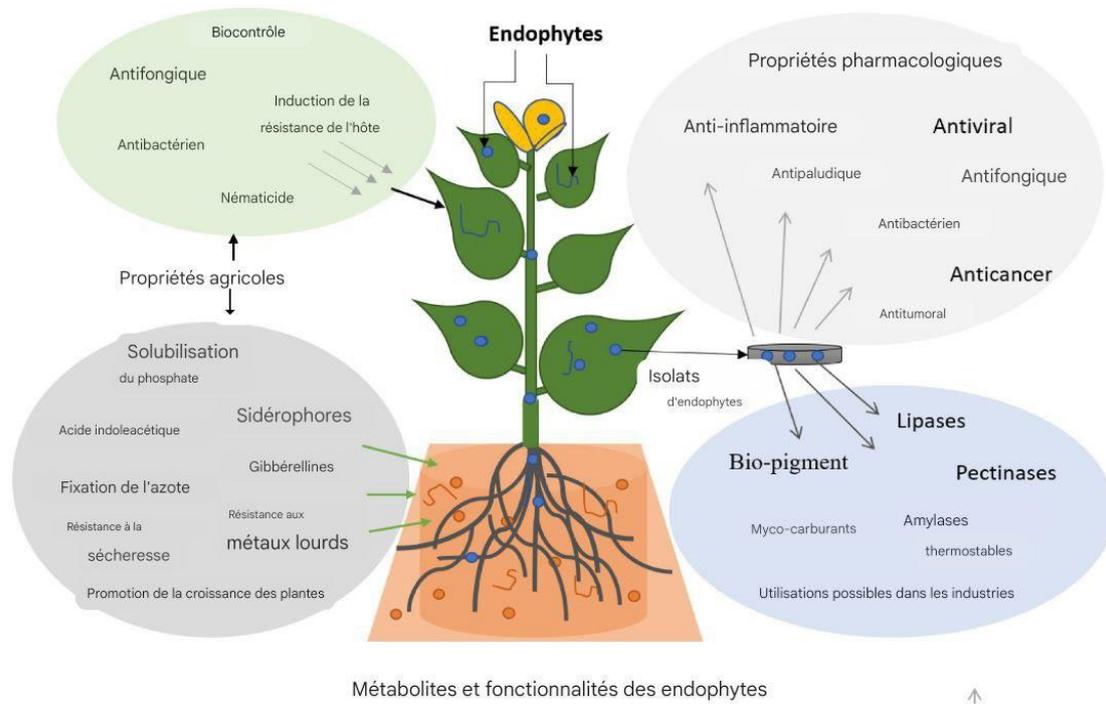


Figure 3: Rôle des endophytes et applications des métabolites dans différents secteurs (Sharma et al., 2021).

Tableau 2 : Rôle fonctionnel des métabolites secondaires des quelques endophytes fongiques.

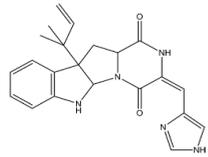
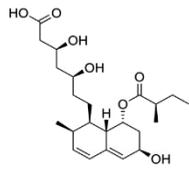
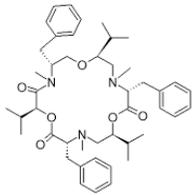
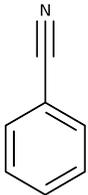
Endophytes	Produit naturel	Structure	Plant hôte	Class de Produit	Activité /Fonction	Référence
<i>Penicillium oxalicum</i>	Roquefortine C		Sauge des prés	Diketopiperazine	Agents aromatiques et antibactériens, en particulier contre les bactéries à Gram positif	(Ai et al., 2023)
<i>Penicillium citrinum</i>	Pravastatin		If du Pacifique	Statine	Anti-oxydant, protège les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres et Réduit le taux de cholestérol.	(Stierle & Stierle, 2000)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Beauvericin		<i>Aglaonema commutatum</i>	Enniatin	Une mycotoxine de cyclohexadépeptide qui a des propriétés insecticides et qui peut induire l'apoptose dans les cellules de mammifères., antimicrobiennes et antivirales.	(Hoque et al., 2022)
<i>Fusarium equiseti</i>	Benzylnitril		Basilic africain	Nitrile aromatique	Antimicrobien, se lie aux groupes sulfhydryles des acides aminés, des protéines et des peptides, bloquant ainsi les voies enzymatiques glycolytiques et respiratoires.	(Adione et al., 2022)

Tableau 2 (suite) : Rôle fonctionnel des métabolites secondaires des quelques endophytes fongiques.

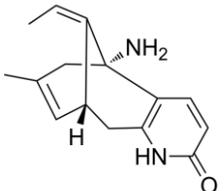
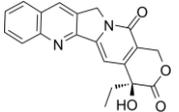
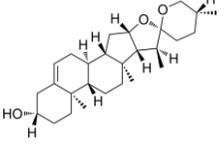
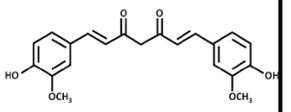
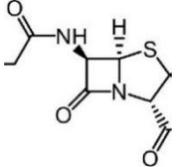
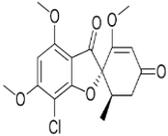
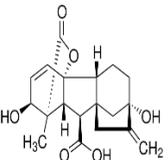
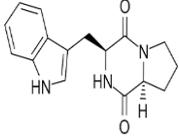
<i>Penicillium citrinum</i>	Huperzine A		<i>Huperziaserrata</i>	Alcaloïdes	Traitement des complications neurologiques, principalement la maladie d'Alzheimer. Inhibiteur de l'acétylcholinestérase et peut également présenter des propriétés neuroprotectrices.	(Thi Minh Le et <i>al.</i> , 2019)
<i>Fusarium solani</i>	Camptothecin		<i>Camptotheca acuminata</i>	Quinolone Alkaloids	Anticancer (inhibe une enzyme appelée topoisomerase I).	(Kaur et <i>al.</i> , 2020)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Diosgenin		<i>Dioscorea zingiberensis</i>	triterpenoids	Antitumoral et traiter le diabète en favorisant la différenciation des adipocytes et en inhibant l'inflammation dans les tissus adipeux.	(Biswas, Nazir, et <i>al.</i> , 2020)
<i>Penicillium frequentans</i>	Curcumine		<i>Curcuma wenyujin</i>	phytopolyphenol	Anti-microbien, anticancer, antiinflammatoire et anti-oxydant.	(Yan et <i>al.</i> , 2014)
<i>Penicillium rubens</i> ,	Penicillin G		Angole	Peptide non ribosomique	Anti-bactérien (traiter les infections bactériennes habituellement gram-positives).	(Bills & Gloer, 2016)

Tableau 2 (suite) : Rôle fonctionnel des métabolites secondaires des quelques endophytes fongiques.

<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griseofulvin		<i>Mentha pulegium</i>	Polykétide	Antifongique se lie à la tubuline fongique, entraînant une altération de la fonction microtubule et mitotique.	(Bills & Gloer, 2016)
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Acide gibbérellique		Riz	Diterpene	Stimulateur de croissance végétale par la stimulation de la germination.	(Bills & Gloer, 2016)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	brevianamide D		<i>Bradysia agrestis</i>	Indole alcaloïdes	Insecticide pour les cultures vivrières comme la tomate.	(Nicoletti et al., 2023)

Les champignons endophytes produisent des métabolites secondaires avec des propriétés antibactériennes qui peuvent freiner la croissance des bactéries pathogènes, notamment celles qui ont une résistance élevée aux antibiotiques (Bactéries Multi-Résistantes BMR) tels que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces deux espèces sont les plus couramment isolées en milieu hospitalier, ils sont impliqués dans l'apparition des infections nosocomiales, qui peuvent provoquer des complications graves, et mortelles (Vincenot et al., 2008; Gao et al., 2021; Ahmed et al., 2023; Akroum & Bououden, 2024).

Les composants naturels de ces champignons sont aussi utilisés pour combattre certaines maladies des plantes, grâce à leur capacité fongicide efficace contre les agents pathogènes (Ling et al., 2024). Selon Benzohra et al. (2024), l'utilisation des endophytes dans la lutte biologique est une stratégie clé contre *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, responsable de la maladie du bayoud sur le palmier dattier, cette maladie incontestablement la plus menaçante et l'une des plus destructrices en particulier dans l'Algérie, où elle a détruit plus de 3 millions de palmiers (Bahriz & Bouras, 2020). D'autre part, les produits naturels issus de ces champignons présentent une activité insecticide importante contre les ravageurs (Mohamed Mahmoud et al., 2021), L'étude de Badaoui et al. (2011) et d'autres ont également mis en évidence la pathogénicité des champignons endophytes contre les insectes des cultures vivrières comme *Tuta absoluta*, communément appelée mineuse de la tomate, est l'un des ravageurs les plus importants qui causent entre 80 % et 100 % de pertes de production des solanacées (Jeong et al., 2022).

I.2 Techniques analytiques des métabolites secondaires

L'analyse des substances chimiques secondaires, est réalisée à l'aide de diverses techniques chromatographiques telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie à haute performance (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse (GC), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (MS). Ces méthodes impliquent l'extraction liquide-liquide en utilisant un solvant organique pour extraire les composés des milieux liquides provenant des cultures fongiques. Plusieurs solvants, ont été utilisés pour l'extraction en fonction de la solubilité du métabolite souhaité. L'acétate d'éthyle, le dichlorométhane, l'hexane, chloroforme, le méthanol et l'éthanol sont les solvants les plus utilisés pour extraire les métabolites du bouillon de culture et être finalement séchés par évaporation (Madhusudhan et al., 2015).

CHAPITRE II.

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II. Matériel et Méthodes

L'expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de Protection et de Valorisation des ressources Agrobiologique (LPVRB) de la faculté SNV, et au laboratoire d'analyse chimique du département de génie des procédés, université Saad Dahleb de Blida 1 ainsi qu'au niveau du laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Koléa (wilaya de Tipaza).

Le présent travail qui a duré entre le mois de février et le mois de juin, a été basé sur la recherche, l'extraction et l'identification des métabolites secondaires de deux champignons endophytes (*Penicillium* et *Fusarium*), par l'utilisation des méthodes analytiques comme la spectroscopie UV-visible et la chromatographie sur couche mince (CCM).

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Champignons endophytes

Les deux champignons utilisés dans la présente étude appartiennent à la collection du Laboratoire de Protection et Valorisation des Ressources Agro-Biologique (LPVRAB) de département de biotechnologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Saad Dahlab de Blida 1. Les champignons endophytes *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *Fusarium oxysporum* (TRR 12 P3) ont été isolés à partir des racines du palmier dattier de Taghit et de Kénadsa (wilaya de Bechar) (Figure 4).

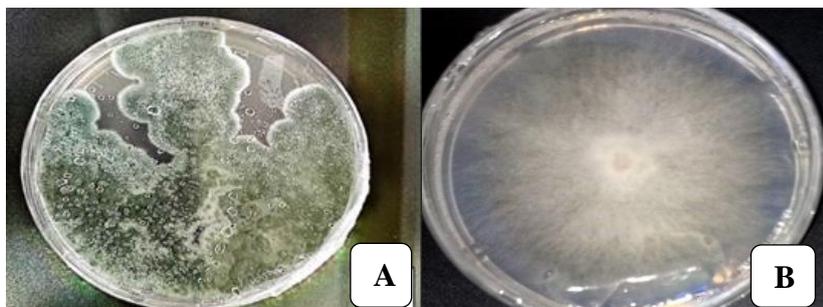


Figure 4 : Champignons endophytes utilisés. A : *Penicillium* sp. (KHR 25 P4), B : *F.oxysporum* (TRR 12 P3).

II.1.1.2. Bactéries Multi-Résistantes (BMR)

Pour étudier l'activité antibactérienne, nous avons utilisé des BMR provenant du laboratoire de l'hôpital de Kolea. Une souche de *Staphylococcus aureus* (Staph cat) isolée d'un cathéter, et une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (Pseudo 1000) provient d'un prélèvement de pus (Figure 5).

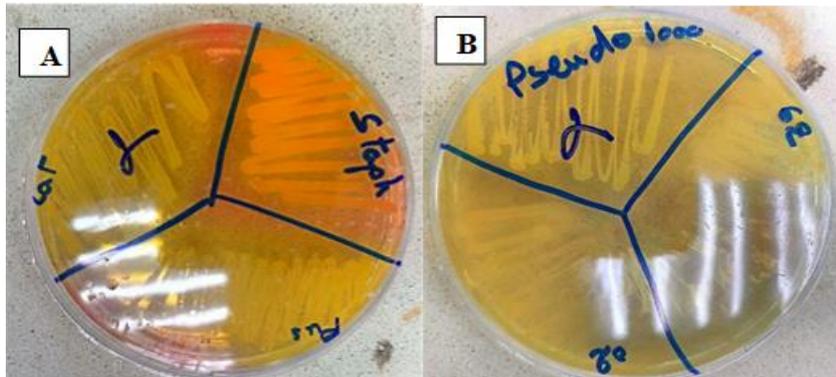


Figure 5 : Bactéries Multi-Résistantes A : *S.aureus*, B : *P.aeruginosa*.

II.1.1.3. Champignon phytopathogène

Afin de mener à bien le test d'antagonisme, nous avons utilisé une souche pathogène issue de la collection du laboratoire LPVRAB, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (F.o.a) agent causal du bayoud de palmier dattier (Figure 6).

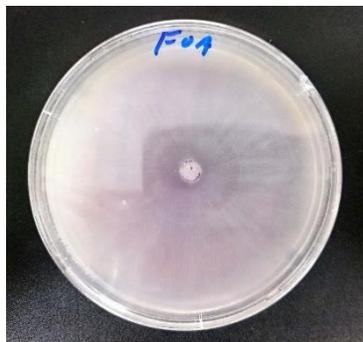


Figure 6 : Champignon pathogène F.o.a.

II.1.1.4. Les larves de *Tuta absoluta*

Les larves de *Tuta absoluta* ont été collectées à partir des feuilles de tomate minées ramassés à partir de plusieurs variétés de tomate cultivées sous serre au niveau de l'Institut Technique des Cultures Maraichères et Industriels de Staouali (ITCMI). Pour leurs utilisations ultérieures, les larves ont été déposées dans des boîtes de Pétri contenant des feuilles de tomate (Figure 7).



Figure 7 : Les larves de *T.absoluta* collectées à partir des feuilles de tomate infectées.

II.1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé dans ce travail est constitué de milieux de culture (Annexe A), des produits chimiques, la verrerie et l'appareillage (Annexe B).

II.2. Méthodes

II.2.1. Régénération et purification des souches fongiques

La régénération et la purification des souches ont été réalisées par repiquage des disques mycéliens à partir des cultures conservées sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Booth & Johnston, 1983) (Annexe A). Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 7 jours.

II.2.2. Caractérisation macroscopique et microscopique des souches fongiques

La caractérisation macroscopique et microscopique des souches fongiques a été réalisé selon (Lestari et *al.*, 2021; Nguyen Xuan, 2024).

II.2.2.1. Caractérisation macroscopique

L'observation macroscopique des boîtes contenant les souches fongiques a été réalisée à l'œil nu, en se référant aux caractéristiques morphologiques des colonies après l'incubation. Nous avons observé attentivement, dans un endroit bien éclairé les caractéristiques suivantes :

- Aspect et texture de la surface de la colonie (cotonneux, poudreux, etc.).
- Pigmentation de la colonie, contour, couleur du verso de la culture, et celle du milieu.
- Diamètre de la colonie.
- Vitesse de la croissance.

II.2.2.2. Caractérisation microscopique

L'identification microscopique a été réalisée par observation au microscope optique sous grossissement $\times 40$ ($G \times 40$), en tenant compte des caractéristiques morphologiques des hyphes, forme et couleur des formes reproductrices, forme et couleur des spores.

II.2.3. Fermentation et extraction des métabolites secondaires

Après l'obtention de cultures pures âgées de 7 jours, des flacons de 250 ml contenant 150 ml du milieu PDB (Potato Dextrose Broth), ont été inoculés par 10 disques de champignons endophytes étudiés (*Penicillium* sp. et *F. oxysporum*), à raison de cinq à huit répétitions pour chaque souche. Les flacons sont fermés et recouverts avec du papier aluminium et du coton, puis incubés à une température ambiante avec une agitation continue pendant 15 jours selon (Xiaoling et *al.*, 2010).

Après cette période de fermentation, le contenu est filtré en deux étapes, la première est réalisée par une mèche à gaz stérile, la deuxième par un papier filtre stérile pour séparer le mycélium du bouillon de culture. Ce dernier a été centrifugé à 1500 tours/min pendant 20 min, et le surnageant a été récupéré selon (Barik et *al.*, 2010).

Pour l'extraction des métabolites secondaires, deux solvants organiques ont été utilisés : l'acétate d'éthyle et le chloroforme ; où à chaque filtrat on rajoute un volume égal de solvant puis le flacon est mis sous agitation continue pendant une heure.

Après, la solution a été mise en décantation dans des ampoules à décanter, pour séparer les deux phases (la phase organique et la phase inorganique). Après séparation, les deux phases sont récupérées pour les concentrer sous la pression par évaporation de solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (model RS 100-PRO Spain) à 45°C pour le chloroforme et à 55°C pour l'acétate d'éthyle. Les extraits obtenus sont récupérés dans des boîtes de Pétri en verre stériles. On exprime généralement le rendement des extraits en masse en calculant la différence entre les boîtes de Pétri en verre contenant de l'extrait et les boîtes de Pétri vides, puis conservées pour utilisation ultérieure selon (Mohanta et *al.*, 2008). (Figure 8) et (Figure 9).

Le rendement des extraits en masse =
les boîtes de Pétri en verre contenant de l'extrait – les boîtes de Pétri vides

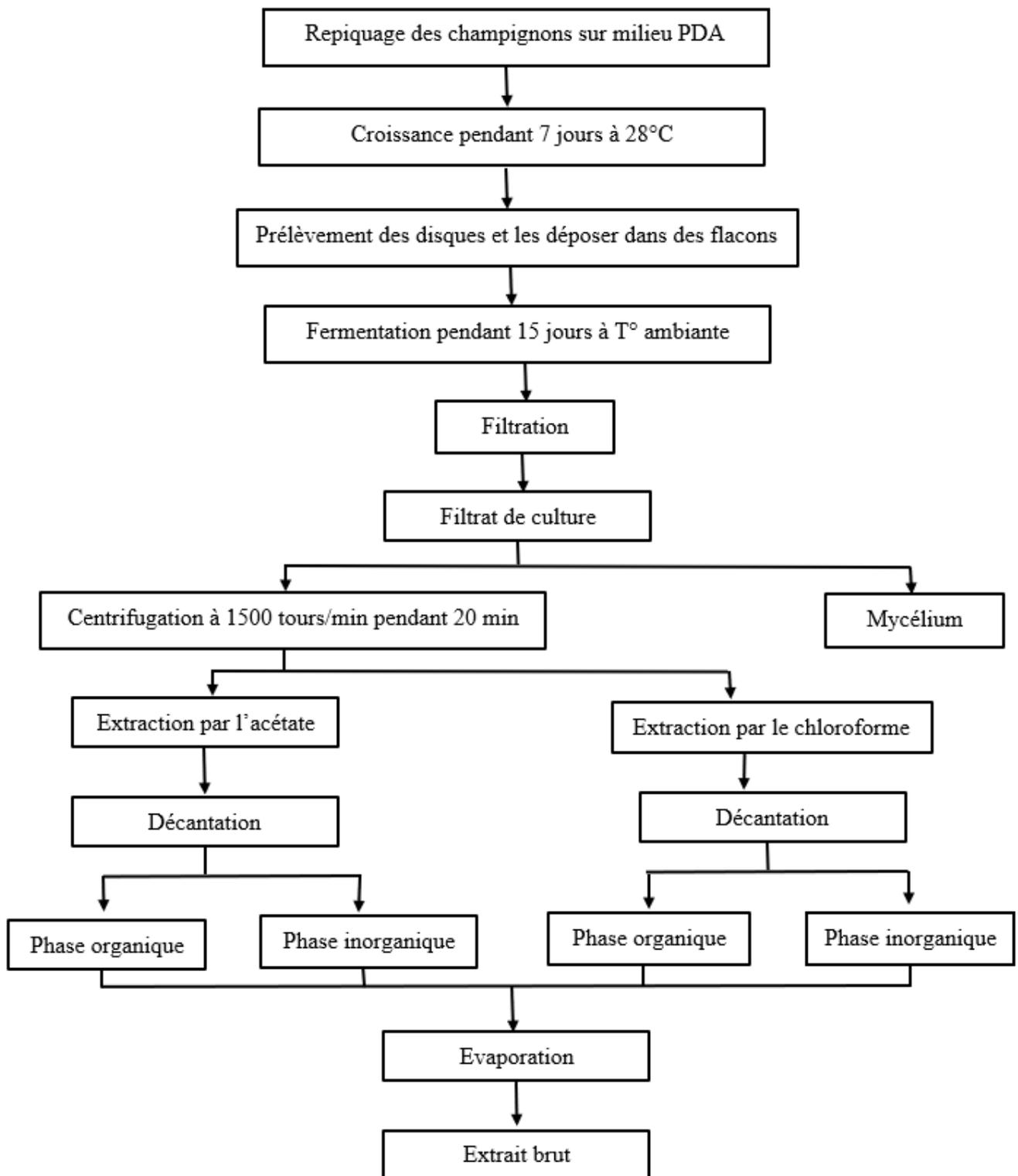


Figure 8 : Schéma récapitulatif des étapes de fermentation et d'extraction des substances bioactives des champignons par l'acétate d'éthyle et le chloroforme.

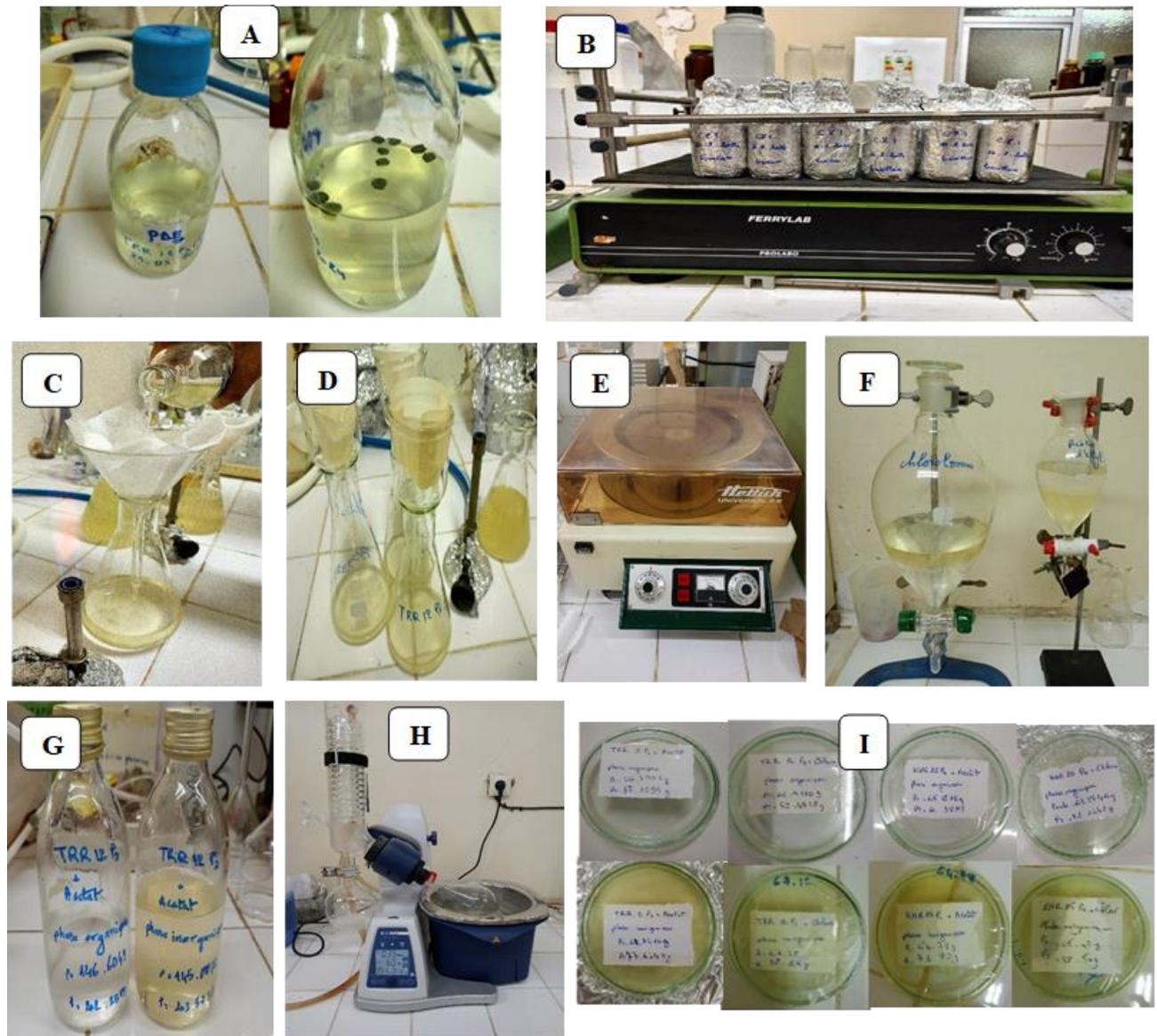


Figure 9 : L'extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes. A : Dépôt des disques mycéliens de *Penicillium* sp. et *F. oxysporum* dans le milieu PDB, B : Flacons déposés dans l'agitateur horizontal. C : Filtration par mèches à gaz. D : Deuxième filtration par papier filtre Watman. E : Centrifugation. F : Extraction avec chloroforme et acétate d'éthyle dans des ampoules à décanter. G : Récupération des deux phases. H : Evaporation du solvant par un évaporateur rotatif (model RS 100-PRO Spain). I : les extraits bruts.

II.2.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'objectif de cette méthode est la recherche du pouvoir antibactérien des extraits et des filtrats de cultures des *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *F. oxysporum* (TRR 12 P3) contre deux Bactéries Multi-Résistantes (BMR) *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Trois techniques ont été choisies.

II.2.4.1. Préparation des suspensions bactériennes

Les tests antibactériens ont été réalisés à partir de cultures jeunes (18 à 24 heures), en phase de croissance exponentielle. L'opacité de la suspension bactérienne dans l'eau physiologique (0,9% NaCl) stérile, doit être équivalente à 0,5 Mc Farland de concentration bactérienne estimée à 10^6 UFC/ml selon (Ikeagwu et *al.*, 2008).

II.2.4.2. Technique des cylindres d'agar (confrontation directe)

Les souches fongiques antagonistes ont été ensemencées sur le milieu PDA (annexe A). Après 10 jours d'incubation à 28°C, des cylindres d'agar des champignons de 6 mm de diamètre ont été déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton, ces derniers sont incubés à 28°C pendant 48 heures. Ensuite, ils sont ensemencés par écouvillonnage selon la technique du NCCLS (National Commite for Clinical Laboratory Standard) par les BMR, et sont incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures selon (Ordóñez et *al.*, 2022)(Figure 10).



Figure 10 : Ensemencement de la surface de la boîte contient le cylindre du champignon antagoniste.

II.2.4.3. Techniques des disques et des puits (confrontation indirecte)

Ces deux techniques consistent à étudier l'effet des substances bioactives des souches fongiques diffusées dans un milieu de fermentation liquide.

- Technique des disques

Un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne a servi pour ensemencer uniformément toute la surface de la boîte de gélose Mueller - Hinton. Après séchage de la surface pendant environ 5 min, des disques de 6 mm de diamètre du papier Wattman imbibés avec 10 μ l de l'extrait à tester de chloroforme ou d'acétate d'éthyle ou de filtrat brut sont séchés et déposés sur la surface des boîtes. Ces dernières, sont incubées à 4°C dans un réfrigérateur pendant 2 heures pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives, puis placées dans

une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures selon (Hazalin *et al.*, 2009) (Figure 11).



Figure 11 : Technique de diffusion par disques.

Après incubation, la lecture se fait à l'aide d'un pied à coulisse en mesurant avec précision les diamètres des zones d'inhibition qui sont représentés par une auréole claire formée autour des disques.

- **Technique des puits**

Des boîtes de Pétri contenant une couche de gélose Mueller-Hinton d'une épaisseur de 4 mm, sontensemencées par les BMR. Après un séchage de 5 ou 4 min, la gélose est perforée avec un cylindre en cuivre de 3 mm de diamètre stérile. Les puits préparés recevront un volume de 10 µl de filtrat de culture. Les boîtes sont déposées à la température ambiante pendant 30 minutes, puis incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures selon (Hastuty *et al.*, 2020) (Figure 12).



Figure 12 : Technique des puits. A : ensemencement uniformément de toute la surface du milieu MH, B : Dépôt de 10 µl de filtrat brut dans les puits perforés.

- **L'antibiogramme**

La méthode d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (MH) est la méthode historique qui reste à ce jour encore très utilisée. Elle repose sur la mise en culture d'un tapis bactérien sur un milieu gélosé sur lequel sont déposés des disques d'antibiotiques selon (CLSI, 2020) (Tableau 3).

Tableau 3 : Les antibiotiques utilisés pour chaque bactérie.

Les BMR utilisées	Les antibiotiques	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Céfoxitine(Cx30)	Vancomycin (VA30)
	Penicillin G(P10)	Acide fusidique (FC10)
	Oxacilline (OX1)	Lincomycin(L2)
	Kanamycin(K30)	Pristinamycin (RP15)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colistin (CL10)	Tétracycline (TC75)
	Ciprofloxacine (CIP5)	Kanamycin (K30)
	Gentamicine (GEN10)	Ticarcillin (TI75)
	Acide Clavulanique (CA2 30)	Zithromax (TO6 10)
	Tétracycline + Acide clavulanique (TCC 75/10)	Levofloxacine (LEV5)
	Acide Pipemidique (PI100)	Netilmicin (NET30)
	Aztreonam (AT30)	

II.2.5. Détermination de l'activité antagoniste

Afin de déterminer l'activité antagoniste des champignons, des filtrats et des extraits obtenus, deux méthodes ont été utilisées :

II.2.5.1. Test d'antagonisme *in vitro* par double culture ou coculture

Les endophytes antagonistes et les pathogènes ont été cultivés séparément dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA afin d'obtenir des cultures pures. L'essai de double culture a été réalisé par des disques de 6 mm de diamètre de chaque endophyte placé dans la périphérie des boîtes de Pétri et le disque du pathogène de même diamètre est déposé à 4,5 cm plus loin, et chaque interaction a subi trois répétitions et incubé à 27°C selon (Mohamed Mahmoud, 2017) (Figure 13).

Après trois jours d'incubation le rayon de chaque colonie est mesuré, et le taux d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{(r^1 - r^2)}{r^1} \times 100$$

r1 : rayon de la colonie de l'agent pathogène dans la direction opposée du potentiel de l'antagoniste (cm). r2 : rayon de la colonie de pathogène dans la direction vers le potentiel de l'antagonisme (cm).

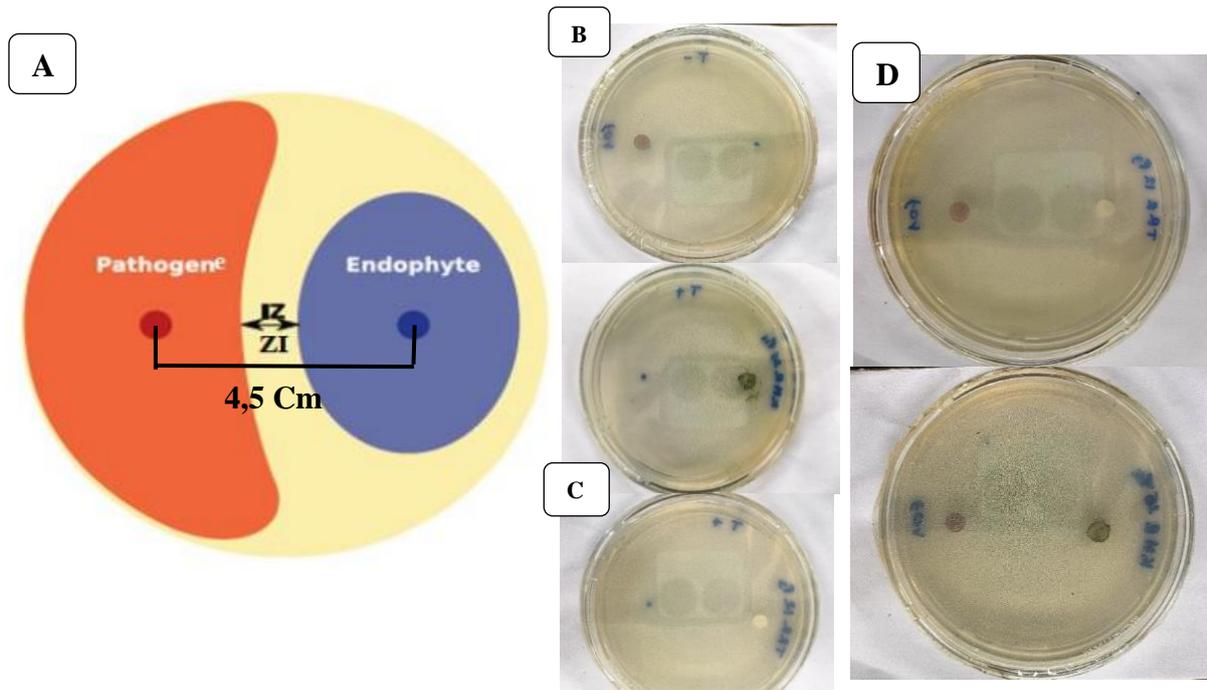


Figure 13 : Méthode de double culture. A : Diagramme du mode de dépôt des endophytes et d'agent pathogène B : Témoin négatif (l'agent pathogène). C : Témoin positif (les endophytes). D : Le dépôt des endophytes et l'agent pathogènes dans la boîte de Pétri.

II.2.5.2. Méthode de diffusion des disques

Le test de l'activité antagoniste des extraits obtenus par la méthode de diffusion par disques consiste à rechercher l'effet des antagonistes et le développement de champignon pathogène selon (Hazalin et *al.*, 2009).

Le champignon pathogène F.o.a a été cultivé sur le milieu PDA, la surface de ce champignon chargée de spores a été raclée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile en forme de L en présence de 10 ml d'eau distillée stérile. Le nombre de spores a été ajusté à une concentration dense approximative de 10^6 à 10^7 spores/ml selon (Badaoui et *al.*, 2011).

Un écouvillon stérile trempé dans la suspension fongique a servi àensemencer uniformément la surface de la boîte PDA. Après séchage de la surface pendant environ 5 min, des disques de 6 mm de diamètre du papier Wattman sont imbibés avec 10 μ l de l'extrait à tester de chloroforme ou d'acétate d'éthyle et sont déposés sur la surface des boîtes. Ces dernières, sont incubées à 4°C dans un réfrigérateur pendant 2 heures pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives, puis placées dans une étuve à 28°C pendant 48 h selon (Hazalin et *al.*, 2009).

II.2.6. Détermination de l'activité antagoniste à l'égard de *Tuta absoluta*

Le but de cette méthode est la mise en évidence d'une stratégie de lutte biologique basée sur l'utilisation des suspensions fongiques et des filtrats de cultures de deux champignons endophytes (*Penicillium* sp. et *F. oxysporum*) contre *T. absoluta* l'agent causal de la mineuse de la tomate.

II.2.6.1. Préparation des suspensions fongiques

Les champignons utilisés *Penicillium* sp. et *F. oxysporum* ont été purifiés sur le milieu PDA, la surface de ces champignons chargée de spores a été raclée à l'aide d'une anse de platine stérile en présence de 10 ml d'eau distillée stérile. Le nombre de spores a été ajusté à une concentration dense approximative de 10^6 à 10^7 spores/ml selon (Mohamed Mahmoud et al., 2021).

II.2.6.2. Inoculation des larves de *Tuta absoluta* par les champignons testés

Huit larves de *T. absoluta* sont déposées délicatement dans chaque boîte de Pétri. Pour alimenter les larves, nous avons entreposé dans chaque boîte des jeunes feuilles de tomate. Les différents traitements fongiques de *Penicillium* sp. et de *F. oxysporum* ont été pulvérisés sur les larves de *T. absoluta*. Le même nombre de larves a été placé dans une boîte témoin pulvérisée par l'eau distillée stérile. Deux répétitions ont été réalisées pour chaque traitement selon (Mohamed Mahmoud et al., 2021) (Figure 14).



Figure 14 : A : Les traitements fongiques utilisés. B : Boîte de 8 larves pulvérisées par un traitement.

II.2.7. Conservation des souches fongiques

La conservation est une étape cruciale afin d'éviter la disparition des souches en vue d'une réutilisation ultérieure. Les souches fongiques ont été conservées en utilisant des tubes d'ependorf stériles. Cette méthode implique de placer les morceaux d'agar contenant les

champignons jeunes et purs dans des eppendorf stériles codés et fermés avec du parafilm, puis les conserver à une température de -20°C .



Figure 15 : Eppendorf contient les disques des souches fongiques à conservées.

II.2.8. Analyse des métabolites secondaires extraits des champignons endophytes

Étant donné que les souches fongiques étudiées synthétisent une combinaison de métabolites secondaires détectés après les tests précédemment effectués, il apparaît nécessaire d'utiliser différentes techniques analytiques afin d'identifier les molécules présentes dans le filtrat et l'extrait brut. Ces analyses ont été effectuées au niveau du laboratoire de chimie, département de génie des procédés.

II.2.8.1. La spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-Visible est la plus ancienne et la plus utilisée des méthodes d'analyse dans les laboratoires. Cependant, elle ne fournit que peu d'informations structurales (analyse qualitative) comparées aux autres méthodes spectroscopiques (*spectres*, s. d.).

Les filtrats de culture, les extraits bruts obtenus et les standards sont additionnés avec de l'eau distillée, chloroforme ou l'acétate d'éthyle ont été traversés dans une cuve en quartz pour être balayés et analysés dans une longueur d'onde λ entre 200 et 800 nm par un spectrophotomètre à UV- visible (SHIMASZU UV-1700) (Figure 16).

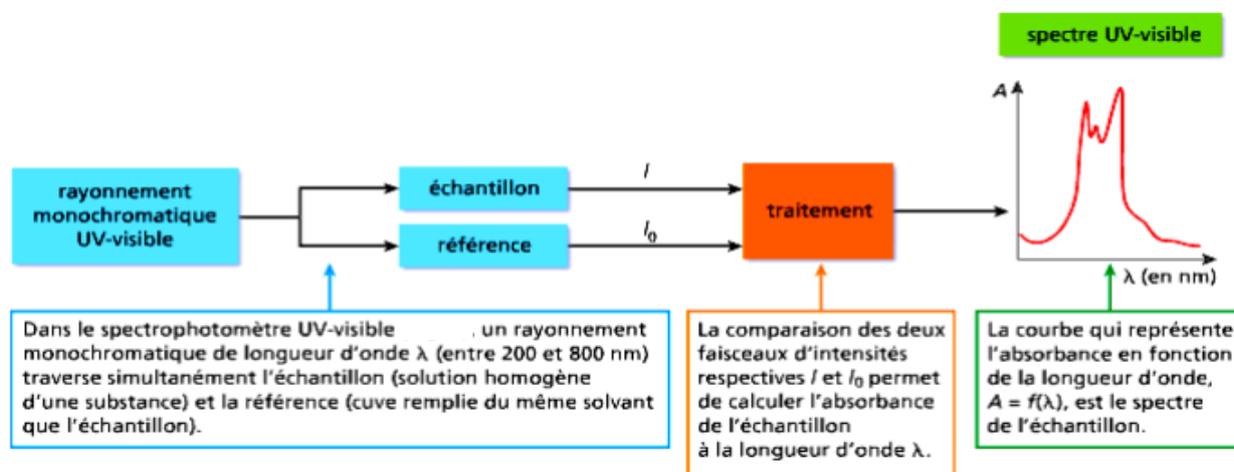


Figure 16 : Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre.

II.2.8.2. La Chromatographie sur Couche Mince

La chromatographie sur couche mince est la méthode analytique la plus couramment employée pour séparer les métabolites secondaires des champignons (Bhagobaty et joshi, 2011). Selon (Cai, 2014), elle est définie comme une méthode biophysique essentielle, rapide, sensible et peu coûteuse, permettant une séparation efficace des métabolites secondaires et leur identification avec une bonne précision.

Le fractionnement et l'identification des métabolites secondaires à partir des extraits de KHR 25 P4 et TRR 12 P3, a été réalisée par CCM sur gel de silice (99571-25EA) ; les extraits de *Penicillium* sp. et *F. oxysporum* ont été déposés sous forme de spots de 20 µl à l'aide d'une seringue à des points repères au bord inférieur des plaques où les standards étant la Pénicilline, la Rutine, l'Acide oléique, l'Acide linoléique, l'Acide laurique, l'Acide myristique et Beta carotène.

Après le dépôt, les plaques ont été séchées à l'air libre, puis placées dans la cuve chromatographique en position verticale contenant l'éluant, trois phases mobiles ont été appliquées : la première phase contient 10 ml d'acétate d'éthyle et 10 ml de chloroforme, la deuxième phase contient 5 ml d'acétate d'éthyle / 20 ml de chloroforme et la troisième phase était 10 ml chloroforme, 10 ml méthanol et 10 ml eau distillée.

Lorsque le front du solvant se trouve à environ 3 cm de l'extrémité supérieure de la plaque ; les plaques ont été retirées et séchées à l'air libre et placées sous une lampe à ultra-violet pour révéler les composés chimiques invisibles à l'œil nu, les différentes taches correspondantes aux constituants du mélange sont ensuite encerclées au crayon, la position de font doit être calculée selon la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{la distance parcourue par le substrat}}{\text{la distance parcourue par le solvant}}$$

CHAPITRE III.

Résultats et Discussion

CHAPITRE III. Résultats et Discussion

III.1. Résultats

III.1.1. Caractérisation macroscopique et microscopique des souches fongiques

L'observation macroscopique et microscopique des champignons a été effectuée après 10 jours d'incubation à 28°C.

Le *Fusarium oxysporum* est défini par une croissance plus ou moins rapide (5 à 7 jours) avec un aspect duveteux, blanc au partie supérieure, brun-chamois au partie inférieure. Il se caractérise par des filaments mycéliens fins, septés et hyalins, des macroconidies incurvées et des microconidies fusiformes ou en forme de reins (Figure 17).

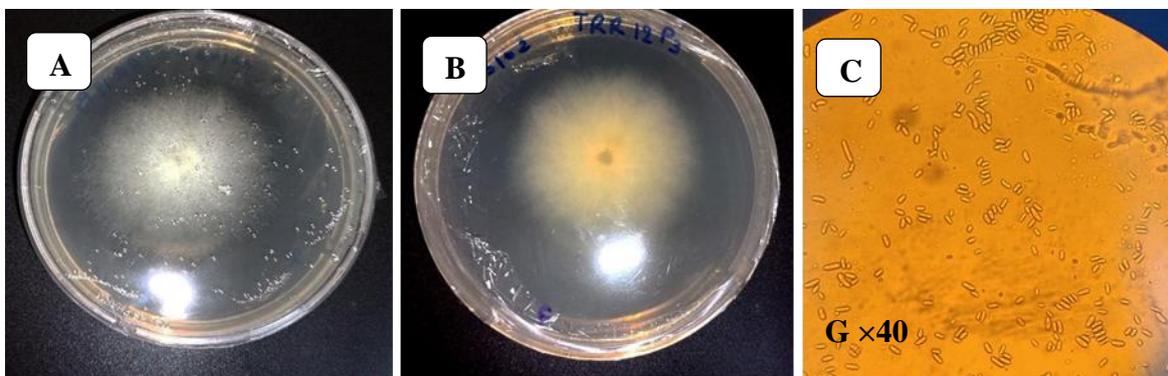


Figure 17 : Observation macroscopique (A : partie supérieure ; B : partie inférieure) et microscopique (C) de *F.oxysporum* (TRR 12 P3).

Le genre *Penicillium* sp. est défini par une croissance plus ou moins lente (5 à 7 jours) avec un aspect duveteux à poudreux, verte à la partie supérieure, jaune à la partie inférieure. Il se caractérise par des filaments mycéliens fins, septés, à bords parallèles, des phialides en forme de pinceau et des conidies rondes à ovoïdes, hyalins et lisses (Figure 18).

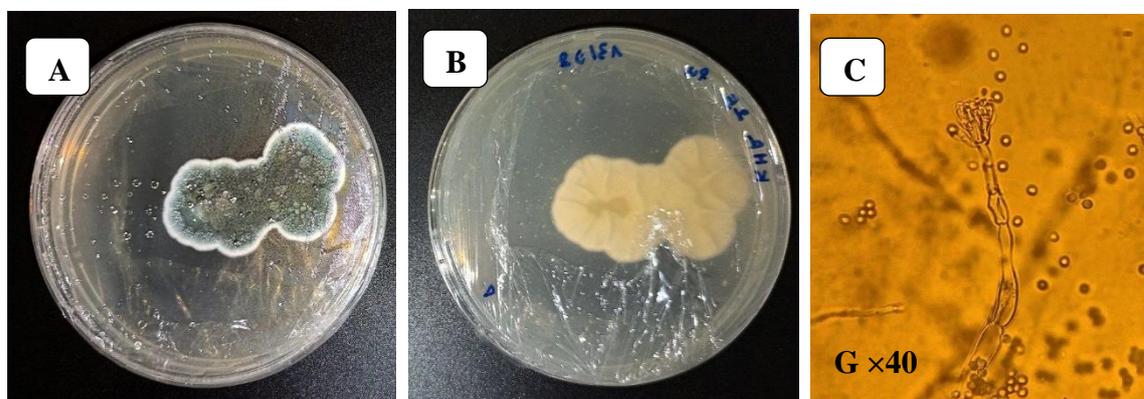


Figure 18 : Observation macroscopique (A : partie supérieure ; B : partie inférieure) et microscopique (C) de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4).

III.1.2. Fermentation et extraction des métabolites secondaires

III.1.2.1. Le rendement des extraits fongiques après fermentation

Les extraits fongiques sont rendus par la quantité d'extrait que l'on obtient après l'extraction (Tableau 4).

Tableau 4 : Le rendement des extraits fongiques.

	Le poids total d'extrait			
	<i>Fusarium oxysporum</i> TRR 12 P3		<i>Penicillium</i> sp. KHR 25 P4	
	Phase organique	Phase inorganique	Phase organique	Phase inorganique
Acétate d'éthyle	1,31g	12,92 g	1,26 g	9,02 g
Chloroforme	2,58 g	11,12 g	3,77 g	13,77 g

III.1.3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des deux espèces fongiques a été examinée. Trois méthodes ont été utilisées : la technique des cylindres d'agar, des disques et des puits.

III.1.3.1. Technique des cylindres d'agar (confrontation directe)

Les résultats indiquent que les deux souches de champignons donnent des zones d'inhibitions contre les deux bactéries multi résistantes ; la moyenne des diamètres d'inhibition a été de 35mm chez TRR 12 P3 contre *P.aeruginosa* et 31 mm contre *S.aureus*, alors que chez KHR 25 P4 a été de 23 mm contre *P.aeruginosa* et 22 mm contre *S.aureus* (Figure 19, 20).

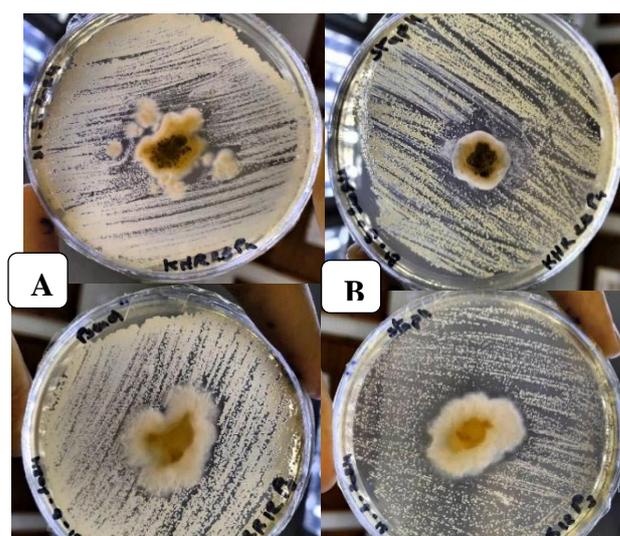


Figure 19 : Des boîtes de Pétri présentant les résultats de l'activité antagoniste exercée par les deux souches fongiques *Penicillium* sp. et *F.oxysporum*. (A : *S.aureus*, B : *P.aeruginosa*).

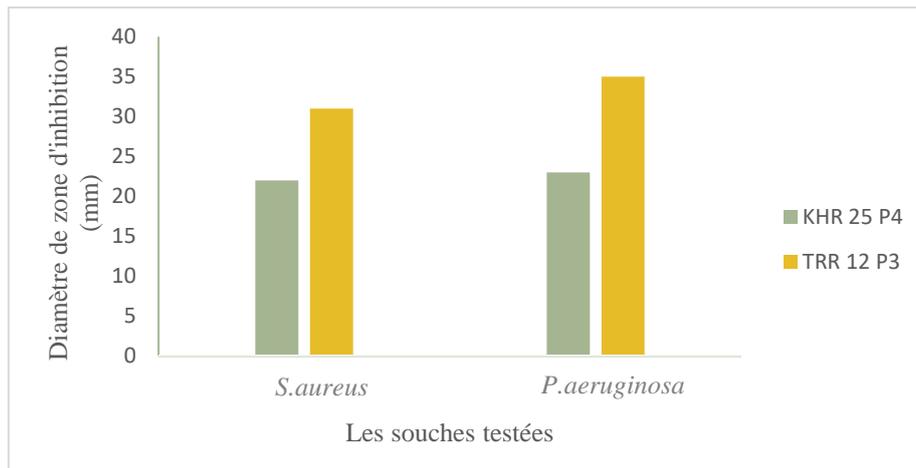


Figure 20 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *F.oxysporum* (TRR 12 P3) contre des souches testées par la technique des cylindres d'agar.

III.1.3.2. Technique des disques

Le test de l'activité antibactérienne des filtrats de culture et des extraits obtenus par la technique des disques a révélé que :

Les extraits organiques de chloroforme ont montré leur effet antibactérien contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. L'extrait chloroformique de *F.oxysporum* (TRR 12 P3) a montré son efficacité contre *P.aeruginosa* avec une zone de 11 mm, et contre *S.aureus* avec une zone de 9,5 mm. De plus, l'extrait de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) a également montré son efficacité avec une zone d'inhibition de 10,5 mm contre *P.aeruginosa*, et 9 mm avec *S.aureus* (Figures 21, 22, 23).

Les extraits organiques d'acétate d'éthyle des endophytes ont exercé une activité antibactérienne importante contre les Bactéries Multi Résistantes. Dont l'extrait de la souche *F.oxysporum* (TRR 12 P3) montre une inhibition avec une zone de 12 mm sur *P.aeruginosa* et 10 mm sur *S.aureus*, tandis que la moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) était de 11 mm chez *P.aeruginosa* et *S.aureus* (Figure 21, 22, 23).

L'extrait inorganique d'acétate d'éthyle de *F.oxysporum* (TRR 12 P3), a montré seulement une zone d'inhibition de 7 mm contre *S.aureus* et aucune activité antibactérienne n'a été détectée en présence de l'extrait inorganique chloroformique, tandis qu'une zone claire transparente autour de disque de l'extrait chloroformique inorganique de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) a été enregistrée (Figures 21, 22, 23).

Les filtrats bruts des souches fongiques n'ont montré aucune zone d'inhibition contre *P.aeruginosa* et/ou *S.aureus* (Figure 24).

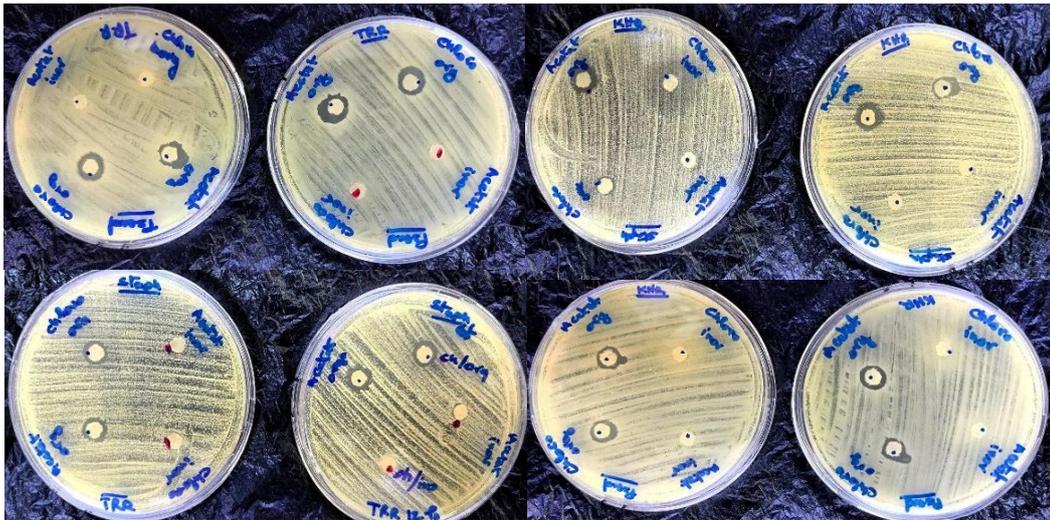


Figure 21 : Des boîtes de Pétri montrant l’activité antibactérienne des extraits fongiques testées par la technique des disques.

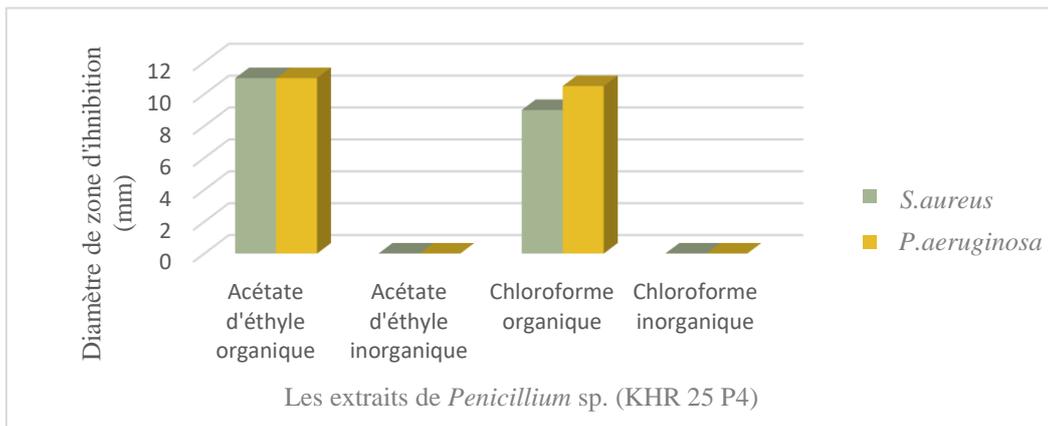


Figure 22 : Diamètres des zones d’inhibition déterminés lors de l’utilisation des extraits de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4).

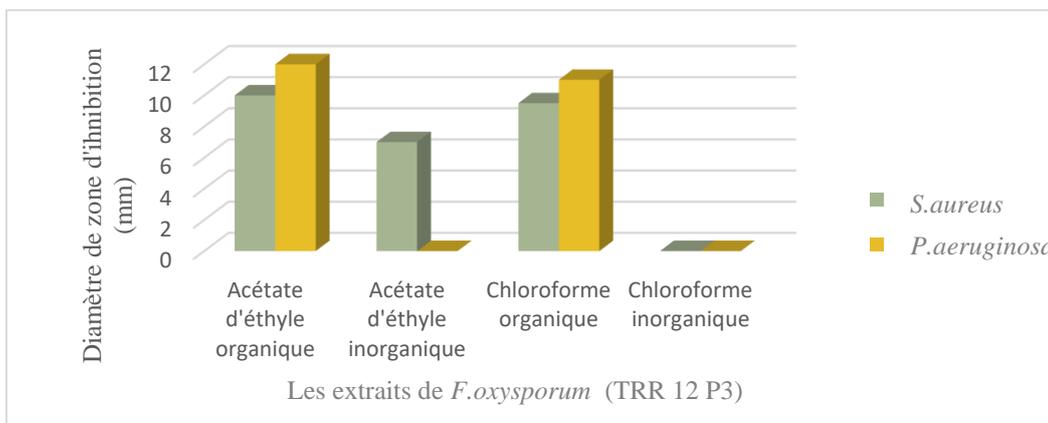


Figure 23 : Diamètres des zones d’inhibition déterminés lors de l’utilisation des extraits de *Fusarium oxysporum* (TRR 12 P3).

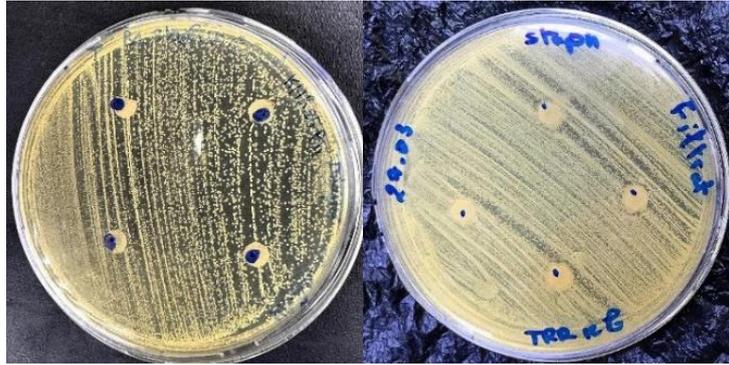


Figure 24 : Des boîtes de Pétri montrant l'activité antibactérienne des filtrats bruts testées par la technique des disques.

III.1.3.3. Techniques des puits

La technique des puits a été utilisée pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne des filtrats bruts des souches fongiques contre les Bactéries Multi-Résistante, les résultats obtenus ne montrent aucune zone d'inhibition en présence de filtrat brut de *F.oxysporum* (TRR 12 P3) chez *S.aureus* et *P.aeruginosa*, tandis que le filtrat de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) a montré une zone claire bien diffusée (Figure 25).



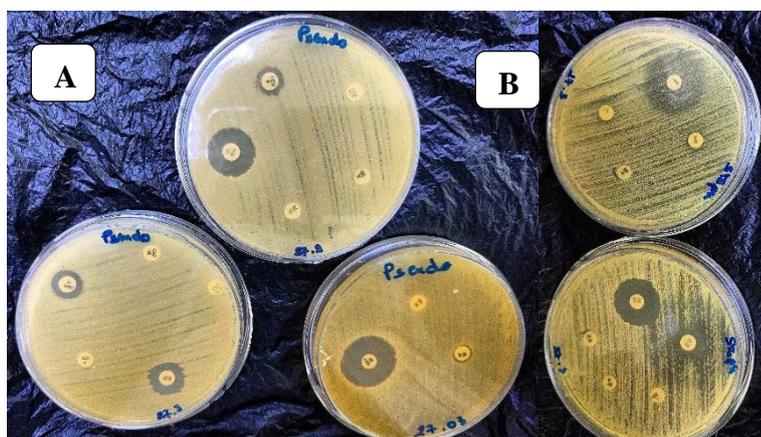
Figure 25 : Des boîtes de Pétri montrant l'effet des filtrats bruts de *Penicillium* sp. et *F.oxysporum* par la technique des puits.

III.1.3.4. L'antibiogramme

L'antibiogramme permet en effet de faire la distinction entre une souche de bactérie résistante et une souche sensible (Tableau 5) et (Figure 26).

Tableau 5 : Le diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'antibiogramme de *S.aureus* et *P.aeruginosa*

Les bactéries	L'antibiotique	Le diamètre	L'antibiotique	Le diamètre
<i>S.aureus</i>	VA 30	20 mm	Cx 30	Abs
	FC 10	12 mm	P 10	Abs
	L 2	24 mm	OX 1	Abs
	RP 15	Abs	K 30	Abs
<i>P.aeruginosa</i>	CL 10	15 mm	TC 75	Abs
	CIP 5	Abs	K 30	Abs
	GEN 10	12 mm	TI 75	Abs
	CA2 30	Abs	TO6 10	17 mm
	TCC 75/10	Abs	LEV 5	12 mm
	PI 100	Abs	NET 30	24 mm
	AT 30	9 mm		

**Figure 26** : Des boîtes de Pétri montrant les résultats d'antibiogramme exercés par les deux souches bactériennes. A : *P.aeruginosa* ; B : *S.aureus*.

III.1.4. Détermination de l'activité antagoniste

III.1.4.1. Test d'antagonisme *in vitro* par double culture ou coculture

Après 10 jours d'incubation, les résultats obtenus indiquent que la croissance mycélienne de la souche pathogène témoin est plus importante par rapport à celle observée lors des différentes confrontations (pathogène - antagoniste). Les deux isolats d'endophytes présentent des effets antagonistes contre l'agent pathogène (F.o.a).

D'après les résultats obtenus, les deux souches endophytes ont provoqué une inhibition de la croissance mycélienne avec l'apparition d'une zone d'inhibition en présence de champignon pathogène, la souche de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) a enregistré les meilleures zones d'inhibition qui atteignent 10 mm, alors que la souche *F.oxysporum* (TRR 12 P3) a enregistré des zones d'inhibition de 8 mm (figure 27, 28).

Le taux d'inhibition maximum a été enregistré en présence de *F.oxysporum* TRR 12 P3 (72,92%), qui présente aussi une précipitation visible en arrière-plan orangé, tandis que le taux le plus faible est enregistré en présence de *Penicillium* sp. KHR 25 P4 (68,75%) (figure 27,28).

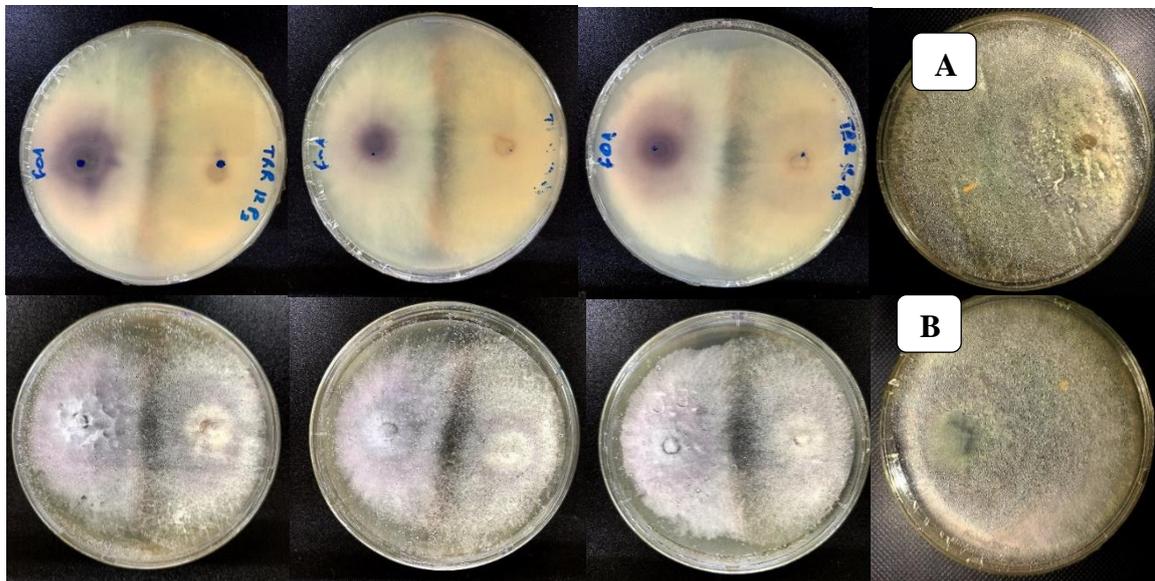


Figure 28 : Effet de l'antagoniste *F.oxysporum* sur la croissance de F.o.a par rapport au témoin. A : témoin de *F.oxysporum* ; B : témoin de F.o.a

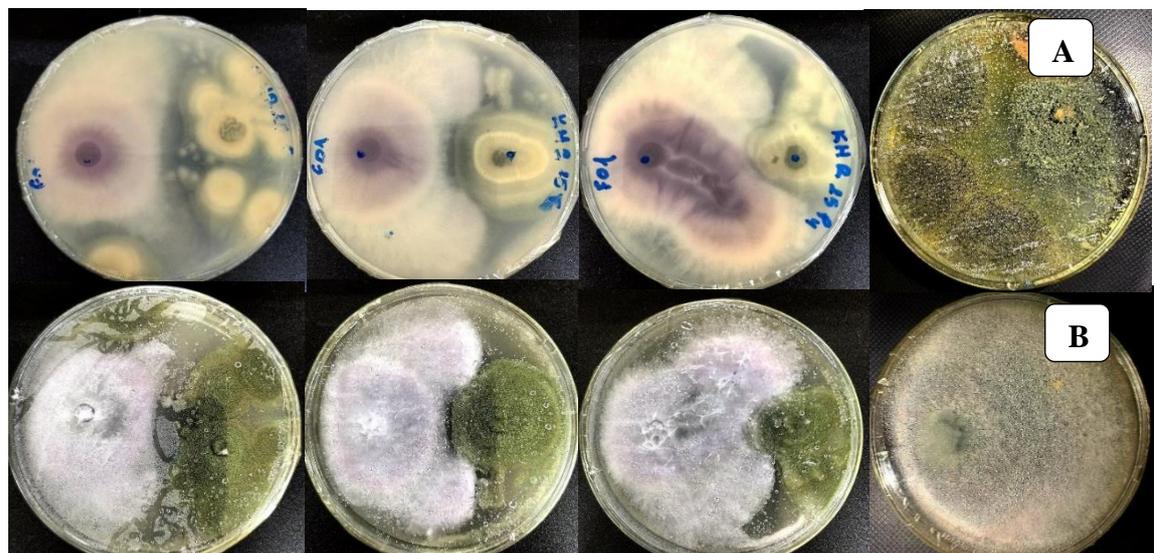


Figure 27 : Effet de l'antagoniste de *Penicillium* sp. sur la croissance de F.o.a par rapport au témoin A : témoin de *Penicillium* sp. ; B : témoin de F.o.a.

III.1.4.2. Méthode de diffusion des disques

L'activité antagoniste des extraits de champignons endophytes dérivés d'acétate d'éthyle et du chloroforme testés par la méthode de diffusion sur disque contre le champignon pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* a montré une bonne activité inhibitrice après 48h par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques. Il est noté que les zones d'inhibition

présentent une diversité de diamètres, dépend des extraits et des espèces antagonistes utilisées (Figure 29).

L'extrait chloroformique de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) a montré la plus grande zone d'inhibition de 19 mm contre F.o.a, tandis que les extraits de chloroforme de *F.oxysporum* (TRR 12 P3) ont enregistré un diamètre de 15,5 mm.

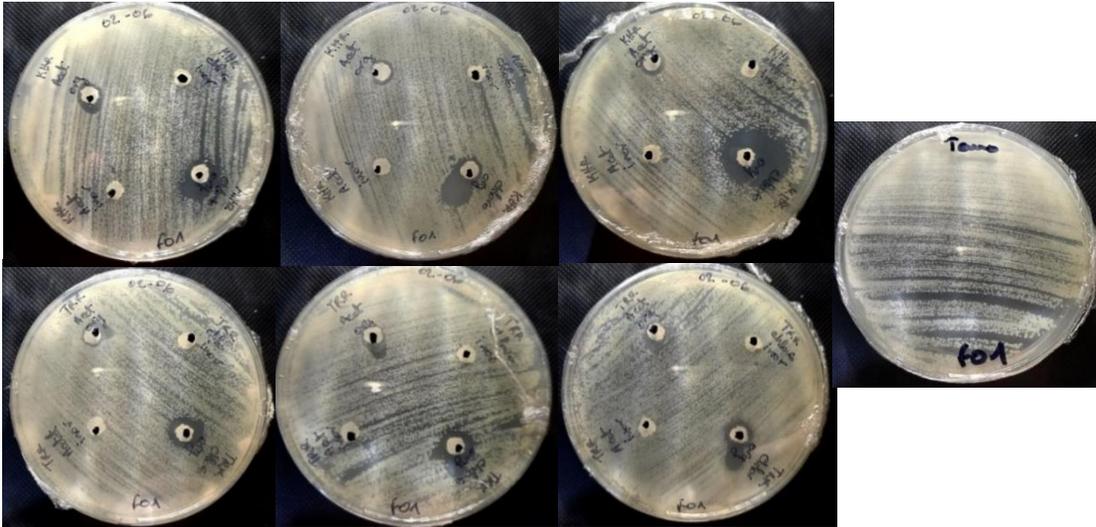


Figure 29 : Zones d’inhibition (en mm) de chaque extrait fongique obtenues par l’acétate d’éthyle et chloroforme (phase organique) en présence de F.o.a.

L'extrait d'acétate d'éthyle de *F.oxysporum* (TRR 12 P3) a enregistré une zone d'inhibition était de l'ordre de 11,5 mm vis-à-vis de F.o.a, tandis qu'elle est de 10 mm chez (KHR 25 P4).

Les divers extraits ont révélé des niveaux variés d'activité antifongique, avec des zones d'inhibition plus importantes (19 mm) en présence des extraits chloroformiques, et moins importantes (11,5 mm) en présence des extraits d'acétate d'éthyle (Tableau 6).

Tableau 6 : Les zones d’inhibition (en mm) obtenues lors du test de diffusion sur disques des extraits des champignons endophytes testés (phase organique).

Extrait des champignons endophytes		Champignon phytopathogène
		<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albidinis</i>
<i>Penicillium</i> sp. KHR 25 P4	Acétate d'éthyle	10 mm
	Chloroforme	19 mm
<i>Fusarium oxysporum</i> TRR 12 P3	Acétate d'éthyle	11,5 mm
	Chloroforme	15,5 mm

III.1.5. Détermination de l'activité antagoniste à l'égard de la mineuse de tomate

Les essais d'antagonismes *in vitro* par l'utilisation de filtrats de cultures et de suspensions fongiques de *Penicillium* sp. et *F.oxysporum* contre les larves de *T.absoluta*, ont montré un effet significatif quel que soit l'antagoniste testé.

Les résultats ont montré que les suspensions fongiques et les filtrats de *Penicillium* sp. et *F.oxysporum* ont entraîné une mortalité des larves de *T.absoluta*, en particulier chez les larves de stade larvaire L1. De plus, la suspension fongique a provoqué un ralentissement du mouvement des larves L3 et L4. Il est intéressant de noter également que les larves exposées à la suspension fongique à base de *Penicillium* sp. ne sont pas métamorphosées en adultes, contrairement aux larves témoins.

Au cours de cette étude, on a remarqué une augmentation de mortalité des larves de *T.absoluta* avec le temps. Après avoir vaporisé les larves infectées par les deux souches fongiques *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *F.oxysporum* (TRR 12 P3), le taux de mortalité a été mesuré à 24, 48 et 72 heures (Figure 30).

Après 24 h, le taux de mortalité des larves de *T.absoluta* était élevé lorsqu'elles étaient exposées à la suspension fongique et au filtrat de *F.oxysporum* 18,75 %. En revanche, une faible mortalité pour les suspensions de *Penicillium* sp. 6,25 % et 0 % pour le filtrat. Aucun changement n'a été observé en ce qui concerne le taux de mortalité pour le témoin.

Après 48 h, les larves traitées avec la suspension et le filtrat de *F.oxysporum* n'ont montré aucun changement dans le taux de mortalité par rapport au premier jour. En revanche, pour les solutions de *Penicillium* sp. ont enregistré une augmentation de la mortalité avec 37,5 % pour la suspension et 31,25 % pour le filtrat de *Penicillium* sp. Il y a eu une légère augmentation du taux de mortalité chez les larves traitées avec de l'eau distillée stérile.

Après 72 heures, la suspension de *Penicillium* sp. a provoqué la mort des larves à un taux de 81,25 % et de 50 % avec le filtre. Tandis que chez *F.oxysporum* le taux de mortalité est 75% avec la suspension fongique et 43,75 % pour le filtrat. Avec une légère augmentation de 25% chez le témoin après 3 jours de pulvérisation.

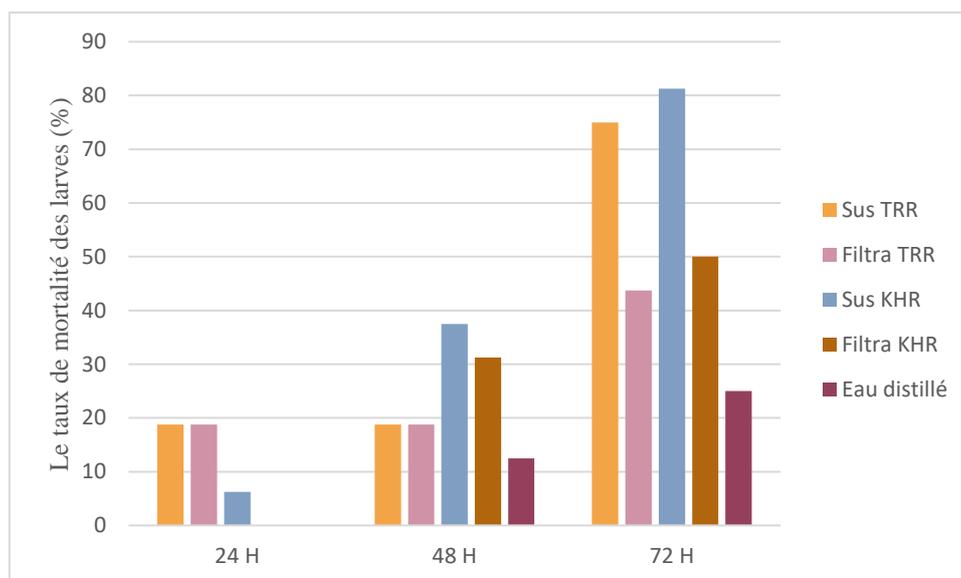


Figure 31 : Le taux de mortalité des larves traitées par suspensions fongiques et filtrats de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *F.oxysporum* (TRR 12 P3).

Une semaine après la pulvérisation, une couche blanche sur les larves non tuées, a été observée, les larves ont été recouvertes par les spores de champignon donnant ainsi l'aspect d'une momie (Figure A). Après 10 jours, les larves se transforment en chrysalides dans les boîtes de Pétri pulvérisées avec les suspensions fongiques et les filtrats de *Penicillium* sp. et *F.oxysporum*. Ces chrysalides évoluent par la suite en adultes (Figure C) (Figure 31)

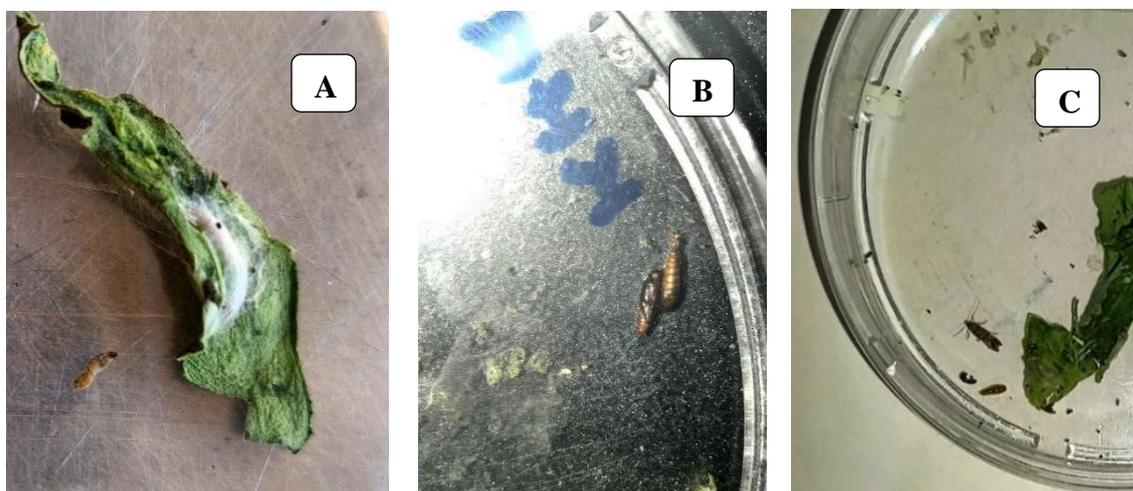


Figure 30 : Les larves de *T. absoluta* dans différents stades après pulvérisation de la suspension fongique de *Penicillium* sp. et *F. oxysporum* A : L'aspect d'une momie, B : Chrysalides, C : Adultes.

Après 15 jours, on fait la deuxième pulvérisation pour les adultes : le taux de mortalité des adultes infestés par les deux souches fongiques (KHR 25 P4) et (TRR 12 P3) a été évalué après 24, 48 et 72 h de pulvérisation.

Après 24 h, nous n'avons remarqué aucun changement dans le taux de mortalité des adultes en utilisant la suspension fongique et le filtrat de *Penicillium* sp et de *F. oxysporum*. et aussi pour les adultes pulvérisés avec l'eau distillée stérile 0 %.

Après 48 heures, mortalité totale pour les adultes pulvérisés avec la suspension et le filtrat de *Penicillium* sp. 100%. Une faible augmentation dans le taux de mortalité a été constatée pour les larves pulvérisées avec le filtrat et suspension de *F. oxysporum* et pour l'eau distillée stérile après 48 h.

Après 72 h ont remarqué une mortalité totale pour les adultes pulvérisés avec la solution et le filtrat de *F. oxysporum* 100%. Après une semaine qui suivit la pulvérisation, on remarque la mortalité totale des adultes qui pulvérisent l'eau distillée stérile.

Les résultats obtenus indiquent que la suspension fongique pour les deux champignons qui atteint la cible et tue plus efficacement comparée aux filtrats de deux champignons ce qui signifie des taux de mortalité élevés.

III.1.6. Résultats d'analyse des métabolites secondaires extraits des champignons endophytes

III.1.6.1. Spectrophotométrie UV-visible

Le spectre UV-visible est déterminé, pour noter la présence ou absence des standards dans nos extraits de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *F.oxysporum* (TRR 12 P3) dans l'acétate d'éthyle et le chloroforme. Le balayage spectral a été effectué entre 190/200 à 800 nm (Figure 32).

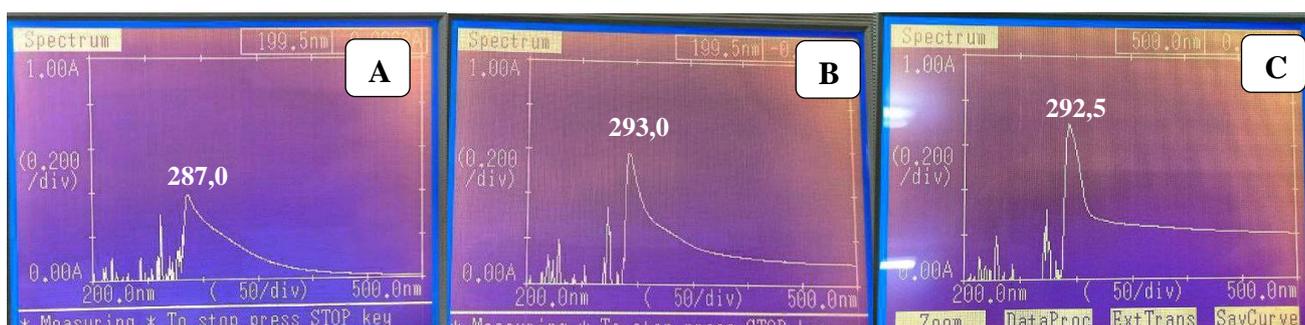


Figure 32 : Les spectres d'absorption des standards. A : Acide myristique. B : Acide oléique. C : Pénicilline.

Les extraits *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *F.oxysporum* (TRR 12 P3) présentent un spectre caractérisé par des séries de pics, ce qui est traduit par l'existence de plusieurs composés (Figure 33).

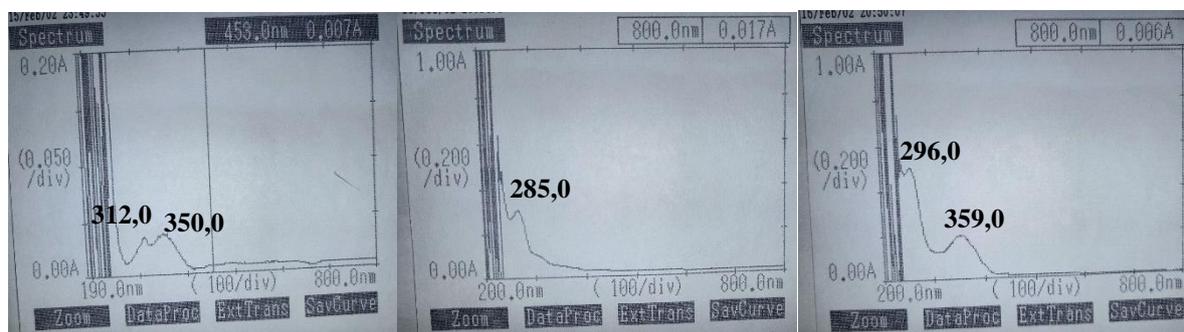


Figure 33 : Les spectres d'absorption des extraits de *Penicillium* sp. et *F.oxysporum*.

L'analyse du spectre UV-visible montre que le spectre d'absorption du standard d'acide linoléique obtenu à un seul pic avec une longueur d'onde maximale de 269,0 nm. Dans le spectre d'absorption de l'extrait KHR 12 P4, on remarque la présence d'un pic avec la même longueur d'onde de 269,0 nm (Figure 34).

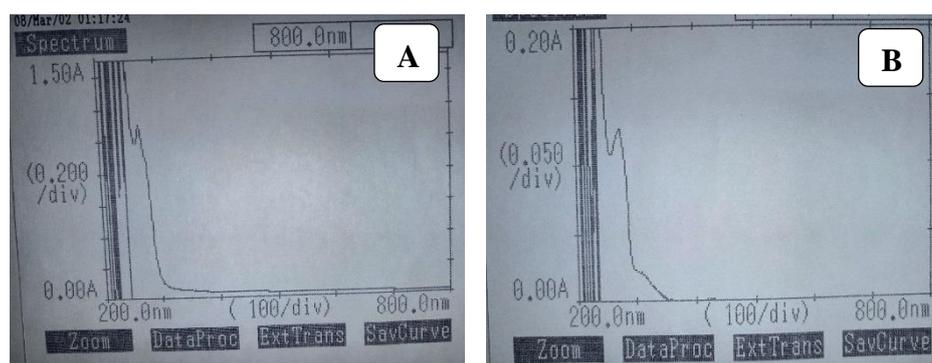


Figure 34 : Les spectres d'absorption. A : l'extrait de *Penicillium* sp. B : l'acide linoléique.

Ces résultats montrent l'existence de la bande d'absorption maximale du standard dans l'extrait, ce qui indique partiellement la présence de l'acide linoléique dans notre extrait.

III.1.6.2. Chromatographie sur couche mince

Afin de réaliser une évaluation qualitative de la composition chimique de nos extraits, nous avons effectué une chromatographie analytique sur couche mince en utilisant trois systèmes de solvants différents pour la phase mobile. Cette chromatographie a permis de séparer les substances actives et de déterminer le meilleur système de séparation, tout en mettant en évidence la présence ou l'absence des standards utilisés (Pénicilline, Rutine, Beta carotène, l'acide oléique, linoléique, laurique et myristique).

La visualisation sous la lampe à UV des chromatogrammes des extraits bruts développés sur les trois systèmes de solvants différents, révèle une bonne séparation des bandes des extraits avec le système "A". En revanche, le système "B" a permis la séparation de quelques composés, et d'un seul standard. Ainsi, le système "C" n'a pas permis la séparation des différents composés présentes dans nos extraits (Tableau 7).

Tableau 7 : Récapitulation d'efficacité des différents systèmes de solvants pour la CCM.

(+) Séparation, (-) Pas de séparation, (+/-) Faible séparation.

Systèmes de solvants	Efficacité de système
A	+
B	+/-
C	-

D'après l'observation des chromatogrammes sous lumière UV, les spots obtenus sous forme de taches fluorescentes permettent de visualiser les standards après la migration et de confirmer leurs présences dans nos extraits de *Penicillium sp.* et/ou *F.oxysporum*.

L'extrait de la souche de *Penicillium sp.* (KHR 25 P4) obtenue par le chloroforme a donné sur la plaque de CCM 1 des taches fluorescentes, l'une de ces taches a un rapport frontal (Rf) de 0,26 identique à celui du standard acide linoléique. Ces résultats montrent la présence de l'acide linoléique dans l'extrait de la souche de *Penicillium sp.* (KHR 25 P4) obtenu par le chloroforme (Figure 35).

Dans la plaque de CCM 2 ; l'extrait de la souche de *Penicillium sp.* (KHR 25 P4) a donné trois taches, l'une a un rapport frontal égal à 0,39 identique à celui de Pénicilline. Ces résultats montrent la présence de la pénicilline dans l'extrait de la souche de *Penicillium sp.* (KHR 25 P4) obtenu par l'extraction par le chloroforme (Figure 35).

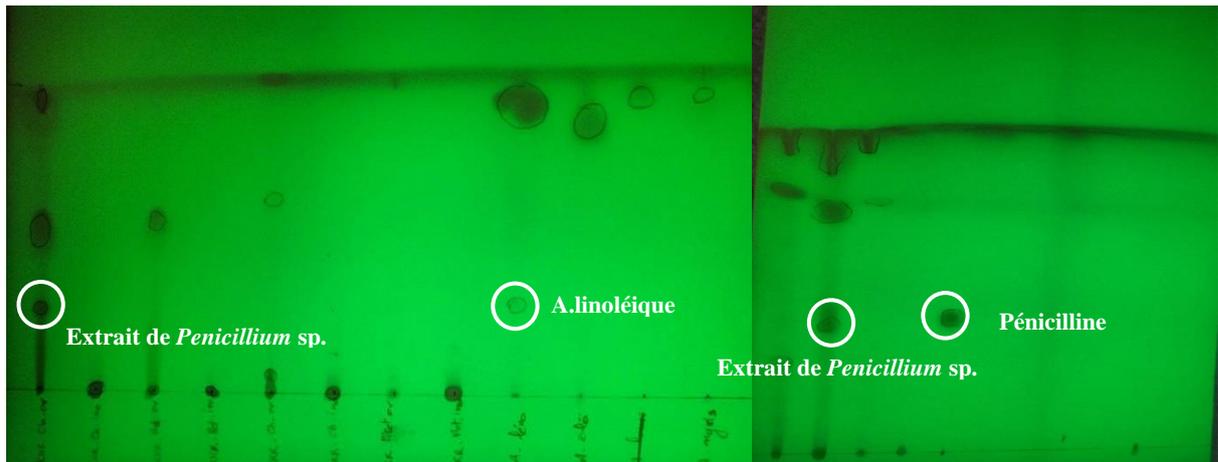


Figure 35 : Révélation des chromatogrammes des extraits de *Penicillium* sp. et *F.oxysporum* par UV.

Dans les autres chromatogrammes, on observe différents métabolites qui ont été migrés selon leur polarité avec l'éluant :

- L'extrait de *F.oxysporum* (TRR 12 P3) a révélé la présence de deux taches différentes de celle du standard avec un rapport frontal varié comme : $R_f = 0,51$ et $R_f = 0,59$.
- L'extrait de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) a révélé la présence de plusieurs taches différentes avec un rapport frontal (R_f) de 0,26 ; 0,26 et 0,5.

III.2. Discussion

Les métabolites secondaires produits par les champignons endophytes représentent une ressource naturelle contenant diverses substances aux bienfaits thérapeutiques variés. *Penicillium* et *Fusarium* produisent une large variété de composés avec différentes activités biologiques.

L'effet antimicrobien des deux souches fongiques *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *Fusarium oxysporum* (TRR 12 P3) à l'encontre de deux souches multi-résistantes (*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) a été mis en évidence à travers l'utilisation des disques de ces champignons et leurs extraits.

Selon les résultats obtenus qui concordent avec ceux obtenus antérieurement par (Strobel et al., 2004; Pimentel et al., 2010), les champignons endophytes peuvent avoir une activité antibactérienne.

Le test de la confrontation directe, a révélé la capacité de *Fusarium oxysporum* (TRR 12 P3) et *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) a inhibé où ralentir la croissance des Bactéries Multi-Résistantes (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*), relativement avec les résultats de Ordóñez et al. (2022) qui prouvées que les champignons ont un effet inhibiteur contre les Gram positive (*S.aureus*) et Gram négative (*P.aeruginosa*), d'autre travaux sur les mêmes bactéries utilisées ont prouvées également l'activité antibactérienne des champignons endophytes (Mohamed Mahmoud et al., en cours de publication). D'autres recherches ont montré que les composés bioactifs des champignons endophytes sont considérés comme une source potentielle d'antibiotique de nouvelle génération (Eshboev et al., 2023).

Le chloroforme et l'acétate d'éthyle sont deux solvants organiques souvent utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires à effet antibactérien (Praveena & Padmini, 2011; Manila et al., 2014). Nos résultats obtenus dans la technique de diffusion des disques par l'utilisation de filtrats bruts de deux champignons, ne montrent aucun effet inhibiteur contre *P.aeruginosa* et/ou *S.aureus* ; par contre, l'utilisation des extraits de l'acétate d'éthyle et de chloroforme ont exercé une activité antibactérienne efficace contre ces souches multirésistantes ; cette activité antibactérienne est beaucoup plus importante chez *P.aeruginosa* par rapport à *S.aureus*.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux groupes de microorganismes différent morphologiquement. Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharidique portant les composants structurels

lipopolysaccharides, ceci rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif, lesquelles seront plus sensibles car elles ont seulement une couche de peptidoglycane extérieure qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (Kumar et al., 2010).

L'effet antagoniste des souches fongiques de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et de *Fusarium oxysporum* (TRR 12 P3) contre un champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* a été mis en évidence à travers l'utilisation de coculture et des extraits fongiques.

Les résultats de la coculture ont révélés la capacité des endophytes utilisés à inhiber la croissance mycélienne du pathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. Selon Mohamed Mahmoud (2017), cette inhibition est due principalement à la compétition entre les endophytes testés et le pathogène pour les nutriments et l'espace. Cette compétition est un processus par lequel les endophytes pourraient empêcher la colonisation de l'hôte par des agents pathogènes (Salmi, 2022).

Plusieurs chercheurs ont montré que le genre *Penicillium* a la capacité de synthétiser des sidérophores, ces derniers présentent un composant de compétition pour l'acquisition du fer, qui inhibe la croissance des microorganismes pathogènes ou leurs activités métaboliques. Tandis que plusieurs souches non pathogènes de *Fusarium* sp. ont démontré l'importance de la compétition pour le glucose et le carbone, comme mécanisme d'action contre les différentes formes spéciales de *Fusarium oxysporum* (Mohamed Mahmoud, 2017).

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disques, ont révélé la capacité des extraits des champignons endophytes testés à inhiber la croissance de la souche pathogène utilisée. Selon Deb et al (2017), cette inhibition est due principalement à l'antibiose qui résulte de la production des substances qui agissent comme des antifongiques. La comparaison de nos résultats avec celle de Aoumria et al. (2019) et de Abouamama et al. (2022), nous a permis de déduire qu'il est possible de contrôler la maladie du Bayoud en utilisant des isolats antagonistes obtenus à partir de la même plante hôte dans notre cas le palmier dattier.

La recherche d'un biopesticide à l'état brut à base de champignons endophytes a été réalisée par plusieurs chercheurs ; (Karaca et al., 2022) ont montré que tous les champignons endophytes peuvent réduire les dommages causés par la mineuse de la tomate. Agbessenou et al. (2022) ont utilisé *Trichoderma asperellum* ; Dabsu & Kovanci. (2023) qui utilise *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* et aussi Mohamed Mahmoud et al. (2021) avec

Clonostachys spp. pour la première fois et *Beauveria bassiana*, ont confirmé la virulence de ces champignons endophytes sur les larves de *Tuta absoluta*. Ce qui nous a poussé à étudier l'action pathogène de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et de *Fusarium oxysporum* (TRR 12 P3) sur la mineuse de la tomate, d'après la bibliographie, aucune recherche n'a été réalisée auparavant.

Les activités démontrées par les résultats obtenus prouvent que les souches de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et de *Fusarium oxysporum* (TRR 12 P3) constituent un large réservoir de nouvelles molécules qui ont été examinées à l'aide de la CCM et du spectrophotomètre UV-visible pour leur identification.

La comparaison des résultats de la CCM et de l'UV-visible du standard d'acide linoléique avec celui des composés produits par la souche de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) a permis d'identifier la présence de l'acide linoléique dans les extraits réalisés, donc la souche de *Penicillium* sp. produit cet acide gras, parallèlement à *Penicillium spinulosum* (Shimi et al., 1959), *Penicillium commune* (Hussein et al., 2017) et *Penicillium brevicompactum* (Ali et al., 2017) qui ont montré leur capacité de produire l'acide linoléique.

Ainsi, la comparaison des extraits avec les standards a permis d'identifier la présence de la Pénicilline dans l'extrait de KHR 25 P4 avec des rapports frontaux identiques. Cet antibiotique reste un traitement de choix pour diverses infections, et sa production par *Penicillium* endophytique est bien connue (Aldeek et al., 2016; Deshmukh et al., 2022; Wen et al., 2022; Azar et al., 2023).

En revanche, l'absence des taches identiques à celui de quelques standards utilisés, tel que l'acide oléique, l'acide myristique, l'acide laurique et beta carotène, ne signifie pas l'absence des standards dans nos extraits, ceci peut être expliqué par le fait que les phases mobiles utilisées ne conviennent pas aux standards testés, tandis que l'apparition de différentes taches après la révélation par la lumière UV montre la présence des différents composés bioactifs dans les différents extraits des deux souches endophytiques. Ces résultats sont similaires à ceux de Deshmukh et al. (2022); Wen et al. (2022) qui montrent la possibilité de l'exploitation des endophytes dans le domaine pharmacologique pour la production des nouveaux traitements d'origine naturelle.

Conclusion

Conclusion

Les endophytes représentent une ressource écologique, capable de synthétiser une pléthore de métabolites secondaires bioactifs à mettre en œuvre dans le secteur pharmaceutique, l'agriculture et les applications environnementales.

Cette étude est basée sur trois parties, la première est consacrée à la fermentation et la récupération du filtrat de culture et de l'extrait brut de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *F.oxysporum* (TRR 12 P3). La deuxième est basée sur la mise en évidence de la présence de ces métabolites par l'activité antibactérienne de ces champignons en présence de deux Bactéries Multi-Résistantes (BMR) (*S.aureus* et *P.aeruginosa*), et leur effet antagoniste *in vitro*, contre un champignon phytopathogène tellurique (*Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis*) qui cause la maladie du bayoud sur le palmier dattier, ainsi que leur effet insecticide à l'égard de *Tuta absoluta* l'agent causale de la mineuse de la tomate. Afin d'identifier ces métabolites différentes techniques analytiques ont été utilisées ; la spectroscopie UV-visible et la chromatographie sur couche mince (CCM).

La mise en évidence de l'activité antibactérien des extraits de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) et *F. oxysporum* (TRR 12 P3) par le test de diffusion sur disques a démontré que tous les extraits avaient une activité inhibitrice sur les bactéries résistantes aux antibiotiques (*S. aureus* et *P. aeruginosa*), les extraits de la souche *F.oxysporum* (TRR 12 P3) présentent une activité antibactérienne plus importante que la souche *Penicillium* sp. (KHR 25 P4), dont les extraits d'acétate d'éthyle avaient plus d'effet que les extraits chloroformiques avec une zone d'inhibition de 12 mm. Tandis que la technique des puis ne montre aucun résultat significatif.

Les essais de l'effet antagoniste *in vitro* de *Penicillium* sp. et *F.oxysporum* contre le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedenis* (F.o.a) ont été révélés par le test de coculture, des taux d'inhibition différents. Le taux le plus élevé est évalué à l'encontre de *F.oxysporum* qui est de 72,92% avec l'apparition d'une zone d'inhibition claire allant jusqu'à 8 mm. L'activité antagoniste à travers la méthode de diffusion sur disque a enregistré la meilleure zone d'inhibition qui est de 19 mm vis-à-vis de F.o.a pour les extraits chloroformiques de *Penicillium* sp.

Les deux champignons endophytes *Penicillium* sp. et *F.oxysporum* ont été également utilisés pour la mise en évidence de leur effet insecticide à l'égard de *Tuta absoluta* l'agent causal de la mineuse de la tomate. L'évaluation de l'antagonisme *in vitro* de la pulvérisation de suspensions fongiques et des filtrats des cultures montre une efficacité remarquable. Les

résultats montrent que les suspensions fongiques de deux souches étaient plus efficaces que les filtrats de cultures, on a enregistré un taux de mortalité de 81,25 % et 75 % pour *Penicillium* sp. et *F.oxysporum* respectivement.

Les analyses des extraits des deux champignons endophytes par la spectroscopie UV-visible et la chromatographie sur couche mince, ont révélé que la souche de *Penicillium* sp. (KHR 25 P4) est une souche productrice de l'antibiotique cas de Pénicilline et l'acide gras cas de l'acide linoléique tandis que la souche *F.oxysporum* (TRR 12 P3) produit des composants qui ne conviennent pas aux standards testés.

Ces résultats montrent que les endophytes testés constituent une source et une usine de plusieurs métabolites présentant un intérêt biotechnologique, nos travaux sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies.

En perspective, on propose :

- Identification moléculaire des souches fongiques pour confirmer leurs affiliations.
- L'extraction, la purification et l'identification des substances bioactives par des méthodes plus performantes et précises « HPLC, CG-MS etc ».
- Tester d'autres standards avec d'autres solvants par différents volumes (phases mobiles).
- L'étude *in vitro* devra être confirmée par un suivi *in vivo* sur l'hôte de chaque pathogène testé.
- D'appliquer ces molécules bioactives sur d'autres agents pathogènes de quarantaine.
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antibactériennes secrétées (CMI).
- Tester ces champignons endophytes sous serre pour confirmer leurs efficacités sur les larves de *Tuta absoluta* et contre leurs œufs et adultes.
- Utiliser ces souches contre d'autres ravageurs.

Références bibliographiques

- **Abdel-Aziz, S. M., Abo Elsouid, M. M., & Anise, A. A. H.** (2017). Chapter 2 - Microbial Biosynthesis : A Repertory of Vital Natural Products. In A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Éds.), *Food Biosynthesis* (p. 25-54). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811372-1.00003-8>
- **Abegaz, B. M., & Kinfte, H. H.** (2019). Secondary metabolites, their structural diversity, bioactivity, and ecological functions : An overview. *Physical Sciences Reviews*, 4(6). <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0100>
- **Abouamama, S., Anis, B., Ryme, T., Sadika, H., Younes, E. G., Morad, C., Rahma, M., & Elamin, B. C. M.** (2022). IN VITRO STUDY OF BIOCONTROL POTENTIAL OF RHIZOSPHERIC MICROORGANISMS AGAINST FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. ALBEDINIS. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 34(1), Article 1. <https://doi.org/10.33866/phytopathol.034.01.0738>
- **Adione, N. M., Onyeka, I. P., Abba, C. C., Okoye, N. N., Okolo, C. C., Eze, P. M., Umeokoli, B. O., Anyanwu, O. O., Okoye, F. B. C., Adione, N. M., Onyeka, I. P., Abba, C. C., Okoye, N. N., Okolo, C. C., Eze, P. M., Umeokoli, B. O., Anyanwu, O. O., & Okoye, F. B. C.** (2022). Detection, isolation and identification of more bioactive compounds from *Fusarium equiseti*, an endophytic fungus isolated from *Ocimum gratissimum*. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 20(3), Article 3. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2022.20.3.0335>
- **Agbessenou, A., Akutse, K. S., Yusuf, A. A., & Khamis, F. M.** (2022). The Endophyte *Trichoderma asperellum* M2RT4 Induces the Systemic Release of Methyl Salicylate and (Z)-jasmone in Tomato Plant Affecting Host Location and Herbivory of *Tuta absoluta*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 860309. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.860309>
- **Ahmed, A. M., Mahmoud, B. K., Millán-Aguíñaga, N., Abdelmohsen, U. R., & Fouad, M. A.** (2023). The endophytic *Fusarium* strains : A treasure trove of natural products. *RSC Advances*, 13(2), 1339-1369. <https://doi.org/10.1039/D2RA04126J>
- **Ai, M., Han, F., Yang, X., Chu, H., Luo, C., Tan, S., Lv, S., Qin, M., & Xie, G.** (2023). Endophytic *Penicillium oxalicum* CX-1 prevented *Phytophthora cactorum* blight on *Salvia miltiorrhiza* and promoted plant growth. *Journal of Applied Microbiology*, 134(2), lxad010. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad010>
- **Akroum, S., & Bououden, F.-Z.** (2024). Antibacterial Activities of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on Multi-Resistant Bacteria. *African Journal of Biomedical Research*, 27(1), Article 1. <https://doi.org/10.4314/ajbr.v27i1.19>
- **Aldeek, Canzani, & Standland.** (2016). (1) (PDF) *Identification of Penicillin G Metabolites under Various Environmental Conditions using UHPLC-MS/MS*. https://www.researchgate.net/publication/295900825_Identification_of_Penicillin_G_Metabolites_under_Various_Environmental_Conditions_using_UHPLC-MSMS
- **Ali, T. H., El-Gamal, M. S., El-Ghonemy, D. H., Awad, G. E., & Tantawy, A. E.** (2017). Improvement of lipid production from an oil-producing filamentous fungus, *Penicillium brevicompactum* NRC 829, through central composite statistical design. *Annals of Microbiology*, 67(9), 601-613. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1287-x>
- **Aoumria, M., Malika, T., & Abderrahmane, S.** (2019, juillet 1). *Biocontrol Potential of Non-pathogenic Fusarium oxysporum in Controlling Date Palm Fusarium Wilt Disease. / Biopesticides International / EBSCOhost.*

<https://openurl.ebsco.com/contentitem/gcd:147492526?sid=ebsco:plink:crawler&id=ebsco:gcd:147492526>

- **Azar, N., Liarzi, O., Zavitan, M., Samara, M., Nasser, A., & Ezra, D.** (2023). Endophytic
- Penicillium species secretes mycophenolic acid that inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Microbial Biotechnology*, 16(8), 1629-1638. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14203>
- **Badaoui, M. I., Berkani, A., & Lotmani, B.** (2011). *Les entomopathogènes autochtones, nouvel espoir dans le contrôle biologique de Tuta absoluta Meyrick 1917 (Lepidoptera : Gelechiidae) en Algérie* [Text]. <https://popups.uliege.be/2030-6318>. <https://popups.uliege.be/2030-6318/index.php?id=1882&format=print>
- **Bahriz, H., & Bouras, N.** (2020). *Study of Bayoud's disease and the varietal behavior of the date palm against Fusarium oxysporum f. Sp. Albedinis in the Mzab valley*. 5, 41-60.
- **Barik, B., Tayung, K. N., Jagadev, P. N., & Dutta, S.** (2010). *Phylogenetic Placement of an Endophytic Fungus Fusarium oxysporum Isolated from Acorus calamus Rhizomes with Antimicrobial Activity*. 2.
- **Benzohra, I. E., Belaidi, H., Megateli, M., Djillali, K., Makhloufi, S., Benouis, S., Boumaaza, B., Mahiout, D., & Bendahmane, B. S.** (2024). Evaluation of Endophytic Microorganisms (*Trichoderma hazianum* and *Bacillus subtilis*) as Biofungicides against Bayoud Disease (*Fusarium oxysporum* f. Sp. Albedinis) on Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Agricultural Science Digest - A Research Journal, Of*. <https://doi.org/10.18805/ag.DF-553>
- **Bills, G. F., & Gloer, J. B.** (2016a). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(6), 10.1128/microbiolspec.funk-0009-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0009-2016>
- **Biswas, D., Nandy, S., Mukherjee, A., Pandey, D. K., & Dey, A.** (2020). Endophytes producing podophyllotoxin from *Podophyllum* sp. and other plants : A review on isolation, extraction and bottlenecks. *South African Journal of Botany*, 134, 303-313. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.038>
- **Biswas, D., Nazir, R., Biswas, P., Kumar, V., Nandy, S., Mukherjee, A., Dey, A., & Pandey, D.** (2020). Endophytic sources of diosgenin, a natural steroid with multiple therapeutic values. *South African Journal of Botany*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.04.009>
- **Bogas, A. C., Cruz, F. P. N., Lacava, P. T., & Sousa, C. P.** (2022). Endophytic fungi : An overview on biotechnological and agronomic potential. *Brazilian Journal of Biology*, 84, e258557. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258557>
- **Booth, C. (Colin), & Johnston, A. (Alexander).** (1983). *Plant pathologist's pocketbook / editors, A. Johnston and C. Booth.* (Second edition). Commonwealth Mycological Institute.
- **Bouguedoura, Benkhalifa, A., & Bennaceur, M.** (2010). *Le palmier dattier en Algérie : Situation, contraintes et apports de la recherche* (p. 15-22). <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.10705>
- **Bruce, S. O.** (2022). Secondary Metabolites from Natural Products. In *Secondary Metabolites—Trends and Reviews*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102222>

- **Bruce, T. J. A.** (2010). Tackling the threat to food security caused by crop pests in the new millennium. *Food Security*, 2(2), 133-141. <https://doi.org/10.1007/s12571-010-0061-8>
- **Cai, L.** (2014). Thin Layer Chromatography. In *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* (Vol. 2014, p. 6.3.1-6.3.18). <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0603s08>
- **Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P.** (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459. <https://doi.org/10.1128/membr.66.3.447-459.2002>
- **Chakravarthi, B. V. S. K., Das, P., Surendranath, K., Karande, A. A., & Jayabaskaran, C.** (2008). Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *Journal of Biosciences*, 33(2), 259-267. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0043-6>
- *CLSI-2020.pdf*. (s. d.). Consulté 6 juin 2024, à l'adresse <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
- **Corrêa, R. C. G., Rhoden, S. A., Mota, T. R., Azevedo, J. L., Pamphile, J. A., de Souza, C. G. M., Polizeli, M. de L. T. de M., Bracht, A., & Peralta, R. M.** (2014). Endophytic fungi: Expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(10), 1467-1478. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>
- **Dabsu & Kovanci.** (2023). Efficacy of *Beauveria Bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Tomato Leaf Miner *Phthorimaea Absoluta*(meyrick). *Indian Journal of Entomology*, 01-07. <https://doi.org/10.55446/IJE.2023.1100>
- **Deacon, J. W.** (2006). *Fungal biology* (4th ed). Blackwell Pub.
- **eb, L., Rajesh, T., Tombisana, R. K., & Majumder, D.** (2017). Antagonistic potential of *Beauveria sp.* Against phytopathogens. 6.
- **Deshmukh, S. K., Dufossé, L., Chhipa, H., Saxena, S., Mahajan, G. B., & Gupta, M. K.** (2022). Fungal Endophytes: A Potential Source of Antibacterial Compounds. *Journal of Fungi*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jof8020164>
- **Devi, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., Yadav, A. N., & Saxena, A. K.** (2020). Chapter 9—Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. In A. A. Rastegari, A. N. Yadav, & N. Yadav (Éds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (p. 147-161). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820528-0.00010-7>
- **Ebadi, M., Ahmadi, F., Tahmouresi, H., Pazhang, M., & Mollaei, S.** (2024). Investigation the biological activities and the metabolite profiles of endophytic fungi isolated from *Gundelia tournefortii* L. *Scientific Reports*, 14(1), 6810. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57222-8>
- **Eshboev, F., Karakozova, M., Abdurakhmanov, J., Bobakulov, K., Dolimov, K., Abdurashidov, A., Baymirzaev, A., Makhnyov, A., Terenteva, E., Sasmakov, S., Piyakina, G., Egamberdieva, D., Nazarov, P. A., & Azimova, S.** (2023). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Secondary Metabolites of Endophytic Fungi Isolated from the Medicinal Plant *Hyssopus officinalis*. *Antibiotics*, 12(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071201>

- **Gao, H., Li, G., & Lou, H.-X.** (2018). Structural Diversity and Biological Activities of Novel Secondary Metabolites from Endophytes. *Molecules*, 23(3), 646. <https://doi.org/10.3390/molecules23030646>
- **Gao, Y., Ji, Y., Li, W., Luo, J., Wang, F., Zhang, X., Niu, Z., Zhou, L., & Yan, L.** (2021). Endophytic Fungi from *Dalbergia odorifera* T. Chen Producing Naringenin Inhibit the Growth of *Staphylococcus aureus* by Interfering with Cell Membrane, DNA, and Protein. *Journal of Medicinal Food*, 24(2), 116-123. <https://doi.org/10.1089/jmf.2020.4686>
- **Halawa, E. M., Fadel, M., Al-Rabia, M. W., Behairy, A., Nouh, N. A., Abdo, M., Olga, R., Fericean, L., Atwa, A. M., El-Nablaway, M., & Abdeen, A.** (2024). Antibiotic action and resistance : Updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1305294>
- **Hastuty, A., Mairani, R., & Rosada, K.** (2020). Antibacterial and Anti-Biofilm Activities of Culture Filtrates from *Schizophyllum commune*, *Coniothyrium* sp., and *Fusarium* sp. *Makara Journal of Science*, 24(2). <https://doi.org/10.7454/mss.v24i1.11869>
- **Hautbergue, T.** (2017). *Caractérisation chimique des métabolomes secondaires de Penicillium et Fusarium par marquage isotopique couplé à la spectrométrie de masse haute résolution* [Phdthesis, Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT]. <https://theses.hal.science/tel-04228503>
- **Hazalin, N. A., Ramasamy, K., Lim, S. M., Wahab, I. A., Cole, A. L., & Abdul Majeed, A. B.** (2009). Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 46. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-46>
- **Hoque, N., Afroz, F., Khatun, F., Rony, S. R., Hasan, C. M., Rana, M. S., & Sohrab, M. H.** (2022). Physicochemical, Pharmacokinetic and Cytotoxicity of the Compounds Isolated from an Endophyte *Fusarium oxysporum*: In Vitro and In Silico Approaches. *Toxins*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/toxins14030159>
- **Hussein, A. A., El Sayed, O., Asker, M. S., Mohamed, S. S., & Abdelhamid, S.** (2017). Biodiesel production from local isolate *Penicillium commune* NRC 2016. *Journal of Scientific Research in Science*, 34(part1), 179-193. <https://doi.org/10.21608/jsrs.2018.12970>
- **Ikeagwu, Es, A., & Ir, I.** (2008). *ANTIBIOTIC SENSITIVITY PATTERN OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN ABAKALIKI, NIGERIA.*
- **Jeong, S., Jeong, S., & Bong, J.** (2022). Detection of Tomato Leaf Miner Using Deep Neural Network. *Sensors*, 22(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/s22249959>
- **Karaca, G., Erol, A. B., Çiğgin, B. A., Acarbulut, H., & Karaca, İ.** (2022). Efficacy of some entomopathogenic fungi against tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera : Gelechiidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00577-9>
- **Kaur, Kumar, V., Gill, R., Dwivedi, P., Dey, A., & Pandey, D.** (2020). Biotechnological strategies for production of camptothecin from fungal and bacterial endophytes. *South African Journal of Botany*, 134, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.001>
- **Kaur, R., & Arora, S.** (2015). ALKALOIDS-IMPORTANT THERAPEUTIC SECONDARY METABOLITES OF PLANT ORIGIN. *23 Juin 2015*, 2(3), 8.

- **Kianfé, B. Y., Tchamgoue, J., Narmani, A., Teponno, R. B., Njouonkou, A.-L., Stadler, M., & Fogue Kouam, S.** (2023). Bioactive Secondary Metabolites from Fungi of the Genus *Cytospora* Ehrenb. (Ascomycota). *Molecules*, 28(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules28073120>
- **Kumar, C. G., Mongolla, P., Joseph, J., Nageswar, Y. V. D., & Kamal, A.** (2010). Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India. *Journal de Mycologie Médicale*, 20(4), 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2010.08.002>
- **Kumaran, R., Johnpaul, M., & Hur, B. K.** (2008). Production of Taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Engineering in Life Sciences*, 8, 438-446. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800019>
- **Lancini, G., & Lorenzetti, R.** (1993). Biosynthesis of Secondary Metabolites. In G. Lancini & R. Lorenzetti, *Biotechnology of Antibiotics and Other Bioactive Microbial Metabolites* (p. 95-132). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9522-6_4
- **Lestari, A., Henri, H., Sari, E., & Wahyuni, T.** (2021). Microscopic Characterization of *Fusarium* sp. Associated with Yellow Disease of Pepper (*Piper nigrum* L.) in South Bangka Regency. *PLANTA TROPICA*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.18196/pt.v9i1.7753>
- **Li, J. Y., Sidhu, R. S., Ford, E. J., Long, D. M., Hess, W. M., & Strobel, G. A.** (1998). The induction of taxol production in the endophytic fungus—*Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 259-264. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900521>
- **Ling, L., Feng, L., Li, Y., Yue, R., Wang, Y., & Zhou, Y.** (2024). Endophytic Fungi Volatile Organic Compounds as Crucial Biocontrol Agents Used for Controlling Fruit and Vegetable Postharvest Diseases. *Journal of Fungi*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/jof10050332>
- **Loyani, L.** (2024). Segmentation-based quantification of *Tuta absoluta*'s damage on tomato plants. *Smart Agricultural Technology*, 7, 100415. <https://doi.org/10.1016/j.atech.2024.100415>
- **Madhusudhan, Tumkur Ramasetty, B., & Prakash, H.** (2015). Isolation and Purification of Bioactive Metabolites from Fungal Endophytes— A Review. *Current Biochemical Engineering*, 2, 111-117. <https://doi.org/10.2174/2212711902999150706114209>
- **Mahmoud, F., Bendebbah, R., Benssaci, B., Toudji, F., Tafifet, L., & Zoulikha, K.** (2021). Entomopathogenic efficacy of the endophytic fungi: *Clonostachys* sp. and *Beauveria bassiana* on *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae under laboratory and greenhouse conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00392-8>
- **Manila, Yadav, A., Kumar, S., Sharma, D., & Yadav, J. P.** (2014). Evaluation of in vitro antimicrobial potential of endophytic fungi isolated from *Eugenia Jambolana* Lam. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 208-211.
- **Manshor, N., Rosli, H., Ismail, N. A., Salleh, B., & Zakaria, L.** (2012). Diversity of *Fusarium* Species from Highland Areas in Malaysia. *Tropical Life Sciences Research*, 23(2), 1-15.

- **Mohamed Mahmoud.** (2017). *Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.)* [Thesis, ENSA]. <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/1931>
- **Mohamed Mahmoud, F., Bendebbah, R., Benssaci, B., Toudji, F., Tafifet, L., & Krimi, Z.** (2021). Entomopathogenic efficacy of the endophytic fungi : *Clonostachys* sp. and *Beauveria bassiana* on *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae under laboratory and greenhouse conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00392-8>
- **Mohanta, Tayung, & Mohapatra.** (2008). Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology*, 5(2). <https://doi.org/10.5580/80b>
- **Mohiuddin, A. K.** (2019). Chemistry of Secondary Metabolites. *Annals of Clinical Toxicology*, 2(1), 1014. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3545055>
- **Nair, G., Raja, S. S. S., Vijayakumar, R., Nair, G., Raja, S. S. S., & Vijayakumar, R.** (2022). Introductory Chapter : Secondary Metabolites - An Overview. In *Secondary Metabolites—Trends and Reviews*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104234>
- **Nguyen Xuan, T.** (2024). *Isolation and selection of potassium solubilizing fungi Penicillium sp. 1*, 57-63.
- **Nicoletti, R., Andolfi, A., Becchimanzi, A., & Salvatore, M. M.** (2023). Anti-Insect Properties of *Penicillium* Secondary Metabolites. *Microorganisms*, 11(5), 1302. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051302>
- **Ordóñez, E., Cucalon, R., Cardenas, D., Ordóñez, N., Coello, S., Elizalde, P., & Cárdenas, W.** (2022). Antarctic fungi with antibiotic potential isolated from Fort William Point, Antarctica. *Scientific Reports*, 12, 21477. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25911-x>
- **Owen, N. L., & Hundley, N.** (2004). Endophytes—The chemical synthesizers inside plants. *Science Progress*, 87(Pt 2), 79-99. <https://doi.org/10.3184/003685004783238553>
- **Pant, S., Mishra, D., Gupta, S., & Chaturvedi, P.** (2021). Chapter 8—Fungal endophytes as a potential source of therapeutically important metabolites. In V. K. Sharma, M. P. Shah, S. Parmar, & A. Kumar (Éds.), *Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology* (p. 275-314). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821734-4.00010-1>
- **Pimentel, M. R., Molina, G., Dionísio, A. P., Maróstica Junior, M. R., & Pastore, G. M.** (2010). The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. *Biotechnology Research International*, 2011, 576286. <https://doi.org/10.4061/2011/576286>
- **Powar, P., Chaudhari, S., Chaudhari, S., & Chaudhari, S.** (2023). Unexploited Potentials of Endophytic Fungi : Patents Review on Endophytic Fungi Related to Secondary Bioactive Compounds. *Pharmacognosy Research*, 15(2), 217-225. <https://doi.org/10.5530/pres.15.2.023>
- **Praveena & Padmini.** (2011). *ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF MYCOTOXINS*.
- **Puri, S. C., Nazir, A., Chawla, R., Arora, R., Riyaz-ul-Hasan, S., Amna, T., Ahmed, B., Verma, V., Singh, S., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Sharma, R. K., & Qazi,**

- G. N.** (2006). The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *Journal of Biotechnology*, 122(4), 494-510. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.10.015>
- **Qi, F. -H., Jing, T. -Z., Wang, Z. -X., & Zhan, Y. -G.** (2009). Fungal endophytes from *Acer ginnala* Maxim : Isolation, identification and their yield of gallic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 49(1), 98-104. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02626.x>
 - **Rodriguez, R., White, J., Arnold, A., & Redman, R.** (2009). Fungal endophytes : Diversity and functional roles. *The New phytologist*, 182, 314-330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
 - **Salmi, D.** (2022). *Isolement et identification de champignons endophytes foliaires d'Urtica dioica L. et étude de leur activité biologique* [Universite Mouloud MAMMERI Tizi-Ouzou]. <https://dspace.ummto.dz/handle/ummto/20309>
 - **Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A.** (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 3(3), 430-439. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
 - **Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K., & Krohn, K.** (2002). Endophytic fungi : A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9), 996-1004. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006342>
 - **Selim, K.** (2012). Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2(1), 31-82. <https://doi.org/10.5943/cream/2/1/3>
 - **Sénéquier-Crozet, A., & Canard, B.** (2016). *Les champignons endophytes : Impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique*. 102.
 - **Sharma, N., Takkar, S., Bhatia, K., Vardhan, H., Tripathi, M., Iqbal, K., Shukla, S., Shukla, K., Tyagi, J., Varma, A., & Mishra, A.** (2023). Recent Advances in Fungal Secondary Metabolites and Their Applications. In I. Singh, V. R. Rajpal, & S. S. Navi (Éds.), *Fungal Resources for Sustainable Economy : Current Status and Future Perspectives* (p. 411-432). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-19-9103-5_15
 - **Shen, B.** (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 285-295. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(03\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00020-6)
 - **Shimi, I. R., Singh, J., & Walker, T. K.** (1959). The component fatty acids of *Penicillium spinulosum* fat. *Biochemical Journal*, 72(1), 184-187. <https://doi.org/10.1042/bj0720184>
 - *Spectres.pdf*. (s. d.). Consulté 18 juin 2024, à l'adresse <https://physique-chimie.dis.ac-guyane.fr/IMG/pdf/spectres.pdf>
 - **Stępień, Ł.** (2023). Plant-Pathogenic *Fusarium* Species. *Journal of Fungi*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/jof9010013>
 - **Stewart, J. E., Kim, M.-S., Lalande, B., & Klopfenstein, N. B.** (2021). Chapter 15— Pathobiome and microbial communities associated with forest tree root diseases. In F. O. Asiegbu & A. Kovalchuk (Éds.), *Forest Microbiology* (p. 277-292). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822542-4.00004-8>
 - **Stierle, A. A., & Stierle, D. B.** (2000). Bioactive Compounds from four Endophytic *Penicillium* sp. Of a Northwest Pacific Yew Tree. In Atta-ur-Rahman (Éd.), *Studies in*

Natural Products Chemistry (Vol. 24, p. 933-977). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80058-7](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80058-7)

- **Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J.** (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257-268. <https://doi.org/10.1021/np030397v>
- **Strobel, G., Hess, W., Ford, E., Sidhu, R., & Yang, X.** (1996). Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 17(5-6), 417-423. <https://doi.org/10.1007/BF01574772>
- **Sun, X., & Guo, L.-D.** (2012). Endophytic fungal diversity: Review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3(1), 65-76. <https://doi.org/10.1080/21501203.2012.656724>
- **Tambadou, F., Lanneluc, I., Sablé, S., Klein, G. L., Doghri, I., Sopéna, V., Didelot, S., Barthélémy, C., Thiéry, V., & Chevrot, R.** (2014). Novel *nonribosomal peptide synthetase (NRPS)* genes sequenced from intertidal mudflat bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12532>
- **Tarnawska, P., Walczak, M., & Burkowska-But, A.** (2024). Cemeteries and graveyards as potential reservoirs of antibiotic resistance genes and bacteria: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 22(1), 297-319. <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01651-w>
- **Thi Minh Le, T., Thi Hong Hoang, A., Thi Bich Le, T., Thi Bich Vo, T., Van Quyen, D., & Hoang Chu, H.** (2019). Isolation of endophytic fungi and screening of Huperzine A-producing fungus from *Huperzia serrata* in Vietnam. *Scientific Reports*, 9(1), 16152. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52481-2>
- **Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Vijayakumar, S. S. S. R. and R., Thirumurugan, D., Cholarajan, A., & Vijayakumar, S. S. S. R. and R.** (2018). An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In *Secondary Metabolites—Sources and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79766>
- **Torres-Garcia, D., Gené, J., & García, D.** (2022). New and interesting species of *Penicillium* (Eurotiomycetes, Aspergillaceae) in freshwater sediments from Spain. *MycoKeys*, 86, 103-145. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.86.73861>
- **Vigneshwari, A., Rakk, D., Németh, A., Kocsubé, S., Kiss, N., Csupor, D., Papp, T., Škrbić, B., Vágvölgyi, C., & Szekeres, A.** (2019). Host metabolite producing endophytic fungi isolated from *Hypericum perforatum*. *PLOS ONE*, 14(5), e0217060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217060>
- **Vincenot, F., Saleh, M., & Prévost, G.** (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2008(407), 61-69. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(08\)74868-8](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(08)74868-8)
- **Wen, J., Okyere, S. K., Wang, S., Wang, J., Xie, L., Ran, Y., & Hu, Y.** (2022). Endophytic Fungi: An Effective Alternative Source of Plant-Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. *Journal of Fungi*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jof8020205>
- **Xiaoling, C., Xiaoli, L., Zhou, S., Junping, G., Shuiping, W., Xiaoming, L., Zhigang, S., & Yongcheng, L.** (2010). Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *J. Ecol. Nat. Environ.*, 2.

- **Yan, J., Qi, N., Wang, S., Gadhawe, K., & Yang, S.** (2014). Characterization of secondary metabolites of an endophytic fungus from *Curcuma wenyujin*. *Current Microbiology*, 69(5), 740-744. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0647-z>
- **Zabalgogeaazcoa, I.** (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens : A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 138-146. <https://doi.org/10.5424/sjar/200806S1-382>

Annexes

Annexe A

Composition des milieux de culture utilisés pour un litre de milieu :

Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) :

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	10000 ml
pH 6	autoclavage 20 min à 120°C

Milieu de culture PDB (Potato Dextrose Broth) :

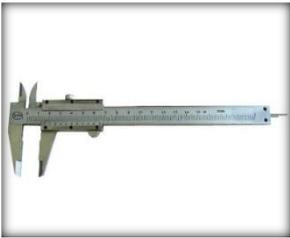
Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Eau distillée	10000 ml
pH 6	autoclavage 20 min à 120°C

Milieu MH Meuler Hinton

Hydrolysate acide de caséine (peptone)	17,5 g
Extrait de viande	2,0 g
Amidon	1,5 g
Calcium	20 à 25 mg
Magnésium	10 à 12,5 mg
Agar	15,0 g
Eau distillée	10000 ml
pH 7,4 +/- 0,2	autoclavage 20 min à 120°C

Annexe B

Appareils

Nom de l'appareil	Photo	Nom de l'appareil	Photo
Agitateur		Etuve	
Autoclave		Balance	
Pied à collise		Spectrophotomètre	
Microscope		Centrifugeuse	
Evaporateur		Hotte aspirante	

Petit matériel

Aiguilles

Bavette

Bec bunsen

Biotés pétris en plastique et en verre

Ciseaux

Coton

Entonnoirs en verre

Eprouvette en verre

Eprouvette graduée 100 ml

Flacons 250 ml

Papier filtre

Papier aluminium

Para film

Pipete pasteur

Tube à essai