

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Saad Dahleb Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

Mémoire de fin d'Études

Pour l'obtention du Diplôme Master 2 en

Biotechnologie microbienne

Sujet :

Extraction et identification des métabolites secondaires des champignons endophytes *Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea* et *Phomopsis* spp.

Présenté par :

Melle Bendraouche Soumia

&

Melle Smadi Naima

Soutenu le : 14/07/2019

Devant le jury composé de :

KRIMI Z.

Professeur

U.S.D.B1

Présidente

MOHAMED MAHMOUD F.

M.C.B

U.S.D.B1

Promotrice

DJELLOUT H.

Doctorante

U.S.D.B1

Examinatrice

BOUTOUMI

Professeur

U.S.D.B1

Invité d'honneur

Promotion : 2018/2019

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Allah le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre promotrice Mme Mohamed Mahmoud, F pour nous avoir proposé ce sujet, sa disponibilité, son aide, ses précieux conseils et suggestions et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer malgré ses charges académiques et professionnelles.

On exprime toutes nos gratitudee au Professeure Krimi, Z pour sa bienveillance de présider notre soutenance. Nous la remercions pour nous avoir accueilli dans son laboratoire, et d'avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires pour réaliser ce travail

Nos vifs remerciements vont également à Mme Djellout, H d'avoir accepté d'examiner notre travail et de l'enrichir par ses propositions.

Nous remercions Mme Selma l'ingénieur du laboratoire de phytopathologie pour son aide et son encouragement.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mr Boutoumi, Professeur au département de chimie industrielle invité d'honneur, qui a bien voulu nous consacrer son temps pour la réalisation de notre travail.

Nous tenons également à remercier tous les ingénieurs du groupe de Saidal Médéa pour leur aide.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère et douce mère, mon très cher père pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consenti à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance, pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études. Je vous aime, qu'Allah vous protège.

A l'étoile de ma vie, ma source de patience, de soutien et d'amour, ma sœur Noussaïba à qui je souhaite beaucoup de succès et de réussite.

A mon cher frère Billel, qu'Allah te garde et te protège et El akiba lik,

A mon fiancé Rabah, qui a été toujours présent à mes côtés. Merci pour ta compréhension, tes encouragements et ton amour.

A ma chère sœur, amie et ma binôme Naima qui a partagé avec moi ce modeste travail, merci pour ta disponibilité, ta patience, ton encouragement, je te remercie pour ton aide et surtout pour tous les moments inoubliables qu'on a pu vivre ensemble, Merci beaucoup Naima je t'aime.

A tous mes cousins, mes cousines, mes oncles Mustapha, Djillali et Mokhtar et mes tantes Hafidha et Djamila, ainsi qu'à ma belle-famille.

A mes grandes mères qui n'ont pas cessé de prier pour moi, qu'Allah leur procure la bonne santé et la longue vie.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés durant mon chemin d'études, mes aimables amies, Rim, Meroua, Rania, Wafa, Khouloud et Sara.

Soumia

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

A ma chère mère pour tout son sacrifice, son amour, sa tendresse, son soutien et sa prière tout au long de mes études.

À celui qui a progressé dans ma vie et dont le rêve de me voir évalué dans mes études. Je dédie tous mes réussites à mon papa, qu'Allah le tout puissant, lui accorde sa Sainte Miséricorde et l'accueille en son vaste Paradis El Djenna. Il me manque énormément.

A mes chers frères Mohamed Rida et Yacine, qu'Allah vous garde et vous protège.

A ma chère sœur, amie et ma binôme Soumia qui a partagé avec moi ce modeste travail, merci pour ta disponibilité, ta patience, ton encouragement, je te remercie pour ton aide et surtout pour tous les moments inoubliables qu'on a pu vivre ensemble, Merci beaucoup Soumia je t'aime.

A Monsieur Bendraouche Mohamed, qui est comme un deuxième père pour moi, merci pour vos conseils, vos encouragements, votre aide, merci beaucoup, qu'Allah vous garde pour votre famille.

A mes très chères cousines Khouloud et Nesrine, et à ma meilleure amie Ikram qui ont partagé avec moi le bien et le mauvais, merci beaucoup je vous aime.

A tous mes cousins et mes cousines, à mes tantes Warda et Radia, et à mes oncles Karim, Rabah, Farid et sa femme Asma, Omar et sa femme Linda.

A mes grandes mères et mon grand-père qui n'ont pas cessé de prier pour moi, qu'Allah leur procure la bonne santé et la longue vie.

Aux personnes qui m'ont toujours encouragé, qui étaient toujours à mes côtés durant mon chemin d'études, mes aimables amies Rim, Meroua, Rania et Wafa.

Naima

Extraction et identification des métabolites secondaires des champignons endophytes *Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea* et *Phomopsis*

Résumé

La présente étude s'intéresse à l'extraction et l'identification des métabolites secondaires à partir de cinq champignons endophytes qui sont connus par la synthèse de certains enzymes présentant un intérêt agrobiotechnologique. L'activité antagoniste des extraits de ces souches a été évaluée à l'encontre de deux champignons phytopathogènes responsables du flétrissement vasculaire sur deux plantes économiquement importantes (tomate et palmier dattier). Les tests qualitatifs des enzymes extracellulaires produites par les champignons endophytes *Beauveria bassiana* (Sn182), *Phomopsis* (C141), et les trois souches de *Clonostachys rosea* {G133, C318 (1), C318 (2)} ont montré que toutes les souches (100%) produisent de la chitinase et de la phosphatase. 80 % des souches testées ont une activité protéolytique à l'exception de G133. Seul la souche *B. bassiana* a la capacité de produire la lipase et l'estérase, alors qu'aucune souche n'a pu produire l'amylase ni la pectinase.

L'analyse par chromatographie sur couche mince de l'extrait d'acétate d'éthyle de *B. bassiana* indique que les phases mobiles utilisées (acétone, eau, toluène, acide acétique glacial) et (acétate d'éthyl méthanol) ne permettent pas la séparation des différents composés décrits dans la littérature contenus dans l'extrait de *B. bassiana*. Cette analyse a montré également que cette souche ne produise pas les deux standards testés : l'ampicilline et le kétoconazole.

Les extraits obtenus par l'extraction à l'acétate d'éthyle et le chloroforme des cinq endophytes testés sur deux champignons phytopathogènes par la méthode de diffusion sur disque, ont montré des zones d'inhibition variant de 0 à 19 mm pour les extraits d'acétate d'éthyle, et de 0 à 13 mm pour les extraits chloroformiques. Ces variations dépendent des extraits testés et des pathogènes étudiés.

Les résultats montrent la présence de métabolites intéressantes, qui peuvent être de nature peptidique (enzymes) et qui joue un rôle important dans la lutte biologique mais ils restent toujours préliminaires.

Mots clés : Activité enzymatique, chromatographie, activité antagoniste, molécules bioactifs, antibiose.

Extraction and identification of secondary metabolites of *Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea* and *Phomopsis*

Abstract

The present study focuses on the extraction and the identification of secondary metabolites from five endophytic fungi that are known to synthesize certain enzymes of biotechnological interest. The antagonistic activity of the extracts of these strains was evaluated in the presence of two phytopathogenic fungi responsible for vascular wilting on two economically important plants (tomato and date palm). Qualitative tests of the extracellular enzymes produced by endophytic fungi *Beauveria bassiana* (Sn182), *Phomopsis* (C141), and the three strains of *Clonostachys rosea* { G133, C318 (1), C318 (2) } showed that all strains (100 %) produce chitinase and phosphatase. 80% of strains tested have proteolytic activity except for G133. Only *B. bassiana* had the ability to produce lipase and esterase, whereas no strain could produce amylase or pectinase.

Analysis by thin layer chromatography of ethyl acetate extract of *B. bassiana* indicates that the mobile phases used (acetone, water, toluene, glacial acetic acid) and (ethyl methanol acetate) do not allow the separation of different compounds described in the literature contained in *B. bassiana* extract. This analysis also showed that this strain does not produce the two standards tested: ampicillin and ketoconazole.

The extracts obtained by extraction with ethyl acetate and chloroform of the five endophytes tested on two phytopathogenic fungi by the disk diffusion method, showed zones of inhibition varying from 0 to 19 mm for the extracts of ethyl acetate, and from 0 to 13 mm for the chloroform extracts. These variations depend on the extracts tested and the pathogens studied.

These results remain preliminary and show the presence of interesting metabolites, which may be of amino acids or proteins (enzymes) nature and which plays an important role in biological control.

Key words: enzymatic activity, chromatography, antagonistic activity, bioactive molecules, antibiosis

استخراج وتحديد المركبات الثانوية للفطريات الداخلية الفطرية *Clonostachys rosea*, *Beauveria bassiana*

الملخص

ترتكز الدراسة الحالية على استخراج وتحديد المركبات الثانوية لخمسة فطريات داخلية والمعروفين بفرز بعض الأنزيمات التي لها فائدة بيو تكنولوجية. تقييم النشاط التثبيطي لمستخلصات هذه السلالات كان بوجود اثنين من الفطريات الممرضة المسؤولة عن الذبول الوعائي عند اثنين من النباتات ذات أهمية اقتصادية (الطماطم والنخيل). أظهرت الاختبارات النوعية للإنزيمات الخارجية المنتجة من طرف الفطريات الداخلية *Beauveria bassiana* {C318(1), *Clonostachys rosea* (Sn182), *Phomopsis* (C141) C318(2), G133} أن جميع السلالات (100 %) منتجة للكيتيناز والفوسفاتاز. 80% من السلالات التي تم اختبارها لها نشاط بروتيني باستثناء G133. فقط *B. bassiana* لديها القدرة على إنتاج الليباز و الاستيراز، في حين اي من السلالات لم تصنع الأميلازو البكتيناز.

يشير التحليل بواسطة تحليل كروماتوجرافي لطبقة رقيقة لمستخلص الأسيئات الإيثيلي لـ *B. bassiana* إلى أن المراحل المتحركة المستخدمة (الأسيتون ، الماء ، التولوين ، حمض الأسيتيك الجليدي واسيتات إيثيل الميثانول) لا تسمح بفصل مختلف المركبات الموصوفة في الأدب الموجودة في مستخلص *B. bassiana*. أظهر هذا التحليل أيضاً أن هذه السلالة لا تنتج المعيارين المختبرين: الأميسلين والكيتوكونازول.

أظهرت المستخلصات التي تم الحصول عليها عن طريق الاستخلاص باستخدام أسيتات الإيثيل والكلوروفورم للفطريات الداخلية الخمسة التي تم اختبارها على الفطريات المسببة للأمراض النباتية بواسطة طريقة النشر عبر القرص ، مناطق تثبيط تتراوح من 0 إلى 19 ملم لمستخلصات أسيتات الإيثيل ، ومن 0 إلى 13 ملم لمستخلصات الكلوروفورم. تعتمد هذه الاختلافات على مستخلصات المثبتين التي تم اختبارها و الفطر الممرض المدروس.

تبقى هذه النتائج أولية وتظهر وجود مركبات مثيرة للاهتمام ، والتي قد تكون ذات طبيعة من الأحماض الأمينية أو بروتينية (الإنزيمات) والتي تلعب دوراً مهماً في المكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية: النشاط الأنزيمي ، كروماتوجرافي ، النشاط التثبيطي ، جزيئات نشطة بيولوجيا ، تضاد.

Liste des abréviations

PDA	Potato Dextrose Agar
EM	Embden-Meyerhof
TCA	Cycle de l'acide tricarboxylique
NRPS	Non Ribosomal Peptid Synthase
PKS	Polykétides synthases
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
COST	European Cooperation on Science and Techonology
NHA	Benefits not adapted to the habitat
HA	Benefits adapted to the habitat
DES	Dark Septate Endophytes
AIA	Acide indole acétique
COV	Les composés organiques volatils
ATP	Adénosine-triphosphate
BCA	Agents de lutte biologique
PPO	Polyphénol oxydase
PAL	Phénylalanines ammoniaques lyase

DMSO	Dimethylsulfoxide
PVK	Pikovskaya
GYP	Glucose Yeast Extract Peptone
PDB	Potato Dextrose Broth
AM	Acétate d'éthyle méthanol
Rf	Rapport frontal
PGPF	Plant Growth Promoting Fungi

Liste des figures

Figure 1. Aperçu des voies métaboliques centrales des champignons,	5
Figure 2. Quelques exemples de classes des champignons..	8
Figure 3. Les classes d'endophytes selon la colonisation de l'hôte	15
Figure 4. Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes.....	16
Figure 5. : Vue microscopique des spores des hyphes et des Blastospores de <i>B. bassiana</i>	22
Figure 6. Métabolites biologiquement actifs de <i>Beauveria bassiana</i>	25
Figure 7. Vue microscopique <i>Clonostachys rosea</i>	27
Figure 8. Structures chimiques de 1 à 7 métabolites secondaires produits par <i>Phomopsis sp.</i>	31
Figure 9. Champignons endophytes utilisés..	32
Figure 10. Champignons pathogènes utilisés.....	33
Figure 11. Les étapes de préparation des métabolites secondaires des champignons endophytes.....	37
Figure 12. L'extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes ..	38
Figure 13. Activité Chitinasique par les champignons endophytes testés.	42
Figure 14. Activité phosphatasique par les champignons endophytes testés.....	43
Figure 15. Activité pectinasique par les champignons endophytes testés.	43
Figure 16. Activité amylolytique par les champignons endophytes testés.	44
Figure 17. Activité protéolytique par les champignons endophytes testés.	44
Figure 18. Activité lipasique par les champignons endophytes testés.....	45
Figure 19. Activité estérasique par les champignons endophytes testés.....	45
Figure 20. Révélation du chromatogramme d'extrait d'acétate d'éthyle de Sn182 de <i>Beauveria bassiana</i> sous UV (250 nm) développé dans la phase mobile (acétone, eau, toluène, acide acétique glacial).....	46
Figure 21. Révélation du chromatogramme d'extrait d'acétate d'éthyle de Sn182 de <i>Beauveria bassiana</i> par UV (250 nm) développé dans la phase mobile (acétate d'éthyl méthanol).	47
Figure 22. Zones d'inhibition (en mm) de chaque extrait fongique obtenu par acétate d'éthyle et chloroforme en présence de <i>Fusarium oxysporum f.sp albedenis</i>	49
Figure 23. Zones d'inhibition (en mm) de chaque extrait fongique obtenues par acétate d'éthyle et chloroforme en présence de <i>Fusarium oxysporum f.sp lycoperici</i>	49

Figure 24. L'activité antagoniste des extraits d'acétate d'éthyle de tous les champignons endophytes testés vis-à-vis du champignon phytopathogène <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedenis</i>	52
Figure 25. L'activité antagoniste des extraits de chloroforme de tous les champignons endophytes testés vis-à-vis du champignon phytopathogène <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedenis</i>	53
Figure 26. L'activité antagoniste des extraits d'acétate d'éthyle de tous les champignons endophytes testés vis-à-vis du champignon phytopathogène <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopercici</i>	54
Figure 27. L'activité antagoniste des extraits de chloroforme de tous les champignons endophytes testés vis-à-vis du champignon phytopathogène <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopercici</i>	55

Liste des tableaux

Tableau 1. Certains métabolites bioactifs isolés des bactéries et des champignons associés aux plantes.	9
Tableau 2. Critères symbiotiques utilisés pour caractériser les classes d'endophytes fongiques.....	15
Tableau 3. Phomopsis en tant qu'agent de biocontrôle	30
Tableau 4. Origine des champignons endophytes utilisés	31
Tableau 5. Origine des champignons phytopathogènes utilisés	33
Tableau 6. Résultat des différents tests d'activités enzymatiques	41
Tableau 7. Les zones d'inhibition (en mm) obtenues lors du test de diffusion sur disque des extraits des champignons endophytes testés.	48

Table des Matières

Remarciment	
DEDICACE	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des Abréviation	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
Chapitre 1 Synthèse bibliographique sur les métabolites secondaires et les champignons endophytes	
1. Les métabolites secondaires.....	4
1.1. Biosynthèse.....	4
1.2. Classification	6
1.2.1. Alcaloïdes	6
1.2.2. Terpénoïdes.....	7
1.2.3. Peptides non ribosomiques	7
1.2.4. Polycétides	7
1.3. Rôles des métabolites secondaires.....	9
1.4. Techniques analytiques des métabolites secondaires	11
2. Généralités sur les champignons endophytes	12
2.1. Diversité des champignons endophytes.....	13
2.2. Classification	14
2.3. Colonisation et transmission.....	16
2.4. Interactions plantes-champignons endophytes	17
2.5. Rôles des champignons endophytes	17
2.5.1. Rôles physiologiques	17
2.5.2. Rôles dans la tolérance aux stress abiotiques	18
2.5.3. Rôle dans la production de phytohormones.....	19
2.5.4. Protection contre les insectes, les vers, les parasites et les herbivores ..	19
2.5.5. Rôle environnemental	20
2.5.6. Protection contre les agents pathogènes	20
2.6. <i>Beauveria bassiana</i>	21
2.6.1. Mode d'action	22
2.6.2. Métabolites secondaires	23

2.6.2.1.	Composés organiques volatiles	24
2.6.2.2.	Ester méthylique de l'acide S - (-) - 10,11-dihydroxyfarnésique	24
2.6.2.3.	Alcaloïdes.....	24
2.6.2.4.	Pigments	24
2.6.2.5.	Cyclodepsipeptides.....	25
2.7.	<i>Clonostachys rosea</i>	26
2.7.1.	Mode d'action	28
2.7.2.	Métabolites secondaires	28
2.8.	<i>Phomopsis</i> spp.	29
2.8.1.	<i>Phomopsis</i> en tant qu'agents de biocontrol	29
2.8.2.	Métabolites secondaires	30

Chapitre 2 Matériel et méthodes

1.	Matériel.....	31
1.1.	Matériel biologique.....	31
1.1.1.	Champignons endophytes	31
1.1.2.	Champignons phytopathogènes	32
1.2.	Matériel non biologique.....	33
1.2.1.	Produits chimiques.....	33
2.	Méthodes.....	34
2.1.	Purification des souches	34
2.2.	Détermination de l'activité enzymatique.....	34
2.2.1.	Chitinase	34
2.2.2.	Phosphatase.....	34
2.2.3.	Pectinase	35
2.2.4.	Amylase	35
2.2.5.	Protéase	35
2.2.6.	Lipase.....	35
2.2.7.	Estérase	36
2.3.	Fermentation et extraction des métabolites secondaires.....	36
2.4.	Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince.....	39
2.5.	Détermination de l'activité antagoniste.....	40

Chapitre 3 Résultats et discussion

3.	Résultats.....	41
3.1.	Résultats de la détermination de l'activité enzymatique.....	41
3.2.	Résultats de la chromatographie sur couche mince	46

3.3. Résultats de la détermination de l'activité antagoniste	48
4. Discussion	56
Chapitre 4 Conclusion et perspectives	
Conclusion et perspectives	62
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

L'émergence de nouvelles maladies, le développement de résistances aux médicaments, et l'augmentation de l'incidence des infections fongiques, ainsi que les risques de toxicité associé à l'utilisation excessive des médicaments, des antibiotiques de synthèse et des produits agrochimiques, pousse les chercheurs à explorer différentes sources naturelles en particulier les métabolites secondaires afin d'obtenir de nouvelles molécules bioactives qui seraient efficaces, possédant une faible toxicité et ayant un impact mineur sur l'environnement.

La plupart des molécules bioactives sont secrétées par des microorganismes y compris les bactéries et les champignons. Les microorganismes endophytes ont reçu une attention considérable au cours des dernières années, à cause de leurs capacités de stimuler la croissance de leur plante hôte et d'augmenter sa tolérance contre la sécheresse, la chaleur, la salinité et la toxicité contre les métaux. Ils ont également un rôle dans la protection d'hôte contre les insectes, les parasites et les herbivores (Selim et *al.*, 2012). Les métabolites secondaires sont de petites biomolécules qui ont un rôle essentiel dans la défense de l'organisme producteur. Ils l'apportent des avantages en termes de survie de diverses manières, en améliorant la disponibilité des éléments nutritifs sous forme d'agents chélateurs tels que les sidérophores, en protégeant contre les agents de stress environnementaux, par exemple les pigments et les osmoprotecteurs. Ils renforcent également les interactions compétitives avec d'autres organismes par la sécrétion des antibiotiques, des diverses molécules de signalisation, ou en agissant comme un mécanisme de défense métabolique par la production des alcaloïdes, des terpénoïdes, des peptides non ribosomiques et des polycétides (Breitling et *al.*, 2013).

Cette protection est également associée à des différentes enzymes extracellulaires y compris la chitinase, la phosphatase, la protéase, l'estérase, la lipase, l'amylase et la pectinase et également à des composés biologiquement actifs isolés particulièrement à partir de ces champignons endophytes. Grâce aux progrès de la biotechnologie l'extraction, la séparation et l'identification de ces composés bioactifs sont devenues possibles, et ce par l'utilisation de différentes méthodes analytiques plus particulièrement la chromatographie sur couche mince et l'HPLC (Bhagobaty et Joshi, 2011).

Les champignons endophytes sont isolés à partir de plusieurs plantes des régions tropicales, subtropicales et tempérés. Parmi ces endophytes on s'intéresse aux champignons telluriques isolés par Mohamed Mahmoud (2017) à partir des racines de palmier dattier d'Alicante Espagne et plus particulièrement à *Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea* et *Phomopsis* qui ont montré un effet positif dans le biocontrôle de flétrissement vasculaire de palmier dattier causé par *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et la fusariose de la tomate causé par *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*. Afin de déterminer la nature des métabolites secondaires secrétés au cours de cette activité antagoniste, le présent travail a été réalisé.

L'objectif de cette étude est basé sur l'évaluation de l'activité enzymatique des souches de *Beauveria bassiana*, de *Clonostachys rosea* et de *Phomopsis* sp. L'extraction et la séparation des métabolites secondaires de ces champignons ont été également réalisées suivie par une évaluation de leurs activités antagonistes par l'utilisation de la méthode de diffusion sur gélose des extraits obtenus.

Les étapes que nous avons effectuées dans ce cadre de recherche sont

- La mise en évidence des activités chitinasiques, phosphatasiques, pectinasiques, amylolytiques, protéolytique, lipasiques et estérasiques des souches fongiques sur différents milieux gélosés.
- L'extraction des métabolites secondaires des souches testées par l'utilisation de deux solvants : le chloroforme et l'acétate d'éthyle.
- L'analyse d'extrait brut de l'acétate d'éthyle de *B. bassiana* par chromatographie sur couche mince.
- L'évaluation de l'activité antagoniste *in vitro* des deux extraits de toutes les souches fongiques par la méthode de diffusion sur gélose contre deux agents pathogènes de flétrissement vasculaire.

Chapitre 1

Recherche bibliographique

Les produits naturels restent les sources principales de découverte des molécules médicamenteuses nouvelles et potentielles. Un grand nombre de plantes, de sources microbiennes et marines ont été testées pour la production de composés bioactifs. Les progrès de la biotechnologie permettent de découvrir de nouveaux métabolites secondaires, plus particulièrement les antibiotiques qui devraient être axés sur les microorganismes endophytes isolés des plantes (Firakova *et al.*, 2007).

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques de faible masse moléculaire avec des structures inhabituelles (Tiwari et Rana, 2015). Contrairement aux métabolites primaires qui sont impliqués aux fonctions vitales d'un organisme, les métabolites secondaires ne participent pas à la croissance et au développement normal d'un organisme. Ils ont souvent un rôle important dans la défense (Costa *et al.*, 2012). Bien que les métabolites secondaires soient dérivés du métabolisme primaire, ils ne constituent pas le squelette moléculaire de base de l'organisme. Leur absence n'entraîne pas la mort immédiate, mais plutôt une altération à long terme de la capacité de survie, de la fécondité de l'organisme, ou peut-être aucun changement significatif (Tiwari et Rana, 2015).

Ces composés possèdent des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anticancéreuses, antitumoraux, antidiabétiques, inhibiteurs du cholestérol, immunosuppresseurs, anti-inflammatoires, insecticides et antiparasitaires (Crozet et Canard, 2016). Ils ont une importance dans le domaine pharmaceutique, dans la biomédecine, en agrochimie, et en agriculture (Huang *et al.*, 2007 ; Tétard-Jones et Edwards 2016). Ils ont également un intérêt dans les domaines de la chimiothérapie, de la phytopathologie, de la conservation des aliments, de la médecine vétérinaire, de la biochimie et de la biologie moléculaire (Awad *et al.*, 2012).

1. Les métabolites secondaires

1.1. Biosynthèse

Le métabolisme secondaire se produit généralement à la dernière phase de croissance (phase stationnaire) des microorganismes producteurs (Ruiz et *al.*, 2010).

La biosynthèse des métabolites secondaires commence lorsque certains des nutriments contenus dans le milieu de croissance des micro-organismes sont épuisés. Les limitations de ces nutriments entraînent l'accumulation des métabolites secondaires et la libération par les inducteurs d'enzymes des gènes nécessaires à la synthèse des métabolites secondaires (Purwestri et *al.*, 2016).

Les complexes enzymatiques tels que les polykétides synthases (PKS) et les peptides synthases non ribosomales (NRPS) jouent un rôle important dans le métabolisme secondaire de nombreux microorganismes. Ces enzymes modulaires utilisent des précurseurs relativement simples pour produire une variété remarquable de composés différents pouvant avoir des activités pharmacologiques intéressantes (Joyce et *al.*, 2011).

La Figure 1 donne un aperçu du métabolisme central et de la manière dont il fournit les précurseurs de la synthèse de nombreux composés. L'épine dorsale du diagramme représente la voie centrale de production d'énergie, dans laquelle les sucres sont décomposés via la voie Embden-Meyerhof (EM) (glycolyse) et le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). De nombreux intermédiaires peuvent être utilisés pour produire d'autres métabolites essentiels ou pour la synthèse d'un large éventail de métabolites secondaires spécialisés. Bien que les champignons puissent obtenir de l'énergie en oxydant une large gamme de composés, il convient de commencer par envisager la croissance d'un champignon sur un sucre simple, tel que le glucose (Deacon, 2005).

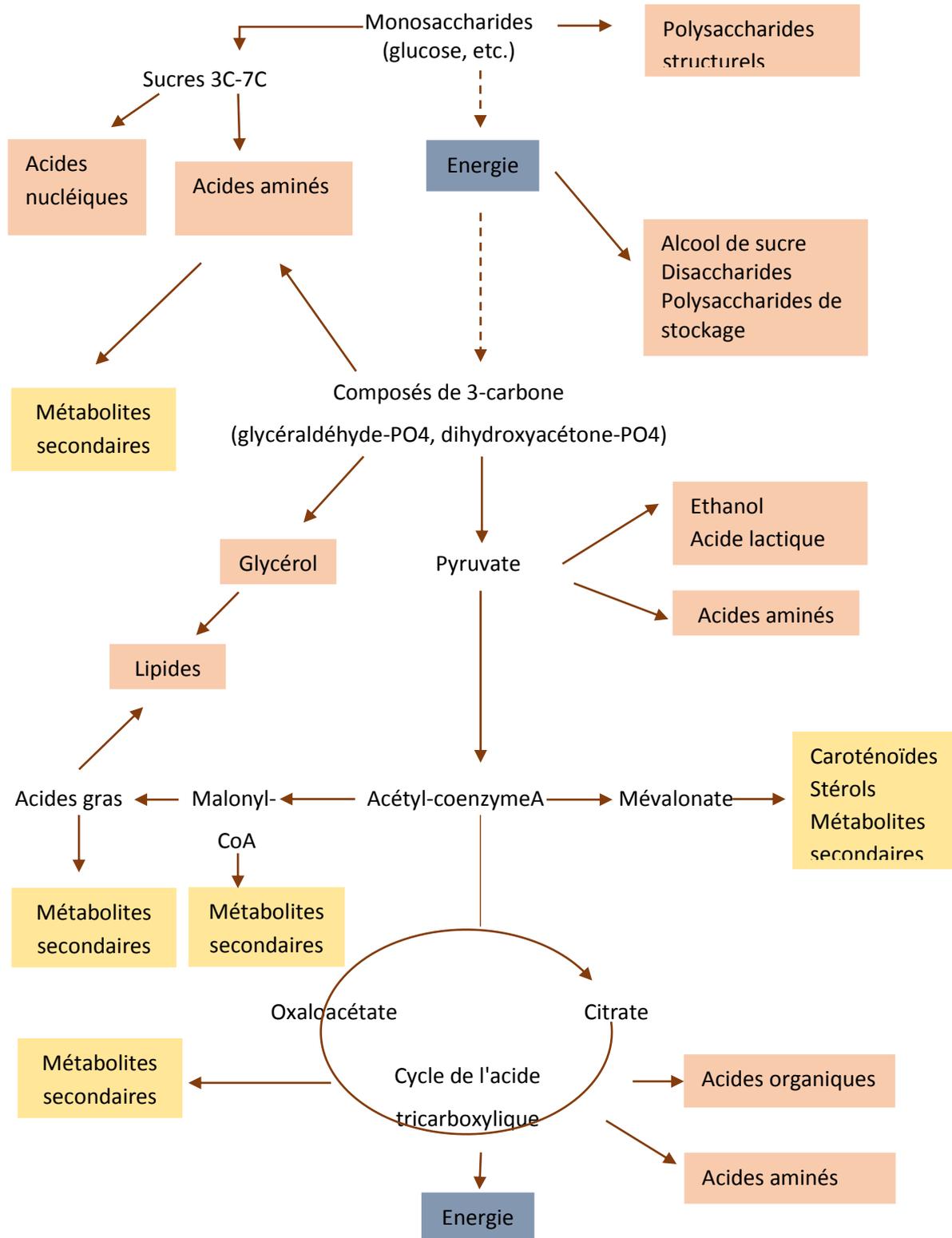


Figure 1. Aperçu des voies métaboliques centrales des champignons, montrant comment la voie de production d'énergie principale (voie Embden – Meyerhof et cycle de l'acide tricarboxylique) fournit les précurseurs de la biosynthèse de divers produits métaboliques (boîtes colorées en rose). Seuls certains des intermédiaires de la voie métabolique centrale sont indiqués. Notez que les métabolites secondaires (notamment les pénicillines et les mycotoxines) sont produits à partir de divers précurseurs, mais principalement à partir de l'acétyl coenzyme A (Deacon, 2005).

1.2. Classification

Les métabolites fongiques sont divers, y compris ceux associés à la synthèse des protéines et à la respiration. Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés et fréquemment définis chimiquement. Certains d'entre eux sont des déchets, alors que d'autres tels que les pigments, les toxines et les antibiotiques ont clairement des fonctions biologiques. En raison de leurs propriétés synthétiques, les champignons sont utilisés dans l'industrie pour la production d'alcool, d'acide citrique et d'autres acides organiques, d'enzymes diverses, et de la riboflavine (Kirk et *al.*, 2008). Les composés isolés à partir des champignons appartiennent à différents groupes structurels : alcaloïdes, terpénoïdes, peptides non ribosomique, polycétides, stéroïdes, xanthones, chinones, phénols, isocoumarines, benzopyranones, tétralones, cytochalasines et enniatines (Schulz et *al.*, 2002). Les phénylpropanoïdes et lignanes, les composés aliphatiques, les lactones et les métabolites miscellaneus sont également d'autres groupes structurelles (Zhang et *al.*, 2006).

1.2.1. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés chimiques naturels contenant des atomes d'azote basiques. Ce sont des métabolites secondaires assez fréquents chez les champignons et certains d'entre eux ont montré une activité antimicrobienne (Souza et *al.*, 2004), antifongique, antitumoraux (Yu et *al.*, 2010). Ils ont également une activité pharmacologique significative et sont majoritairement dérivés des acides aminés. Ils proviennent du métabolisme de l'ornithine, de la lysine, de la phénylalanine, de la tyrosine, du tryptophane, de l'arginine, de la proline, de l'acide anthranilique et de l'histidine. Les alcaloïdes sont classés en 3 groupes (Crozet et Canard, 2016) :

- Les alcaloïdes vrais (Figure 2, I).
- Les pseudo-alcaloïdes (Figure 2, II).
- Les proto-alcaloïdes (Figure 2, III).

L'une des voies de synthèse principale des métabolites secondaires des champignons est celle qui vise à produire des alcaloïdes vrais (alcaloïdes indoliques). Cette voie permet aux champignons, à partir du tryptophane, de produire les molécules d'intérêt thérapeutique majeur qui sont par exemple la vinblastine et la

vincristine (deux puissants anticancéreux) ou encore de produire des composés toxiques pour les animaux (dérivés de l'ergot, toxique pour le bétail) (Zhanga, 2012).

1.2.2. Terpénoïdes

Les principaux terpénoïdes isolés à partir des champignons sont : les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes (Yu et *al.*, 2010). Au cours de la période 2006-2010, 65 sesquiterpènes, 45 diterpènes, 5 monoterpènes et 12 autres terpènes, représentant 127 terpénoïdes, ont été isolés des champignons et ont tous une activité biologique telle qu'antimicrobienne, anticancéreuse et antiprotozoaire (Souza et *al.*, 2004).

Parmi les terpénoïdes remarquables produits par les champignons (Figure 2, IV) : les dérivées de l'acide gibbérellique produites notamment par l'espèce *Aspergillus fumigatus* (Khan et *al.*, 2011). Ces composés sont regroupés sous le terme de gibbérellines. Ce sont des phytohormones qui provoquent une élongation cellulaire au niveau de l'entre noeud, une croissance des tiges, des pousses et des fruits et induisent la germination ainsi que la floraison des plantes. Ils sont utilisés pour augmenter la taille des fruits et leur teneur en sucre (Crozet et Canard, 2016).

1.2.3. Peptides non ribosomiques

Les peptides non ribosomiques sont des métabolites secondaires que l'on retrouve chez les bactéries et les champignons. Ils sont synthétisés par des NRPS (Non Ribosomal Peptid Synthase) qui sont des grands complexes enzymatiques multi-domaines (Tambadou, 2014). De nombreux peptides non ribosomiques produits par les champignons présentaient des activités antimicrobiennes, telle que la leucinostatine A produite par *Acremonium* sp. Ils ont aussi un intérêt pharmaceutique comme la cryptocandine A (antimycosique) décrite chez *Cryptosporiopsis quercina* (Figure 2, V) (Strobel et *al.*, 1999b).

1.2.4. Polycétides

Les polycétides (ou polyacétates) forment une classe des métabolites secondaires que l'on retrouve chez les bactéries, les plantes et les champignons. Dans ces derniers les polycétides sont synthétisés par des polycétides synthases de type I. Leurs structures et leurs fonctions sont très diverses, dont beaucoup possèdent des activités pharmacologiques. Certains d'entre eux, comme par exemple la lovastatine (Figure 2, VI), la codinaeopsine et l'acide cytosporique ont une activité thérapeutique

(Keller et al., 2005 ; Raghunath et al., 2012 ; Crozet et Canard, 2016). Activités pharmacologiques. Certains d'entre eux, comme par exemple la lovastatine (Figure 2, VI), la codinaeopsine et l'acide cytosporique ont une activité thérapeutique (Keller et al., 2005 ; Raghunath et al., 2012 ; Crozet et Canard, 2016).

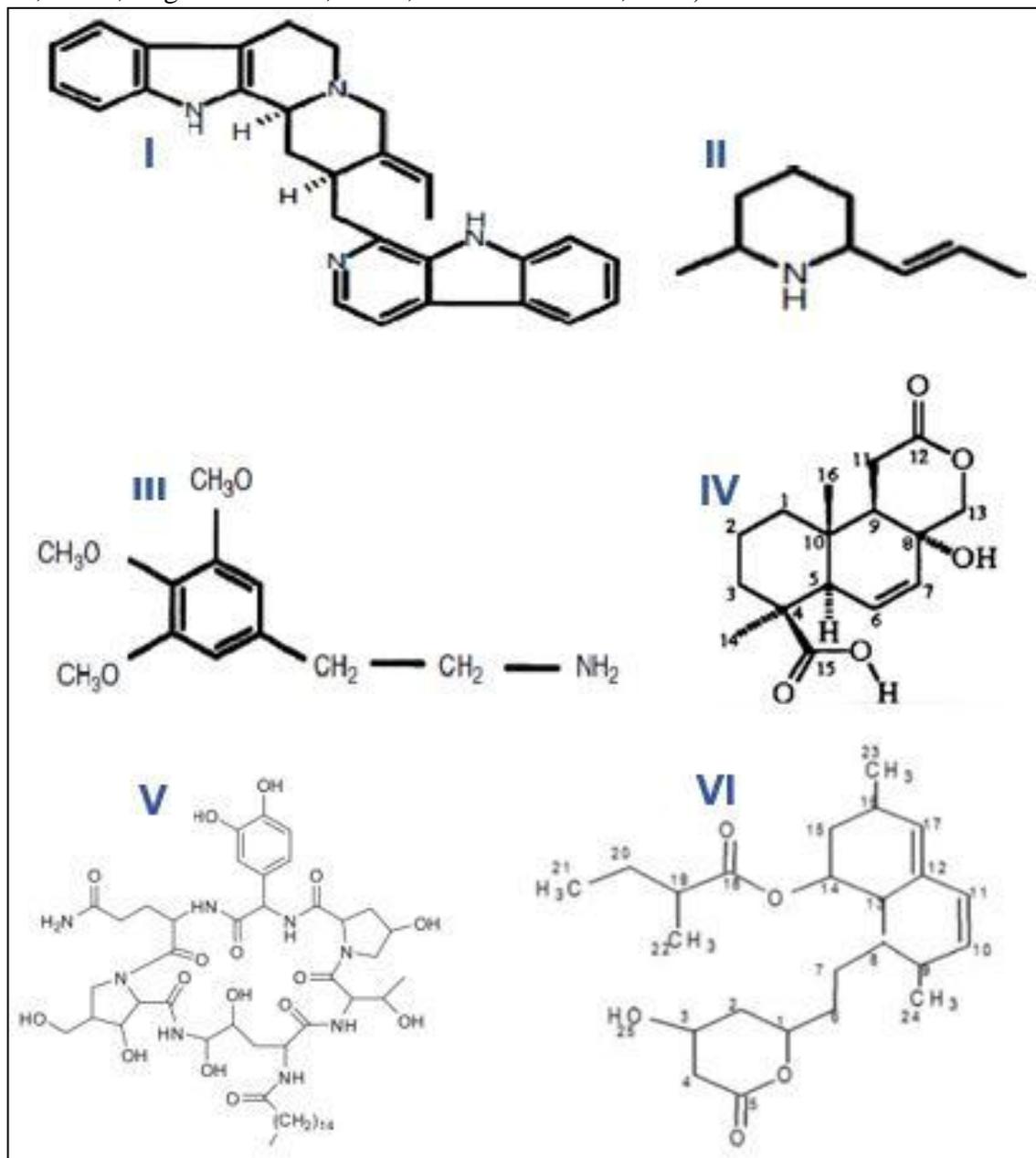


Figure 2. Quelques exemples de classes des champignons. I : Usambaeensine (alcaloïde vrai) (Aniszewski, 2015), II : Pinidine (pseudo-alcaloïde) (Aniszewski, 2015), III : Mescaline (proto-alcaloïde) (Aniszewski, 2015), IV : Terpenoïde (Shulz et al., 2002), V : Cryptocandine A (peptide) (Ratnaweera et de Sila ,2017), VI : Lovastatine (polycétide) (Parthasarathy et Sathiyabama, 2015).

1.3.Rôles des métabolites secondaires

Les bactéries et les champignons associés aux plantes (Tableau 1) produisent des substances à utilisation potentielle en médecine, en agriculture ou encore en industrie. Ces composés ont des activités antibactériennes, antifongiques, anticancéreuses, antimigraineuses, antibiotiques, antidépresseurs, antidiabétiques, anti-inflammatoires, immunosuppresseurs, antimycosiques, antivirales et antioxydantes.

Tableau 1. Certains métabolites bioactifs isolés des bactéries et des champignons associés aux plantes.

Endophytes	Plantes hôtes	Métabolites bioactifs	Activités biologiques	Références
<i>Serratia Marcescens</i>	<i>Rhyncholacis Penicillata</i>	Oocydine A	Antifongique	(Saliba, 2015)
<i>Pseudomonas viriflava</i> EB273	<i>Lactuca saliva</i>	Ecomycine B.C	Antifongique	(Miller et al., 1998)
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Pseudomycins A, B, C, D	Antifongique	(Harisson et al.,1991)
<i>Streptomyces</i> sp. HK 10595	<i>Kannedelia candel</i>	Xiamycin B Indospine Sespenine	Antibactérienne	(Ding et al., 2011)
<i>Streptomyces</i> NRRL 30562	<i>Kennedia Nigriscans</i>	Munumbicines Munumbicidi D	Antibactérienne Anti malarial	(Saliba, 2015)
<i>Bacillus Amyloliuefaciens</i>	<i>Scutellaria baicalensis Georgi</i>	Surfactine Fengycine	Antibactérienne Antifongique	(Saliba, 2015)
<i>Stemphylium globuliferanuman</i>	<i>Mentha pulegium</i>	Alterporriol N et E	Antibactérienne	(Debbab et al., 2009)
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptothecin	Anticancéreuse	(Rehman et al., 2008)
<i>Chaetomium</i> sp	<i>Salvia officinalis</i>	Cochliodinol Isocochliodinol	Anticancéreuse	(Debbab et al., 2009)
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Polysiphonia urceolata</i>	Chaetopyranin	Antioxydante Cytotoxique	(Khiralla et al., 2017)

Tableau 1. Certains métabolites bioactifs isolés des bactéries et des champignons associés aux plantes (suite)

<i>Alternaria</i> sp.	<i>Polygonum senegalense</i>	Alternariol Alternusin	Anticancéreuse	(Aly et al., 2008)
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Trixis vauthieri</i>	Altenusin	Antifongique Antiparasite	(Cota et al., 2008)
<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Taxus mairei</i>	Brefeldin A	Anticancéreuse	(Khiralla et al., 2017)
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Trichosporiella species</i>	Trichodin	Antibactérienne	(Patil et al., 2016)
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Piper aduncum</i>	Phomenone	Antifongique	(Silva et al., 2010)
<i>Acremonium zaea</i>	<i>Zea mays</i>	Pyrocidines A et B	Antifongique	(Wicklow et al., 2005)
<i>Paecilomyces</i> sp. <i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Taxus mairei</i> <i>Torreya grandis</i>	Brefeldin A	Antivirale Antibactérienne Antifongique Antinématode	(Wang et al., 2007)
<i>Cephalosporium</i> sp.	<i>Sinarundinaria nitida</i>	4,6- dihydroxyl- 5- methoxy -7- methylphthalide	Antioxydante	(Huang et al., 2012)
<i>Microsphaeropsis olivacea</i> <i>Cephalosporium</i> sp.	<i>Pilgerodendron uviferum</i> <i>Trachelospermum jasminoides</i>	Graphislactone A	Antioxydante	(Hormazabal et al., 2005)
<i>Edenia</i> sp.	<i>Petrea volubilis</i>	Palmarumycin CP17 Palmarumycin CP18	Anti-leishmanial	(Martinez-Luis et al., 2008)
<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Juniperus cedrus</i> <i>Erica arborea</i>	Nodulisporins A-C Nodulisporins D-F	Antifongique Antibactérienne Antialgique	(Khiralla et al., 2017)

Tableau 1. Certains métabolites bioactifs isolés des bactéries et des champignons associés aux plantes (suite)

<i>Acremonium</i> sp.	<i>Taxus baccata</i>	Leucinostatin A	Anticancéreuse Antifongique	(Khiralla et al., 2017)
<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Subglutinol A	Immunosuppressive	(Lim et al., 2015)
<i>Fusarium solani</i> <i>F. oxysporum</i> <i>F. proliferatum</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Acide cajaninstilbene	Antioxydante Antiinflammatoire Analgésique Hypotriglycerimique Hypoglycemique	(Zhao et al., 2012)
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Laguncularia racemosa</i>	3-Hydroxypropionic acid	Antibactérienne	(Sebastiane s et al., 2012)
<i>Phomopsis</i> sp	<i>Laurus azorica</i>	Cycloepoxylactone Cycloepoxytriol B	Antifongique Antibactérienne	(Khiralla et al., 2017)
<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Excoecaria agallocha</i>	Phomopsin A	Anticancéreuse	(Patil et al., 2016)
<i>Phomopsis cassiae</i>	<i>Cassia speciablis</i>	3,12-Dihydroxycadalene	Antifongique	(Silva et al., 2006)
<i>Beauveria bassiana</i>	sol	Beauvericin	insecticide antibiotique cytotoxique	(keswani et al., 2015)
<i>Clonostachys rosea</i>	sol	Peptaibols Gliotoxine Viridine	Antibactérienne Antifongique	(Lorito et al., 2010)

1.4. Techniques analytiques des métabolites secondaires

L'analyse des métabolites secondaires principalement celle des antibiotiques s'effectue selon différentes techniques chromatographiques, par exemple : 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 méthodologies impliquent l'extraction liquide-liquide par l'utilisation d'un solvant organique à partir des milieux liquides des cultures fongiques. Différents solvants, seuls ou en combinaison, ont été utilisés pour l'extraction en fonction de la solubilité du métabolite souhaité. L'acétate d'éthyle, le chloroforme, le méthanol, le dichlorométhane, l'hexane, l'éthanol sont les solvants les plus couramment utilisés pour extraire les métabolites du bouillon de culture et être finalement séchés par évaporation. Le choix du solvant pour l'extraction dépend principalement de la solubilité du composant que l'on souhaite extraire. (Madhusudhan et al., 2015).

La technique analytique la plus utilisée pour la séparation des métabolites secondaires des champignons est la chromatographie sur couche mince (Bhagobaty et joshi, 2011). Elle est définie comme étant une technique biophysique importante, rapide, sensible et peu coûteuse qui ne nécessite que quelques microgrammes d'échantillons pour une analyse réussie. Elle est couramment utilisée pour déterminer le nombre de composants dans un mélange, vérifier l'identité et la pureté d'un composé, surveiller l'évolution d'une réaction, déterminer la composition de solvant pour les séparations préparatives, et analyser les fractions obtenues par chromatographie sur colonne. Comme toutes les formes de chromatographie, la CCM implique un équilibre dynamique et rapide des molécules entre les deux phases (phase mobile et phase stationnaire). Cet équilibre des forces intermoléculaires détermine la position d'équilibre et donc la capacité du solvant à déplacer le soluté vers le haut de la plaque. Cet équilibre dépend de la polarité du matériel de CCM, (2) de la polarité du solvant de développement et (3) de la polarité de la ou des molécules d'échantillon (Cai, 2014).

Les composés biologiquement actifs isolés particulièrement à partir des microorganismes ont reçu une attention considérable au cours de ces dernières années en raison de leurs différentes propriétés appliquées dans divers domaines. Cette importance est due aux microorganismes producteurs principalement aux champignons endophytes où leur capacité à augmenter la croissance et la tolérance des plantes et les protéger contre les stress biotiques et abiotiques a été constatée (Chapla et *al.*, 2014).

2. Généralités sur les champignons endophytes

Littéralement, le mot endophyte signifie «dans la plante» (endon, Dans ; phyton, plante) (Schulz et Boyle, 2005). Ce terme a été inventé par Anton de Bary (1866) pour faire référence à tout organisme présent dans les tissus végétaux, distinct des épiphytes vivants à la surface des plantes (Moricca et Ragazzi, 2008). La définition la plus couramment utilisée pour décrire les endophytes est celle de Petrini (1991) qui définit les endophytes comme étant tous les microorganismes vivant dans les organes végétaux internes à un certain moment de leurs vies et peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommages apparents chez l'hôte (Hyde et Soyong, 2008).

Vu l'importance de ces microorganismes, cet aspect a attiré l'attention de plusieurs chercheurs sur ce sujet, qui ont abouti à la constitution d'un groupe de recherche nommé 'Endophytes in Biotechnology and Agriculture, affilié à la coopération européenne en science et technologie (European Cooperation on Science and Technology) (COST action) (WWW.endophytes.eu). Ce groupe de chercheurs définit les endophytes comme des organismes et des nano-organismes, les bactéries et les champignons endophytes qui vivent dans les plantes d'une manière inter ou intracellulaire en interagissant biochimiquement et génétiquement avec l'hôte, sans induire de symptômes de pathogénicité. Cette définition élargie rapporte les fonctions principales de ces microorganismes, notamment, la promotion de la croissance et la défense par synthèse des phytohormones, de biosurfactants, d'enzymes ou des précurseurs de métabolites secondaires des végétaux (WWW.endophytes.eu).

2.1. Diversité des champignons endophytes

Les champignons endophytes représentent un groupe extrêmement diversifié (Zabalgoitia, 2008), la plupart d'entre eux appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota*. Cependant, certains appartiennent à d'autres taxons tels que les *Deuteromycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* et *Oomycota* (Saar et al., 2001 ; Sun et Guo, 2012). Leur diversité a été estimée à 1,5 millions d'espèces sur Terre (Sun et Guo, 2012). En outre, plus de 90% d'espèces de champignons endophytes ne sont pas décrites (Shipunov et al., 2008). Huang et al. (2008) ont décrit seulement 80.000 à 100.000 espèces.

Les champignons endophytes ont été trouvés chez presque toutes les espèces de plantes examinées à ce jour (Hyde et Soyong, 2008). Chacune de ces plantes existantes sur terre hébergerait au moins une, à plusieurs centaines d'endophytes (Strobel et Daisy, 2003). Ils ont été isolés à partir du palmier (Taylor et al., 1999), des grands arbres (Gonthier et al., 2006), des lichens (Li et al., 2007) et des graminées marines (Venkatachalam et al., 2015). Parmi les facteurs qui influencent la diversité observée chez les champignons endophytes les variations géographiques : les taxons isolés de la même espèce hôte ont tendance à changer d'un endroit à un autre (Collado et al., 1999), les variations géo-climatiques : les assemblages endophytes semblent plus riches dans les zones tropicales que dans les zones tempérées ou froides du monde (Arnold et Lutzoni, 2007). L'âge de la plante a également un effet sur la

diversité. Les plantes semblent accumuler un nombre croissant d'endophytes dans leurs tissus quand l'exposition à l'inoculum d'endophyte augmente. De ce fait, les parties les plus anciennes de la plante peuvent héberger plus d'endophytes que les plus jeunes (Arnold *et al.*, 2003).

2.2. Classification

Rodriguez *et al.* (2009) ont classé les champignons endophytes en quatre classes : deux principaux groupes (Clavicipitacées et non clavicipitacées) en se basant sur des données de phylogénie et des traits d'histoire de vie. Cependant, ils se sont basés sur la colonisation (Figure 3), la transmission de l'hôte, la biodiversité végétale et les avantages pour les conditions physiques conférées aux hôtes pour classer les endophytes non clavicipitacées en trois groupes fonctionnels (Tableau 2).

Alors que Schaechter (2011) exposa un autre point de vue sur la classification. Il a déclaré que les champignons endophytes étaient souvent divisés en deux groupes principaux, en fonction des différences de taxonomie, de gamme d'hôtes, de modes de transmission, de la colonisation, de spécificité des tissus et des fonctions écologiques. Le groupe 1 comprend les endophytes clavicipitacées qui infectent certaines graminées. Le groupe 2 est constitué des endophytes non clavicipitacées (Khiralla *et al.*, 2017).

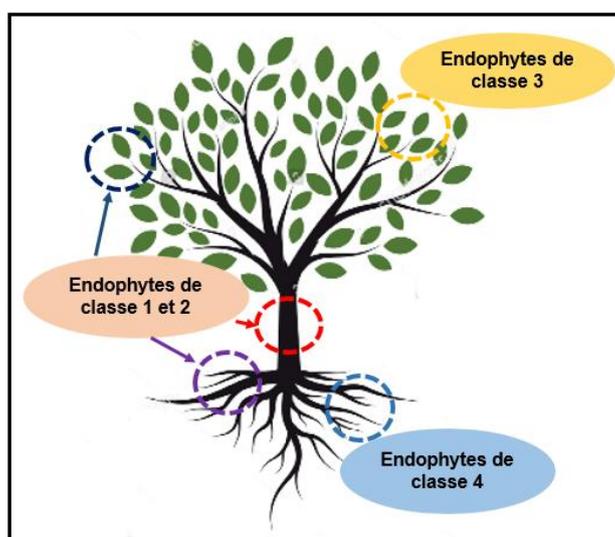


Figure 3. Les classes d'endophytes selon la colonisation de l'hôte (Kusari et Spiteller, 2012)

Tableau 2. Critères symbiotiques utilisés pour caractériser les classes d'endophytes fongiques (Rodriguez *et al.*, 2009).

	Clavicipitacées	Non clavicipitacées		
Critères	Classe1	Classe2	Classe3	Classe4
Gamme d'hôte	Etroite	Vaste	Vaste	Vaste
Tissu (s) colonisé (s)	Pousse et rhizome	Pousse, racine et rhizome	Pousse	Racine
Colonisation <i>in planta</i>	Extensif	Extensive	Limitée	Extensive
Biodiversité <i>in planta</i>	Faible	Faible	Haute	Inconnue
Transmission	Vertical et horizontal	Vertical et horizontal	Horizontal	Horizontal
Avantages	NHA	NHA et HA	NHA	NHA

Les avantages non adaptés à l'habitat (NHA), tels que la tolérance à la sécheresse et l'amélioration de la croissance, sont courants chez les endophytes, quel que soit leur habitat d'origine. Les avantages adaptés à l'habitat (HA) résultent de pressions sélectives spécifiques à l'habitat, telles que le pH, la température et la salinité.

2.3.Colonisation et transmission

Une colonisation réussie par les endophytes dépend de nombreuses variables, notamment du développement d'une manière inter et intracellulaire, la spécificité d'organe ainsi que de la colonisation de la partie végétative et également du système racinaire (Schulz et Boyle 2005). Elle dépend aussi du type de tissu végétal, génotype de la plante, taxon microbien, type de souche, et des conditions environnementales biotiques et abiotiques (Hardoim *et al.*, 2015).

La colonisation des tissus de la plante hôte dans la partie aérienne (feuilles et pousses) peut être intercellulaire discrète et localisée (Schulz et Boyle, 2005), ou intercellulaire et systémique (Stone *et al.*, 2000). Tandis que la colonisation des racines peut aussi être intracellulaire et limitée à des cellules individualisées ou inter- et intracellulaire (Figure 4). Les hyphes forment souvent des enroulements intracellulaires, comme c'est le cas pour les DSE (*Dark Septate Endophytes*) (Stone *et al.*, 2000 ; Sieber, 2002).

Les modes de reproduction et de transmission des champignons endophytes dans une population de plante hôte sont reconnus comme des facteurs ayant une importance pour indiquer leur propagation. Dans la transmission verticale, la croissance se fait complètement à l'intérieur des tissus de la plante hôte (Selosse et Schardl, 2007). Les hyphes du champignon sont transmis de la plante vers la descendance via les biais des graines. Dans la transmission horizontale, le champignon est transmis par les spores sexuées ou asexuées et va donc infecter les autres plantes (Gallery *et al.*, 2007).

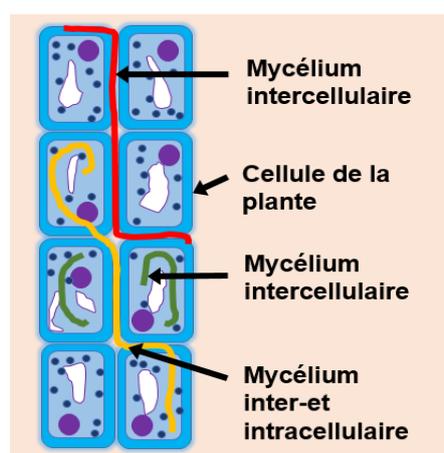


Figure 4. Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes (Kusari et Spiteller, 2012).

2.4. Interactions plantes-champignons endophytes

Toute interaction plante-champignon est précédée d'une rencontre physique entre une plante et un champignon, suivie de plusieurs barrières physiques et chimiques qui doivent être surmontées pour réussir à établir une association (Kusari *et al.*, 2012). La relation mutuelle profite aux champignons endophytes en leur fournissant de l'énergie, des nutriments, un abri ainsi qu'une protection contre le stress environnemental. Par ailleurs, les endophytes fongiques profitent indirectement à la croissance des plantes en produisant des substances spéciales, principalement des métabolites secondaires et des enzymes, qui sont responsables de l'adaptation des plantes aux stress abiotiques tels que la lumière, la sécheresse et les stress biotiques, tels que les attaques par les herbivores, les insectes, les nématodes et les microorganismes pathogènes (Kogel *et al.*, 2006).

2.5. Rôles des champignons endophytes

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

2.5.1. Rôles physiologiques

Les endophytes peuvent promouvoir activement ou passivement la croissance des plantes par divers mécanismes, car les métabolites endophytes offrent une diversité d'aptitudes vis-à-vis des plantes hôtes renforcées par une résistance accrue des plantes aux stress biotiques et abiotiques, ainsi qu'une accélération de la croissance des plantes (Selim et *al.*, 2012).

De nombreux endophytes sont capables de fixer l'azote (N), la solubilisation du phosphate et l'augmentation de son absorption, la production de sidérophores, et d'hormones végétales telles que l'auxine, les abscisines, l'éthylène, les gibbérellines et l'acide indole acétique (AIA), qui sont importants pour la régulation de la croissance et du développement des plantes (Baldani et *al.*, 1986).

Piriformospora indica est capable de mobiliser des plantes indisponibles en P en excréant des phosphatases extracellulaires, ainsi qu'en assurant la médiation de l'absorption et de la translocation de P marqué via un processus dépendant de l'énergie (Singh et *al.*, 2000). Il est également possible que *P. indica* soit impliqué dans l'accumulation de N dans les pousses de *Nicotiana tobaccum* et d'*Arabidopsis thaliana*. La teneur en N dans *N. tobaccum* a été augmentée de 22%, indiquant un transfert d'environ 60% de N de substrat dans les plantes (Sherameti et *al.*, 2005).

2.5.2. Rôles dans la tolérance aux stress abiotiques

Les plantes sont exposées à des conditions environnementales changeantes, les obligeant à s'adapter à des températures extrêmes, des insuffisances d'eau et des produits chimiques. Plusieurs études ont démontré que les plantes associées à des champignons endophytes ont été plus tolérantes à la sécheresse, à la chaleur, à la toxicité des métaux et à une salinité élevée (Waller et *al.*, 2005). Les champignons endophytes des graminées fourragères comme le cas de Fétuque élevée augmentent de

manière significative la tolérance à la sécheresse de cette espèce (Clay et Schardl, 2002). La teneur en eau des graminées associées à des endophytes était plus élevée que celle des graminées dépourvues d'endophytes (Kouadria, 2019).

Redman et al. (2002) ont démontré que les champignons endophytes pourraient aussi augmenter la tolérance à la chaleur chez leurs hôtes. Cette tolérance a été détectée chez *Dichanthelium lanuginosum* colonisée par l'endophyte *Cuvarularia* sp qui résiste à des températures de 65° C, alors que les plantes non colonisées ne résistaient même pas à une température de 40° C. Il a été suggéré que l'endophyte agirait comme un déclencheur biologique pour activer la réponse au stress plus rapidement et plus fortement que dans les plantes non symbiotiques. Cette résistance à la température peut être très avantageuse pour ces plantes qui pourraient croître dans des chaleurs où tous les agents pathogènes, les ravageurs et les mauvaises herbes ne résisteraient pas.

Les champignons endophytes peuvent aussi améliorer la photosynthèse de leur hôte, par exemple quand *Agave victoria-reginae* grandit en présence du champignon endophyte *Fusarium oxysporium*, la chlorophylle totale et la teneur en sucre augmente, entraînant une augmentation du rendement de la photosynthèse des plantes par rapport à celles dépourvues d'endophyte (Kouadria, 2019).

2.5.3. Rôle dans la production de phytohormones

Les endophytes peuvent favoriser la croissance en produisant des phytohormones sans aucune facilitation apparente de l'absorption des nutriments par l'hôte et ni d'une stimulation du métabolisme de ces derniers. Les champignons endophytes peuvent augmenter la biomasse de la plante en produisant des hormones de croissance ou en induisant la production d'hormones de l'hôte (Schulz et Boyle, 2005). L'utilisation d'extraits d'endophytes provenant de cultures fongiques pour stimuler la croissance des plantes indique que les agents solubles dans les extraits de culture peuvent stimuler la croissance de l'hôte de la même manière que les champignons en croissance active. Ceci prouve que les champignons endophytes produisent des phytohormones *in vitro et in vivo* (Selim et al., 2012).

Par exemple, l'extrait mycélien de *Piriformospora indica* induit une augmentation similaire de la biomasse de pousses de maïs comme le champignon le fait lui-même. La promotion de la croissance est attribuable à l'AIA comme le champignon synthétise l'hormone *in vitro* (Varma *et al.*, 1999).

2.5.4. Protection contre les insectes, les vers, les parasites et les herbivores

Mandyam et Jumpponen (2005) ont suggéré trois mécanismes possibles par lesquels les endophytes peuvent améliorer la résistance des plantes hôtes.

Le premier mécanisme repose sur l'amélioration globale des performances des plantes endophytes, ce qui les aide à tolérer les herbivores et à subir des dommages sans effets visibles sur la productivité (Gehring et Whitham, 2002). Le deuxième mécanisme possible est l'altération qualitative et quantitative de la chimie nutritionnelle des plantes, en modifiant les teneurs en glucides et en azote, le rapport C / N et la composition en phytostérol (Schulz et Boyle 2005). Les endophytes sont capables de modifier les niveaux et la teneur en éléments nutritifs des plantes hôtes, ce qui, associé à une altération du métabolisme des glucides, affecte donc la sensibilité des herbivores hôtes. Le troisième mécanisme possible est la production de moyens de dissuasion alimentaires par les endophytes eux-mêmes (Selim *et al.*, 2012).

2.5.5. Rôle environnemental

Les endophytes jouent un rôle important dans la communauté écologique, dans le but de réduire l'ampleur de la dégradation de l'environnement, de la perte de la biodiversité et de la détérioration des sols et des ressources en eau causée par un excès d'insecticide organique toxique, d'eaux usées industrielles et de gaz toxiques. La lutte biologique utilisant des endophytes comme nouvelle méthode efficace est de plus en plus utilisée pour assainir l'environnement et tuer des insectes ou des agents pathogènes (Selim *et al.*, 2012). Une nouvelle application d'endophytes dans le domaine de la phytoremédiation est l'élimination assistée par les plantes des xénobiotiques et des métaux lourds du sol. Cette application a été rapportée dans de nombreuses revues. Cependant, le succès de la phytoremédiation dépend de la

capacité des microbes et des plantes à tolérer et à accumuler de fortes concentrations de polluants, tout en produisant une biomasse importante (Ma et *al.*, 2011).

2.5.6. Protection contre les agents pathogènes

Il existe au moins trois mécanismes principaux par lesquels les endophytes peuvent améliorer la résistance de l'hôte aux agents pathogènes (Mandyam et Jumpponen, 2005).

Le premier mécanisme repose sur la compétition entre endophytes et pathogènes sur les mêmes ressources. Le deuxième mécanisme possible de contrôler des agents pathogènes peut être lié à la capacité des endophytes à augmenter la capacité de l'hôte à produire des phytoalexines et / ou des composés biocides, ou à la capacité de l'endophyte lui-même à produire des fumigants et d'autres agents antimicrobiens. Le troisième mécanisme consiste à améliorer la résistance de l'hôte aux agents pathogènes en induisant des réponses de défense de l'hôte par des endophytes localisés (Selim et *al.*, 2012).

Il est probable que de nombreux endophytes pénétrant dans les tissus peuvent induire une résistance aux agents pathogènes et dans de nombreux cas, plusieurs de ces trois mécanismes peuvent agir simultanément. Par exemple, la colonisation des racines par *Phialophora graminicola* peut réduire de manière préventive la croissance de l'agent pathogène *Gaeumannomyces graminis* par compétition pour l'espace et les ressources. Cependant, il peut également former des barrières mécaniques résultantes de l'épaississement de l'endoderme qui inhibe la colonisation par l'agent pathogène (Speakman et Lewis, 1978).

Une grande diversité a été constatée chez les champignons endophytes, mais pour la suite de cette partie bibliographique on s'intéresse beaucoup plus à *Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea* et *Phomopsis* sp.

2.6. *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana a été découverte par Agostino Bassi di Lodi en 1834 en tant que pathogène causant la muscardine blanche du ver à soie (*Bombyx mori*). L'identification initiale a été faite par Balsamo-Crivellis comme étant *Botrytis*

bassiana, tandis que Spegazzini l'a appelé *Sporotrichum globoliferum* et Petit comme *Isaria vexans*, mais nommée plus tard *B. bassiana* par Vuillemin en 1912 (Lipa et al., 2017). *B. bassiana* appartient à la famille des Ascomycota, classe des Sordariomycetes et ordre des Hypocreales (Mohamed Mahmoud et al., 2017). C'est un champignon entomopathogène qui peut être isolé à partir des cadavres d'insectes ou du sol dans les zones boisées (Beilharz et al., 2002). Les colonies de *Beauveria bassiana* se développent relativement lentement et peuvent apparaître poudreuses ou laineuses, avec des couleurs allant du blanc au jaune et parfois rosées. Les hyphes aériens (conidiophores) sont septés, lisses, hyalins et d'une largeur d'environ 2 µm (Figure 5A), à extrémité terminale en zigzag formant de façon sympodiale de petites spores unicellulaires. Les hyphes submergés sont structurés de la même façon, mais plus grands (1,5 à 3 µm) (Saranraj et Jayaprakash, 2017). Les conidies sont produites sur des épis courts appelés conidiophores donnant aux cellules conidiogènes un aspect épineux. En condition aérobie, le champignon produit des conidiospores de forme sphériques (1-4 µm de diamètres). Cependant, le champignon a la capacité de se développer en condition anaérobie où il produit de blastospores de forme ovales (2-3 µm de diamètres) (Figure 5B). Les blastospores sont aussi infectieux que les conidiospores (Sabbahi, 2008).

B. bassiana est considéré comme l'un des champignons les plus efficaces pour diverses raisons, notamment : la distribution cosmopolite, la capacité d'infecter n'importe quel stade de la vie de son hôte, une gamme d'hôtes plus étendue que les autres *Deutéromycètes*, peut infecter presque tous les ordres d'insectes et peut infecter certains tissus végétaux (Saranraj et Jayaprakash, 2017).

B. bassiana a une limite supérieure de température générale pour la croissance de 34 – 36°C, des températures plus élevées peuvent réduire considérablement l'efficacité (Noma et Strickler, 1999).

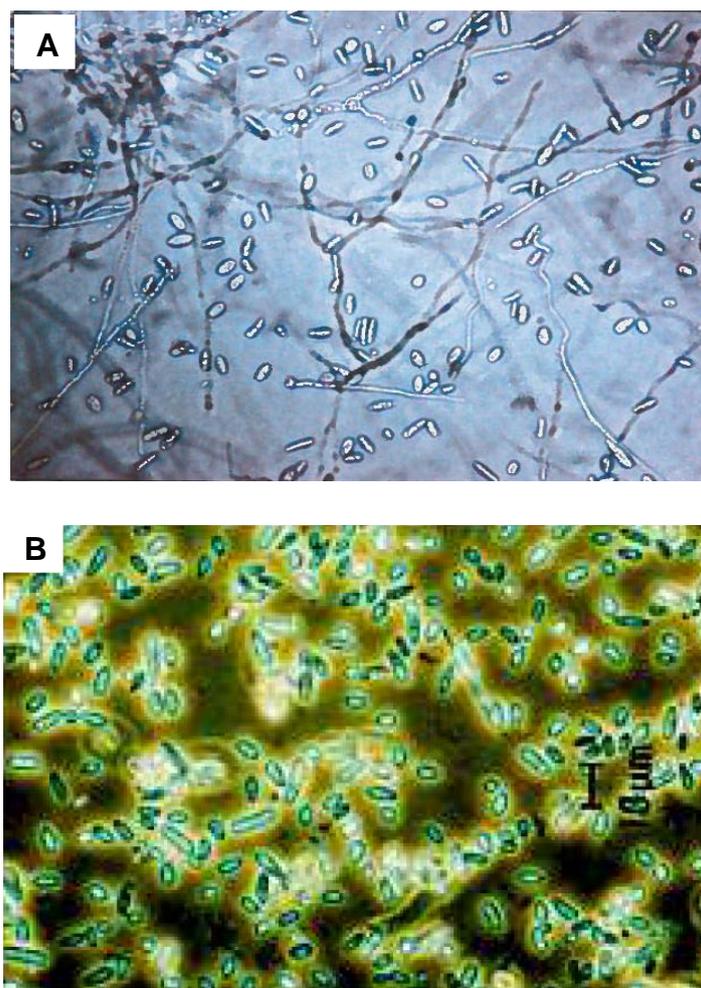


Figure 5. A : Vue microscopique des spores (unités infectieuses) et des hyphes (forme de filaments) de *B. bassiana* Gx400 (Sabbahi, 2008), B : Blastospores de *B. bassiana* (Halouane, 2008)

2.6.1. Mode d'action

Mohamed Mahmoud *et al.* (2017) ont isolé *B. bassiana* à partir des racines de palmier dattier d'Alicante Espagne comme un endophyte. *B. bassiana* a été rapporté en présentant des activités antagonistes contre divers phytopathogènes dus à l'antibiose, la compétition pour l'espace et les nutriments, les agents lytiques, métabolites secondaires, endophytisme et résistance systémique induite. Il est largement reconnu comme l'agent de biocontrôle à double usage le plus prometteur contre les agents phytopathogènes, en plus de ses propriétés entomopathogènes contre les insectes nuisibles. *B. bassiana* a également montré une activité inhibitrice contre la croissance mycélienne de champignons parasites des plantes appartenant aux genres *Fusarium* (Mohamed Mahmoud, 2017).

B. bassiana est utilisé comme insecticide biologique pour lutter contre un certain nombre d'organismes nuisibles, tels que les coleoptères, les hyménoptères, les lépidoptères, les hétéroptères, les homoptères et les diptères (keswani et *al.*, 2015).

Comme chez d'autres champignons entomopathogènes, les espèces de *Beauveria* attaquent leurs insectes hôtes par voie percutanée. La voie d'infection comprend les étapes suivantes : (1) fixation de la spore à la cuticule de l'insecte, (2) germination des spores sur la cuticule, (3) pénétration à travers la cuticule, (4) maîtrise de la réponse immunitaire de l'hôte, (5) prolifération (6) excroissance saprophyte de l'hôte mort et production de nouvelles conidies (de Fariaa et Wraight, 2007).

Lorsque l'insecte meurt, le champignon sécrète un antibiotique pigmenté rouge, l'oosporéine, qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries saprophages dans le tube intestinal de l'insecte (Inglis et *al.*, 2001).

2.6.2. Métabolites secondaires

B.bassiana est bien connu pour produire une vaste gamme de métabolites biologiquement actifs. Il existe principalement des composés organiques volatils, des alcoïdes (tennéline, bassianine, pyridovéricine, pyridomacrolidine), des pigments non peptidiques (oosporéine), des cyclodepsipeptides non synthétisés par le ribosome (beauvericines et allobévericines, bassianolides et beauveriolides).

2.6.2.1. Composés organiques volatiles

Quand le champignon entomopathogène pénètre à travers la cuticule de l'insecte et agit comme un agent pathogène, les champignons doivent perturber la couche protectrice à la surface de l'insecte. Les composés organiques volatils (COV) libérés par les champignons peuvent vaincre cette couche protectrice. Les champignons émettent environ 300 COV connus (Hung et *al.*, 2015). Parmi les COV libérés par *B.bassiana*, les diisopropylnaphtalènes (> 57%) (isomères 2,3 et 2,6), l'éthanol (10,2%) et des sesquiterpènes (6,4%) ont été détectés (Crespo et *al.*, 2008).

2.6.2.2. Ester méthylique de l'acide S - (-) - 10,11-dihydroxyfarnésique

L'ester méthylique de l'acide S - (-) - 10,11-dihydroxyfarnésique (I) se trouve également parmi les métabolites secondaires de *B.bassiana* (Figure 6A). Ce composé est un inhibiteur puissant de la synthèse de mélanine et peut potentiellement être utilisé pour les biomatériaux cosmétiques (Baek et *al.*, 2014). Le test d'irritation a prouvé l'innocuité de cette substance dans les cosmétiques. Il n'irrite même pas la peau ni les yeux (Son et Lee, 2013).

2.6.2.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes produits par le champignon entomopathogène *B.bassiana* sont des dérivées de la 2-pyridine (Figure 6A). A ce jour, la tennéline (II), la bassianine (III) (Patocka, 2016), la pyridovéricine (IV) et la pyridomacrolidine (V) ont été retrouvés (Takahashi et *al.*, 1998b). Bien que leur rôle exact dans l'interaction fongique avec l'hôte ne soit pas encore élucidé, ils ont certainement reçu une attention considérable dans la communauté biologique et chimique (de Silva et *al.*, 2009).

2.6.2.4. Pigments

Des substances colorantes jaunes et rouges ont été trouvées dans des isolats du champignon *Beauveria* (Patocka, 2016). Les pigments jaunes de *B.bassiana* ont été identifiés comme étant des alcaloïdes 2-pyridones tennéline (II) et bassianine (III) et le pigment rouge a été identifié comme étant l'oosporéine de pigment de dibenzoquinone (VI) (figure 6B). L'oosporine a des propriétés antibiotiques et cytotoxiques (Alurappa et *al.*, 2015). Les pigments de *Beauveria*, tenellin, bassianin et oosporéine, inhibaient tous l'activité ATPase totale de la membrane des érythrocytes (Jeffs et Khachatourians, 1997).

2.6.2.5. Cyclodepsipeptides

Le champignon entomopatogène *B.bassiana* est la source d'une série de dépsipeptides cycliques biologiquement actifs synthétisés non-ribosomiquement (Patocka, 2016). Ces composés ont une activité cytotoxique (Valencia et *al.*, 2011) et sont les substances biologiquement actives les plus importantes de *B.bassiana*. Plusieurs types de cyclodepsipeptides ont été trouvés chez *B. bassiana* : les

beauvericines et les allobévericines, les bassianolides et les beauveriolidés (Figure 7B).

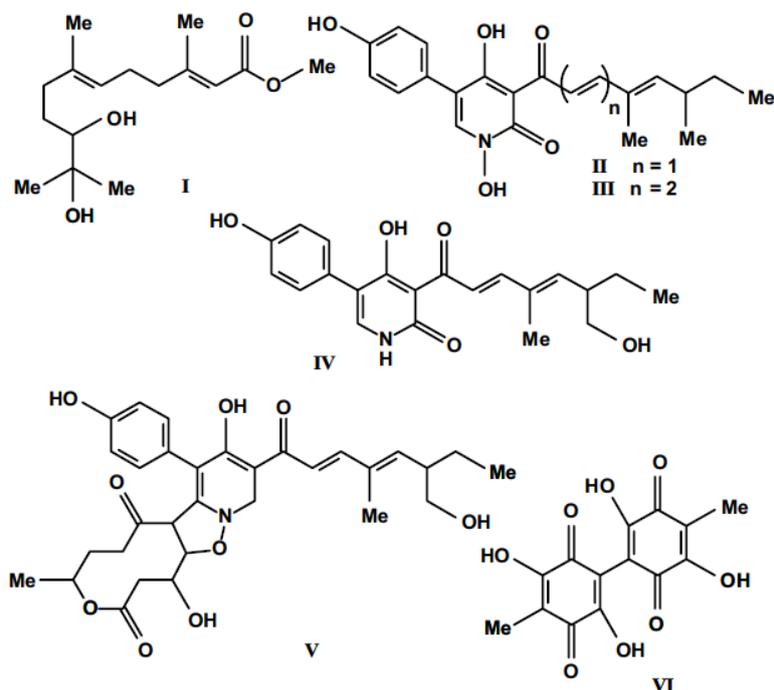


Figure 6A. Métabolites biologiquement actifs de *Beauveria bassiana*. I - S - (-) - 10,11-dihydrofarnésique, Ester méthylique de l'acide II - tennelin, III - bassianine, IV - pyridovéricine, V - pyridomacrolidine, VI – oosporéine (Patocka, 2016).

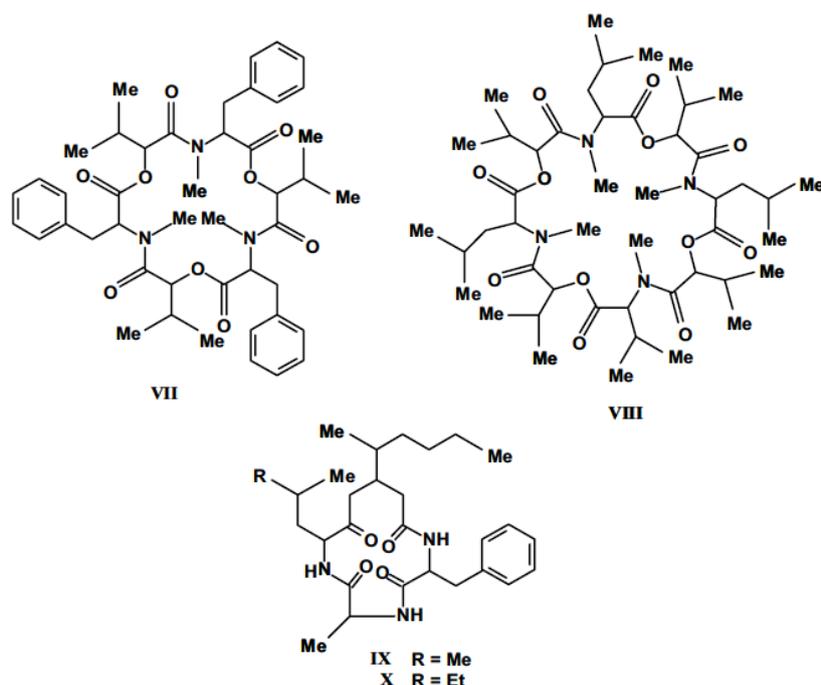


Figure 6B. Métabolites biologiquement actifs de *Beauveria bassiana*. VII - la bévericine, VIII - bassianolide, IX - beauveriolide I, X - beauveriolide III (Patocka, 2016).

2.7. *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea est un hyphomycète qui produit des conidies unicellulaires dans des formes conidiophores pénicillées ou verticillées (Rodrigo et *al.*, 2015). Il appartient à la famille des Ascomycota, la classe des Sordariomycetes et l'ordre des Hypocreales (Mohamed Mahmoud et *al.*, 2017). Ce champignon est présent dans divers habitats, notamment dans les régions tropicales, tempérées, désertiques et subarctiques. Il a été signalé dans des prairies et des terres boisées cultivées, des forêts, des landes, des eaux douces et des sols côtiers, en particulier ceux à pH neutre à alcalin. Bien qu'il soit naturellement présent dans le sol, le champignon peut coloniser les débris végétaux et les tiges, les feuilles, les fruits, les graines et les racines des mauvaises herbes et des cultures (Sutton et *al.*, 1997). En outre, ce champignon est un endophyte isolé à partir des racines de palmier dattier d'Alicante Espagne (Mohamed Mahmoud et *al.*, 2017). *Clonostachys rosea* a été signalé comme étant un champignon entomopathogène de deux ravageurs de la cicadelle, à savoir *Sonesimia grossa* et *Oncometopia tucumana* en Argentine (Anwar et *al.*, 2018).

Les champignons mycotrophes *Trichoderma* spp et *Clonostachys* spp (Druzhinina et al., 2011) ont été signalés comme un groupe d'agents de lutte biologique (BCA) impliquant le phénomène de mycoparasitisme contre les champignons pathogènes. Ils peuvent également utiliser la biomasse fongique morte (saprotrophie). Il y'a des preuves d'inhibition de pathogène par *Clonostachys rosea* avec contact direct des hyphes sans pénétration, qui peut être considéré comme un effet de mycoparasitisme indirect. *C.rosea* peut produire un grand nombre de spores adhésives qui adhèrent à la transmission des nématodes et infectent ou tuent l'hôte. *Clonostachys rosea* digère les matériaux dans le sol en tant que saprophyte et est également connu comme parasite des champignons et des nématodes (Toledo et al., 2006).

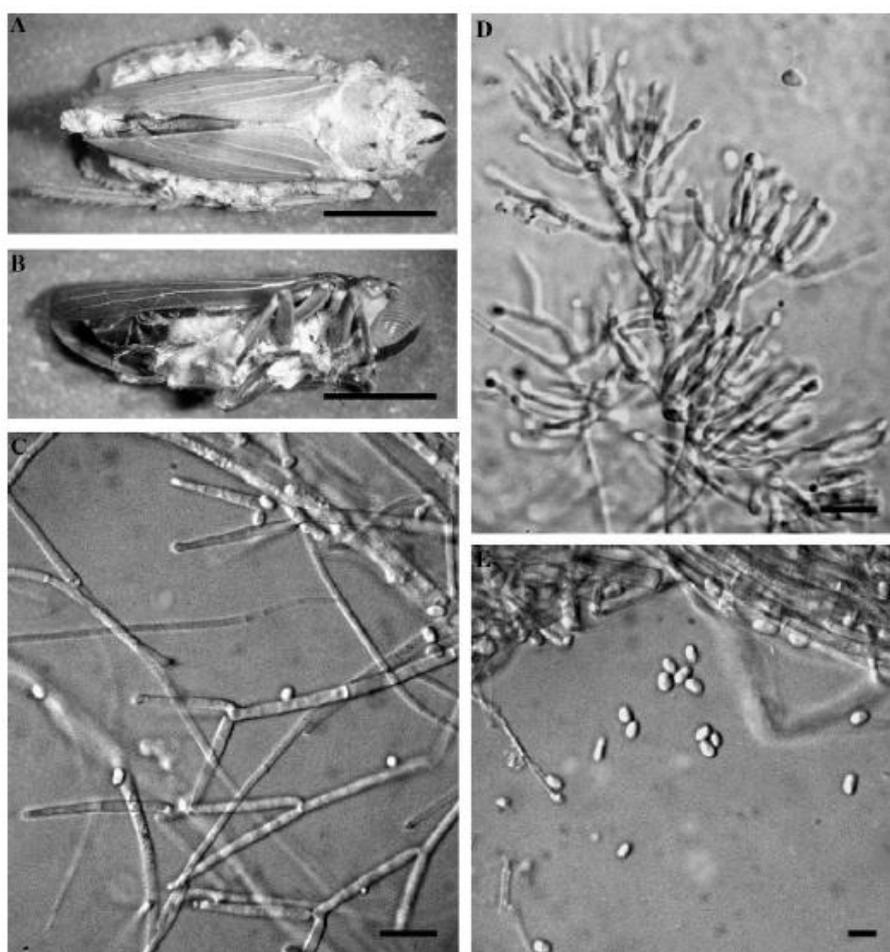


Figure 7. *Clonostachys rosea*. (A) et (B) sur *Sonesimia grossa*. (C) Conidiophores primaires, phialides et conidies. (D) Conidiophores secondaires, phialides et conidies. (E) Conidia. Barres d'échelle : (A et B 3 mm ; (C) 15 μ m ; (D) 11 μ m ; (E) 10 μ m. (Toledo et al., 2006)

2.7.1. Mode d'action

En tant que mycoparasite, *C. rosea* est un agent de biocontrôle potentiellement utile contre plusieurs agents phytopathogènes économiquement importants, y compris *Verticillium dahliae* (Keinath et al., 1991), *S. sclerotiorum*, *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea* (Rodriguez et al., 2011), et *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici* (Mohamed Mahmoud, 2017). Certains de ses modes d'antagonisme contre les agents pathogènes sont la compétition en nutriments, le mycoparasitisme et la résistance induite (Sutton et al., 1997).

L'antagoniste *C. rosea* a été évalué pour son efficacité à contrôler l'agent pathogène *B.cinerea*. Il est efficace pour lutter contre la moisissure grise sur les géraniums, bégonias, cyclamens, poivrons verts, concombres, tomates, framboises, rosiers, luzernes, tabacs, eucalyptus et fraises (Corrêa et al., 2010 ; Cota et al., 2008a,b). Chez ces plantes, *B. cinerea* a été supprimé par compétition pour la colonisation des nutriments et / ou des tissus et l'hyperparasitisme (Cota et al., 2008b ; Li et al., 2002).

2.7.2. Métabolites secondaires

De nombreuses enzymes de défense sont impliquées dans la réaction de défense contre les agents phytopathogènes. Ceux-ci incluent des enzymes oxydantes telles que le polyphénol oxydase (PPO), qui catalyse la formation de lignine, et d'autres phénols oxydants qui contribuent à la formation de barrières de défense en renforçant la structure cellulaire (Mouekouba et al., 2014). Des enzymes telles que les phénylalanines ammoniacales lyase (PAL) sont impliquées dans la biosynthèse de la phytoalexine ou de composés phénoliques. Il a été rapporté que de telles enzymes jouent un rôle dans les réponses de défense contre les agents pathogènes chez plusieurs espèces de plantes (Binutu et al., 2000). Il produit une large gamme de composés organiques volatils toxiques pour les organismes, notamment les champignons, les bactéries et les insectes (Zhang et al., 2008). Ces endophytes peuvent s'opposer directement aux champignons phytopathogènes par la sécrétion d'enzymes dégradant les parois cellulaires telles que les chitinases, les b-1,3-glucanases, les b-1,6-glucanases et les protéases, ainsi que d'antibiotiques tels que les

peptaibols, la gliotoxine, la viridine et les 6-pentyl -2H-pyran-2-one (Lorito et al., 2010; Mukherjee et al., 2012).

2.8. *Phomopsis* spp.

Les espèces de *Phomopsis* sont des endophytes chez de nombreux hôtes dans les régions tempérées et tropicales et sont particulièrement communes dans l'aubier des angiospermes (Rossman et al., 2007). *Phomopsis* est caractérisé par des conidiomes noirs ostiolés contenant des phialides allongées et cylindriques pouvant produire deux types de conidies hyalines non septées, à savoir alpha et bêta. Les conidies alpha sont aseptées, généralement hyalines, fusiformes et généralement biguttulées, mais manquent parfois de guttules ou présentent plus de guttules. Les bêta-conidies sont également aseptées et hyalines, mais sont filiformes, droites ou plus souvent en hamates et dépourvues de guttules (Udayanga et Liu, 2011). Généralement, les conidiophores sont hyalins, ramifiés et parfois courts septés. Ils sont fréquemment multiseptés et filiformes, avec une conidiogenèse monophyladique entéroblastique (Cristescu, 2003).

2.8.1. *Phomopsis* en tant qu'agents de biocontrol

Certaines espèces de *Phomopsis* ont été signalées comme mycoherbicides potentiels pour lutter contre les mauvaises herbes envahissantes et destructrices en raison de leur mode de vie hémibiotrophique à nécrotrophe, de leur sporulation extensive et de leur persistance dans l'environnement (Roskopf et al., 2000a, b).

La vaste gamme d'hôtes d'espèces de *Phomopsis*, la spécificité d'hôte de certaines espèces et les mécanismes d'infection, la persistance des agents pathogènes dans l'environnement s'est révélée être un outil utilisable dans les systèmes de gestion intégrée des mauvaises herbes (Ortiz-Ribbing et Williams, 2006).

Exemples de *Phomopsis* potentiellement disponible dans la lutte biologique contre les mauvaises herbes est énuméré dans le Tableau 3.

Tableau 3. *Phomopsis* en tant qu'agent de biocontrôle (Udayanga et Liu, 2011)

Agents de biocontrôle	Hôte / cible
<i>Phomopsis</i> sp	<i>Carthamus lanatus</i> (chardon de Safron)
<i>P. emicis</i> Shivas	<i>Emex australis</i>
<i>P. convolvulus</i> Ormeno	<i>Convolvulus arvensis</i>
<i>P. amaranthicola</i> Roskopf, Charud., <i>Shabana et Benny</i>	<i>Amaranthus</i> sp.
<i>P. cirsii</i> Grove	<i>Cirsium arvense</i>

2.8.2. Métabolites secondaires

Phomopsis est un genre également créatif qui a fait plusieurs découvertes importantes, notamment des métabolites fongiques physiologiquement actifs exclusifs et structurellement significatifs (Udayanga et Liu, 2011).

Quelques métabolites secondaires produits par *Phomopsis* : La cytochalasine J (1) et H (2), le 5'-épialténène (3), l'alternariol monométhyléther (4), l'alternariol (5), la cytosporone C (6) et le nouveau produit naturel 2-hydroxyalternariol (7) sont montrés dans la figure 8. (Chapla et *al.*, 2014).

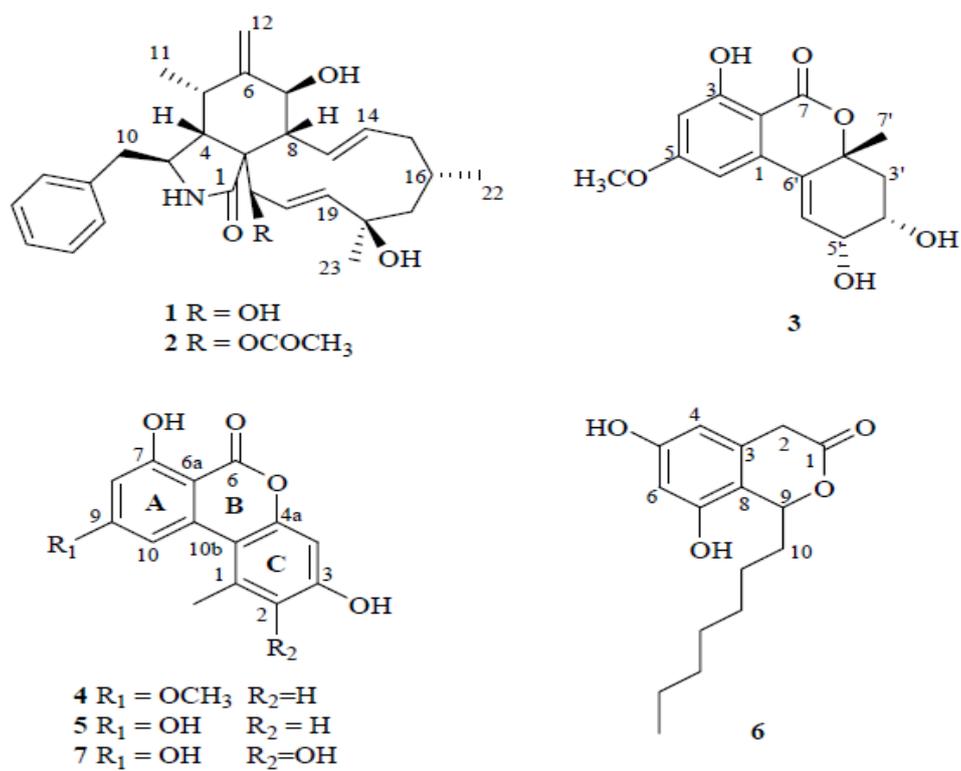


Figure 8. Structures chimiques de 1 à 7 métabolites secondaires produits par *Phomopsis* sp. (Chapla et al., 2014).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

L'objectif de notre travail est basé sur l'étude des champignons endophytes (*Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea*, *Phomopsis* spp.), afin de déterminer leurs activités enzymatiques, et d'extraire leurs métabolites secondaires. Cette extraction a pour but d'analyser ces métabolites en utilisant la méthode analytique CCM, et également d'évaluer leurs effets antagonistes *in vitro* à l'encontre de deux champignons phytopathogènes telluriques.

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Champignons endophytes

Les trois champignons utilisés dans la présente étude appartiennent à la collection du laboratoire de phytopathologie (Département de Biotechnologie Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Blida 1). Les champignons endophytes ont été isolés à partir des racines du palmier dattier d'Alicante Espagne par Mohamed Mahmoud (2017) (Tableau 4) (Figure 9).

Tableau 4. Origine des champignons endophytes utilisés

Champignons fongiques	Nom scientifique	Plante d'origine	Source
Sn 182	<i>Beauveria bassiana</i>	Palmier dattier	Collection du laboratoire de phytopathologie
C 141	<i>Phomopsis</i> spp.		
G133	<i>Clonostachys rosea</i>		
C 318 (1)			
C 318 (2)			

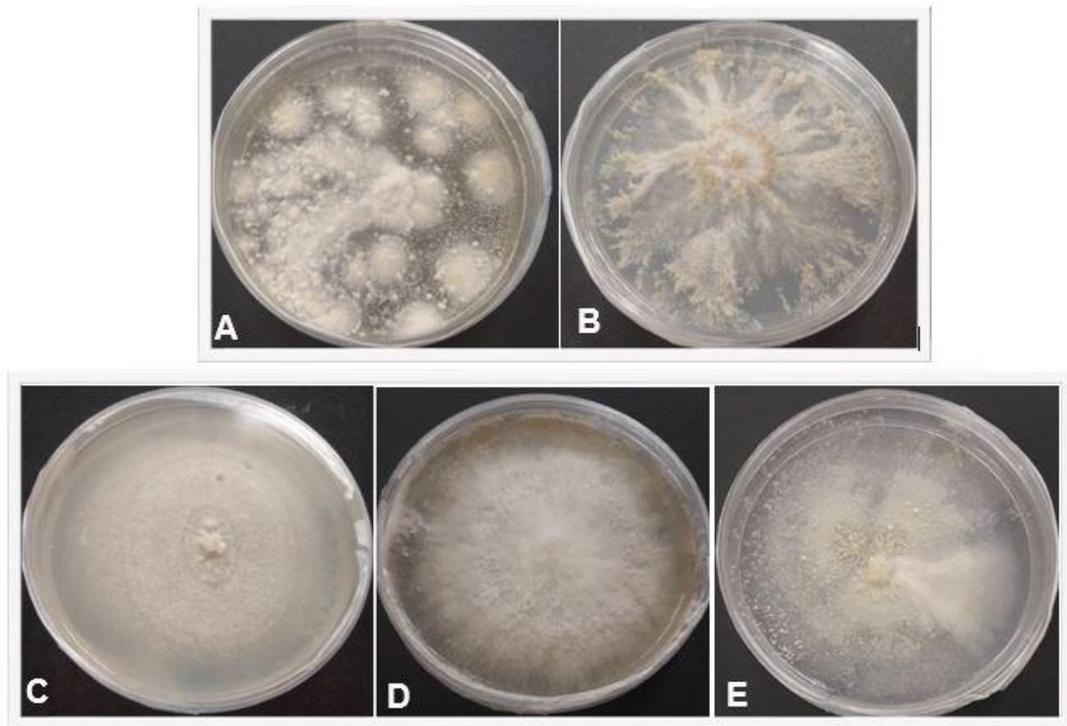


Figure 9. Champignons endophytes utilisés. A : *Beauveria bassiana*, B : *Phomopsis* spp. , C : *Clonostachys rosea* C318 (1), D : *Clonostachys rosea* C318 (2), E : *Clonostachys rosea* (G133).

1.1.2. Champignons phytopathogènes

Pour réaliser le test d'antagonisme, nous avons utilisé deux souches pathogènes provenant de la collection du laboratoire de phytopathologie (Département de Biotechnologie Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Blida 1) : une souche locale *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, agent causal de flétrissement fusarien de palmier dattier et une souche étrangère *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* agent causal de la fusariose vasculaire de la tomate (Tableau 5) (Figure 10).

Tableau 5. Origine des champignons phytopathogènes utilisés

Souche phytopathogène	Nom scientifique	Plante d'origine	Provenance
G1	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i>	Palmier dattier	Laboratoire de phytopathologie d'Université de Blida
G2	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i>	Tomate	Laboratoire de phytopathologie d'Université de Belgique

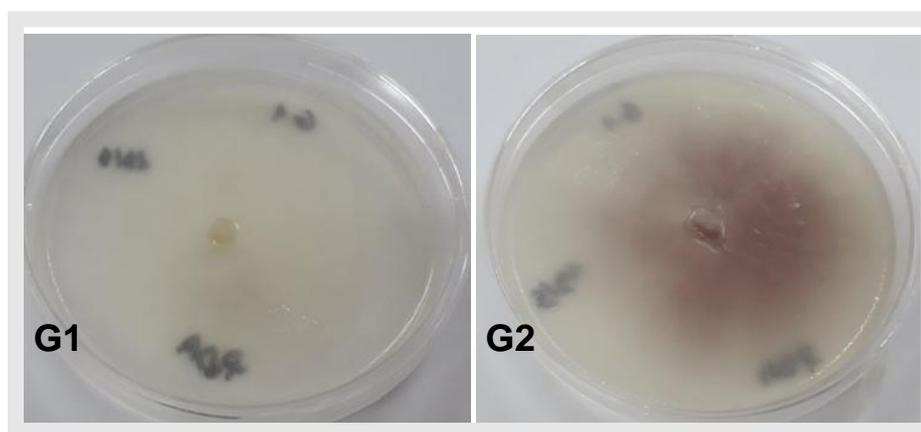


Figure 10. Champignons pathogènes utilisés. G1: *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, G2: *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*.

1.2. Matériel non biologique

1.2.1. Produits chimiques

- Acétate d'éthyle, chloroforme, tween 80, tween20
- Glucose (C₆H₁₂O₆), agar, Peptone, Extrait de levure, Amidon (C₆H₁₀O₅) n, gélatine, chitine
- Bleu de bromophénol (C₁₉H₁₀Br₄O₅S), Pectine, Sulfate d'ammonium (NH₂)₂ SO₄, phosphate bicalcique (Ca₂PO₄), Chlorure de potassium (KCl), Magnesium sulfate heptahydrate (Mg SO₄ 7H₂O), Sulfate de mananèse (II) (MnSO₄), Sulfate de fer (II) (FeSO₄), Sodium phosphate dibasic (Na₂ HPO₄), Phosphate de potassium monobasique (KH₂ PO₄), Chlorure d'ammonium (NH₄ Cl), Chlorure de sodium (NaCl), Chlorure de calcium dihydrate (CaCl₂ 2H₂O), Diméthylsulfoxyde (DMSO) (CH₃)₂SO.

2. Méthodes

2.1. Purification des souches

La purification a été réalisée par plusieurs repiquages successifs des disques mycéliens de chaque champignon dans des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé à base de pomme de terre (PDA, Potatose Dextrose Agar) (Johnscon et Both, 1983).

2.2. Détermination de l'activité enzymatique

L'étude de l'activité des enzymes extracellulaires chitinase, phosphatase, pectinase, amylase, protéase, lipase et estérase chez les champignons endophytes a été faite par une technique qualitative à l'aide de différents milieux solides qui nous aident à examiner un grand nombre de champignons dans un temps relativement court.

2.2.1. Chitinase

Le test qui indique l'activité de chitinase a été réalisé sur le milieu PDA, modifié avec remplacement du glucose par la chitine (Annexe A). Les disques mycéliens sont déposés dans des petites boîtes de Pétri contenant le milieu à raison de deux répétitions et une boîte sans champignon sert comme témoin. Ces dernières sont incubées à 28°C pendant 5 jours. La bonne croissance des souches fongiques dans ce milieu indique la production de chitinase.

2.2.2. Phosphatase

Le test de solubilisation du phosphate a été effectué sur le milieu Pikovskaya (PVK) bicalcique solide modifié par l'addition de 2 ml de bleu de bromophénol (Pikovskaya, 1948) (Annexe B). Des disques mycéliens issus de précultures fraîches sont repiqués dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PVK, à raison de quatre répétitions pour chaque souche fongique. Une boîte de Pétri contenant le milieu sans inoculum sert comme témoin. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. La formation d'halo clair ou la décoloration du milieu PVK autour des spores est un indicateur de solubilisation du phosphate.

2.2.3. Pectinase

La production de pectinase par les champignons endophytes a été déterminée selon Cattelan *et al.* (1988). Le milieu M9 agar (Miller, 1974) a été utilisé, additionné de 10g de pectine, de 1,2g d'extrait de levure et de 2ml de bleu de bromophénol (Annexe C). On dépose les disques mycéliens sur le milieu gélosé, à raison de trois répétitions par souche et une boîte sans champignon sert comme témoin. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 2 jours. La présence d'un halo clair autour de la colonie indique une réponse positive pour la production de pectinase.

2.2.4. Amylase

Le test de production d'amylase a été réalisé en utilisant le milieu GYP (Glucose Yeast Extract Peptone) décrit par Maria *et al.* (2005), auquel on ajoute 2% d'amidon soluble (Annexe C). Des disques mycéliens sont inoculés dans des boîtes de Pétri contenant ce milieu, en raison de quatre répétitions pour chaque souche et une boîte sans disque mycélien sert comme témoin. L'incubation se fait à 28°C pendant 3 à 5 jours. L'activité amylolytique a été démontrée en inondant les boîtes avec du lugol's iodine. L'apparition de la zone claire formée autour de la colonie révèle la présence de l'enzyme.

2.2.5. Protéase

Le test de protéase a été réalisé sur le milieu GYP (Maria *et al.*, 2005), additionné de 0,4% de gélatine (gélatine, 8 g / 100 ml d'eau distillée) et 2ml de bleu de bromophénol (Annexe D). Les champignons sont cultivés dans des boîtes de Pétri contenant ce milieu, à raison de trois répétitions par souche. Une boîte sans inoculum sert comme témoin. Après incubation à 28°C pendant 7 à 8 jours, les plaques ont été inondées avec du sulfate d'ammonium aqueux. La présence d'un halo clair autour des colonies indique une activité protéolytique.

2.2.6. Lipase

L'activité lipolytique a été déterminée en utilisant le milieu peptone agar medium (Annexe D) décrit par Maria *et al.* (2005), auquel on ajoute le tween 20 stérilisé préalablement par filtration sous vide (1 ml pour 100 ml du milieu) et 2 ml de bleu de bromophénol. Des boîtes contenant ce milieu sont inoculées avec des disques mycéliens, à raison de trois

répétitions par souche et une boîte sans champignon sert comme témoin. L'incubation des boîtes se fait à 28°C pendant 3 à 5 jours. La présence d'un halo clair indique une réponse positive pour la production de lipase.

2.2.7. Estérase

L'activité estérasique a été déterminée en utilisant le milieu peptone agar medium (Annexe D) décrit par Carrim *et al.* (2006), auquel on ajoute le tween 80 stérilisé séparément par filtration sous vide (1 ml pour 100 ml du milieu) et 2 ml de bleu de bromophénol. Des boîtes contenant ce milieu sont inoculées avec des disques mycéliens, à raison de quatre répétitions par souche et une boîte sans champignon sert comme témoin. L'incubation des boîtes se fait à 28°C pendant 3 à 5 jours. La présence d'un halo clair indique une réponse positive pour la production d'estérase.

2.3. Fermentation et extraction des métabolites secondaires

Dans chaque flacon contenant 100 ml de milieu PDB, 5 disques de champignons endophytes étudiés ont été déposés (*B. bassiana*, *C. rosea*, *Phomopsis* spp.) (Xiaoling *et al.*, 2010). Ces flacons sont fermés avec du papier aluminium et placés dans un agitateur électrique pour assurer une agitation continue pendant 15 jours (Figure 11). La récupération des filtrats de culture a été réalisée par l'utilisation des mèches à gaz et du papier filtre pour séparer le mycélium du bouillon de culture (Mohanta *et al.*, 2008 ; Barik *et al.*, 2010). Ce dernier a été centrifugé à 1500 tours/min pendant 20 min, et le surnageant a été récupéré.

L'extraction a été faite par deux solvants organiques, l'acétate d'éthyle et le chloroforme, où à chaque filtrat on rajoute un volume égal à celui du solvant et on le met sous agitation pendant deux heures. La solution est ensuite mise en décantation dans des ampoules à décanter, pour séparer les deux phases. La phase organique a été récupérée pour être concentrée sous pression par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavor du type Heidolph 2, Allemagne) à 45 °C pour le chloroforme et de 65°C pour l'acétate d'éthyle (Figure 12) (Mohanta *et al.*, 2008).

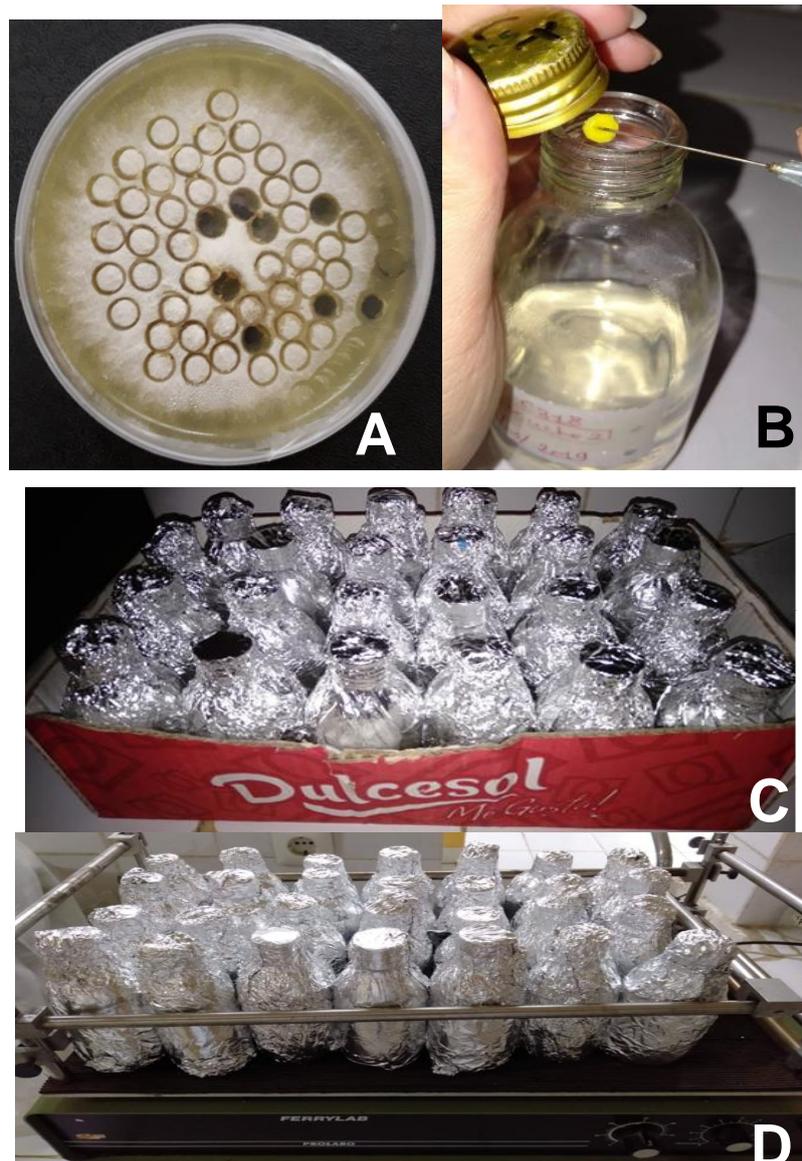


Figure 11. Les étapes de préparation des extraits fongiques pour la production des métabolites secondaires des champignons endophytes. A : Les disques mycéliens de *Clonostachys rosea* C318 (2), B : Dépôt des disques de *C.rosea* dans le milieu PDB, C : Flacons de PDB fermés par l'aluminium contenant les disques mycéliens de *Beauveria bassiana* (Sn182), *Clonostachys rosea* {G133, C318 (1), C318 (2) et *Phomopsis* (C141), D : Flacons déposés dans l'agitateur horizontale.

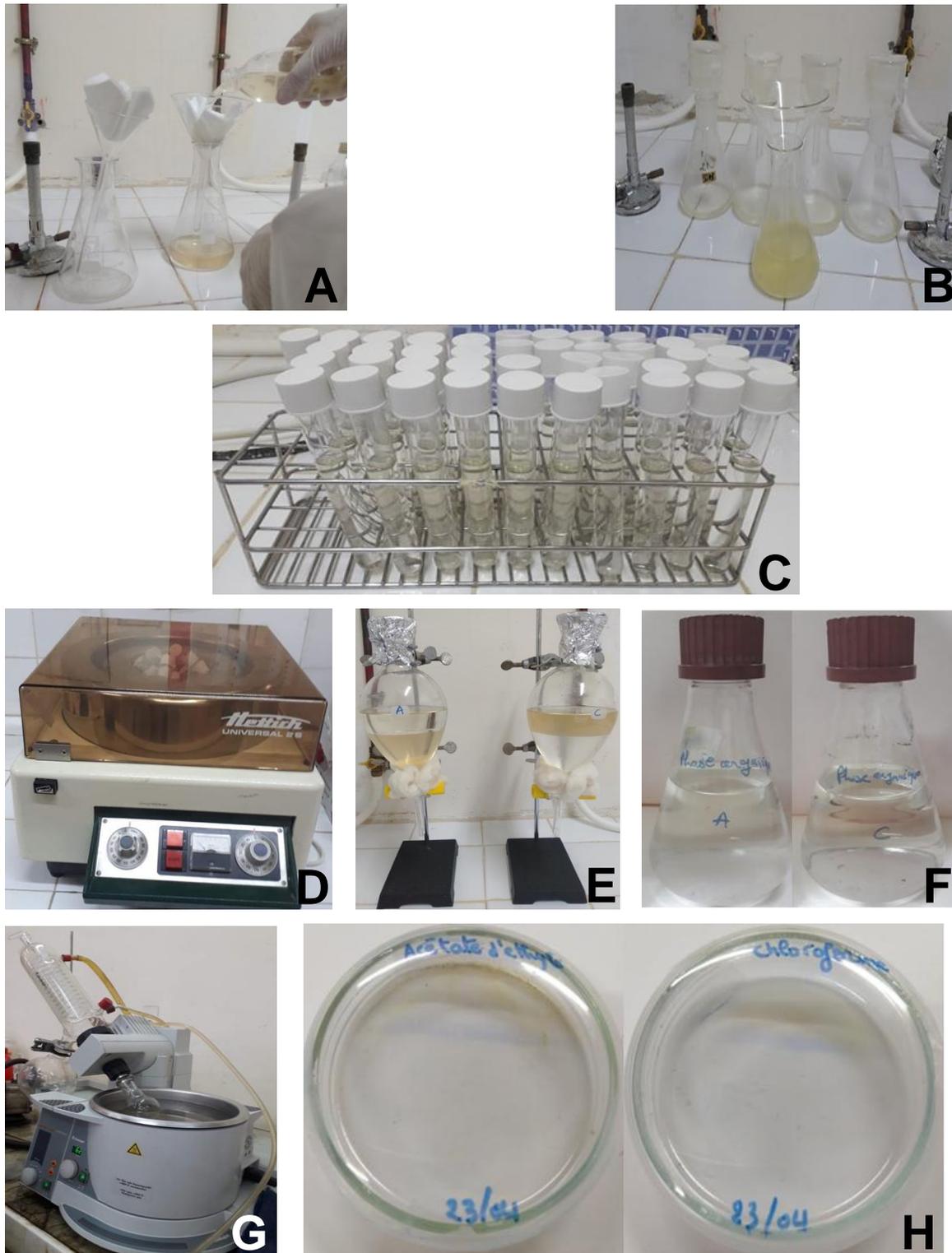


Figure 12. L'extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes. A : Filtration par méches à gaz, B : Deuxième filtration par papier filtre Watman, C : Tubes contenant les bouillons de culture, D : Centrifugation, E : Extraction avec chloroforme et acétate d'éthyle dans des ampoules à décanter, F : Récupération de la phase organique, G : Dosage de la phase organique par l'évaporateur (Heidolph 2, Allemagne), H : Extrait brut

2.4. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince

Selon les descriptions de Betina (1973), la séparation des composés à activité antibiotique, à partir des extraits de l'acétate d'éthyle de *Beauveria bassiana* Sn182, a été réalisée par chromatographie sur couche mince sur gel de silice dont le but de séparer les différents composés d'un mélange homogène.

L'extrait de *B. bassiana* a été déposé sous forme de spots de 150 µl à l'aide d'un capillaire à des points repères au bord inférieur des plaques où les standards étant l'ampicilline qui a une activité antibactérienne et kétoconazole qui a une activité antifongique, puis ces taches ont été séchées par un séchoir.

Deux phases mobiles ont été appliquées : la première phase contient 650 ml d'acétone, 100 ml d'eau, 100 ml de toluène et 25 ml d'acide acétique glacial pour le standard ampicilline, la deuxième phase contient l'acétate d'éthyle méthanol AM 100 ml / 15 ml pour le standard kétoconazole.

Les plaques ont été placées dans des cuves en position verticale, lorsque le front des phases mobiles se trouve à environ 1cm de l'extrémité supérieure des plaques : les plaques ont été retirées et séchées à l'air libre et placées sous une lampe à ultras violets 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 front doit être marquée. La révélation a été réalisée sous rayons ultras violets et le Rapport frontal a été calculé selon la formule suivante :

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

2.5. Détermination de l'activité antagoniste

Afin de déterminer l'activité antagoniste des extraits obtenus par l'extraction à l'acétate d'éthyle et le chloroforme, la méthode de diffusion sur disques a été utilisée (Hazalin *et al.*, 2009).

Les champignons pathogènes *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, et *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* ont été purifiés sur le milieu PDA, la surface de ces champignons 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 (Mukhtar *et al.*, 2008).

Les boîtes contenant du PDA ont été inoculées avec 100 μ l des suspensions fongiques. Chaque extrait fongique a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de façon à obtenir une concentration de 1mg/ml. Ensuite 10 μ l de chaque extrait ont été déposés à l'aide d'une micropipette sur les disques stériles (6 mm de diamètre) placés à la surface des géloses préalablement inoculés avec les champignons pathogènes, (Hazalin *et al.*, 2009). Une boîte contenant le milieu PDA inoculé avec les suspensions fongiques pathogènes et des disques mouillés avec le DMSO seul sans extraits sert comme témoin.

Les boîtes ainsi préparées ont été mise pendant 2 heures à 4°C afin que les métabolites puissent diffuser, ensuite elles ont été mises à incuber à 28°C pendant 72 heures. Les diamètres des zones d'inhibition claires autour des disques ont été mesurés selon Zeroug (2011) et qui révèlent l'activité antifongique des extraits.

Chapitre 3

Résultats et discussion

3. Résultats

3.1. Résultats de la détermination de l'activité enzymatique

Les tests qualitatifs permettant de démontrer la production d'enzymes extracellulaires à partir des souches fongiques testés nous ont permis d'obtenir les résultats ainsi résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Résultat des différents tests d'activités enzymatiques

Isolats	Sn182	G133	C141	C318(1)	C318(2)
Chitinase	+	+	+	+	+
Phosphatase	+	+	+	+	+
Pectinase	-	-	-	-	-
Amylase	-	-	-	-	-
Protéase	+	-	+	+	+
Lipase	+	-	-	-	-
Estérase	+	-	-	-	-

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

Sn182 : *Beauveria bassiana*, G133 : *Clonostachys rosea*, C141 : *Phomopsis* spp. , C318(1) : *Clonostachys rosea*, C318(2) : *Clonostachys rosea*.

Selon les résultats montrés dans le Tableau 6, les champignons endophytes testés semblent producteurs de différentes enzymes extracellulaires :

Toutes les souches fongiques sont capables de dégrader la chitine par la production de chitinase, ce qui est démontré par une bonne croissance des mycéliums fongiques (Figure 13).

Tous ces endophytes ont également la capacité de solubiliser le phosphate par la production de phosphatase, ce qui est indiqué soit par la décoloration du milieu comme le cas de *B. bassiana* (Sn182) ou par la formation d'halo claire autour des colonies de *Clonostachys rosea* {G133, C318(1), C318(2)} et *Phomopsis* (C141) (Figure 14).

Parmi les cinq souches fongiques, quatre endophytes manifestaient une activité protéolytique. Cette activité de la protéase a été observée chez *B. bassiana* (Sn182), *Phomopsis* (C141), *Clonostachys rosea* (C318 1 et 2), et les résultats ont été indiqués par la formation d'une zone claire autour de la colonie (Figure 15).

Tous les champignons n'étaient pas capables de produire la pectinase qui dégrade la pectine. Ces résultats ont été démontrés par l'absence d'une zone claire autour des colonies (Figure 16).

L'absence de zone claire autour des colonies de tous les endophytes après l'inondation avec le lugol's iodine montre l'incapacité de ces souches de dégrader l'amidon par l'amylase (Figure 17).

Une zone claire apparaisse seulement autour du mycélium de *B. bassiana* dans le milieu (peptone agar medium + tween 20) et (peptone agar medium + tween 80) révélant la production de lipase et d'estérase respectivement, contrairement aux souches de *Clonostachys rosea* et *Phomopsis* qui montrent une absence d'halo autour de leurs colonies, ce qui indique l'absence de ces deux enzymes (Figure 18, 19).

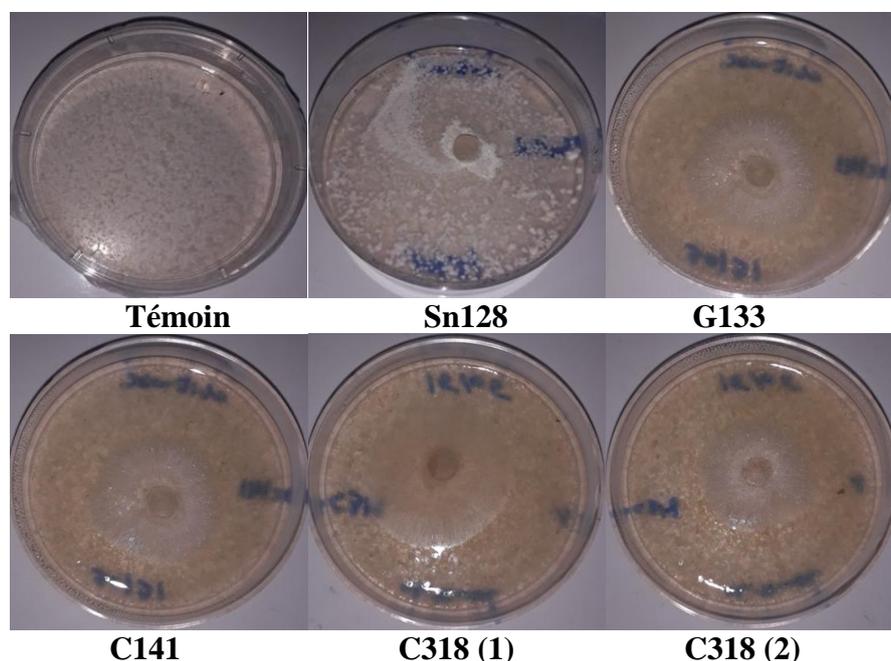


Figure 13. Activité Chitinasique par les champignons endophytes testés.

Sn182 : *Beauveria bassiana*, G133 : *Clonostachys rosea*, C141 : *Phomopsis* spp. ,
C318(1) : *Clonostachys rosea*, C318(2) : *Clonostachys rosea*.

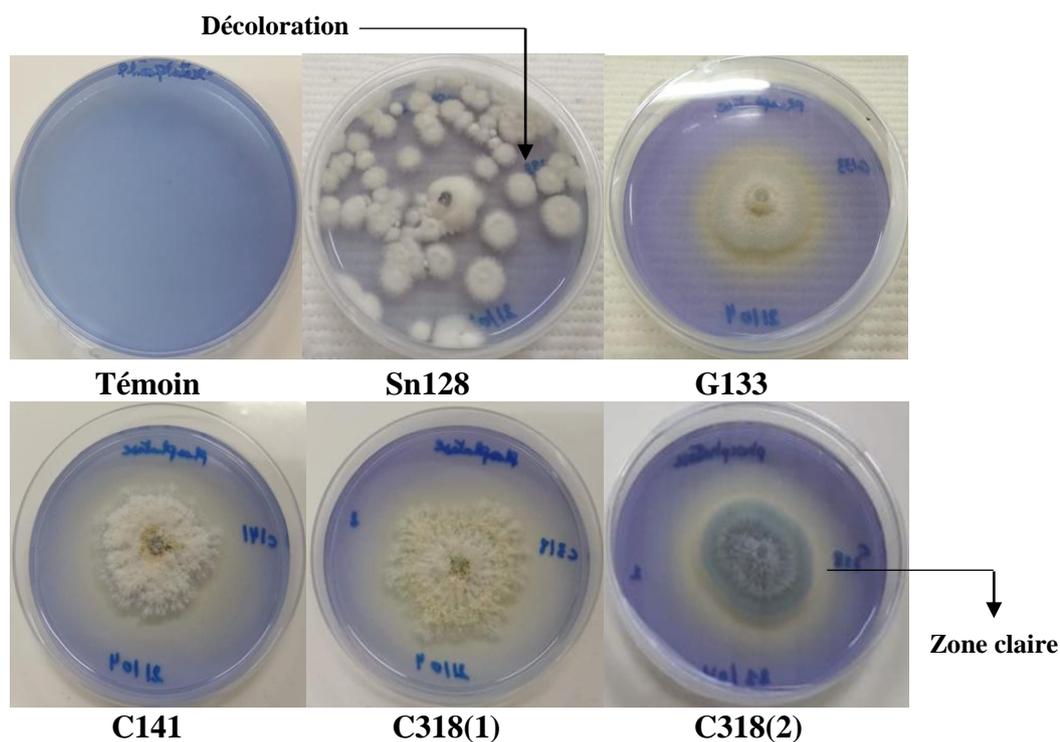


Figure 14. Activité phosphatasique par les champignons endophytes testés.

Sn182 : *Beauveria bassiana*, G133 : *Clonostachys rosea*, C141 : *Phomopsis* spp. ,
 C318(1) : *Clonostachys rosea*, C318(2) : *Clonostachys rosea*.

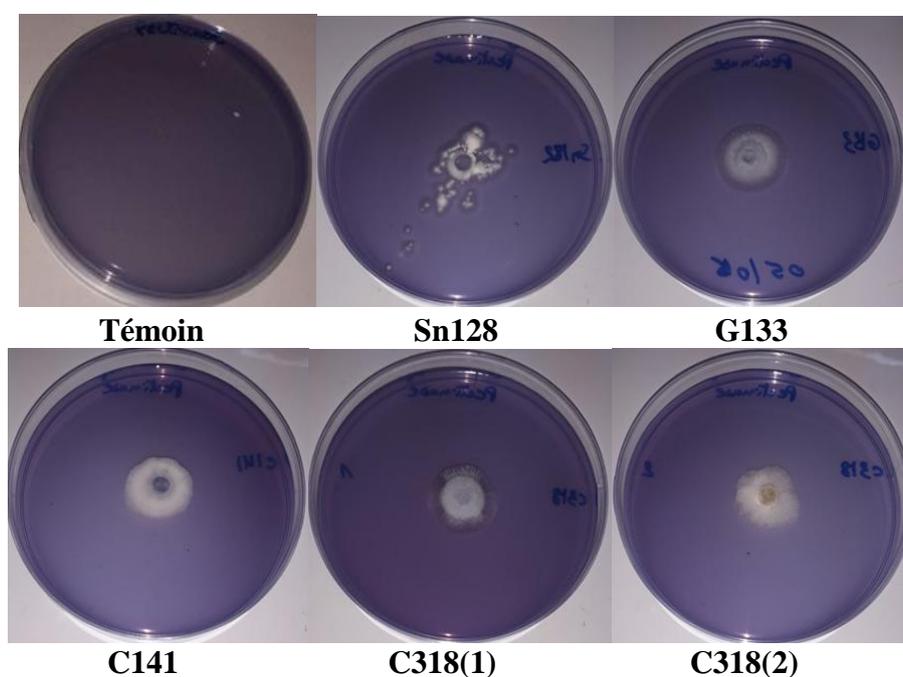


Figure 15. Activité pectinasique par les champignons endophytes testés.

Sn182 : *Beauveria bassiana*, G133 : *Clonostachys rosea*, C141 : *Phomopsis* spp. ,
 C318(1) : *Clonostachys rosea*, C318(2) : *Clonostachys rosea*.

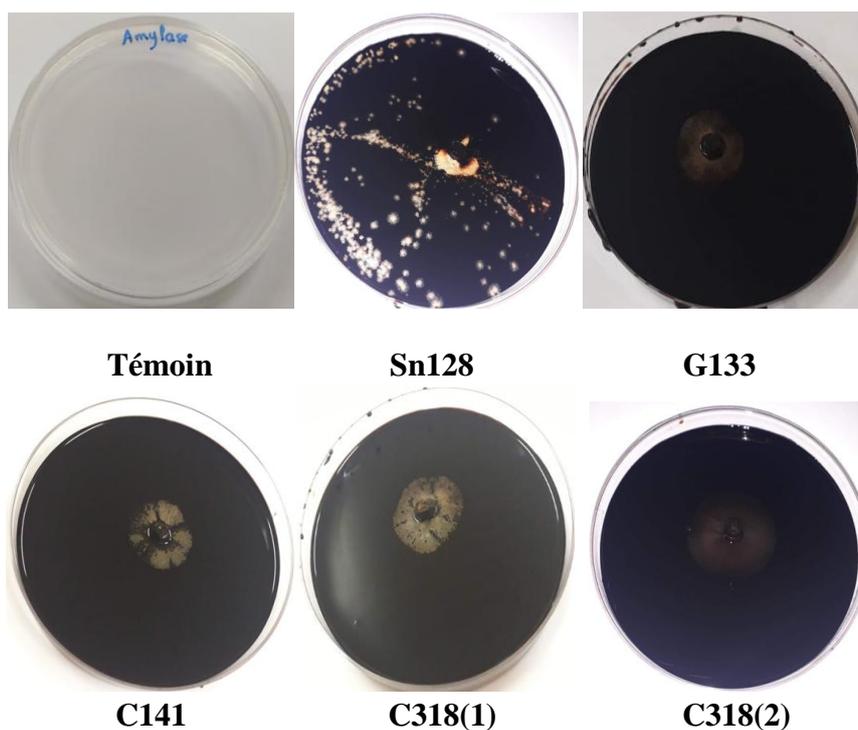


Figure 16. Activité amylolytique par les champignons endophytes testés.

Sn182 : *Beauveria bassiana*, G133 : *Clonostachys rosea*, C141 : *Phomopsis* spp. ,
 C318(1) : *Clonostachys rosea*, C318(2) : *Clonostachys rosea*.

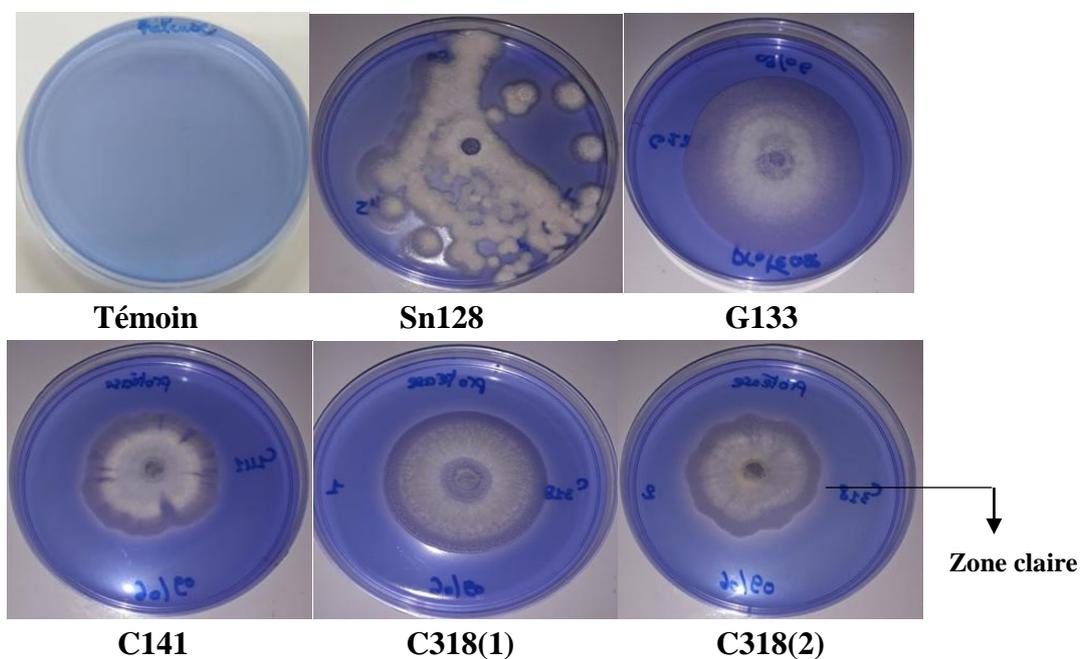


Figure 17. Activité protéolytique par les champignons endophytes testés.

Sn182 : *Beauveria bassiana*, G133 : *Clonostachys rosea*, C141 : *Phomopsis* spp. ,
 C318(1) : *Clonostachys rosea*, C318(2) : *Clonostachys rosea*.

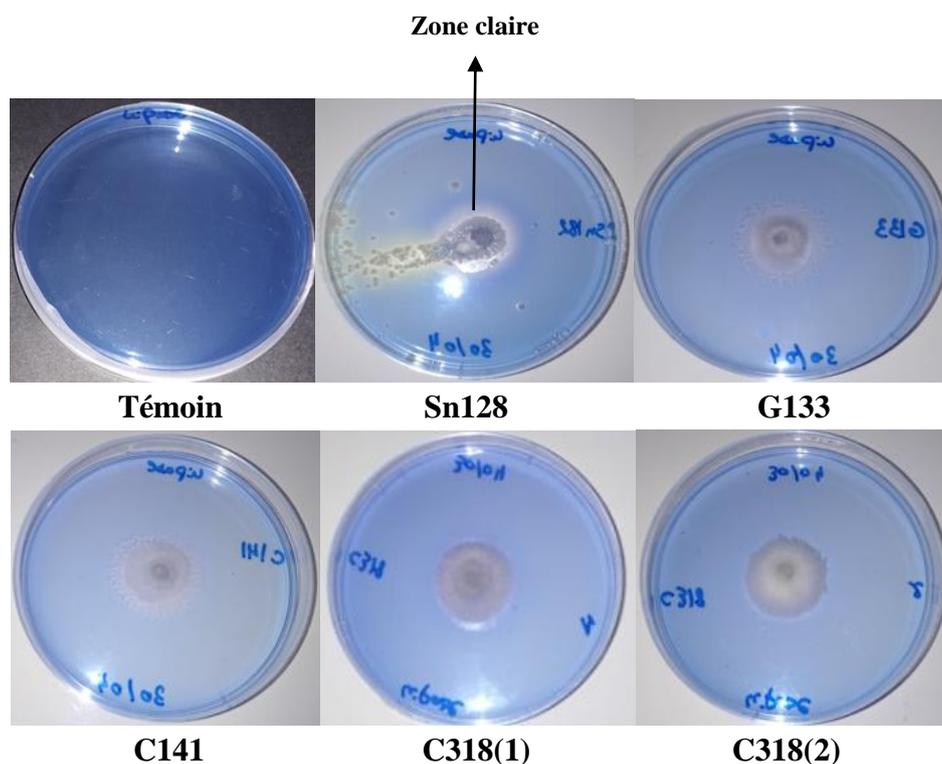


Figure 18. Activité lipasique par les champignons endophytes testés.

Sn182 : *Beauveria bassiana*, G133 : *Clonostachys rosea*, C141 : *Phomopsis* spp. ,
 C318(1) : *Clonostachys rosea*, C318(2) : *Clonostachys rosea*.

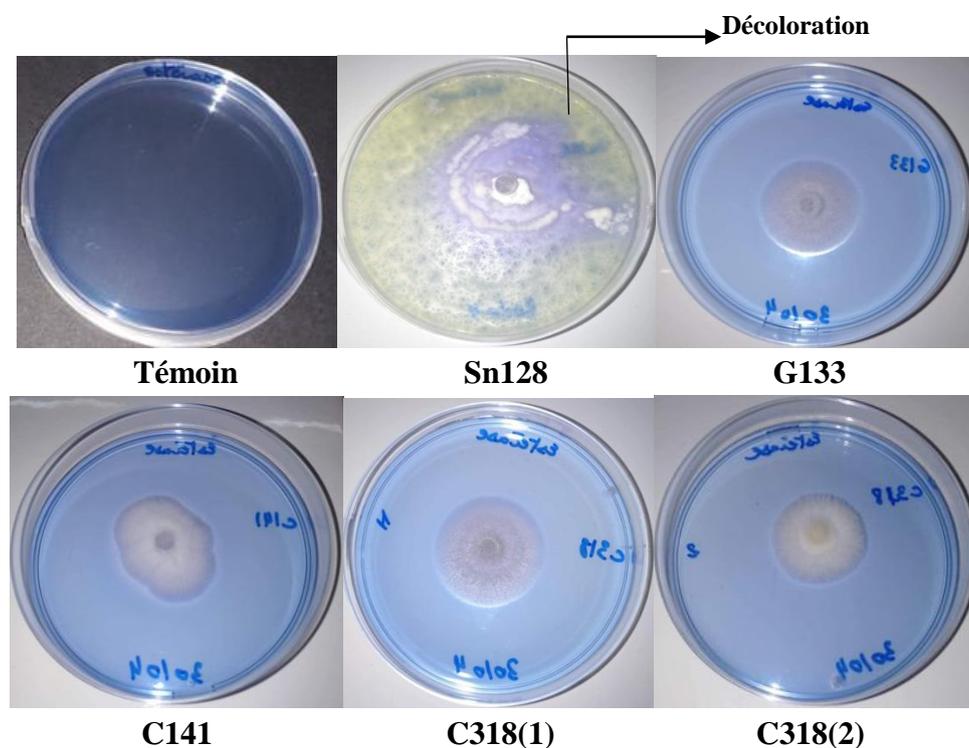


Figure 19. Activité estérasique par les champignons endophytes testés.

Sn182 : *Beauveria bassiana*, G133 : *Clonostachys rosea*, C141 : *Phomopsis* spp. ,
 C318(1) : *Clonostachys rosea*, C318(2) : *Clonostachys rosea*.

3.2. Résultats de la chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince était établie dans le but d'analyser les composés. L'extrait obtenu par le solvant d'extraction acétate d'éthyle de la souche Sn182 de *Beauveria bassiana* a été déposé au bord inférieur de la plaque. Après migration les résultats ont été notés et illustrés dans les Figures 20 et 21.

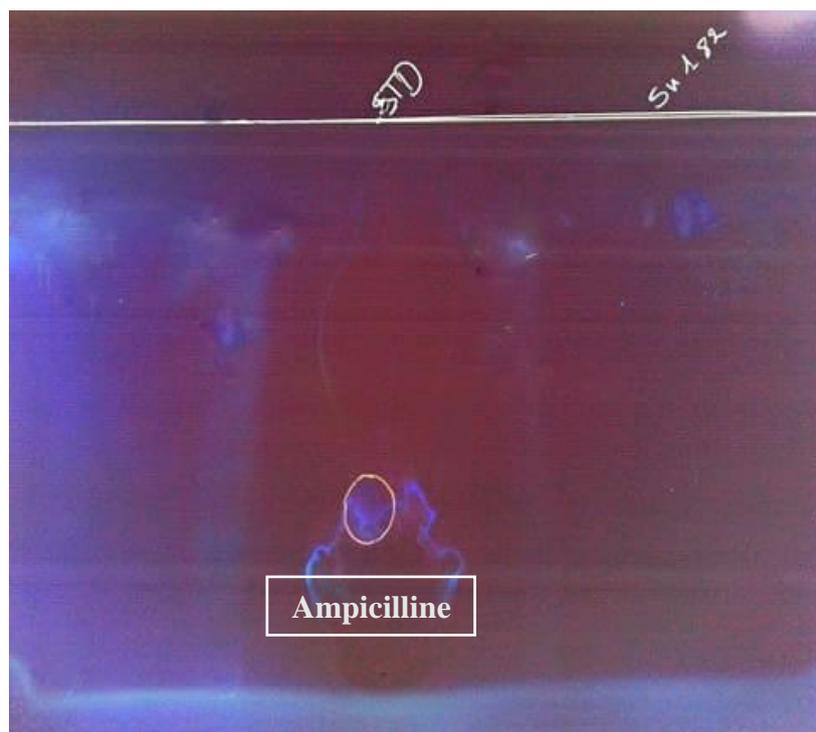


Figure 20. Révélation du chromatogramme d'extrait d'acétate d'éthyle de Sn182 de *Beauveria bassiana* sous UV (250 nm) développé dans la phase mobile (acétone, eau, toluène, acide acétique glacial) en présence d'ampicilline comme standard.

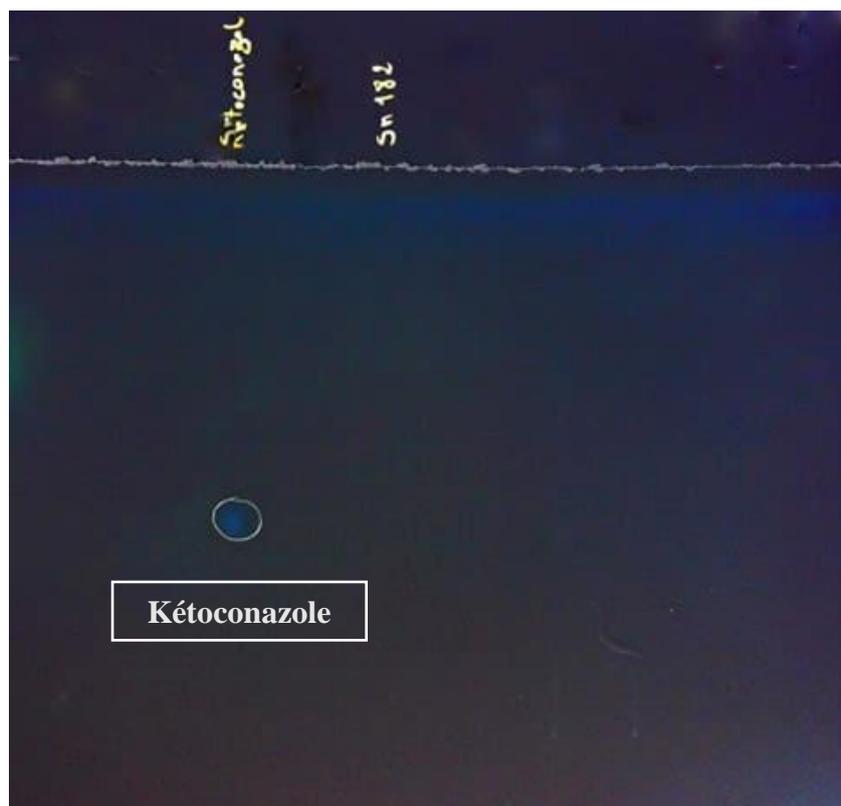


Figure 21. Révélation du chromatogramme d'extract d'acétate d'éthyle de Sn182 de *Beauveria bassiana* par UV (250 nm) développé dans la phase mobile (acétate d'éthyl méthanol) en présence de kétoconazole comme standard.

D'après les résultats obtenus des deux phases mobiles (acétone, eau, toluène, acide acétique glacial) et (acétate d'éthyl méthanol) aucune tache n'a été détectée par UV, ce qui affirme que la souche de *B. bassiana* Sn182 ne produit pas d'ampicilline qui a montré un $R_f = 0,24$, ni de kétoconazole qui a un $R_f = 0,42$.

3.3. Résultats de la détermination de l'activité antagoniste

L'activité antagoniste des extraits obtenus à l'aide d'acétate d'éthyle et de chloroforme des champignons endophytes testés contre les deux champignons pathogènes tellurique *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici* par la méthode de diffusion sur disque, nous a permis d'obtenir les résultats ainsi résumé dans le Tableau 7 et dans les Figures 22 et 23.

Tableau 7. Les zones d'inhibition (en mm) obtenues lors du test de diffusion sur disque des extraits des champignons endophytes testés.

Extraits des champignons endophytes		Champignons pathogènes	
		<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>albedinis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopercici</i>
Sn182	Acétate d'éthyle	17	18
	Chloroforme	0	13
C141	Acétate d'éthyle	17	15
	Chloroforme	16	0
G133	Acétate d'éthyle	15	17.5
	Chloroforme	0	0
C318 (1)	Acétate d'éthyle	0	19
	Chloroforme	15	0
C318(2)	Acétate d'éthyle	0	0
	Chloroforme	16.5	0

B. bassiana : Sn182, *Phomopsis* spp. : C141, *C. rosea* : C133, C318 (1), C318 (2)

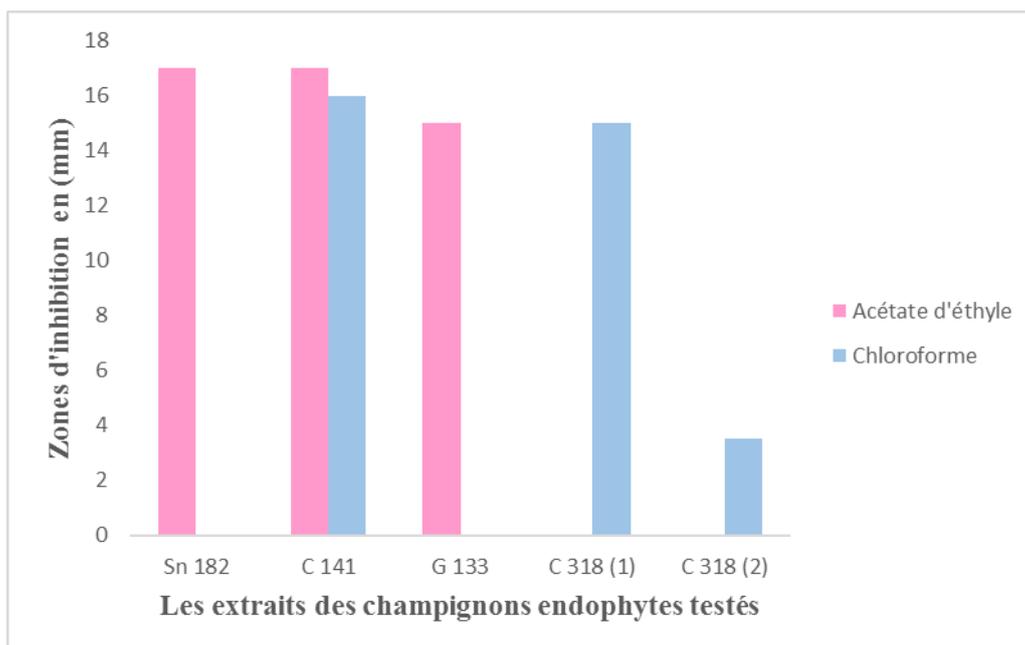


Figure 22. Zones d’inhibition (en mm) de chaque extrait fongique obtenu par acétate d’éthyle et chloroforme en présence de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedenis*.

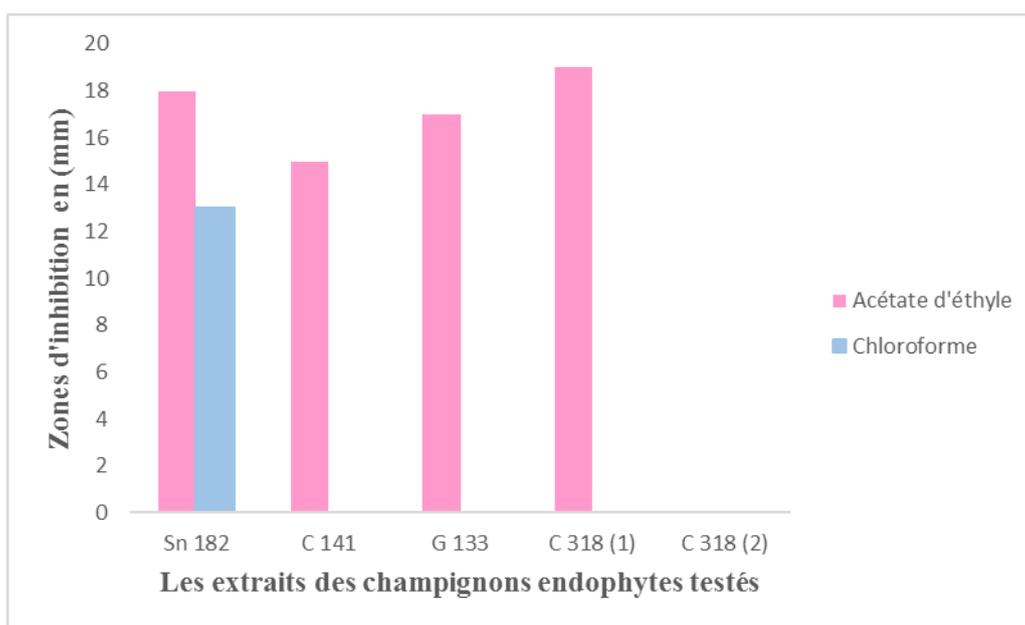


Figure 23. Zones d’inhibition (en mm) de chaque extrait fongique obtenues par acétate d’éthyle et chloroforme en présence de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*.

Après 3 jours d'incubation, les extraits des cinq souches sélectionnées ont montré une bonne activité inhibitrice vis à vis des souches pathogènes testées et ce par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques. Nous constatons qu'il y a une variabilité de diamètres des zones d'inhibition. Cette variation dépend des extraits des espèces antagonistes utilisées et aussi des agents pathogènes étudiés.

Nous avons remarqué que parmi les extraits des cinq souches testés, l'extrait d'acétate d'éthyle de C318 (1) (*Clonostachys rosea*) a enregistré la meilleure zone d'inhibition qui est de 19 mm vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*, alors qu'un diamètre de 17 mm a été enregistré par les extraits d'acétate de Sn182 (*Beauveria bassiana*) et de C141 (*Phomopsis*) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*.

Nous avons constaté qu'en présence d'extrait chloroformique de *Clonostachys rosea* C318 (2) la zone d'inhibition enregistrée était de 16,5 mm vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, tandis qu'elle est de 13 mm chez *Beauveria bassiana* Sn182 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*.

Pour les extraits d'acétate d'éthyle, l'effet d'antagonisme exercé sur *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* a été observé par *Beauveria bassiana* Sn182 et *Phomopsis* C141 dont la zone été de 17 mm. Alors que *Clonostachys rosea* G133 provoque une zone d'inhibition de 15 mm, contrairement aux extraits des autres souches de *Clonostachys rosea* C318 (1) et (2) qui n'ont pas montrées de zones d'inhibition (Figure 24).

Pour les extraits de chloroforme l'activité antifongique vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* à été démontrée par l'apparition d'une zone d'inhibition de 16,5 mm en présence de l'extrait de *Clonostachys rosea* C318 (2), alors qu'en présence d'extrait de *Phomopsis* C141 et de *Clonostachys rosea* C318 (1), le diamètre était de 16 mm et de 15 mm respectivement, tandis qu'aucune zone n'a été observée lors de l'application des extraits de *Beauveria bassiana* Sn182 et *Clonostachys rosea* G133 (Figure 25).

En présence des extraits d'acétate d'éthyle de *Clonostachys rosea* C318 (1), *Beauveria bassiana* Sn182, *Clonostachys rosea* G133 et *Phomopsis* C141, les zones d'inhibition de l'ordre de 19 mm, 18 mm, 17.5 mm et 15 ont été observées vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*. Par contre, aucune zone d'inhibition claire n'a été remarquée en présence d'extrait de *Clonostachys rosea* C318 (2) (Figure 26).

Une zone d'inhibition de 13 mm a été remarquée en présence d'extrait chloroformique de *Beauveria bassiana* Sn182 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*, contrairement aux extraits de *Clonostachys rosea* C318 (1), C318 (2) et G133 ainsi que *Phomopsis* C141 qui n'ont pas exercé de zones d'inhibition (Figure 27).

D'après ces résultats les différents extraits ont montré une activité antifongique plus ou moins grande, où les zones d'inhibition étaient plus importantes (19 mm) en présence des extraits d'acétate d'éthyle, et moins importante (13 mm) en présence des extraits chloroformiques.

Témoin *Fusarium oxysporum* f.sp *albedenis* (G1) / DMSO

Acétate, Sn182 / G1



Acétate, C141 / G1



Acétate, G133 / G1

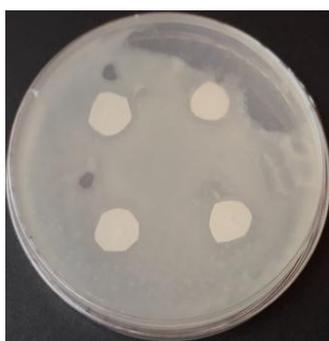


Acétate, C318 (1) / G1



Acétate, C318 (2) / G1

Figure 24. L'activité antagoniste des extraits d'acétate d'éthyle de tous les champignons endophytes testés vis-à-vis du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp *albedenis* (G1). Sn182 : *B. bassiana*, C141 : *Phomopsis*, G133, C318 (1), C318 (2) : *C.rosea*.

Témoin *Fusarium oxysporum* f.sp *albedenis* (G1) / DMSO

Chloroforme, Sn182 / G1



Chloroforme, C141 / G1



Chloroforme, G133/G1



Chloroforme, C318 (1) / G1



Chloroforme, C318 (2) / G1

Figure 25. L'activité antagoniste des extraits de chloroforme de tous les champignons endophytes testés vis-à-vis du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp *albedenis* (G1). Sn182 *B. bassiana*, C141 *Phomopsis*, G133, C318 (1), C318 (2) *C. rosea*.

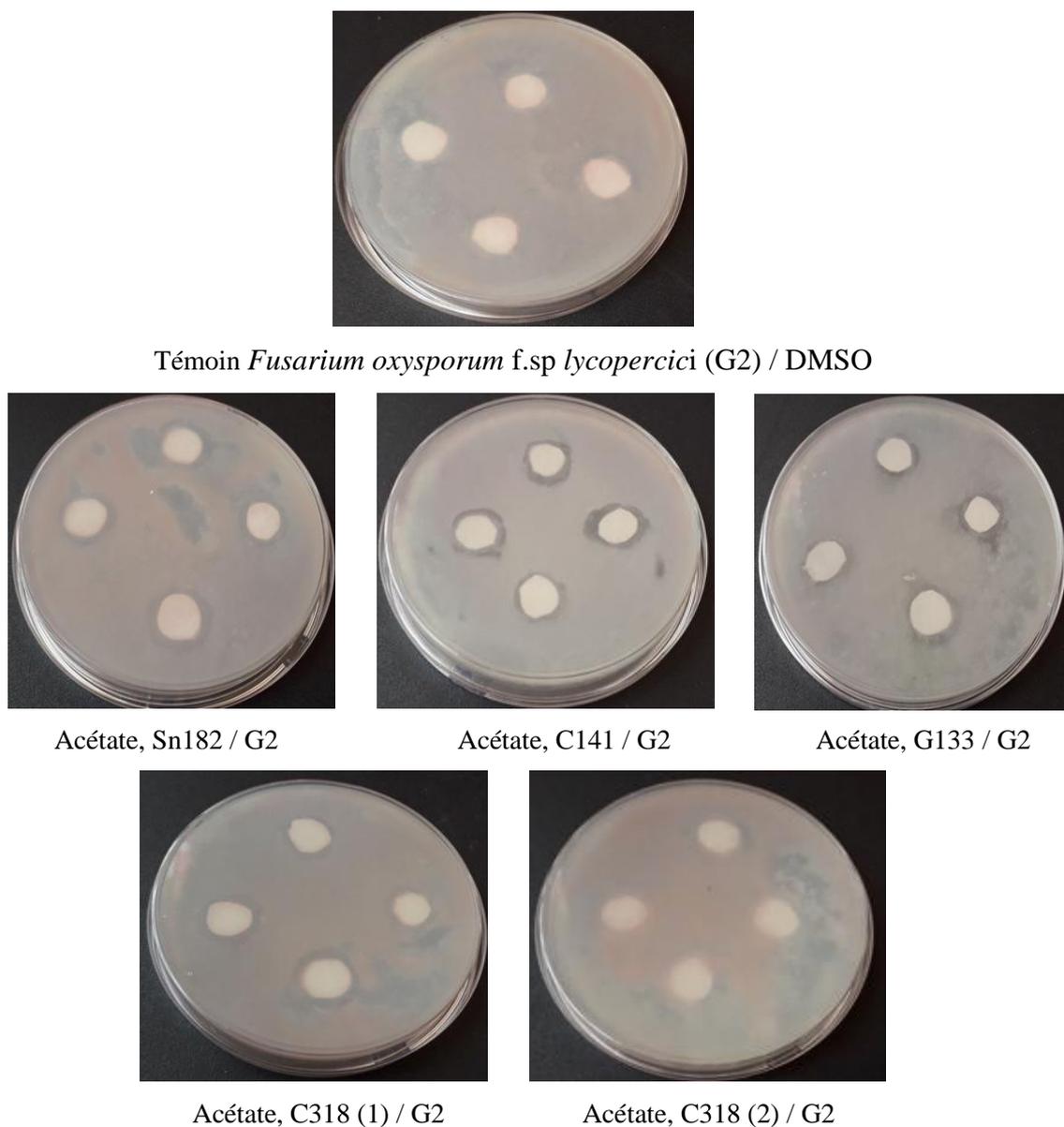
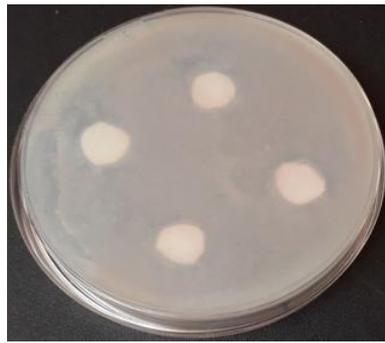
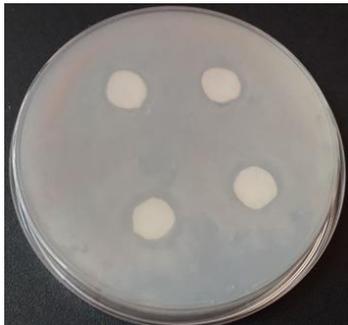
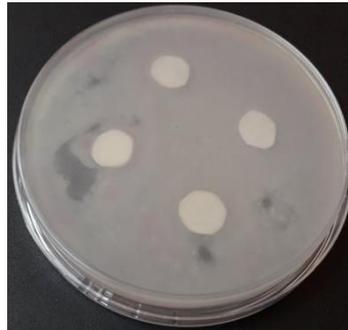


Figure 26. L'activité antagoniste des extraits d'acétate d'éthyle de tous les champignons endophytes testés vis-à-vis du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici* (G2). Sn182 *B. bassiana*, C141 *Phomopsis*, G133, C318 (1), C318 (2) *C.rosea*.

Témoin *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici* (G2) / DMSO

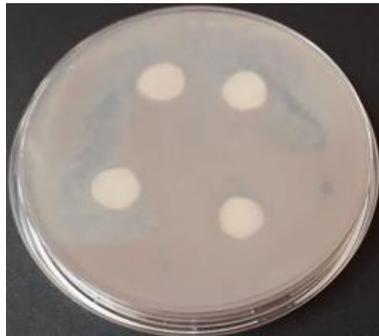
Sn182, Chloroforme / G2



C141, Chloroforme / G2



G133, Chloroforme / G2



C318 (1), Chloroforme / G2



C318 (2), Chloroforme / G2

Figure 27. L'activité antagoniste des extraits de chloroforme de tous les champignons endophytes testés vis-à-vis du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici* (G2). Sn182 *B. bassiana*, C141 *Phomopsis*, G133, C318 (1), C318 (2) *C.rosea*.

4. Discussion

Les résultats obtenus à partir de la détermination de l'activité enzymatique ont révélé que la plupart des endophytes testés ont la capacité de dégrader plusieurs substrats par la production de différentes enzymes extracellulaires.

Les enzymes extracellulaires sont synthétisées à l'intérieur de la cellule puis sécrétées à l'extérieur de la cellule. Elles ont pour fonction de décomposer les macromolécules complexes en unités plus petites qui seront ensuite absorbées par l'organisme en tant que source unique de carbone, d'énergie et de nutriments (Yadav *et al.*, 2015).

Les résultats de l'activité chitinasique montrent que tous les endophytes testés, donnent une réponse positive dans le cas de la production de chitinase. La chitine est un polymère de β -1,4 N-acétyl glucosamine; c'est l'un des polymères les plus abondants dans la nature après la cellulose (Tharanathan et Kitter, 2003). Les chitinases sont largement distribuées dans les plantes, les bactéries, les champignons, les insectes et les vertébrés (Pérez *et al.*, 2014). Il s'agit du principal composant structural des parois cellulaires des champignons et de l'exosquelette des invertébrés (Seidl, 2008). Ils agissent en synergie avec les protéases pour dégrader la cuticule de l'insecte et sont associés aux différents stades de champignons entomopathogènes. Par exemple : la germination, la croissance hyphale, la morphogénèse, la nutrition et la défense contre les antagonistes (Adams, 2004). Les chitinases dans les champignons mycoparasites sont le plus souvent suggérées comme étant impliquées dans le mycoparasitisme (Haran *et al.*, 1996). Nos résultats sont similaires à ceux de Firouzbakht *et al.* (2015) et de Dhawan et Joshi (2017) qu'ils ont révélé que 100% des isolats des *B.bassiana* testés présentaient une activité chitinasique. Ils sont également approximatifs avec ceux de Pasqualetti *et al.* (2019) où ils ont montré que 39 % de leurs souches étaient capables de dégrader la chitine. Parmi eux, *Clonostachys rosea* IG119 qui a montré la meilleure croissance.

Toutes les souches testées qui sont considérées comme des PGPF (Mohamed Mahmoud, 2017) ont montré une activité phosphatasique. Le phosphore (P) est considéré comme un macronutriment essentiel, et en fonction de sa disponibilité il pourrait limiter la croissance des plantes en raison de ses propriétés structurales,

fonctionnelles et métaboliques. Il se trouve dans les sols sous forme organique et inorganique. Plusieurs microorganismes du sol, y compris des bactéries et des champignons, sont capables de minéraliser les phosphates organiques et de solubiliser les phosphates inorganiques (Matos et *al.*, 2017). Selon Illmer et Schineer (1995) la solubilisation du phosphate pourrait être en raison des divers acides organiques produits par les endophytes, ce qui entraîne une réduction du pH, facilitant ainsi la solubilisation du phosphate (Shubha et Srinivas, 2017). Nos résultats sont similaires à ceux de Shubha et Srinivas (2017) qui ont signalé que 93.33% de leurs isolats sont producteurs de phosphatase comme par exemple *Trichoderma* (CAL3), *Colletotrichum truncatum*. Contrairement à Sahoo et Gupta (2014) qui ont testé 160 souches fongiques pour leurs activités phosphatasiques, parmi eux, 26 souches fongiques appartenant au genre *Alternaria* (1), *Aspergillus* (10), *Curvularia* (1), *Fusarium* (3), *Paecilomyces* (2), *Penicillium* (2), *Mycélium stérile* (7) présentaient une solubilisation de phosphate sous culture solide.

Les pectinases microbiennes sont des enzymes importantes dans les processus phytopathologiques, la symbiose plante-microbe et la décomposition du matériel végétal mort. La dégradation du tissu hôte par les phytopathogènes commence généralement par la production d'enzymes pectinolytiques, les principales enzymes impliquées dans la pathogenèse des plantes. Les champignons qui dégradent les substances pectiques sont probablement des agents pathogènes (Choi et *al.*, 2005; Sunitha et *al.*, 2013). Aucun des champignons testés n'a montré une activité pectinasique. Ces résultats sont similaires à ceux de Choi et *al.* (2005) qui ont rapporté que la production de pectinase était absente chez les souches de *Phomopsis* sp.

L'activité amylolytique des champignons endophytes contribue à la dégradation de l'amidon en glucides simples qui peuvent ensuite être assimilés par les champignons et leur hôte (Venkatesagowda et *al.*, 2012). Aucune de nos souches n'a produit de l'amylase. Ces résultats sont différents par rapport à ceux de Choi et *al.* (2005) où ils ont rapporté que les deux souches de *Phomopsis* sp. testées sont productrices d'amylase. Nos résultats étaient similaires avec ceux de Murad et *al.* (2007), ils n'ont observé aucune activité amylolytique dans leurs souches de

B.bassiana. Cela était également attendu puisque les cuticules d'insectes n'ont pas d'amidon dans leur composition.

80% des souches fongiques {Sn182, C141, C318(1), C318(2)} ont montré des résultats positifs pour le test protéolytique. Une protéase est toute enzyme qui effectue la protéolyse, c'est-à-dire qui commence le catabolisme des protéines par hydrolyse des liaisons peptidiques qui lient les acides aminés ensemble dans la chaîne polypeptidique formant la protéine (Rajput et al., 2016). La protéase aide les champignons endophytes à surmonter la barrière de défense de l'hôte et à obtenir les nutriments nécessaires à leur développement (Amirita et al., 2012). Les présents résultats sont en accord avec Dhawan et Joshi (2017) qui ont signalé la production de protéase par toutes les souches de *B.bassiana*. Ces résultats sont aussi similaires avec ceux de Li et al. (2006) où *C. rosea* a montré une activité maximale de la protéase au 7^{ème} jour d'incubation.

Seul *Beauveria bassiana* montre un résultat positif pour la production de lipase. L'importance des lipases pour hydrolyser les liaisons ester des lipoprotéines, des graisses et des cires à l'intérieur du tégument de l'insecte est bien connue. Ils contribuent de manière significative à la pénétration de la cuticule et à la libération initiale des nutriments (Seidl, 2008). Nos résultats pour ce test sont semblables à ceux trouvés dans l'étude réalisée par Dhawan et Joshi (2017) où 100% des isolats de *B.bassiana* montrent une activité protéolytique.

Une activité estérasique a été montrée seulement chez *B. bassiana*. Les estérases sont des biocatalyseurs qui dégradent les liaisons pertinentes dans toutes les molécules (Bakht et al., 2015). Nos résultats sont similaires avec ceux de Firouzbakht et al. (2015) qui ont trouvé 100% de *B.bassiana* testés présentaient une activité estérasique.

Les métabolites secondaires isolés des microorganismes et qui exhibent une activité antimicrobienne (antibactérienne, antifongique, antiprotozoaire), sont dits antibiotiques (Berdiy, 2005). Ils peuvent exercer une activité antibactérienne, antifongique et antiprotozoaire (Berdiy, 2005). La synthèse des antibiotiques est étroitement liée au métabolisme cellulaire qui est à son tour lié à la disponibilité des

éléments nutritifs ainsi qu'à d'autres conditions environnementales (Thomashow, 1996).

L'extrait de *Beauveria bassiana* obtenu par le solvant d'acétate d'éthyle a été séparé par CCM. Les résultats obtenus montrent que les deux phases mobiles acétone et acétate d'éthyle méthanol utilisées pour chaque standard ne sont pas polaires avec l'extrait acétate d'éthyle de cette souche Sn 182, ce qui signifie que ces deux phases ne conviennent pas à la séparation des différents composés contenus dans l'extrait de *B.bassiana*. Nos résultats montrent que la souche Sn182 est probablement non productrice de composés à effet antibiotique cas de l'ampicilline et le kétoconazole.

Les résultats de CCM et HPLC de Berestetskiy et *al.* (2018) ont montré que *Beauveria bassiana* produit le métabolite secondaire beauvericin qui joue un rôle important en tant qu'antibiotique, cytotoxique et insecticide.

Bien que des métabolites secondaires autres que l'ampicilline et le kétoconazole non pas été identifiés au cours de cette recherche, Strasser et *al.* (2000) et Vey et *al.* (2001) rapportent qu'il existe chez *B.bassiana* des composés tels que la bassianine, le bassianolide, beauverolides et le beauveriolides (Berestetskiy et *al.*, 2018).

Les résultats obtenus à partir de la détermination de l'activité antagoniste par la méthode de diffusion sur disque ont révélé la capacité de certains extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle des champignons endophytes testés à inhiber la croissance des souches pathogènes utilisés.

Cette inhibition est due principalement à l'antibiose qui résulte de la production des substances qui agissent comme des antibiotiques. L'antibiose est définie comme un antagonisme induit par la production des métabolites spécifiques ou non des microorganismes qui sont nuisibles à la croissance ou aux activités métaboliques d'autres organismes. Il s'agit de la production d'antibiotiques, de composés organiques volatils bioactifs (COV), d'agents lytiques, d'enzymes et de substances toxiques (Lipa et *al.*, 2017).

D'après nos résultats, il apparaît que *B. bassiana* applique probablement l'antibiose comme mécanisme d'action. Ses extraits ont permis l'apparition d'une

zone d'inhibition vis-à-vis des champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*. Nos résultats sont similaires à ceux d'Ownley et al. (2010) où ils ont signalé la présence du phénomène d'antibiose de *B. bassiana* contre des agents phytopathogènes, notamment *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Armillaria mellea*, *Rosellinia necatrix*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani*. Selon Sheng-Li et Zheng-zhi (2011), *B. bassiana* a la capacité d'inhiber le pathogène par compétition sur les nutriments et l'espace suivie de mécanisme d'antibiose. Cette action est observée par la technique de confrontation sur milieu gélosé.

Une zone d'inhibition claire a été observée chez les extraits des trois souches antagonistes de *C. rosea* {G133, C318 (1), C318 (2)} vis-à-vis des deux champignons pathogènes testés. Cela signifie que les extraits de ces souches jouent un rôle antifongique contre ces deux pathogènes. Le parasitisme des hyphes s'est avéré être la forme d'antagonisme utilisée dans le cas de *Clonostachys rosea*. La capacité de *C. rosea* à traiter le mycoparasitisme des hyphes, des sclérotites et d'autres fructifications chez divers types de champignons est bien connue. L'espèce produit également des inhibiteurs fongiques et des enzymes qui dégradent les parois cellulaires, entraînant la perte de turgescence et provoquant la lyse d'hyphes pathogènes (Suazo et al., 2011). Patkowska et al. (2018) ont rapporté l'inhibition de *Fusarium oxysporum* et d'autres champignons pathogènes tels que *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria dauci*, *Alternaria radicina*, et *Rhizoctonia solani* par *Clonostachys rosea*. Selon Mohamed Mahmoud (2017) *Clonostachys* sp. et *Beauveria bassiana* sont des antagonistes très efficaces contre trois agents pathogènes telluriques (*F.oxysporum* f.sp *albedinis*, *F.oxysporum* f.sp *lycopercici* ainsi que *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) et leurs effets d'antagonisme étaient remarquables par le phénomène de mycoparasitisme et de l'antibiose.

L'apparition de la zone d'inhibition a été observée dans les extraits de *Phomopsis* contre les deux champignons phytopathogènes, ce qui confirme l'activité antagoniste de cette souche. Les études de Santos et al. (2019) ont démontré que le type d'interaction entre les endophytes et les agents pathogènes était l'inhibition de la croissance mycélienne par contact, ce qui suggère que la compétition pour l'espace comportait le mécanisme d'inhibition. Ils ont également prouvé la capacité de

Phomopsis à réduire la croissance des phytopathogènes *Fusarium solani*, *Glomerella* sp. et *Moniliophthora perniciosa*. Mohamed Mahmoud (2017) a montré que *Phomopsis* applique le phénomène de l'antibiose qui se traduit probablement par la production des antibiotiques qui inhibent la croissance mycélienne des pathogènes (*F.oxysporum* f.sp *albedinis*, *F. oxysporum* f.sp *lycopercici* ainsi que *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*).

Les résultats ont montré que parmi les dix extraits d'acétate d'éthyle testés pour leur activité antifongique, 30 % ont révélé une activité positive vis-à-vis du champignon *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et 40 % contre le champignon *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*. Tandis que 30 % des extraits de chloroformes ont montré un effet antagoniste contre *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et 10 % contre *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*. Cela peut être expliquée de deux manières : (i) Il se peut que les composants actifs ne soient pas bien dissous dans les extraits par le solvant ou que de très petites quantités soient extraites, ce qui donne peu ou pas d'efficacité aux extraits.(ii) Il est fort probable que les composants bioactifs ont la polarité qui est la mieux extraite par l'acétate d'éthyle parmi les fractions de solvant (Ogundare et *al.*, 2006).

Chapitre 4
Conclusion et perspectives

Les champignons endophytes sont considérés comme des sources d'excellents nouveaux produits naturels bioactifs tels que les antibiotiques et les enzymes. Ils ont un potentiel d'exploitation dans le domaine médical, agricole et industrielle. Ces molécules bioactives possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides. Les effets bénéfiques induits par ces endophytes ne se limitent pas à la promotion de la croissance des plantes, mais également réagissent comme agents de protection des végétaux contre les ravageurs et les microorganismes phytopathogènes.

D'après nos résultats nous constatons que la production d'enzymes extracellulaires par des tests qualitatifs a été retrouvée chez les 5 souches testés. Cela a été prouvé par l'apparition d'une zone claire autour de leurs colonies. 100 % (cinq souches) des endophytes testés ont la capacité de dégrader la chitine et de solubiliser le phosphate, ce qui indique que toutes les souches testées sont productrices de chitinase et de phosphatase, 80 % (4 souches) dégradent les protéines par la production de la protéase. Pour l'activité lipasique et estérasique seulement *Beauveria bassiana* (20 %) a produit la lipase et l'estérase et 100 % des souches testés ne dégradent pas la pectine et l'amidon et ce par l'absence de pectinase et d'amylase.

Selon les résultats d'analyse de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Beauveria bassiana* par la chromatographie sur couche mince, nous avons constaté que les phases mobiles acétone, eau, toluène, acide acétique glacial et acétate d'éthyl méthanol ne permettent pas la séparation des différents composés contenus dans l'extrait de *B.bassiana*, ce qui est peut être due à l'absence de polarité entre l'extrait testé et les 2 phases mobiles. Nos résultats montrent également que cette souche est probablement non productrice d'antibiotiques cas de l'ampicilline et de kétoconazole testés.

L'activité antagoniste à travers la méthode de diffusion sur disque en présence des deux champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici* et les extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle des cinq souches endophytes étudiées, a montré l'apparition des zones d'inhibition allant de 0 à 5 mm pour les extraits d'acétate d'éthyle et de 0 à 3,5 mm pour les extraits de chloroforme.

Nous avons remarqué que parmi les extraits des cinq souches testés, l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche de *Clonostachys rosea* (C318 (1)) a enregistré la meilleure zone d'inhibition qui est de 5 mm vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*, alors qu'un diamètre de 4 mm a été enregistré par l'extrait d'acétate d'éthyle de *Beauveria bassiana*

(Sn182) et de *Phomopsis* C141 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*. Tandis qu'en présence d'extrait chloroformique de *Clonostachys rosea* C318 (2), la zone d'inhibition enregistrée était de 3,5 mm vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, alors qu'elle était de 2 mm chez *Beauveria bassiana* Sn182 vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*.

Le test de diffusion sur disques a démontré que parmi les 10 extraits d'acétate d'éthyle testés trois extraits des souches de *Beauveria bassiana*, *Phomopsis*, et de la souche (G133) de *Clonostachys rosea* ont la capacité d'inhiber la croissance de *F. oxysporum* f.sp *albedinis* F. et de *F. oxysporum* f.sp *lycopercici*, alors que l'extrait de la souche C318 (1) de *C.rosea* a exercé une inhibition seulement sur ce dernier agent pathogène. Sur les 10 extraits de chloroforme testés trois extraits ; celui de *Phomopsis* sp. (C141, et des deux souches de *C.rosea* C318 (1) et C318 (2) ont montré une activité antagoniste vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* tandis que l'extrait de *B.bassiana* Sn182 a montré une inhibition seulement vis à vis de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopercici*.

Les extraits d'acétate d'éthyle avaient plus d'effet que les extraits chloroformiques, cette différence peut être expliquée par le fait que les deux solvants ont des polarités différentes que celles des composants bioactifs, qui ont été peut être mieux extraites par l'acétate d'éthyle.

Nous avons constaté que l'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des extraits des souches antagonistes, mais aussi des pathogènes étudiés. Cette variation est liée au mécanisme d'antibiose et de mycoparasitisme exercés par les extraits des endophytes qui fait intervenir des enzymes et des antibiotiques. Ces résultats préliminaires montrent que les endophytes testés constituent une source et une usine de plusieurs métabolites présentant un intérêt biotechnologique.

En perspectives on propose :

- D'évaluer la production des enzymes extracellulaires dans des milieux liquides et déterminer leurs concentrations par des méthodes appropriées.
- Pour extraire et identifier les métabolites secondaires il sera plus intéressant de tester d'autres standards que l'ampicilline et le kétoconazole avec d'autres solvants (phases mobiles).
- D'appliquer ces molécules bioactifs sur d'autres agents pathogènes de quarantaine.
- L'étude *in vitro* devra être confirmée par un suivi *in vivo* sur l'hôte de chaque pathogène testé.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Adams D.J.**, 2004 - Fungal Cell Wall Chitinases and Glucanases. *Microbiology*, n° 150, p.p.2029-2035.
- **Alurappa R., Venkataramana M., Nirmaladevi D., Gupta V.K., Chandranayka S., Srinivas C.**, 2015 - Cytotoxic effects of *oosporein* isolated from endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi*. *Front Microbiol*, n° 6, p. 870.
- **Aly A.H., Edrada-Ebel R., Wray V., Muller W.E.G., Kozytska S., Hentschel U., Proksch P., Ebel R.**, 2008 - Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces sp.* Isolated from the medicinal plant *Urospermumpicroides*. *Phytochemistry*, n° 69, p.p.1716–1725.
- **Amirita A., Sindhu P., Swetha J., Vasanthi N.S., Kannan K.P.**, 2012 - Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. *World J Sci Technol*, n° 2(2), p.p.13-19.
- **Aniszewski T.**, 2015 - *Alkaloids Chemistry, Biology, Ecology, and Applications* Second edition. ISBN: 978-0-444-59433-4.
- **Anwar W., Ali S., Nawaz K., Iftikhar S., Javed M.A., Hashem A., Alqarawi A.A., Abd_Allah E.F., Akhter A.**, 2018 - Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). *Biocontrol Science and Technology*, n° 10, p.p.1-12.
- **Arnold A.E., Lutzoni F.**, 2007 - Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecol*, n° 88, p.p.541-549.
- **Arnold A.E., Mejía L.C., Kylo D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A.**, 2003 - Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS USA*, n° 100, p.p. 15649-15654.
- **Awad H.M., EL-Shahed K.Y.I., Ramlan A., Sarmidia M.R., Hesham A., El-Enshasya.**, 2012 - Antibiotics as Microbial Secondary Metabolites: Production and Application. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*, n°59, Suppl 1, p.p. 101-11.

- **Baek S.H., Ahn J.W., Nam S.H., Yoon C.S., Shin J.C., Lee S.H.,** 2014 - S(-)-10, 11-Dihydroxyfarnesoic Acid Methyl Ester Inhibits Melanin Synthesis in *Murine Melanocyte* Cells. *Molecular Sciences*, n° 15, p.p.12750– 12763.
- **Bakht F.H., Zibae A., Hoda H., Sohani M.M.,**2015 - Virulence Determination of *Beauveria bassiana* Isolates on a *Predatory Hemipteran, Andrallus spinidens Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae)*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, n° 50 (1), p.p.115–125.
- **Baldani J.I., Baldani V.L.D., Seldin L., Döbereiner J.,** 1986 - *Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, n°36, p.p. 86-93.
- **Barik B.P., Tayung K., Jagadev P.N., Dutta S.K.,** 2010 - Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus rhizomes* with antimicrobial activity. *European Journal of Biological Sciences*, n° 2, p.p.8-16.
- **Beilharz V.C., Parberry D.G., Swart H.J.,** 2002 - A selective agent for certain soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, n° 79, p.p.507-511.
- **Bender C.L., Rangaswamy V., Loper J.,** 1999 - Polyketide production by plant-associated *pseudomonads*. *Annu Rev. Phytopathol*, n°37, p.p.175-196..
- **Berdy J.,** 2005 - Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot*, n°58 (1), p.p.1-26.
- **Berestetskiy A.O., Ivanova A.N., Petrova M.O., Prokofeva D.S., Stepanycheva E.A., Uspanov A.M., Lednev G.R.,** 2018 - Comparative Analysis of the Biological Activity and Chromatographic Profiles of the Extracts of *Beauveria bassiana* and *B. pseudobassiana* Cultures Grown on Different Nutrient Substrates. *Microbiology*, n° 87(2), p.p.200-214.
- **Betina V.,** 1973 - Bioautography in paper and the layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromato*, n°78, p.p.45-51.
- **Bhagobaty R.K., Joshi S.R.,** 2011 - Metabolite profiling of endophytic fungal isolates of five ethno-pharmacologically important plants of Meghalaya. *Journal of Metabolomics and Systems Biology*, n° 2(2), p.p.20-31.

- **Binutu O.A., Cordell G.A.,** 2000 - Gallic acid derivative from *Mezoneuron benthamianum* leaves. *Pharmaceutical Biology*, n° 38, p.p.284–286.
- **Cai L.,** 2014 - Thin Layer Chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, n°8, p.p.1-2.
- **Carrim A.J.I., Barbosa E.C., Vieira J.D.G.,** 2006 - Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (*Carobinha-do-campo*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, n° 49, p.p.353-359.
- **Cattelan A.J., Hartel, P.G., Fuhrmann J.J.,** 1999 - Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of American Journal*, n° 63(6), p.p.1670-168.
- **Chapla V.M., Zeraik M.L., Ximenes V.F., Zanardi L.M., Lopes M.N., Cavaleiro A.J., Silva D.H.S., Young M.C.M., da Fonseca L.M., Bolzani V.S., Araújo A.R.,** 2014 - Bioactive Secondary Metabolites from *Phomopsis* sp., an Endophytic Fungus from *Senna spectabilis*. *Molecules*, n° 19, p.p.6597-6608.
- **Choi Y.W., Hodgkiss I.J., Hyde K.D.,** 2005 - Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *J Agric Technol*, n° 1, p.p.55-66.
- **Clay K., Schardl C.,** 2002 - Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, n° 160, p.p.S99-S127.
- **Collado J., Platas G., González I., Peláez F.,** 1999 - Geographical and seasonal influences on the Distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol*, n° 144, p.p. 525-532.
- **Corrêa E.B., Bettiol W., Morandi M.A.B.,** 2010 - Controle biológico da podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* e promoção de crescimento de alface hidropônica com *Clonostachys rosea* [Biological control of *Pythium aphanidermatum* root rot and growth promotion of hydroponic lettuce by *Clonostachys rosea*]. *Tropical Plant Pathology*, n° 35, p.p.248–252.
- **Costa T.D.A., Vieira R.F., Bizzo H.R., Silveira D., Gimenes M.A.,** 2012 - Secondary Metabolites. *Health Sciences Quality*, University of Brasilia, Brasília, Brazil.

- **Cota L.V., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G., Macedo P.E.F., Antunes R.F.,** 2008b - Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control*, n° 46, p.p.515–522.
- **Cota B.B., Rosa L.H., Caligiorne R.B., Rabello A.L.T., Alves T.M.A., Rosa C.A., Zani C.L.,** 2008 - Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett*, n° 285, p.p.177–182.
- **Crespo R., Pedrini N., Juárez M.P., Dal Bello G.M.,** 2008 - Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *MicrobiolResarch*, n° 163, p.p.148-151.
- **Cristescu C.,** 2003 - A new species of *Phomopsis* Sacc. (Mitosporic fungi) in Romania. *RoumBoil–BiolVeget*, n° 48, p.p.45–49.
- **Crozet A.S., Canard B.,** 2016 - Les champignons endophytes: impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. *Sciences pharmaceutiques*. ffdumas01266084.
- **Deacon J.W.,** 2005 - *Fungal Biology, (4ème édition)*. Wiley-Blackwell, p.384.
- **Debbab A., Aly A.H., Edrada-Ebel R.A., Muller W.E.G., Mosaddak M., Hakiki A., Ebel R., Proksch P.,** 2009 - Bioactive metabolites from endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Menthapulegium*. *BiotechnolAgronSoc Environ*, n° 13(2), p.p.229–234.
- **deFariaa M.R., Wraight S.P.,** 2007 - *Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types*. *Biological Control*, n° 43, p.p.237–256.
- **de Silva E.D., Geiermann A.S., Mitova M.I., Kuegler P., Blunt J.W., Cole A.L.J., Munro M.H.G.,** 2009 - Isolation of 2-Pyridone Alkaloids from a New Zealand Marine-Derived *Penicillium* species. *J Nat Prod*, n° 2(3), p.p.477-479.
- **Dhawan M., Joshi N.,** 2017 - Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. *Veterinary Microbiology*, n° 233, p.p.1-8.

- **Ding L., Maier A., Feibig H.H., Lin W.H., Hertweck C.,** 2011 - A family of multi-cyclic indolosesquiterpenes from a bacterial endophyte. *Organic and Biomolecular Chemistry*, n° 9, p.p. 4029–4031.
- **Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P.K., Zeilinger S., Grigoriev I.V., Kubicek C.P.,** 2011 - Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, n° 9, p.p. 749–759.
- **Firáková S., Šturdíková M., Múčková M.,** 2007 - Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia, Bratislava, Section Botany*, n°62(3), p.p.251-257.
- **Firouzbakht H., Zibae A., Hoda H., Sohani M.M.,** 2015 - Virulence Determination of *Beauveria bassiana* Isolates on a Predatory Hemipteran, *Andrallus spinidens Fabricius* (Hemiptera: Pentatomidae). *Acta Phytopathologicaet Entomologica Hungarica*, n° 50(1), p.p.115-125.
- **Gallery R. E., Dalling J. W., Arnold A. E.,** 2007 - Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with *Cecropia*. *Ecology*, n°88, p.p.582-588.
- **Ganley R.J., Brunfeld S.J., Newcombe G.,** 2014 - A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol.101, n° 27, p.p. 10107-10112.
- **Gehring C.A., Whitman T.G.,** 2002 - Mycorrhizae-herbivore interactions: population and community consequences. In: *Mycorrhizal ecology* (Van der Heijden M, Sanders I, Eds.) Springer, Berlin, p.p. 295-320.
- **Gond S.K., Verma V.C., Mishra A., Kumar A., Kharwar R.N.,** 2010 - Role of Fungal Endophytes in Plant Protection. *Management of Fungal Plant Pathogens*, p.p.183-184.
- **Gonthier P., Gennaro M., Nicolotti G.,** 2006 - Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity*, n°21, p.p. 69-80.

- **Halouane F.**, 2008 - Recherche Fondamentale sur l'entomopathogènes *Beauveria bassiana* (Blas.-Criv.)Vuill. (AcSomycota:Hypocreales), Thèse de doctorat, Institut National Agronomique D'EL Harrach. Algérie.
- **Haran S., Schickler H., Chet I.**, 1996 - *Molecular* mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiol, n° 142, p.p.2321-2331.
- **Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A.**, 2015 - The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. MicrobiolMolBiol Rev.
- **Harrison L., Teplow D.B., Rinaldi M., Strobel G.**, 1991 - *Pseudomycins*, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae* possessing broad-spectrum antifungal activity. Journal of General Microbiology, n° 137, p.p.2857-2865.
- **Hazalin N. A., Ramasamy K., Lim S. M., Wahab I. A., Cole A. L. and 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, n°9.p.46.
- **Hormazabal E., Schmeda-Hirschmann G., Astudillo L., Rodriguez J., Theoduloz C.**, 2005 - Metabolites from *Microsphaeropsis livacea*, an endophytic fungus of *Pilgerodendron uviferum*. Z Naturforsch, n° 60c, p.p.11–21.
- **Huang W.Y., Cai Y.Z., Hyde K.D., Corke H., Sun M.**, 2008 - Biodiversity of endophytic fungi with 29 traditional Chinese medicinal plants. Fungal Diversity, n° 33, p.p.61-75.
- **Huang W.Y., Zhong C.Y., Kevin D.H., Harold C., Mei S.**, 2007 - Endophytic fungi from *Nerium oleander L* (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. World J MicrobiolBiotechnol, n°23, p.p.1253-1263.
- **Huang X.Z., Zhu, Y., Guan X.L., Tian K., Guo J.M., Wang H.B., Fu G.M.**, 2012 - A Novel Antioxidant *Isobenzofuranone* Derivative from fungus *Cephalosporium sp. AL031*. Molecules, n° 17, p.p.4219–4224.
- **Hung R., Lee S., Bennett J.W.**, 2015 - Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. ApplMicrobiolBiotechnol, n° 99(8), p.p.3395-3405.

- **Hyde K. D., Soyong K.,** 2008 - The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, n°33, p.p.163-173.
- **Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H.,** 2001 - Use of *Hyphomycetous* Fungi for Managing Insect Pests. *Fungi as biocontrol agents*, p.p.23-69.
- **Jeffs L.B., Khachatourians G.G.,** 1997 - Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes. *Toxicon*, n° 35(8), p.p.1351-1356.
- **Jonhston A., Booth C.,** 1983 - Plant pathologist's pocket Book. 2nded commonwealth. Mycological institute, Kew Surrey, England, p.439.
- **Keinath A.P., Fravel, D.R., Papavizas G.C.,** 1991 - Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahlia*. *Phytopathology*, n° 81, p.p.644–648
- **Keller N.P., Turner G., Bennett J.W.,** 2005 - Fungal secondary metabolism— from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol*, n°3(12), p.p.937-47.
- **Keswani C., Singh S.P., Singh H.B.,** 2015 - *Beauveria bassiana*: Status, Mode of action, Applications and Safety issues. *Biotech Today*, n° 3(1), p.p.16-20.
- **Khan A.L., Hamayun M., Kim Y.H., Kang S.M., Lee J.H., Lee I.J.,** 2011 - *Gibberellins* producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochem*, n°46(2), p.p.440-7.
- **Khiralla A., Spina R., Yagi S., Mohamed I., Laurain-Mattar D.,** 2017 - Endophytic fungi: occurrence, classification, function and natural products. *Microbiology research advances*, Chapter 1.
- **Kirk P.M., Cannon P.F., Minter, D.W., Stalpers J.A.,** 2008 - Dictionary of the Fungi. 10th Edition, Wallingford, CABI, p. 22.
- **Kogel K.H., Franken P., Hückelhoven R.,** 2006- Endophyte or parasite – what decides? .*Current Opinion in Plant Biology*, n° 9, p.p. 358-363.
- **Kouadria R.,** 2019 - Contribution des champignons endophytes à la tolérance aux facteurs adverses (biotiques et abiotiques) des espèces cultivées : isolement des champignons endophytes et étude de leur contribution à la tolérance à la salinité ou à des polluants. UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM. Algérie.
- **Kusari S., Spiteller M.,** 2012 - Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*, n° 1866, p.p. 241–66.

- **Li G.Q., Huang H.C., Kokko E.G., Acharya S.N.,** 2002 - Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. Botanical Bulletin of Academia Sinica, n° 43, p.p.211–218.
- **Li J., Yang J., Huang X., Zhang K.,** 2006 - Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. Process Biochemistry, n° 41,925–929.
- **Li W.C., Zhou J., Guo S.Y., Guo L.D.,** 2007 - Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. Fungal Diversity, n°25, p.p.69-80.
- **Lim W., Park J., Lee Y.H., Hong J., Lee Y.,** 2015 - Subglutinol A, an immunosuppressive α - pyronediterpenoid from *Fusarium subglutinans*, acts as an estrogen receptor antagonist. Biochemical and Biophysical Research Communications, n° 461(3), p.p.1-6.
- **Lipa D.T., Rajesha R.K., Tombisanaa.,Majumdera D.,** 2017 - Antagonistic potential of *Beauveria sp.* against phytopathogens. Bull EnvPharmacol Life Sci, n° 6(3), p.p.207-212.
- **Lorito M., Woo S.L., Harman G.E., Monte E.,** 2010 - Translational research on *Trichoderma*: from ‘Omics to the Field. Phytopathol, n° 48, p.p.395–417.
- **Ma Y., Prasad M.N.V., Rajkumar M., Freitas H.,** 2011-Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. Biotechnology Advances, n° 29, p.p., 248-258.
- **Madhusudhan M.C., Bharathi T.R., Prakash H.S.,** 2015 - Isolation and Purification of Bioactive Metabolites from Fungal Endophytes. CurrentBiochemical Engineering, n° 2, p.p.111-117.
- **Mandyam K., Jumpponen A.,** 2005 - Seeking the elusive functions of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. Studies in Mycology, n° 53, p.p.173-189.
- **Maria G.L., Sridhar K.R., Raviraja N.S.,** 2005 - Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. Journal of Agricultural Technology, n° 1, p.p.67-80.
- **Martínez-Luis S., Della-Togna G., Coley P.D., Kursar T.A., Gerwick W.H., Cubilla-Rios L.,** 2008 - Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia sp.* J Nat Prod, n° 71, p.p.2011–2014.

- **Miller C.M., Miller R.V., Garton-Kenny D., Redgrave B., Sears J., Condrón M.M., Teplow D.B., Strobel G.A., 1998** - Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *Journal of Applied Microbiology*, n° 84, p.p.937-944.
- **Mohamed Mahmoud., Zoulikha K., Maciá-Vicenteh J.G., Errahmani M.B., Lopez-Llorca L.V., 2017** -Endophytic fungi associated with roots of date palm (*Phoenix dactylifera*) in coastal dunes.*Rev IberoamMicol*, n°34(2), p.p.116–120.
- **Mohamed Mahmoud F., 2017** - Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*phoenix dactylifera* L.).p191. Ecole Nationale Supérieure d’Agronomie
- **Mohanta J., Tayung K., Mohapatra U., 2008** - Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology*, n° 5(2), p.p.1-8.
- **Molina G., Pimentel M.R., Bertucci T.C.P., Pastore G.M., 2012** - Application of fungal endophytes in biotechnological processes. *Chemical Engineering Transactions*, vol.27, p.p.289-294.
- **Moricca S., Ragazzi A., 2008** - Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Disculaquercina*. *Phytopathology*, n°98, p.p.380-386.
- **Mouekouba L.D.O., Zhang L., Guan X., Chen X., Chen X., Chen H., Zhang J., Zhang J., Li J., Yang Y., Wang A., 2014** - Analysis of *Clonostachys rosea*-Induced Resistance to Tomato Gray Mold Disease in Tomato Leaves. *Plos One*, n° 9(7), p.p.1-15.
- **Mukherjee P.K., Horwitz B.A., Kenerley C.M., 2012** - Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. *Microbiology*, n° 158, p.p.35–45.
- **Murad A.M., Laumann R.A., Mehta A., Noronha E.F., Franco O.L., 2017**- Screening and secretomic analysis of enthomopatogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to copea Weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, n°145, p.p.333-338.
- **Noma T., Strickler K., 1999** - Factors affecting *Beauveria bassiana* for control of *Lygus bug* (*Hemiptera: Miridae*) in alfalfa seed fields. *J Agric Urban Entomol*, n° 16(4), p.p.215–233.

- **Ortiz-Ribbing L., Williams M.M.,** 2006 - Conidial germination and germ tube elongation of *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthion* leaf surfaces of seven *Amaranthus* species: implications for biological control. *Biol Control*, n° 38, p.p.356–362.
- **Ownley B.H., Gwinn K.D., Vega F.E.,** 2010 - Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol*, n° 55, p.p.113-128.
- **Parthasarathy R., Sathiyabama M.,** 2015 - Lovastatin-producing endophytic fungus isolated from a medicinal plant *Solanum xanthocarpum*. *Natural Product Research*, n° 29(24), p.p. 2282-2286.
- **Pasqualetti M., Barghini P., Giovannini V., Fenice M.,** 2019 - High Production of Chitinolytic Activity in *Halophilic Conditions* by a New Marine Strain of *Clonostachys rosea*. *Molecules*, n°24, p 1880.
- **Patil R.H., Patil M.P., Maheshwari V.L.,** 2016 - Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic Fungi, Biotechnological Production and Their Potential Applications. *Studies in Natural Products Chemistry*, First Ed, p.p.189-205.
- **Patkowska E., Jamiolkowska A., Błażewicz-Woźniak M.,** 2018 - Antagonistic activity of selected fungi of the soil environment of carrot. *Plant Soil Environ*, n° 64.
- **Patocka J.,** 2016 - Bioactive metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. *Mil Med Sci Lett*, n° 85(2), p.p.80-88.
- **Pérez L.C.S., Florido J.E.B., Navarro S.R., Mayagoitia J.F.C., López M.A.R.,** 2014 - Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*, n° 2, p.p.65-76.
- **Pikovskaya R.I.,** 1948 - mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologia*, n° 17, p.p.362-370.
- **Raghunath R., Radhakrishna A., Angayarkanni J., Palaniswamy M., Nadu T.,** 2012 - Production and cytotoxicity studies of lovastatin from *Aspergillus niger* PN2 an endophytic fungi isolated from *Taxus baccata*. *IJABPT*, n°3(3), p.p.342-351.

- **Ratnaweera P.B., de Sila E.D.,** 2017 - Endophytic Fungi: A Remarkable source of Biologically Active Secondary Metabolites. In Mahesheswri D., Annapurna K. (eds) *Endophytes: Crop Productivity and Protection .Sustainable Development and Biodiversity*, n° 16.
- **Redman R.S., Sheehan K.B., Stout R.G., Rodriguez R.J., Henson J.M.,** 2002 - Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, p.p. 298-1581.
- **Rehman S., Shawl A.S., Kour A., Andrabi A., Sudan P., Sultan P., Verma V., Qazi G.N.,** 2008 - An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. *Applied Biochemistry Microbiology*, n° 44(2), p.p.203–209.
- **Rodrigo M., Saraiva-Kirk J., Czymmek, Álefe V., Borges-Nilmara P., Caires.,Maffia L.A.,** 2015 - Confocal microscopy study to understand *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea* interactions in tomato plants. *Biocontrol Science and Technology*, n° 25(1), p.p.56-71.
- **Rodriguez M.A., Cabrera G., Gozzo F.C., Eberlin M.N., Godeas A.,** 2011 - *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology*, n° 110, p.p.1177–1186.
- **Rodriguez R. J., White J. F.; Arnold A. E.,** 2009 - Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol*, n° 182, p.p.314–330.
- **Roskopf E.N., Charudattan R., Shabana Y.M., Benny G.L.,** 2000a - *Phomopsis amaranthicola*, a new species from *Amaranthus* sp. *Mycologia*, n° 92, p.p.114–122.
- **Roskopf E.N., Charudattan R., DeValerio J.T., Stall W.M.,** 2000b - Field evaluation of *Phomopsis amaranthicola*, a biological control agent of *Amaranthus* spp. *Plant Dis*, n° 84, p.p.1225–1230.
- **Rossmann A.Y., Farr D.F., Castlebury L.A.,** 2007 - A review of the phylogeny and biology of the *Diaportheales*. *Mycoscience*, n° 48, p.p.135–144.
- **Ruiz B., Chávez B., Forero A., García-Huante Y., Romero A., Sánchez M., Rocha D., Sánchez B., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Langley E.,** 2010 - Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, n°36(2), p.p.146-167.

- **Saar D.E., Polans N.O., Sorensen P.D., Duvall M.R.,** 2001 - Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter*, n°19, P.P. 249-260.
- **Sabbahi R.,** 2008 - Utilisation de champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaires des principaux insectes ravageurs Fraiseraiies, Thèse de doctorat, Université Québec . Canada.
- **Sahoo H.R., Gupta N.,** 2014 - Evaluation of Phosphate Solubilising Potential of Some Endophytic Fungi under Solid and Liquid State. *BMR Microbiology I*, n°1(1), p.p.1-6.
- **Saikkonen K., Faeth S.H., Helander M., Sullivan T.J.,** 1998 - Fungal endophytes: a continuum of Interactions with Host Plants. *Annu Rev Ecol Syst*, n° 29(1), p.p.319-43.
- **Saliba S.,** 2015 - Nouvelle approches biotechnologiques pour l'obtention d'alcaloïdes : culture in vitro de *Leucojumaestivum L* et isolement d'endophytes bactériens d'*Amaryllidaceae*, Thèse de doctorat, Université de Lorraine.
- **Santos C.M., Ribeiro A.S., Garcia A., Polli A.D., Polonio J.C., Azevedo J.L., Pamphile J.A.,** 2019 - Enzymatic and antagonist activity of endophytic fungi from *Sapindus saponaria L.* (Sapindaceae). *Acta bot, Colomb*, n°24(2), p.p.322-330.
- **Saranraj P., Jayaprakash A.,** 2017 – Agrobeneficial Entomopathogenic Fungi- *Beauveria bassiana*: A review. *Indo-Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR)*, n° 3, p.p.1051-1087.
- **Schulz B., Boyle C., Draeger S., et al.,** 2002 - Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol, Res*, n°106(9), p.p. 996- 1004.
- **Schulz B., Boyle C.,** 2005 - The endophytic continuum. *Mycological Research*, n°109, p.p. 661-686.
- **Sebastianes F.L.S., Cabedo N., El Aouad N., Valente A.M.M.P., Lacava P.T., Azevedo J.L., Pizzirani-Kleiner A.A., Cortes D.,** 2012 - 3-Hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungus *Diaporthe phaseolorum*. *Curr Microbiol*, n° 65, p.p.622–632.

- **Selim K.A., El-Beih A.A., AbdEl-Rahman T.M, El-Diwany A.I.,** 2012 - Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, n° 2(1), p.p.31-82.
- **Selosse M. A., Schardl C. L.,** 2007 - Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist*. n° 73, p.p 452-458.
- **Seidl V.,** 2008 - Chitinases of Filamentous Fungi: A Large Group of Diverse *Proteins with Multiple Physiological Functions*. *Fungal Biology Reviews*, n° 22, p.p.36-42.
- **Sheng-Li Z., Zheng-zhi Z.,** 2011 - Antagonism of *Beauveria bassiana* against Two *Fusarium spp.* Pathogenic to Cotton. *Chinese Journal of Biological Control*, n° 27(3), p.p.349-356.
- **Sherameti I., Shahollari B., Venus Y., Altschmied L., Varma A., Oelmuller R.,** 2005 - The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and Arabidopsis roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *The Journal of Biological Chemistry*, n° 280, p.p. 26241-26247.
- **Shipunov A., Newcombe G., Raghavendra A. K. H., Anderson C. L.,** 2008 - Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. *American Journal of Botany*, n°95, p.p.1096-1108.
- **Shubha J., Srinivas C.,** 2017 - Diversity and extracellular enzymes of endophytic fungi associated with *Cymbidium aloifolium L.* *African Journal of Microbiology Research*, n° 16(48), p.p.2248-2258.
- **Sieber T.N.,** 2002 - Fungal Root Endophytes. In: Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. (eds), *Plant roots: The Hidden Half*, third ed. Marcel Dekker, New York, Basel [etc.], p.p. 887-917.
- **Silva G.H., de Oliveira C.M., Teles H.L., Pauletti P.M., Castro-Gamboa I., Silva D.H.S., Bolzani V.S., Young M.C.M., Costa-Neto C.M., Pfenning L.H., Berlinck R.G.S., Araujo A.R.,** 2010 - Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum (Piperaceae)*. *Phytochemistry Letters*, n° 3, p.p.164–167.

- **Silva G.H., Teles H.L., Zanardi L.M., Young M.C.M., Eberlin M.N., Hadad R., Pfenning L.H., Costa-Neto C.M., Castro-Gamboa I., Bolzani V.S., Araujo A.R.,** 2006 – Cadinanesesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). *Phytochemistry*, n° 67, p.p.1964–1969.
- **Singh A., Sharma J., Rexer K.H., Varma A.,** 2000 - Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformosporaindica* - A revolutionary plant growth promoting fungus. *Current Science*, n° 79, p.p.1548-1554.
- **Son H.U., Lee S.H.,** 2013 - Evaluation of eye irritation by S-(-)-10, 11-dihydroxyfarnesic acid methyl ester secreted by *Beauveria bassiana* CS1029. *Experimental and Therapeutic Medicine*, n° 6, p.p.909-912.
- **Souza A.Q.L., Souza A. D. L., Filho S. A.,** 2004- Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) .In Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.). *Rich and Strychnoscogens bentham, Acta., Amaz* ,n° 34,p.p.185-195.
- **Speakman J.B., Lewis B.G.,** 1978 - Limitation of *Gaeumannomyces graminis* by wheat root responses to *Phialophora radicicola*. *New Phytologist*, n° 80, p.p.373-380.
- **Stone J.K., Bacon C.W., White J.J.,** 2000 - An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White Jr JF (eds), *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker, Inc, New York, p.p. 3-29.
- **Strobel G., Daisy B.,** 2003 - Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev*, n° 67, p.p.491-502.
- **Strobel G.A., Miller R.V., Martinez-Miller C., Condrón M.M., Teplow D.B, Hess W.M.,** 1999b - *Cryptocandin*, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiology*, n° 145, p.p.1919-2.
- **Suazo P.M., Opazo A., Zaldúa S., González G., Sanfuentes E.,** 2011 - Evaluation Of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. Strains to control *Fusarium circinatum* In *Pinus radiata* SEEDLINGS. *Chilean Journal of Agricultural Research*, n° 71(3), p.p.412-417.
- **Sun, X., Guo, L.D.,** 2012 - Endophytic fungal diversity: Review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, n° 3, p.p.65-76.

- **Sunitha V.H., Devi D.N., Srinivas C.,** 2013 – Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World J AgricSci*, n° 9(1), p.p.1-9.
- **Surendra K.G., Mishra A., Sharma V.K., Verma S.K., Kumar ., Kharwar R.N., Kumar A.,** 2011 - Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycoscience*.
- **Sutton J.C., Li D.W., Peng G., Yu H., Zhang P., Valdebenito-Sanhueza R.M.,** 1997 -*Gliocladiumroseuma* versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease*, n°81(4), p.p.316–328.
- **Takahashi S., Uchida K., Kakinuma N., Hashimoto R., Yanagisawa T., Nakagawa A.,** 1998b - The structures of *pyridovericin* and *pyridomacrolidin*, new metabolites from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *J Antibiotics*, n° 51(11), p.p.1051-1054.
- **Tambadou F.,** 2014 - Étude de la production de peptides non-ribosomiques chez des souches de *Paenibacillus*. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, p. 202.
- **Taylor J.E., Hyde K.D., Jone E.B.G.,** 1999 - Endophytic Fungi associated with the Temperate palm *Trachycarpus Fortunei* within and outside its natural geographic range. *New phytologist*, n°142, p.p. 335-346.
- **Tharanathan R.N., Kittur F.S.,** 2003 - The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, n° 43, p.p.61-87.
- **Thomashow L.S., Weller D.M.,** 1996 - Current concepts in the use of introduction bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: *Plant –microbe interactions*, vol.1. G.Stacey and N.T.Keen (eds.) Chapman and Hall, London, United Kingdom, 187-236.
- **Tiwari R., Rana C.S.,** 2015 - Plant secondary metabolites: A review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, n°3(5), p.p.661-670.
- **Toledo A., Virla E., Humber R., Paradell S., Lastra C.L.,** 2006 - First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopiatucumana* and *Sonesimiagrossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, n° 92, p.p.7–10.

- **Tétard-Jones C., Edwards R.,** 2016 - Potential roles for microbial endophytes in herbicide tolerance in plants. *Pest ManagSci*, n°72(2), p.p.203–209.
- **Udayanga D., Liu X.,** 2011 - The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*, n° 50, p.p.189–225.
- **Valencia J.W., Gaitán-Bustamante A.L., Jiménez A.V., Grossi-de-Sá M.F.,** 2011 - Cytotoxic activity of fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: an intraspecific evaluation of *beauvericin* production. *CurrMicrobiol*, n° 63(3), p.p.306-312.
- **Varma A., Verma S., Sudha., Sahay N., Butehorn B., Franken P.,** 1999 - *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, n° 65, p.p. 2741-2744.
- **Venkatachalam A., GovindaRajulu M.B., Thirunavukkarasu N., Suryanarayanan T.S.,** 2015 - Endophytic fungi of marine algae and seagrasses: a novel source of chitin modifying enzymes. *Mycosphere*, n° 6(3), p.p.345-355.
- **Venkatesagowda B., Ponugupaty E., Barbosa A.M., Dekker R.F.,** 2012 - Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oilbearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. *World J MicrobiolBiotechnol*, n° 28(1), p.p.71-80.
- **Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., von W. D., Franken P., Kogel K. H.,** 2005 - *The endophytic fungus Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, n° 102, p.p.13386-13391.
- **Wang F.W., Jiao R.H., Cheng A.B., Tan S.H., Song Y.C.,** 2007 - Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium sp.* *World J MicrobiolBiotechnol*, n° 23, p.p.79–83.
- **Wicklow D.T., Roth S., Deyrup S.T., Gloer J.B.,** 2005 - A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycol Res*, n° 109(5), p.p.610–618.

- **Xiaoling C., Xiaoli L., Shining Z., 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. *Journal of Ecology and The Natural Environment*, n° 2, p.p.17-24.
- **Yadav R., Singh A.V., Joshi S., Kumar M.,** 2015 - Antifungal and enzyme activity of endophytic fungi isolated from *Ocimum sanctum* and Aloe vera. *African Journal of Microbiology Research*, n° 9(29), p.p.1783-1788.
- **Yu H.L., Zhang L., Li C., Guo W., Li P., Sun L.Q.,** 2010 - “Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced endophytes”. *Microbiological research*, vol. 165, p.p. 437-449.
- **Zabalgogezcoa I.,** 2008 - Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, n°6, p.p.138-146.
- **Zeroug A.,** 2011 - Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk.). *Memoir de magister, Universite Ferhat Abbas –Setif-* p 58.
- **Zhang H. W., Song Y. C., Tan R. X.,** 2006 - Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, n°23, p.p. 753-771.
- **Zhang L., Yang J., Niu Q., Zhao X., Ye F., Liang L., Zhang K.Q.,** 2008 - Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n° 78, p.p.983–990.
- **Zhanga Y.,** 2012 - Alkaloids Produced by Endophytic Fungi: A Review. *Nat Prod Commun*, n° 7(7), p.p.963-8
- **Zhao J.T., Fu Y., Luo M., Zu Y., Wang W., Zhao C., Gu C.,** 2012 - Endophytic fungi from Pigeon Pea [*Cajanuscajan* (L.) Millsp.] Produce antioxidant Cajaninstilbene acid. *Journal of Agricultural and food chemistry*, n° 60, p.p.4314–4319.

Annexes

Annexe A :

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

Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) : (Jonsthor et Booth, 1983)

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	10000 ml
pH 6	autoclavage 20 min à 120°C

Milieu de culture PDB (Potato Dextrose Broth) : (Jonsthor et Booth, 1983)

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

Milieu de production de chitinase :

Pomme de terre	200 g
Chitine	20 g
Agar	15 g
Eau distillé	1000 ml
pH 6	autoclavage 30 min à 100°C

Annexe B :

Milieu de culture PVK : (Pikovskaya, 1948) :

(NH ₂) ₂ SO ₄	0,5 g
Extrait de levure	0,5 g
Phosphate bicalcique	5 g
KCL	0,2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
Glucose	10 g
Agar	17 g
MnsSO ₄	trace
FeSO ₄	trace
Bleu bromophénol	2 ml
Eau distillée	1000 ml
pH 6.7	autoclavage 30 min à 100°C

Annexe C :

Milieu de culture M9 Agar : (Miller, 1974)

Na ₂ GPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
Eau doublement distillée	1000 ml
Agar	20 g
pH 6.8	autoclavage 30 min à 100°C

Milieu de production de pectinase : (Cattelan et al., 1999)

Milieu minimum M9 agar + 10 g de pectine + 1,2 d'extrait de levure additionné de 2 ml bleu bromophénol

Milieu de culture Pepton agar medium : (Maria et al., 2005)

Peptone	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,1 g
Agar	16 g
Eau distillée	1000 ml
pH 6	autoclavage 30 min à 100°C

Milieu de production d'amylase :

Milieu minimum de Pepton Agar medium + 2 % d'amidon soluble

Annexe D :

Milieu de production de protéase :

Milieu minimum de Pepton Agar medium + 0,4 % de gélatine additionné de 2 ml de bleu de bromophénol

Milieu de culture GYP : (Maria et al., 2005)

Glucose	1 g
Extrait de levure	0,1g
Peptone	0,5g
Agar	16 g
Eau distillée	1000 ml

pH 6 autoclavage 30 min à 100°C

Milieu de production de Lipase :

Milieu minimum de GYP+ 10g de Tween 20 additionné de 2ml bleu bromophénol.

Milieu de production d'Estérase :

Milieu minimum de GYP+ 10g de Tween 80 additionné de 2ml bleu bromophénol.