

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEM
OCRATIQUE ET POPULAIRE**

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA-1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention

Du diplôme de master II en science de la nature et de la vie

Spécialité : biotechnologie microbienne

Thème

**Extraction des métabolites secondaires et l'évaluation de
l'activité enzymatique des champignons endophytes :
Aspergillus terreus et une souche affiliée a la famille de
*Botryosphaeriaceae***

Date de soutenance : le 14/07/2019

Présenté Par :

Belhoute Yasmine

Elkamr Chahrazed Aicha

Devant le jury composé de :

KRIMI Z.

MOHAMED MAHMOUD F.

DJELOUT H.

Professeur

M.C.B

Doctorante

U.S.D.B

U.S.D.B

U.S.D.B

Présidente

Promotrice

Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018/2019

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah, le clément et le miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre grande gratitude à notre promotrice Madame MOHAMED MAHMOUD.F Pour son encadrement et son aide précieuse.

A professeure KRIMI.Z de nous avoir accueillie au sein de l'équipe de laboratoire de la phytopathologie et de nous avoir accordé son temps, ses conseils avisés et de nous avoir honorée de présider le jury

A Madame DJELOUT. H d'avoir accepté d'être notre examinatrice

Nous remercions également Madame SELMA l'ingénieure de laboratoire de phytopathologie.

Un immense merci à Madame Bakhti et Monsieur Ben Aissa pour son accueil chaleureux lors de notre passage au niveau de laboratoire physico-chimique SAIDAL, nous exprimons également toute nos gratitude aux ingénieurs Kouider Amar.M , Hantabli.M, Zouambia.F et Ms. Taïbe du groupe SAIDAL, pour leurs aides et leurs gentillesse.

Nous adressons un grand merci à notre responsable d'option Pr BENCHABEN.

A tous nos enseignants,

Et nous remercions tous les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

DEDICACES

*C'est avec profonde gratitude et sincère mot, que je dédie ce modeste travail à mes chers
parents*

A mon frère bien aimé : Karim

A ma chère sœur : Lilya

À Mes oncles et mes tantes, spécialement à mon oncle Redha mouici

Tout amour et appréciation pour mes grands-parents qu'Allah vous garde et vous protège

A la mémoire de mon grand père

A Qui je souhaite la paix et Que Dieu lui offre le Paradis.

A mes cousines spécialement, Djalila et Nour

A mes meilleures chères amies Anissa et Selma

*Je vous remercie pour l'ambiance amicale, pour votre adorable compagnie et vos
encouragements. Je vous souhaite plein de succès et de bonheur.*

*A mon binôme Yasmine et la meilleure amie qui m'a accompagnée tout au long de ces
années avec sa gratitude et respect.*

Elkamr Aicha Chahrazed

DEDICACES

C'est avec profonde gratitude et sincère mot, que je dédie ce modeste travail à ma princesse maman Fadhlî.W et mon cher papa Abed'El Kader, qui m'ont donné l'amour, le courage et le soutien, je vous aime énormément mes chères parents.

A mon âme sœur Yassine qui m'a encouragé, m'a soutenu et m'a supporté durant tous mes parcours que j'ai suivis pour arriver à réussir

A mes chères sœurs : Sarah et Hadjer

A mon cher oncle Fadhlî Mohamed

Tout amour et appréciation pour ma grand-mère Fadhlî.K qu'Allah te garde et te protège

A la mémoire de mes grands pères

A Qui je souhaite la paix et Que Dieu lui offre le Paradis.

A mes meilleures chères amies Amel et Selma

Avec qui je partage des souvenirs d'une sincère et profonde amitié et des moments agréables. Je vous souhaite plein de succès et de bonheur.

A mon binôme Chahrazed et la meilleure amie qui m'a supporter durant tous ces années avec tous tendresse, amour et respect dont j'avais besoin

Belhout Yasmine

Sommaire

| | |
|---------------------------|----|
| Introduction | 01 |
|---------------------------|----|

Chapitre I : synthèse bibliographique

| | |
|---|----|
| 1. Les métabolites secondaires..... | 03 |
| 2. Les mycoendophytes un large réservoir de nouvelles molécules bioactives..... | 11 |
| 3. Généralité sur Les <i>Aspergillus</i> | 22 |
| 4. Généralité sur les <i>Botryosphaeriaceae</i> | 27 |

Chapitre II : matériels et méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Matériel..... | 31 |
| 1.1. Matériel biologique..... | 31 |
| 1.2. Matériel non biologique..... | 32 |
| 2. Méthodes..... | 33 |
| 2.1. Régénération des souches fongiques..... | 33 |
| 2.2. Purification des souches fongiques..... | 33 |
| 2.3. Fermentation et extraction des métabolites secondaires élaborés par les souches mycoendophytes..... | 33 |
| 2.4. Analyse des métabolites secondaires extraits des mycoendophytes..... | 39 |
| 2.5. Activité enzymatique..... | 42 |

Chapitre III : résultats et discussion

| | |
|--|----|
| 1. Résultats..... | 48 |
| 1.1. Analyse des extraits fongiques par (CCM)..... | 48 |
| 1.2. Analyse de l'extrait B 1283 par spectrométrie UV-visible..... | 55 |
| 1.3. Détermination de l'activité enzymatique..... | 57 |
| 2. Discussion..... | 65 |

| | |
|-------------------------|----|
| Conclusion | 69 |
|-------------------------|----|

| | |
|--|----|
| Références bibliographiques | 71 |
|--|----|

Extraction des métabolites secondaires et l'évaluation de l'activité enzymatique des champignons endophytes : *Aspergillus terreus* et une souche affiliée à la famille des *Botryosphaeriaceae*

Résumé

Afin de contribuer dans l'exploitation des métabolites secondaires d'origine naturelle via la recherche des nouvelles sources de substances bioactives, nous avons essayé d'analyser les métabolites secondaires sécrétés par quatre souches mycoendophytes, trois d'*Aspergillus terreus* et une souche affiliée à la famille des *Botryosphaeriaceae*, tout en mettant en évidence l'activité enzymatique de ces souches.

Les extraits des quatre champignons ont été analysés par la chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant trois systèmes de solvants, dont nous avons recherché la présence ou l'absence de deux composés antimicrobiens « l'ampicilline et le kétoconazole ». Le système solvant **A.AAR** n'a pas permis la séparation des extraits, en revanche le système **A.E.T.AAG** révèle une bonne séparation qui montre la présence des composés de nature acide aminée et l'absence d'ampicilline chez tous les extraits obtenus par l'acétate d'éthyle ; dans le cas de système **A.M** seulement un composé d'une seule souche d'*Aspergillus terreus* (B 1283) a été séparé ce qui révèle l'existence de l'antifongique kétoconazole dans ce extrait, ce dernier a été analysé par la spectrométrie UV-Visible qui confirme la présence d'environ 23 % de kétoconazole chez cette souche.

L'évaluation de la production de sept enzymes extracellulaires a été réalisée pour les souches fongiques étudiées; les résultats ont démontré que les quatre champignons endophytes produisent la chitinase. Seulement les souches d'*Aspergillus terreus* sont capables de produire la phosphatase et la protéase. Une souche d'*Aspergillus terreus* et une affiliée à la famille de *Botryosphaeriaceae* ont une activité lipasique, par contre tous les mycoendophytes ne synthétisent pas l'amylase, l'estérase et la pectinase.

Les résultats des tests réalisés montrent que les mycoendophytes utilisés représentent une source de production de molécules bioactives à concentration élevée qui possèdent un intérêt biotechnologique et pharmacologique.

Mot clés : Biotechnologie, l'UV-visible, la CCM, ampicilline, kétoconazole, activité enzymatique.

Extraction of secondary metabolites of endophytic fungi: *Aspergillus terreus* and *Botryosphaeriaceae*

Abstract

Secondary metabolites of natural origin constitute an enormous resource of effective treatments with low toxicity and with a minor impact on the environment. In order to contribute in exploitation of these molecules through the search for new sources of bioactive substances, we have tried to identify the secondary metabolites, secreted by mycoendophytic strains three of *Aspergillus terreus* and one of *Botryosphaeriaceae*, while highlighting the activity enzymatic of these strains.

The extracts of the four fungus obtained by ethyl acetate were analyzed by thin layer chromatography (TLC) which is sought for the presence or absence of two antimicrobial compounds « ampicillin and ketoconazole » ; 100% of the extracts tested show the absence of ampicillin but other compounds of amino acid nature and / or protein were found in these extracts. On the other hand, the *Aspergillus terreus* strain (B 1283) revealed the existence of the antifungal ketoconazole in its extract; the latter was analyzed by UV-Visible spectrometry, which confirms the presence of approximately 23% of ketoconazole in this strain.

The evaluation of the production of seven extracellular enzymes was performed for our fungal strains; the results demonstrated that 100% of mycoendophytes produce chitinase, 75% of the fungus produce phosphatase and protease, which are the strains of *Aspergillus terreus*. 50 % of the fungus represent lipase activity. otherwise all mycoendophytes don't synthesize amylase, esterase and pectinase.

The results of the tests carried out show that the mycoendophytes used represent a source of production of new bioactive molecules, which constitute a biotechnological interest.

Key words: Endophytic fungi, secondary metabolites, ampicillin, ketoconazole, enzymatic activity, *Aspergillus terreus*, *Botryosphaeriaceae*.

ملخص

استخراج ودراسة مواد الايض الثانوية للفطرياتالداخلية:

Aspergillus terreus, Botryosphaeriaceae

تمثل الأيضيات الثانوية ذات الأصل الطبيعي مورداً هائلاً للعلاجات الفعالة ذات اثار سلبية منخفضة وبتأثير بسيط على البيئة. من أجل المساهمة في استغلال هذه الجزيئات من خلال البحث عن مصادر جديدة للمواد الايضية الثانوية، حاولنا تحديد الأيضيات الأنزيمي لهذه *Aspergillus terreus* و *Botryosphaeriaceae* الثانوية، التي يفرزها سلالات فطرية مع إبراز النشاط السلالات

الطبقة الرقيقة تم تحليل مستخلصات الفطريات الأربعة التي تم الحصول عليها بواسطة أسيتات الإيثيل بواسطة كروماتوجرافيا للبحث عن مركبين "الأمبوسلين والكيوتوكونازول". 100 ٪ من المستخلصات التي تم اختبارها تظهر عدم وجود الأمبوسلين ولكن تم العثور على مركبات أخرى ذات طبيعة احماض امينية و / أو بروتينات.

من ناحية أخرى، كشفت سلالة عن وجود المضاد للفطريات الكيتوكونازول في مستخلصه، وقد تم تحليل هذا الأخير بواسطة مطياف الأشعة فوق البنفسجية المرئية الذي يؤكد وجود حوالي 23 ٪ من الكيتوكونازول في هذه السلالة.

تم اختبار إنتاج سبعة إنزيمات لسلالاتنا الفطرية. أظهرت النتائج أن 75 ٪ من الفطريات الداخلية تنتج الفوسفاتيز والبروتياز ، الليباز ، 50 ٪ من الفطريات تمثل نشاط الليباز. ينتج 100٪ الكيتيناز ضد الأميليز والإستيراز والبكتيناز ، والتي لا يتم تصنيعها بواسطة جميع الميكندوفيت

بالنسبة للنشاط الأنزيمي ، أظهرت الاختبارات النوعية أن 100٪ من الفطريات الداخلية الفطرية لا تنتج الأميليز والإستيراز والبكتيناز ، في حين يتم تصنيع الكيتينيناز بواسطة جميع الفطريات؛ في حالة البروتياز والفوسفاتيز فقط التي لها نشاط إيجابي. والآخر من *Aspergillus terreus* (T 2257). سلالات *Aspergillus terreus* سلالتان من الفطريات لها نشاط الليباز ، أحدهما *Botryosphaeriaceae* (AA 1101 (B))

أظهرت نتائج الاختبارات التي تم إجراؤها أن الكائنات الفطرية المختبرة لها أهمية في البيوتكنولوجيا وبشكل خاص كمصدر لجزيئات نشطة حيويًا.

Aspergillus الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية ، الايضية الثانوية ، الأمبوسلين ، الكيتوكونازول ، النشاط الأنزيمي ، *terreus*، *Botryosphaeriaceae*

Table de matières

Remercîment

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction.....01

Chapitre I : synthèse bibliographique

1. Les métabolites secondaires.....03

1.1.Définition des métabolites secondaires.....04

1.2.Classification.....05

1.2.1. Les alcaloïdes.....05

1.2.2. Les terpènes et terpénoïdes.....07

1.2.3. Les polycétides.....08

1.2.4. Peptide non ribosomique.....08

1.3.La biosynthèse des métabolites secondaire chez les microorganismes.....08

1.4.Rôles des métabolites secondaires.....11

1.4.1. Activités pharmacologiques.....11

1.4.2. Activités biologiques.....11

2. Les mycoendophytes un large réservoir de nouvelles molécules bioactives.....11

2.1.Définition et historique des champignons endophytes.....14

2.2.Diversité et taxonomie des champignons endophytes.....15

2.3.Colonisation des champignons endophytes.....17

2.4.Interaction champignon-hôte.....17

2.5.Rôles des champignons endophytes.....18

2.5.1. Aspect pharmacologique.....18

2.5.2. Aspect écologique.....19

2.5.2.1.Rôle physiologique chez les plantes-hôtes.....19

| | |
|--|----|
| 2.5.2.2. Protection contre les herbivores..... | 20 |
| 2.5.2.3. Protection contre les insectes..... | 20 |
| 2.5.2.4. Réduction des nématodes..... | 21 |
| 2.5.2.5. Protection contre les microorganismes pathogènes..... | 21 |
| 3. Généralité sur Les <i>Aspergillus</i> | 22 |
| 3.1. <i>Aspergillus terreus</i> | 23 |
| 3.2. Les métabolites secondaires produits par <i>Aspergillus terreus</i> | 24 |
| 4. Généralité sur les <i>Botryosphaeriaceae</i> | 27 |
| 4.1. Les métabolites secondaires produits par <i>Botryosphaeriaceae</i> | 30 |

Chapitre II : matériels et méthodes

| | |
|--|----|
| 1. Matériel..... | 31 |
| 1.1. Matériel biologique..... | 31 |
| 1.1.1. Endophytes fongiques..... | 31 |
| 1.2. Matériel non biologique..... | 32 |
| 2. Méthodes..... | 33 |
| 2.1. Régénération des souches fongiques..... | 33 |
| 2.2. Purification des souches fongiques..... | 33 |
| 2.3. Fermentation et extraction des métabolites secondaires élaborés par les souches mycoendophytes..... | 33 |
| 2.4. Analyse des métabolites secondaires extraits des mycoendophytes..... | 39 |
| 2.4.1. La chromatographie sur couche mince..... | 39 |
| 2.4.2. Identification par UV-Visible..... | 42 |
| 2.5. Activité enzymatique..... | 42 |
| 2.5.1. Chitinase..... | 42 |
| 2.5.2. Amylase..... | 42 |
| 2.5.3. Protéase..... | 43 |
| 2.5.4. Lipase et estérase..... | 43 |
| 2.5.5. Phosphatase..... | 43 |
| 2.5.6. Pectinase..... | 44 |

Chapitre III : résultats et discussion

| | |
|--|----|
| 1. Résultats..... | 48 |
| 1.1. Analyse des extraits fongiques par CCM..... | 48 |
| 1.1.1. Choix du système de solvant de migration..... | 48 |

| | | |
|------------------------------------|--|----|
| 1.1.2. | La mise en évidence de présence ou absences des composés antimicrobiens. | 50 |
| 1.1.2.1. | Révélation d'ampicilline et des acides aminés..... | 50 |
| 1.1.2.2. | Révélation de kétoconazole..... | 53 |
| 1.2. | Analyse de l'extrait B 1283 par spectrométrie UV-visible..... | 55 |
| 1.3. | Détermination de l'activité enzymatique..... | 57 |
| 2. | Discussion..... | 65 |
| Conclusion | | 69 |
| Références bibliographiques | | 71 |
| Annexes | | |

Liste des tableaux

| N° | Intitulé | page |
|----|--|------|
| 01 | Aperçu de certains métabolites secondaires des mycoendophytes avec une activité biologique au cours des dernières années. | 13 |
| 02 | Classification des champignons endophytes selon les critères symbiotique. | 16 |
| 03 | Les <i>Aspergillus</i> producteurs des métabolites secondaires. | 23 |
| 04 | Quelques espèces de <i>Botryosphaeriaceae</i> producteurs de métabolites secondaires. | 30 |
| 05 | Origine et provenance des endophytes fongiques. | 31 |
| 06 | Les différents systèmes solvants pour la CCM. | 40 |
| 07 | Récapitulation d'efficacité des différents systèmes solvants pour la CCM. | 48 |
| 08 | Les résultats de détection de l'ampicilline et des acides aminés dans les extraits d' <i>Aspergillus terreus</i> obtenus par l'acétate d'éthyle. | 51 |
| 09 | Résultat des différents tests d'activités enzymatiques. | 57 |
| 10 | Croissance mycélienne des champignons endophytes en présence de la chitine après 10 jours. | 57 |

Listes des figures

| N° | Intitulé | page |
|----|---|------|
| 01 | Structure chimique de : A : d'alcaloïde, B : du terpène, C : du terpénoïde. | 06 |
| 02 | Les principales voies des métabolites secondaires fongiques. | 10 |
| 03 | Les classes des mycoendophytes selon la localisation des tissus colonisés. | 16 |
| 04 | Racine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> recouverte par un maillage d'hyphes de <i>Colletotrichum tofieldiae</i> . | 20 |
| 05 | La compétition entre champignon endophyte et champignon phytopathogènes. | 22 |
| 06 | Aspect microscopique d' <i>Aspergillus terreus</i> . | 26 |
| 07 | Aspect macroscopique <i>Aspergillus terreus</i> . | 26 |
| 08 | Aspect de jeunes cultures en boîte de Pétri d'une espèce de Botryosphaeriaceae. | 28 |
| 09 | Asque de <i>Botryosphaeria parva</i> . | 28 |
| 10 | Conidie de <i>Diplodia serratia</i> . | 29 |
| 11 | Les conidies de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> . | 29 |
| 12 | Conidies de <i>Diplodia mutila</i> . | 30 |
| 13 | Les mycoendophytes étudiés. A : Botryosphaeriaceae ; B, C, D : <i>Aspergillus Terreus</i> . | 32 |
| 14 | Fermentation et extraction des champignons endophytes avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme. | 34 |
| 15 | Préparation des disques mycéliens. | 35 |
| 16 | Inoculation des disques mycéliens dans le milieu PDB. | 26 |
| 17 | Flacons contenant les disques mycéliens déposés dans l'agitateur électrique. | 37 |
| 18 | Filtration du bouillon de culture. | 37 |
| 19 | Centrifugation du bouillon de culture. | 37 |
| 20 | Séparation du mélange (extrait + solvant) par décantation. | 38 |
| 21 | Concentration de la phase organique par évaporation du solvant. | 38 |
| 22 | Préparation des échantillons pour la CCM. | 39 |

| | | |
|----|--|----|
| 23 | Injection des échantillons dans la plaque CCM. | 40 |
| 24 | La cuve chromatographique. | 40 |
| 25 | Le rapport frontal RF. | 41 |
| 26 | Inoculation des disques mycéliens dans le milieu tests Chitinase. | 44 |
| 27 | Inoculation des disques mycéliens dans les milieux tests. A : Amylase, B : Protéase. | 45 |
| 28 | Inoculation des disques mycéliens dans les milieux tests. A : Lipase, B : Estérase . | 46 |
| 29 | Inoculation des disques mycéliens dans les milieux tests. A : Phosphatase, B : Pectinase . | 47 |
| 30 | Révélation des chromatogrammes par UV développées dans le système solvant A.AAR . | 49 |
| 31 | Révélation des chromatogrammes par le réactif niyhdrine développées dans le système solvant A.AAR . | 49 |
| 32 | Révélation des chromatogrammes des extraits d' <i>Aspergillus terreus</i> obtenus par l'acétate d'éthyle par UV développées dans le système solvant A.E.T.AAG . | 52 |
| 33 | Révélation des chromatogrammes des extraits d' <i>Aspergillus terreus</i> obtenus par l'acétate d'éthyle par le réactif niyhdrine développées dans le système solvant A.E.T.AAG . | 52 |
| 34 | Révélation des chromatogrammes des extraits obtenus par l'acétate d'éthyle par UV développées dans le système solvant A.M . | 54 |
| 35 | Révélation des chromatogrammes des extraits obtenus par l'acétate d'éthyle par le réactif niyhdrine développées dans le système solvant A.M . | 54 |
| 36 | Spectre d'absorption de kétoconazole. | 56 |
| 37 | Spectre d'absorption de l'extrait de la souche B 1283 d' <i>Aspergillus terreus</i> obtenus par acétate d'éthyle. | 56 |
| 38 | Comparaison du diamètre de la croissance mycélienne des champignons endophytes en présence de la chitine et su le milieu PDA. | 58 |

| | | |
|----|---|----|
| 39 | Croissance mycélienne des champignons endophytes en présence de la chitine. | 58 |
| 40 | L'activité pectinolytique des champignons endophytes. | 59 |
| 41 | L'activité amylasique des champignons endophytes. | 60 |
| 42 | L'activité estérasique des champignons endophytes. | 61 |
| 43 | L'activité phosphatasique exercée par les champignons endophytes. | 62 |
| 44 | L'activité protéasique exercée par les champignons endophytes. | 63 |
| 45 | L'activité lipasique exercée par les champignons endophytes. | 64 |

Liste des abréviations

A : *Aspergillus*.

A.AAR : Acétone/solution d'acétate d'ammonium R de 154 g/l ajustée à pH=5 avec l'acide acétique glacial R (10/90)

A.E.T.AAG : Acétone/eau/toluène/acide acétique glacial (650/100/100/25)

AgNP : Nanoparticules d'argent.

AM : Acétate d'éthyle-méthanol 100/15.

C : Celsius.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CMI : Concentration minimal inhibitrice.

Co : Coenzyme.

CPG : chromatographie en phase gazeuse

DES : Dark Septate Endophytes.

GYP : Glucose yeast extract peptone.

HA : Les avantages adaptés à l'habitat.

HPLC : La chromatographie liquide à haute performance.

IAA : L'indole-3, l'acide acétique.

INRA : Institut national de la recherche agronomique.

IPP : Isopentyl PyroPhosphate.

NHA : Les avantages non adaptés à l'habitat.

NRP : Non ribosomal peptide.

NRPS : Non ribosomal peptide synthétase.

PDA : Potato Dextrose Agar.

PDB : Potato dextrose broth.

PVK : Pivoskaya

RF : Le rapport frontal.

Rpm : Rotation par minute.

UV : Ultrat violet.

6PAP : 6-pentyl- α -pyrone.

Vis : visible

1. Les métabolites secondaires :

L'étude du métabolisme secondaire des microorganismes ces dernières décennies a conduit à la découverte de nombreuses molécules, le plus souvent dans une optique d'utilisation thérapeutique. Cette partie propose d'explicitier les différents usages possibles des métabolites secondaires (Haas, 2015).

L'émergence de nouvelles maladies, le développement de résistances aux médicaments, l'augmentation de l'incidence des infections microbiennes et les risques de toxicité associée à l'utilisation excessive des médicaments et des antibiotiques, constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. La propagation de ce phénomène pousse les chercheurs à développer de nouvelles molécules d'intérêts thérapeutiques afin d'obtenir de nouveaux médicaments qui seraient efficaces, possédant une faible toxicité et ayant un impact mineur sur l'environnement (Dambolena et al., 2016).

L'exploitation des microorganismes pour la recherche des nouvelles molécules bioactives est amorcée par Alexander Fleming en 1928 par la découverte de la pénicilline chez le champignon *Penicillium notatum*, suivie par la découverte de la streptomycine par Waksman en 1944 chez les *Streptomyces griseus* ce qui annonce l'âge d'or de la découverte d'antibiotiques (Woodruff, 2014).

Au sein d'une très large diversité, certaines bactéries et champignons se démarquent par la richesse de leurs métabolites secondaires. Chez les bactéries ; les *Bacillus*, les *Pseudomonas* et les actinomycètes tel que les *Amiclatopsis*, *Micromonospora*, *Salinospora* ou plus spécialement les *Streptomyces* sont particulièrement prolifiques pour la production d'une large gamme des métabolites secondaires qui représentent la source de la majorité des composés bioactifs utilisés par l'homme. Ainsi les champignons filamenteux des genres *Penicillium* et *Aspergillus* constituent des modèles excellents pour la recherche de nouvelles molécules bioactives (Sanchez et al., 2012).

Les métabolites secondaires trouvés chez les microorganismes sont très diversifiés et représentent de nombreuses activités biologiques. On peut citer les bactéricides, les bactériostatiques (on parle alors d'antibiotiques) et les antifongiques.

D'autres composés peuvent jouer un rôle dans la régulation du métabolisme de l'organisme. Quelques molécules peuvent également servir à la communication entre les cellules (quorum sensing) (Valan, 2008).

Certains métabolites secondaires jouent le rôle d'inhibiteurs d'enzymes, sont capables d'agir sur le niveau d'efficacité d'enzymes du métabolisme primaire et de diminuer celui-ci. Ces propriétés ont donné lieu à de nombreuses applications notamment en médecine, comme la lovastatine (isolée chez *Aspergillus terreus*) qui est capable d'inhiber l'action de la réductase d'HMG-CoA, une enzyme permettant la synthèse du mévalonate, précurseur du cholestérol (Haas, 2015).

Ainsi, Certains souches de *Trichoderma sp* sont utilisées commercialement pour la production des cellulases et d'autres enzymes qui dégradent les polysaccharides complexes. Il est fréquemment employé dans les industries alimentaires et textiles (Howell, 2003).

Les espèces *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma koningii* peuvent produire l'antibiotique 6-pentyl- α -pyrone (6PAP) ; c'est un antibiotique appartient au métabolites volatiles et jouant un rôle dans la lutte biologique à l'égard des champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum* (Jeleh et al., 2013 ; Blaszczyk et al.,2011) .

1.1. Définition des métabolites secondaires :

Les composés naturels synthétisés par les microorganismes sont nombreux parmi eux il y a les métabolites secondaires.

Ces métabolites sont généralement définis comme étant des molécules de faible poids moléculaire, habituellement sont produits pendant la phase de croissance tardives (idiophase), impliqués indirectement dans le développement et la reproduction de l'organisme, ainsi, procurent à l'organisme un avantage généralement écologique ; par opposition aux métabolites primaires qui interviennent dans le fonctionnement vital de l'organisme (Suryanarayanan et Thennarasan, 2004 ; Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

Ces métabolites secondaires sont des composés biologiquement actifs qui peuvent être utilisés comme source potentielle dans le domaine pharmaceutique,

agricole et industriel, ils possèdent un large spectre d'activité biologique comprenant des composés antimicrobiens, antiviraux, immunosuppresseurs, agents anticancéreux, antioxydants et insecticides ...etc (Suryanarayanan et Thennarasan, 2004 ; Demain et Sanchez, 2009 ; Zhao et *al.*, 2010 ; Miracl, 2018).

1.2. Classification :

Grâce aux améliorations techniques, le nombre de produits naturels découverts ces dernières années dépasse un million, environ 5% sont d'origine microbienne (Hyde et Soyong, 2008).

Les métabolites secondaires des microorganismes sont très variés avec une grande diversité structurale. Leur classification est basée sur la structure chimique (présence de sucre), la composition (présence ou absence d'azote) et la voie par laquelle ils sont synthétisés.

Les classes chimiques les plus retrouvées sont les alcaloïdes, les peptides non ribosomiques, les polycétides et les terpènes (Bruneton, 2009).

1.2.1. Les alcaloïdes :

Un alcaloïde est un composé organique naturel, hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (figure 01) (Bruneton, 2009).

Ils 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. Selon Bruneton (2009) ils sont classés en 3 groupes :

- **Les alcaloïdes vrais** : Synthétisés à partir d'acides aminés, ils ont leur atome d'azote inclus dans un hétérocycle,
- **Les pseudo-alcaloïdes** : Non dérivés d'acides aminés, généralement leur atome d'azote est inclus dans un hétérocycle,
- **Les proto-alcaloïdes** : Amines simples synthétisées à partir d'acides aminés, dont l'atome d'azote n'est pas inclus dans un cycle.

Les alcaloïdes présentent fréquemment de propriétés pharmacologiques marquées et ont de nombreuses utilisations en thérapeutique, notamment au niveau de système nerveux central, du système nerveux autonome et du système cardiovasculaire. On notera aussi l'existence d'antitumoraux, d'antiparasitaires et de curarisants (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

Cependant, il existe une pléthore de champignons produisant des alcaloïdes, ayant différentes structures et activités biologiques. Trois alcaloïdes nouveaux, **la lyconadine D**, **la lyconadine E** et **la complanadine E** ont été isolés de *Lycopodium complanatum* (Ishiuchi et al., 2011).

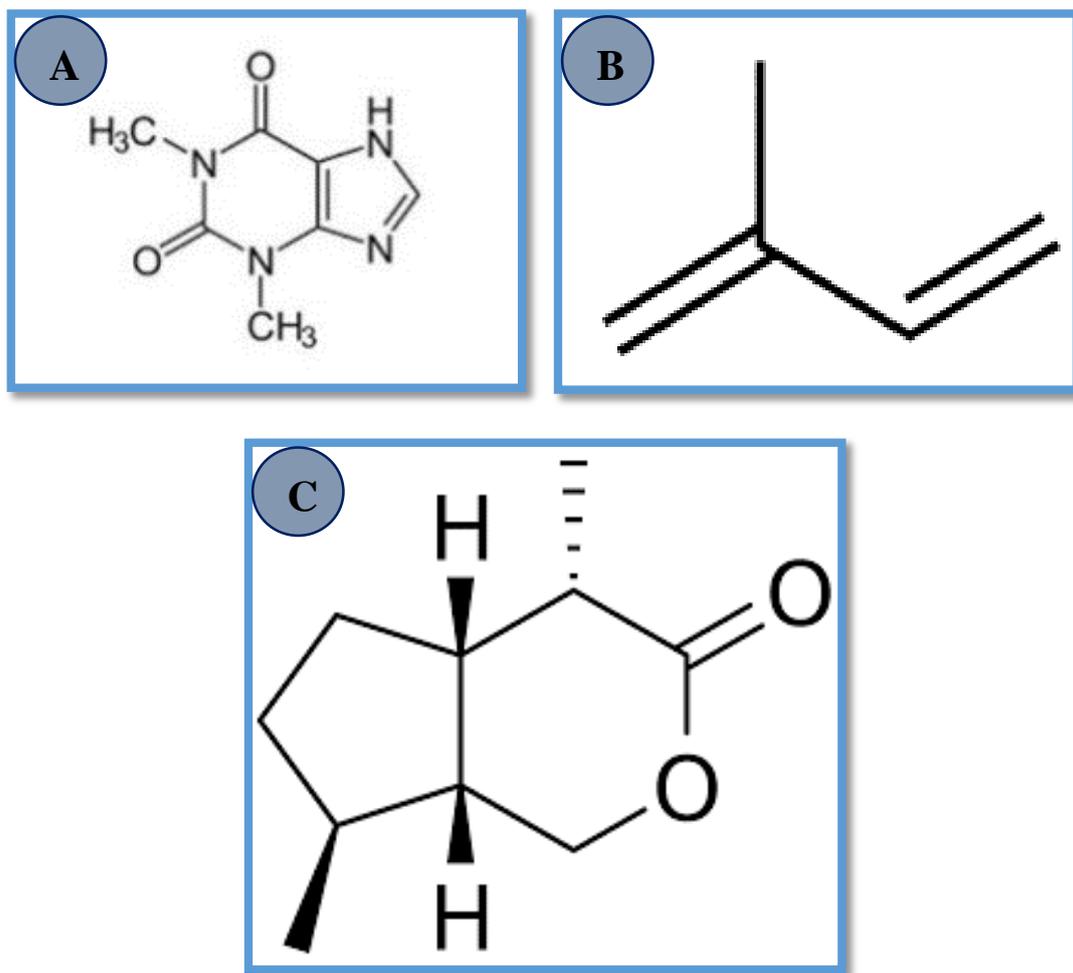


Figure 01 : Structure chimique de : **A** : d'alcaloïde (Keller et al., 2005), **B** : du terpène (Strobel et al., 1999), **C** : du terpénoïde (Strobel et al., 1999).

1.2.2. Les terpènes et terpénoïdes :

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures naturels produits à partir d'Isopentyl PyroPhosphate (IPP). Leur squelette carboné est composé de plusieurs unités d'isoprènes (diène 35 composé de 5 carbones), qui mises bout-à-bout, forment une molécule pouvant être cyclique ou linéaire (Toubal, 2017).

Leurs formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont x : est variable en fonction de degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les poly terpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc), la molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016) (figure 01).

Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique et ils sont formés du couplage de plusieurs unités isopréniques (Strobel et *al.*, 1999).

Les terpènes représentent une large famille de métabolites secondaires possédant des structures variées. Ces métabolites peuvent avoir différentes activités biologiques. Ils possèdent des propriétés antibiotiques comme le pentalenolactone ou le terpène glycoside phénalinolactone (Binz et *al.*, 2008).

Les terpénoïdes ont des structures analogues aux terpènes (structure isoprène multiple de 5 carbones) (figure 01) mais ne sont pas des hydrocarbures. Par exemple ils possèdent des atomes d'oxygènes donnant lieu à des groupements alcools ou cétones (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

Ils sont issus à partir des précurseurs d'acétyl CoA ou de malonyl CoA., et formés de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (polymères de l'isoprène) (Toubal, 2017).

Les terpénoïdes ont un intérêt qui conditionne leur utilisation en médecine par leurs propriétés différentes contre les poux de tête adultes, effets ovicides, et aussi pour des propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires, antivirales et antioxydantes (Dambolena et *al.*, 2016).

On retrouve parmi les terpénoïdes remarquables produits par des champignons les dérivés de l'acide gibbérélique, produit notamment par l'espèce *Aspergillus fumigatus*, endophyte du Soja (Khan et *al.*, 2011).

Ces composés des phytohormones 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. On les utilise pour augmenter la taille des fruits et leur teneur en sucre (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

1.2.3. Les polycétides :

Les polycétides (ou polyacétates) sont les métabolites secondaires les plus fréquents chez les champignons. Leurs structures et leurs fonctions sont très diverses. Ils sont synthétisés par des polycétides synthases de type I ; Il s'agit d'une protéine multi-domaine (Keller et *al.*, 2005).

Ces métabolites secondaires sont utilisés surtout dans le domaine pharmacologiques ; comme la lovastatine, la codinaeopsine et l'acide cytosporique (Raghunath et *al.*, 2012).

1.2.4. Peptide non ribosomique :

Les peptides non ribosomiques (Non Ribosomal Peptide : NRP) constituent l'une des principales familles de métabolites secondaires. Ces molécules sont assemblées par des méga-complexes enzymatiques appelés synthétases de peptides non ribosomiques (Non Ribosomal Peptide Synthetase : NRPS) (Haas, 2005).

Ils sont fréquemment produits par des champignons comme par exemple la cryptocandine A (antimycosique) décrite chez *Cryptosporiopsis cf. quercina* (strobel et *al.*, 1999).

1.3. La biosynthèse des métabolites secondaire chez les microorganismes :

La production des métabolites secondaires n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même, ils les produisent après avoir terminé leur phase de croissance et avoir entamé la phase stationnaire (Sanchez et Demain, 2002).

Les métabolites secondaires sont formés par voie enzymatique qui se produit via des protéines individuelles, libres ou complexe, ou à travers des grandes parties multifonctionnelles polypeptides effectuant une multitude de réactions enzymatiques. Par exemple, les polykétides synthases et les peptides synthétases (Demain, 1998).

Les gènes codant pour les enzymes de métabolite secondaire est généralement chromosomique. Seulement quelques-uns des gènes de biosynthèse se sont avérés être des plasmides (Martinez-Bueno et *al.*, 1990). Que ce soit chromosomique ou plasmidique, les gènes du métabolite secondaire sont généralement regroupés. Chez les champignons des grappes de gènes biosynthétiques ont été trouvés pour les processus biosynthétiques ; de stérigmatocystine chez *Aspergillus nidulans* et de trichothécènes chez *Fusarium sporotrichioides* (Hohn et *al.*, 1995 ; Brown et *al.*, 1996)

La nature temporelle du métabolisme secondaire est certainement de nature génétique mais l'expression peut être grandement influencée par l'épuisement d'un nutriment, ou l'addition d'un inducteur et / ou par une diminution de taux de croissance (Bibb, 2005). Comme la formation des antibiotiques est également régulée par des nutriments (Azote, phosphore et source de carbone), métaux, taux de croissance, rétroaction et inactivation enzymatique (Sanchez et demain, 2002).

Les principales voies de biosynthèse impliquées dans la production du métabolite secondaire sont ceux qui forment des composés aromatiques, isoprènes, oligosaccharides, peptides, polykétides et anneaux de beta-lactame. De nombreux intermédiaires peuvent être utilisés pour les produire : les terpènes sont synthétisés à partir du mévalonate, les polycétides ont pour origine le malonyl CoA (malonyl Coenzyme A), les alcaloïdes et les peptides utilisent des acides aminés (Demain, 2012) (figure 02).

1.4. Rôles des métabolites secondaires :

Les microorganismes sont capables de produire des molécules d'intérêt très diverses tant sur le plan chimique que sur le plan de leurs activités (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

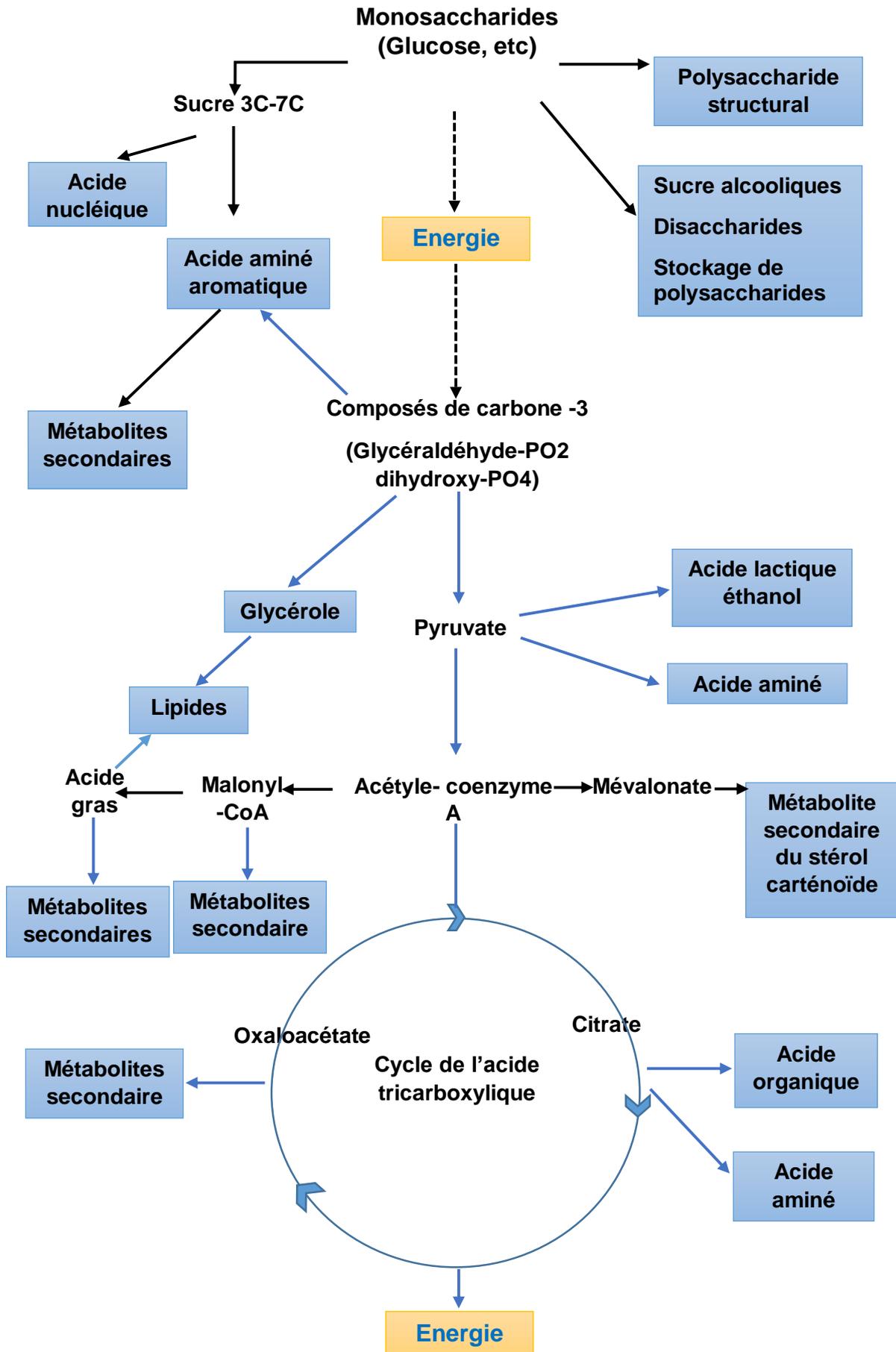


Figure 02 : Les principales voies des métabolites secondaires fongiques (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

1.4.1. Activités pharmacologiques et biologiques :

Les métabolites secondaires possèdent une activité pharmacologique significative, ils sont utilisés comme : anticancéreux, antimigraineux, antibiotiques, antidépresseurs, antidiabétiques, anti-inflammatoires, immunosuppresseurs et hypolipémiants

Les métabolites secondaires ont des fonctions biologiques qui peuvent s'avérer essentiels ; comme armes de compétition utilisées contre bactéries, amibes, plantes, insectes et animaux, en tant qu'agents de transport de métaux, en tant qu'agents de symbiose entre microbes et plantes, nématodes, insectes et animaux supérieurs; sous forme d'hormones sexuelles et comme effecteurs de différenciation (Zhang et *al.*, 2006). Ils ont un rôle dans la communication (hormones et phéromones...ect) entre plantes, micro-organismes, insecte ou animaux comme les parfums isoprénoïdes volatils des plantes qui attirent les insectes pollinisateurs (essentiels pour la reproduction) (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016)

2. Les mycoendophytes un large réservoir de nouvelles molécules bioactives :

Les champignons endophytes sont considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (Strobel et *al.*, 2004; Tan et Zou, 2001) (tableau 01). Ces champignons produisent le plus grand nombre de métabolites secondaires par rapport aux autres catégories d'endophytes (Zhang et *al.*, 2006). Donc, ils présentent un intérêt économique très important.

La connaissance de la biologie de ces mycoendophytes permet de maîtriser de mieux en mieux leurs capacités de synthétiser ces molécules bioactives.

Schulz et *al.* (2002), ont isolé approximativement 6500 espèces mycoendophytes et ont testé leurs potentiels biologiques. Ils ont analysé 135 métabolites secondaires et ont trouvé que 51% de composés bioactifs sont de nouveaux produits naturels (Hyde et Soyong, 2008).

La valorisation et l'exploitation de ces principes actifs d'origine naturelle a été progressé grâce à des nouvelles techniques. Parmi les méthodes les plus utilisées dans ce genre de recherche est la chromatographie et la spectroscopie.

Les techniques chromatographiques sont développés avec une rapidité au cours de ces 40 dernières années. La chromatographie est aujourd'hui une méthode puissante d'analyse qualitative et quantitative comme la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Neilson, 2000).

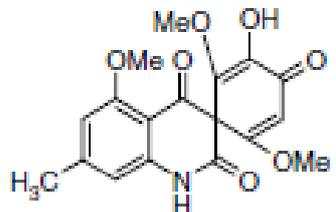
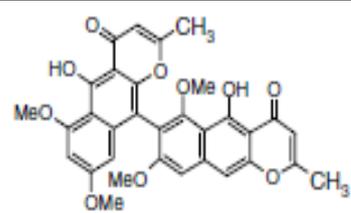
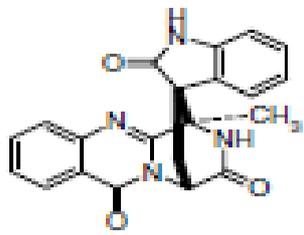
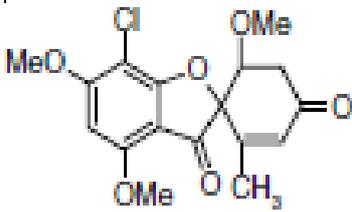
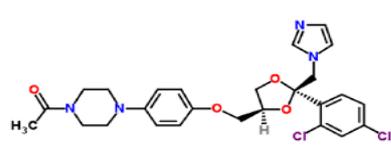
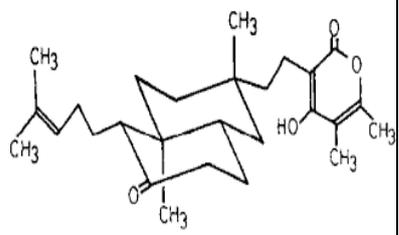
La spectroscopie aujourd'hui consiste la technique la plus utilisée en chimie, physique et biologie pour extraire des informations du monde microscopiques. Elle permet de sonder la matière pour la mise en évidence quantitative et qualitative des molécules qui composent cette matière. Il existe plusieurs méthodes spectroscopiques comme Spectrophotométrie UV-Visible (UV-Visible), Spectroscopie infrarouge (IR) et Spectrométrie de masse (SM)...etc (Glasser, 1987).

2.1. Définition et historique des champignons endophytes :

Le terme endophyte vient du grec. Etymologiquement, il signifie « à l'intérieur d'une plante » (Schulz et Boyle, 2005). Il a été employé et défini pour la première fois par De Bary en 1866 comme un organisme colonisant asymptotiquement un végétal supérieur (Wilson et Carroll, 1994).

Cette définition a été modifiée plusieurs fois ; la plus acceptée et utilisée décrite les endophytes comme étant tous les micro-organismes vivants dans les tissus végétaux internes au moins pour une durée de leurs cycles de vie et peuvent coloniser les tissus internes des plantes sans causer des dommages apparents chez l'hôte, bien qu'ils puissent après une période de latence ou d'incubation causer de maladies (Petrini et *al.*, 1992).

Tableau 01 : Aperçu de certains métabolites secondaires des mycoendophytes avec une activité biologique au cours des dernières années.

| Nom de champignon | Plante hôte | Métabolite | Activité biologique | Structure | Références |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------|---|--|---|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Cynodon dactylon</i> | Asperfumoid | Inhiber la croissance de <i>Candida albicans</i> |  | (Liu <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Aspergillus niger</i> | <i>Cynodon dactylon</i> | Rubrofusarin b | Inhibiteur de la protéine de cancer du côlon xantin, oxydase et certains agents pathogènes microbiens |  | (Song <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Eupenicillium spp</i> | <i>Murraya paniculata</i> | Alantryphenone | Insecticide |  | (Fabio <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Xylaria sp.F0010</i> | <i>Abies holophylla</i> | Griseofulvine | Antifongique |  | (Park <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Aspergillus clavatonanicus</i> | <i>Mirabilis jalapa L.</i> | ketoconazole | Antifongique |  | (https://pubche.m.ncbi.nlm.nih.gov) |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> | <i>Melia azedarach</i> | Pycnophorin | Antimicrobien |  | (Weber <i>et al.</i> , 2004) |
| | | | | | |

Les divers investigateurs ont défini par conséquent les endophytes par différentes manières qui dépendent habituellement de la perspective dans laquelle les endophytes étaient isolés et plus tard identifiés. 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 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).

Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolés en tant qu'endophytes, ce sont des champignons présents dans divers végétaux ; et qui sont capables de coloniser les tissus sains internes des plantes ; se développent sous la couche des cellules épidermiques sans affecter négativement ou altérer le statut biologique et physiologique du partenaire végétal et former donc un type de croissance asymptomatique dessine l'une des images de la symbiose mutuelle établies dans l'environnement (Strobel et *al.*, 2004 ; Zhao et *al.*, 2010 ; Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

L'existence de ces champignons est connue depuis la fin du 19^{ème} siècle. Les premiers fossiles de mycoendophytes remontent aux temps où les plantes supérieures sont apparues sur terre (Redecker et *al.*, 2000).

Depuis les cinquante dernières années, des publications se sont progressivement intensifiées, mais c'est à partir de la fin du 20^{ème} siècle que les champignons endophytes ont réellement attiré l'attention avec la découverte de la production de plusieurs molécules bioactives (antimicrobien, antioxydants, biopesticides et anticancéreux...etc) comme l'anti-cancéreux Paclitaxel par l'endophyte *Taxomyces andreanae* (Stierle et *al.*, 2013).

2.2. Diversité et taxonomie des champignons endophytes :

Les champignons endophytes constituent un groupe polyphylétique très diversifié omniprésent, sont majoritairement issus du phylum d'Ascomycota ; cependant certains appartiennent à d'autres taxons tels que les *Deuteromycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* et les *Oomycota*.

Ils sont ubiquistes ; établissent des associations avec une multitude d'espèces végétales appartenant aux diverses familles botaniques ; des plantes allant des grands arbres, palmier, les graminées marines, les forêts et même à partir des lichens, qui colonisent à leur tour une vaste gamme de biotopes (Saar *et al.*, 2001 ; Arnold, 2007).

En 1990, la diversité fongique était estimée à 1,5 million d'espèces. Les estimations en 2008 montrent que plus de 90 % d'espèces de champignons endophytes ne sont pas décrites et seulement 80.000 à 100.000 espèces ont été décrites (Huang *et al.*, 2008 ; Shipunov *et al.*, 2008 ; Fernandes *et al.*, 2009).

Selon Rodriguez *et al.* (2009) ; les mycoendophytes sont classés en quatre groupes majeurs en fonction de six propriétés qui sont : les tissus colonisés, modèle de colonisation des plantes, gamme d'hôte, niveaux de biodiversité des plantes, fonctions écologiques et mécanismes de transmission entre les générations d'hôtes (Tableau 02) (Figure 03).

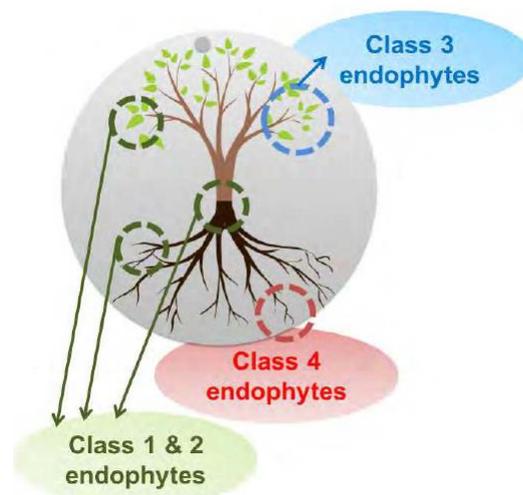


Figure 03 : Les classes des mycoendophytes selon la localisation des tissus colonisés (Kusari *et al.*, 2011)

Tableau 02 : Classification des champignons endophytes selon les critères symbiotique. **NHA :** Les avantages non adaptés à l'habitat, tels que la tolérance à la sécheresse et l'amélioration de la croissance, sont courants chez les mycoendophytes, 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 (Rodriguez et *al.*, 2009).

| les critères | <i>Clavicipitaceae</i> | <i>Non clavicipitaceae</i> | | |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------|------------|------------|
| | Classe 1 | Classe 2 | Classe 3 | Classe 4 |
| La gamme d'hôte | Petite | Large | large | large |
| Tissus(s) colonisé(s) | Tige et rhizome | Tige, racine et rhizome | Tige | racine |
| Colonisation des plantes | Extensif | Extensif | limité | extensif |
| La biodiversité des plantes | Faible | Faible | élevé | inconnue |
| transmission | Vertical et horizontal | Vertical et horizontal | horizontal | horizontal |
| Avantage(s) | NHA | NHA et HA | NHA | NHA |

2.3. Colonisation des champignons endophytes :

La colonisation des membres du règne végétale par les champignons endophytes est ubiquiste. Une même espèce de champignon endophyte est capable de coloniser plusieurs hôtes différents et chaque hôte peut être colonisé par différentes espèces, dont les multiples couches des tissus sont utilisées comme habitat (Oses et *al.*, 2008).

La spécificité des champignons endophytes à l'égard de la plante hôte est déterminée par plusieurs facteurs : Des régulateurs de nature chimique, le génotype de l'hôte, la période de l'année et des facteurs physico-chimiques environnants.

La colonisation des tissus internes des plantes hôtes par les mycoendophytes, peut être intracellulaire et limitée à quelques cellules individualisées, intercellulaire localisé ou systémique, ou bien à la fois intra et intercellulaire formant des structures de sclérote, elle peut s'avérer limitée au système racinaire comme pour les endophytes noirs cloisonnés ou DES (Dark Septate Endophytes), confinée au feuilles et aiguilles, intercellulaire à la fois au niveau des racines et des jeunes pousses, ou adapté à une croissance au niveau de l'écorce (Fisher et Petrini, 1987 ; Jumpponen, 2001 ; Schulz et Boyle, 2005 ; Suryanarayanan, 2009 ; Stone et *al.*, 2014).

A l'échelle de la partie colonisée de la plante hôte, les champignons endophytes sont ainsi repartis en mycoendophytes colonisateurs des feuilles et des pousses, du phloème, du xylème et des racines (Shipunov et *al.*, 2008).

2.4. Interaction champignon-hôte :

Les champignons endophytes recouvrent une grande diversité d'organismes. On retrouvera ainsi un large spectre d'interactions différentes entre la plante et les mycoendophytes. Ces interactions sont le résultat de multiples stratégies de vie, différentes d'un mycoendophyte à un autre et d'un hôte à un autre (Schulz et Boyle, 2005).

Elles dépendent des facteurs abiotiques, des interactions avec d'autres espèces, de la géographie et de la phylogénie et varient de l'antagonisme au mutualisme, c'est pour cette raison que la gamme d'interactions mycoendophyte-hôte est considérée comme un continuum (Saikkonen et *al.*, 1998 ; Zabalgoitia, 2008).

Ainsi, une plante peut abriter des organismes plus ou moins bénéfiques pour elle. Dans le cas d'une interaction mutualiste où la plante et le champignon retirent un avantage, le mycoendophyte se transmette verticalement par croissance dans les graines. Par contre, si le champignon est transmis horizontalement par les spores il sera hostile à cause de l'arrêt de production de semences de l'hôte provoqué par le mycoendophyte antagoniste (Scharidl et *al.*, 2004).

Certains mycoendophytes sont des saprophytes ou l'interaction entre la plante et le champignon dépend d'un équilibre antagoniste, cet équilibre est le résultat d'un ajustement entre les réactions de virulence de mycoendophyte nécessaires pour la colonisation de la plante, et la réaction de défense de la plante en réponse à la virulence de cet endophyte (Fisher et Petrini, 1987 ; Bourdel, 2015). Dès lors qu'un déséquilibre est introduit, le résultat se traduit par soit la virulence plus forte que les mécanismes de défense où le mycoendophyte devient pathogène, soit les défenses plus fortes que la virulence qui conduira au rejet de cet endophyte (Deckert, 2001).

2.5. Rôles des champignons endophytes :

Les champignons endophytes reçoivent la nutrition, la protection, et la possibilité de se propager grâce à leurs hôtes, en retour la plante hôte bénéficie aussi de certains avantages procurés par le mycoendophyte (Clay et Schardl, 2002 ; Kusari et al., 2012).

La littérature scientifique sur les champignons endophytes se focalise en particulier sur deux aspects :

2.5.1. Aspect pharmacologique :

Les mycoendophytes ont la capacité de produire de nombreuses molécules bioactives dont certaines possèdent des propriétés thérapeutiques utilisables contre de très nombreuses maladies (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

Le premier médicament anticancéreux produit par les champignons endophytes est un anti tumoral produit par *Taxus sp* trouvés au niveau de son endophytes, *Taxomyces andreae*, *Tubercularia sp.* (Gary et Strobel, 2003 ; Gimenez et al., 2007).

Dix-neuf genres de champignons endophytes (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryodiplodia*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Ectostroma*, *Fusarium*, *Metarhizium*, *Monochaetia*, *Mucor*, *Ozonium*, *Papulaspora*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Pithomyces*, *Taxomyces* et *Tubercularia*) isolés des plantes produisant du taxol se sont avérés produire du Paclitaxel (Zhao et al., 2010).

2.5.2. Aspect écologique :

L'ubiquité et l'hyperdiversité des mycoendophytes supposent que ces derniers jouent des rôles extrêmes importants dans le fonctionnement des écosystèmes, ainsi, leurs actions au sein d'un biotope donné sont multiples (Rudgers et *al.*, 2005 ; Selim et *al.*, 2012).

2.5.2.1. Rôle physiologique chez les plantes-hôtes :

Les mycoendophytes peuvent conférer activement ou passivement à la plante hôte la capacité de maintenir et d'améliorer ses performances biotiques à travers différents mécanismes tels que les métabolites secondaires qui augmentent la résistance de la plante aux facteurs de stress biotiques et abiotiques (stress hydrique, salin, hautes températures, ...etc.) (Cao et *al.*, 2009).

Les champignons endophytes sont rapportés pour être capables de faciliter l'accès aux nutriments par la fixation d'azote, solubilisation du phosphate et l'absorption de l'eau dans la rhizosphère (endomycorhize) (Selim et *al.*, 2012 ; Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

Ainsi, les effets des champignons endophytes dans la photosynthèse ont été démontrés, c'est l'exemple de l'endophyte *Colletotrichum musae* qui a diminué la capacité photochimique (capacité photosynthétique) dans la banane (Pinto et *al.*, 2000 In Selim et *al.*, 2012).

Des chercheurs de l'INRA ont mis en évidence la colonisation des racines d'*Arabidopsis thaliana* par le champignon tellurique *Colletotrichum tofieldiae*, qu'ils dévoilent une capacité d'augmenter la croissance et la fertilité de la plante (Hiruma et *al.*, 2016) (Figure 04).

Dans ce contexte de bioprotection, Il a été constaté que les plantes colonisées par ce groupe d'endophytes se développent mieux, ceci est dû en partie à la synthèse de certains types de régulateurs de croissance, hormones, telles que l'auxine, gibbérellines et l'acide indolacétique (Loiret et *al.*, 2004, Sandhiya et *al.*, 2005, Firakova et *al.*, 2007 In Selim et *al.*, 2012).

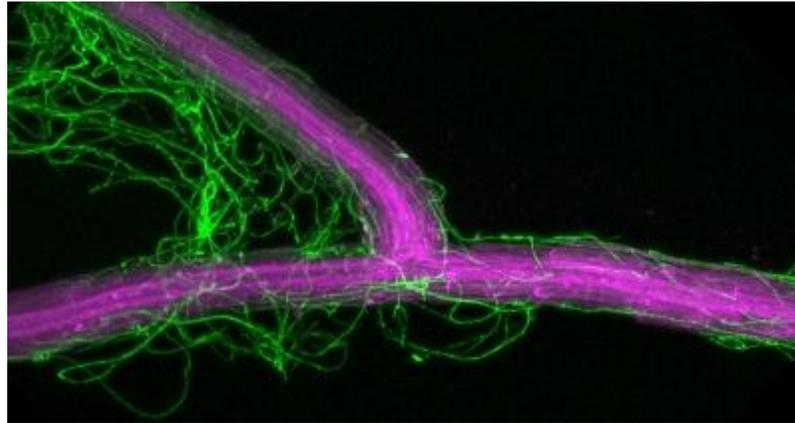


Figure 04 : Racine d'*Arabidopsis thaliana* (magenta) recouverte par un maillage d'hyphes de *Colletotrichum tofieldiae* (vert) (Hiruma et *al.*, 2016).

2.5.2.2. Protection contre les herbivores :

Ce groupe fongique peut protéger leur plantes-hôtes contre les herbivores par plusieurs mécanismes. L'un de ces mécanismes de résistance est l'amélioration totale des performances de la plante afin de tolérer ces herbivores (Bae et *al.*, 2008 In Selim et *al.*, 2012).

Ainsi, les mycoendophytes systémiques et foliaires, comme les champignons *Clavicipitaceae*, peuvent réduire la capacité nutritive chez les vertébrés herbivores par production des alcaloïdes toxiques tels que l'ergot (Cao et *al.*, 2009 ; Schardl, 2001 In Selim et *al.*, 2012).

2.5.2.3. Protection contre les insectes :

Certains mycoendophytes peuvent protéger leurs hôtes contre les insectes ravageurs (Spiering et *al.*, 2005 ; Sia et *al.*, 2013 ; Ho et *al.*, 2012).

Webber et Gibbs (1984) ; ont démontré la protection des végétaux contre les insectes due à des champignons endophytes par exemple *Phomopsis oblonga*, qui protège les ormes contre le coléoptère dendroctone *Physocnemum brevilineum*; cette protection est assurée par production des composés toxiques.

2.5.2.4. Réduction des nématodes :

Certaines études ont indiqué que les mycoendophytes Calvicipitacées avaient une activité antinématode. Kimmons et *al.* (1990) ; ont déclaré que l'infection de fétus

Festuca arundinacea avec un champignon endophyte *Acremonium coenophialum* réduit la population de nématodes dans les sols des champs.

2.5.2.5. Protection contre les microorganismes pathogènes :

Les champignons endophytes se sont des agents antagonistes protègent leur plantes-hôtes contre les microorganismes pathogènes par plusieurs mécanismes, parmi eux ; il y a la production d'antibiotiques, la stimulation des mécanismes de défense de l'hôte, la concurrence pour la nourriture ou les sites de colonisation, et le mycoparasitisme (Li et *al.*, 2000).

L'activité antagoniste des mycoendophytes contre les microorganismes pathogènes est élucidé par l'endophyte *Cryptosporiopsis quercina* d'une plante médicinale *Tripterigeum wilfordii* qui produit la cryptocin, montre une puissante activité contre *Pyricularia oryzae* agent de la pyriculariose du riz (Kim et *al.*, 2007).

L'agent antagoniste *Trichoderma spp* induit une résistance chez la tomate contre le *Fusarium oxysporium* f.sp. *lycopersici*. (Rai et *al.*, 2016). Ainsi, *Aspergillus* et *Penicellium* agissent contre le *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, l'agent responsable de la fusariose du palmier dattier (Bayoud) (Chakroune et *al.*, 2008).

Plusieurs extraits liquides des cultures des champignons endophytes ont démontré une inhibition de la croissance de plusieurs espèces de champignons phytopathogènes (Arnold et *al.*, 2003 ; Park et *al.*, 2005). Les scientifiques ont étudié l'un de ces champignons endophytes, nommé *Paraconiothyrium variable* isolé d'un conifère du Jardin des Plantes de Paris. Ce champignon s'est montré particulièrement actif en inhibant, *in vitro*, la croissance d'un phytopathogènes commun, *Fusarium oxysporum*. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives dans la lutte contre les champignons producteurs de mycotoxines susceptibles de contaminer les aliments et les fourrages (figure 05) (Combés et *al.*, 2012).

Ces endophytes peuvent aussi induire ou activer des mécanismes de défenses des plantes hôtes, ces mécanismes sont : la stimulation du métabolisme oxydatif, la mort cellulaire rapide et localisée, l'accumulation de phytoalexines et la synthèse de protéines reliées à la pathogénèse (PR) (Rodriguez et *al.*, 2003 ; Cao et *al.*, 2009).

Certains champignons endophytes peuvent être des mycoparasites ; ils peuvent produire des enzymes dégradant les parois cellulaires, qui leur permettent de percer des trous dans les champignons phytopathogènes et d'extraire des nutriments pour leur croissance (Clay et Schardl, 2002).

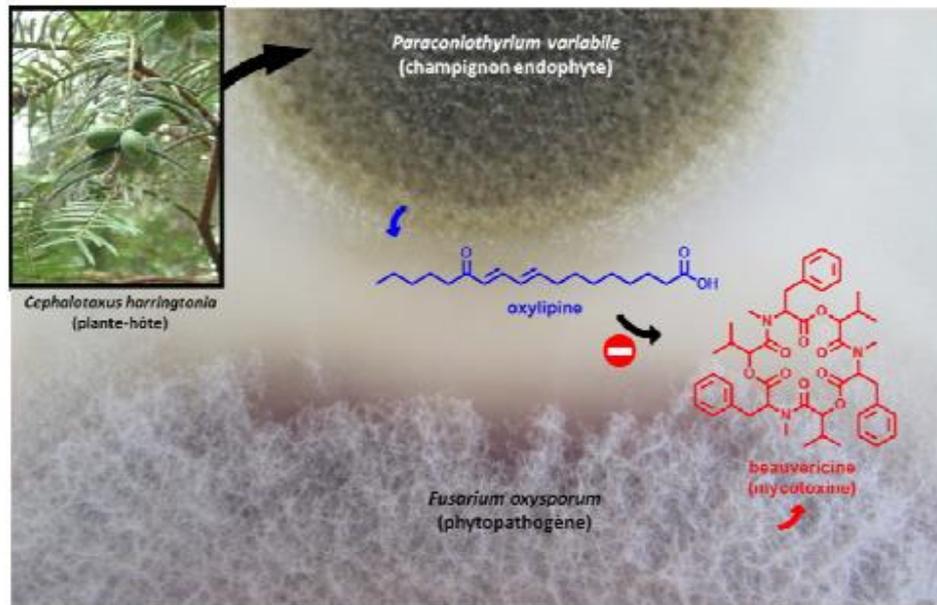


Figure 05 : La compétition entre champignon endophyte et champignon phytopathogènes (endophyte en haut, phytopathogènes en bas, sur gélose en boîte de Pétri la compétition est visible en arrière-plan ; l'endophyte produit l'oxylipine (en bleu) qui inhibe la production de la mycotoxine (en rouge) par le phytopathogènes (Combés et *al.*, 2012).

3. Généralité sur Les *Aspergillus* :

Webster et Weber (2007) ; donnent une classification où le genre d'*Aspergillus* appartient au phylum des *Ascomycota*, classe des *Plectomycetes* de l'ordre des *Eurotiales* et de la famille des *Trichomaceae*.

Les Aspergillus sont des moisissures omniprésentes, largement distribuées dans la nature grâce à leur capacité de produire un grand nombre de spores aéroportées et facilement transmissibles par le courant d'air, la majorité de ces espèces n'ont pas de besoins nutritionnels particuliers (Bennett, 2010). Ils peuvent présenter à la fois des formes sexuées (champignons parfaits) et des formes asexuées (champignons imparfaits) (Scriban, 1993).

De nombreuses espèces appartenant à ce genre sont connues pour leur capacité de produire certains molécules bioactives ceux-ci incluent *A. terreus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. carbonarius* et *A. ibericus* (tableau 03).

Tableau 03 : Les *Aspergillus* producteurs des métabolites secondaires (Pitt, 2000 ; Mikusova et al., 2014 ; Mishra et al., 2017 ; Park, 2017).

| Espèces d' <i>Aspergillus</i> | Métabolites secondaires |
|-----------------------------------|--|
| <i>Aspergillus terreus</i> | cyclosporine A, acide terreique, gliotoxine |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | cellulase, xylanase |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | endoglucanase, β -glucosidase |
| <i>Aspergillus niger</i> | alpha-amylase, beta-glucanase, l'ochratoxine A |
| <i>Aspergillus flavus</i> | acide aspergillique, acide cyclopiazonique |
| <i>Aspergillus versicolor</i> | sterigmatocystine |
| <i>Aspergillus clavatonanicus</i> | kétoconazole |

3.1. *Aspergillus terreus* :

Aspergillus terreus est un champignon endophyte caractérisé par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens de diamètre fin régulier, septé et ramifié. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophore) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides (figure 06). Pour les caractères culturels, *A. terreus* présente une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose ou malt, Sabouraud) peuvent se développer sur une gamme de pH assez large (2 à 8), cependant une croissance optimale est obtenue à pH 5-6. Leur croissance est possible à des températures « 11-13°C, 35-40°C et 45-48°C ». Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs : après 96 heures, les colonies poudreuses ou granuleuses vont prendre leur teinte caractéristique, brune (figure 07). L'espèce d'*Aspergillus*

terreus est utilisée dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes et d'antifongiques (Tabuc, 2007).

3.2. Les métabolites secondaires produits par *Aspergillus terreus* :

Aspergillus terreus élabore un certain nombre de composés biologiquement pertinents, tels que la sulochrine et la butyrolactone I. Il produit également d'autres composés bioactifs bénéfiques, l'asperfuranone et la cyclosporine A (médicament à des propriétés anti-inflammatoire, antifongique, antiparasitaire et immunosuppresseur) (Sallam et al., 2003 ; Samson et al., 2011 ; Guo et Wang, 2014; Yin et al., 2016).

En Outre, *A.terreus* est souvent utilisé dans l'industrie pour produire des acides organiques importants, tels que l'acide itaconique, l'acide cis-aconitique et l'acide asperterrique. Il a la capacité de produire des molécules avec des propriétés antibactériennes tel que flavipine, la terreine et la citrinine pour inhiber la croissance de plusieurs bactéries « *Trichophyton mertagrophytes* et *Sporothrix schenckii* » (Botton et al.,1990 ; Guangquan et al., 2011).

A.terreus est un entrepôt de plusieurs composés bioactifs anticancéreux, ces composés présentent une meilleure activité cytotoxique contre la lignée cellulaire cancéreuse. Les polykétides en font partie, elles constituent l'une des principales catégories de produits naturels et un grand nombre de ces groupes ont une activité biologique importante. *Aspergillus terreus* produit un groupe de statines composé de polycétides, la famille des statines comprend une longue liste de composés naturels et synthétiques, tels que la compactine d'origine naturelle et la pravastatine (Frisvad et al., 2004).

A.terreus est réputé pour la production de la lovastatine (un médicament hypocholestérolémiant) qui est capable d'inhiber l'action de la réductase d'HMG-CoA, une enzyme permettant la synthèse du mévalonate, précurseur du cholestérol (Alberts et al., 1980 ; Hendrickson et al., 1999 ; Haas, 2015).

Cependant, après des recherches plus poussées sur nombreux métabolites secondaires d'*Aspergillus terreus*, des chercheurs ont découvert des nouveaux

composés bioactifs notamment un thiophène rare ,l'anhydrojavanicine, méthylbostrycoïdine , 8-O-méthyljavanicine, botryosphaérone D, 6-éthyl-5-hydroxy-3,7-diméthoxynaphtoquinone, 3,5-dihydroxy- (22E, 24R) - ergosta-7,22-dien-6-one, trihydroxy- (22E, 24R) -ergosta-7,22-dien-6-one, NGA0187 et beauvericine (Deng et *al.*, 2013).

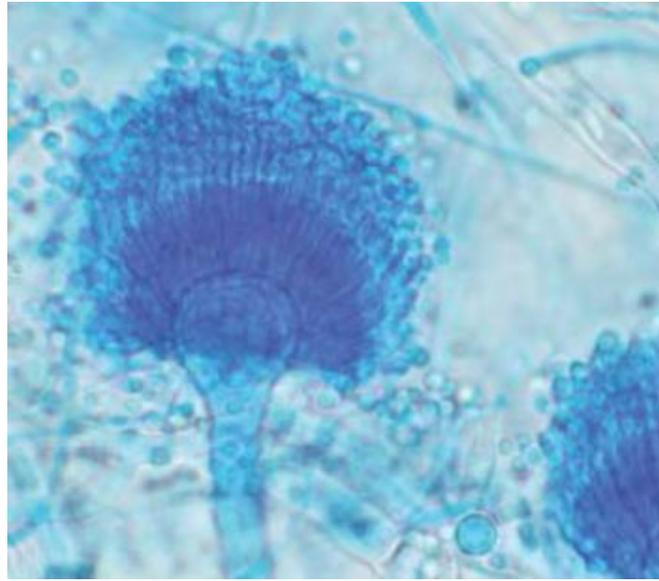


Figure 06 : Aspect microscopique d'*Aspergillus terreus* (Tabuc, 2007).



Figure 07 : Aspect macroscopique *Aspergillus terreus* (culture de 14 jours sur Czapek à 25 °C) (Tabuc, 2007).

4. Généralité sur les *Botryosphaeriaceae* :

Les champignons appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* sont très cosmopolites et polyphages ; comprennent des endophytes et des saprophytes (Phillips et *al.*, 2013 ; Dissanayake et *al.*, 2016). Ils sont rapportés principalement sur des hôtes ligneux et favorise la dissémination par les graines (Blancard et Lecomte, 2017). On les trouve dans toutes les régions géographiques et climatiques du monde, à l'exception des régions polaires (Smith et *al.*, 1996).

La famille des *Botryosphaeriaceae* est constituée par au moins une dizaine de genres et 21 espèces, dont les anamorphes sont réparties dans 7 genres fongiques. Elle appartient au phylum d'*Ascomycota*, classe des *Dothideomycetes* de l'ordre des *Botryosphaeriales* (Dissanayake et *al.*, 2016).

Les *Botryosphaeriaceae* sont caractérisés par une croissance rapide sur les milieux de culture classique (gélose nutritive) peuvent se développer sur une large gamme de pH (3 à 8), leur croissance optimale est obtenue à pH 5-6, à des températures entre 30 et 33°C. Après 48 heures d'incubation, le mycélium de cette famille fongique est généralement blanc puis devient pigmenté gris-brun jusqu'à noir avec le temps (figure 08).

La forme sexuée (téléomorphe) de ces champignons est très rarement rencontrée dans la nature. La figure 09 permet de se rendre compte de l'aspect que peut avoir par exemple la forme sexuée de *Botryosphaeria parva*. Les ascospores produites par des asques contenues dans des périthèces sont hyalines et aseptées dans un premier temps, elles bruniront légèrement en se cloisonnant éventuellement en vieillissant.

La forme asexuée (anamorphe) se matérialise par la formation aisée de pycnides. Celles-ci produisent des conidies (pycniospores) hyalines pour certaines espèces, se mélanisant pour d'autres devenant brunes avec l'âge (figures 10 à 12) (Blancard et Lecomte, 2017).



Figure 08 : Aspect de jeunes cultures en boîte de Pétri d'une espèce de *Botryosphaeriaceae* (Daniel et al., 2017).

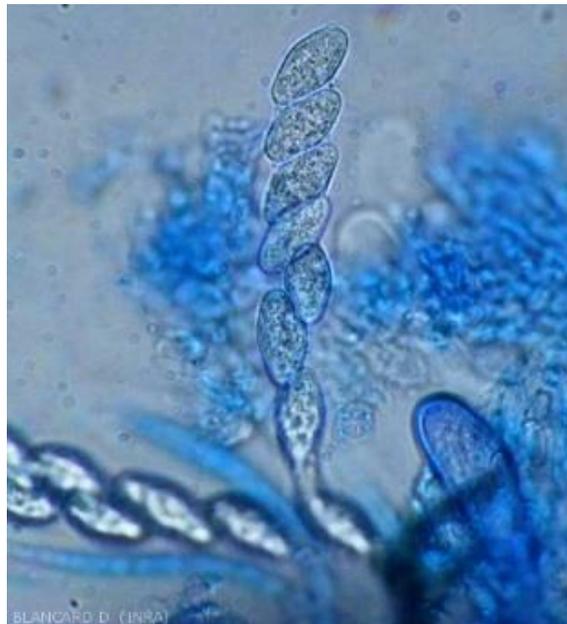


Figure 09 : Asque de *Botryosphaeria parva* contient 8 ascospores hyalines et non cloisonnées, mesurant $18/27 \times 8/11 \mu\text{m}$. Ultérieurement, elles deviendront brun clair et montreront 1 à 2 cloisons (téléomorphe de *Neofusicoccum parvum*) (Blancard et Lecomte, 2017).



Figure 10 : Conidie de *Diplodia serratia* se formant à l'extrémité d'un conidiophore hyalin. Les conidies de ce champignon mesurent $25/27 \times 10/12 \mu\text{m}$, et elles sont brunes et sans cloison (anamorphe de *Botryosphaeria obtusa*) (Blancard et Lecomte, 2017).



Figure 11 : Les conidies de *Lasiodiplodia theobromae* ont les dimensions suivantes : $24/28 \times 12/15 \mu\text{m}$. Elles sont d'abord hyalines et non cloisonnées, et deviennent brun sombre, disposant d'une cloison et de striations irrégulières longitudinales. (Anamorphe de *Botryosphaeria rhodina*) (Blancard et Lecomte, 2017).



Figure 12 : Conidies de *Diplodia mutila* mesurant $23.5/27 \times 12/14 \mu\text{m}$. Elles demeurent souvent hyalines et sans cloison, avec une paroi épaisse. (Anamorphe de *Botryosphaeria stevensii*) (Blancard et Lecomte, 2017).

4.1. Les métabolites secondaires produits par la famille de *Botryosphaeriaceae* :

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés à partir des cultures solides du champignon endophyte *Botryosphaeriaceae* (tableau 04). Ces métabolites ont été évalués *in vitro* pour leurs activités antimicrobiennes, antioxydantes et cytotoxiques. Tels que la pycnophorine qui inhibe de manière significative la croissance de *Bacillus subtilis* et de *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de concentration inhibitrice minimale (CMI) égales de $25 \mu\text{M}$, la stemphyperyleneol qui a une activité antifongique puissante contre l'agent phytopathogène *Alternaria solani* avec une CMI de $1,57 \mu\text{M}$, et des cytotoxines qui agissent contre la lignée de cellules cancéreuses HCT116 (Xiao et *al.*, 2014).

Tableau 04 : Quelques espèces de *Botryosphaeriaceae* producteurs de métabolites secondaires.

| Espèces de <i>Botryosphaeriaceae</i> | Métabolites secondaires |
|--------------------------------------|---|
| <i>Botryosphaeria sp</i> | Botryoisocoumarin A |
| <i>Botryosphaeria dothidea</i> | Antibactérien chaetoglobosin C et F |
| <i>Botryosphaeria sp</i> | 3-hydroxy-N-(1-hydroxy-3-methylpentan-2-yl)-5-oxohexanamide |

Introduction

Dans la nature, il existe plusieurs substances biologiquement actives qui couvrent l'ensemble des activités antimicrobiennes, antioxydantes, antitumorales, antiparasitaires et immunosuppresseurs.

La découverte des antibiotiques au début du XX^{ème} siècle, a permis des grandes avancées en thérapeutique et a contribué à l'essor de la médecine moderne. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de microorganismes résistants aux traitements a mis un terme à cette vague d'optimisme et incité les chercheurs à trouver continuellement de nouvelles molécules thérapeutiques (El Amri et *al.*, 2014). Si les plantes ont longtemps été considérées comme la principale source de molécule active, depuis près d'un demi-siècle, les microorganismes et plus spécialement les endophytes représentent une source plus importante en substances bioactives.

Ainsi, ces microorganismes ont une forte teneur à produire quelques enzymes utilisés dans les différents secteurs pharmacologique, agro-alimentaire et industriel...etc.

Donc, les endophytes représentent en effet, une source d'inspiration non négligeable dans la quête de nouvelles molécules surtout après les avancés techniques tel que la CCM, HPLC, CPG...etc. , qui ont permet l'extraction, la séparation et l'identification précise de ces molécules. Ceci révèle l'importance de réaliser encore des études sur les métabolites secondaires provenant d'autres mycoendophytes (Hu et *al.*, 2002; Jayakumar et *al.*, 2006; Jeong et *al.*, 2010; Chiffolleau, 2014).

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont l'objectif consiste en une étude sur quelques métabolites secondaires de quatre champignons endophytes ; trois d'*Aspergillus terreus* et une espèce appartenne de la famille de *Botryosphaeriaceae* tout en mettant en évidence leurs activités enzymatiques.

Ce document contient les parties suivantes :

- Dans la première partie théorique, les études sont rapportées sur les métabolites secondaires et les différents endophytes qu'ils les secrètent.
- A la deuxième partie une étude pratique a été réalisée selon les étapes suivantes :

Introduction

- extraction des métabolites secondaires par l'utilisation de deux solvants «chloroforme et Acétate d'éthyle».
- Analyse des métabolites secondaires par les techniques analytiques séparatives CCM qualitative et l'UV-visible.
- Evaluation de l'activités enzymatiques des champignons endophytes.

Matériel et méthodes :

Notre travail porte sur l'extraction et l'identification par la chromatographie sur couche mince et l'UV-visible des métabolites secondaires à partir de quatre souches fongiques ; une de la famille des *Botryosphaeriaceae* et trois souches de l'espèce *Aspergillus terreus*, tout en mettant en évidence la production *in vitro* de sept enzymes (amylase, estérase, chitinase, lipase, pectinase, phosphatase et la protéase). Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de phytopathologie (département de Biotechnologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Blida 1), et au niveau de laboratoire physicochimique de Saidal à Médéa.

1. Matériel :

1.1. Matériel biologique :

1.1.1. Endophytes fongiques :

Les endophytes fongiques étudiés proviennent de la collection du laboratoire de phytopathologie (département de Biotechnologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Blida 1), isolés à partir de la partie aérienne de *Zygothymus album* et de la partie racinaire du palmier dattier, de la région d'Adrar d'Algérie (Tableau 05) (Figure 13).

Tableau 05 : Origine et provenance des endophytes fongiques.

| Endophyte fongique | Nom binomial | Compartiment végétal | Région | Provenance |
|--------------------|---|---|-----------------|---|
| AA 1101 (B) | Espèce affiliée à la famille de <i>Botryosphaeriaceae</i> | La partie aérienne de <i>Zygothymus album</i> | Adrar (Algérie) | Collection du laboratoire de phytopathologie. Université de Blida 1 |
| B 1283 | <i>Aspergillus terreus</i> | La partie racinaire du palmier dattier | | |
| T 1172 | | | | |
| T 2257 | | | | |

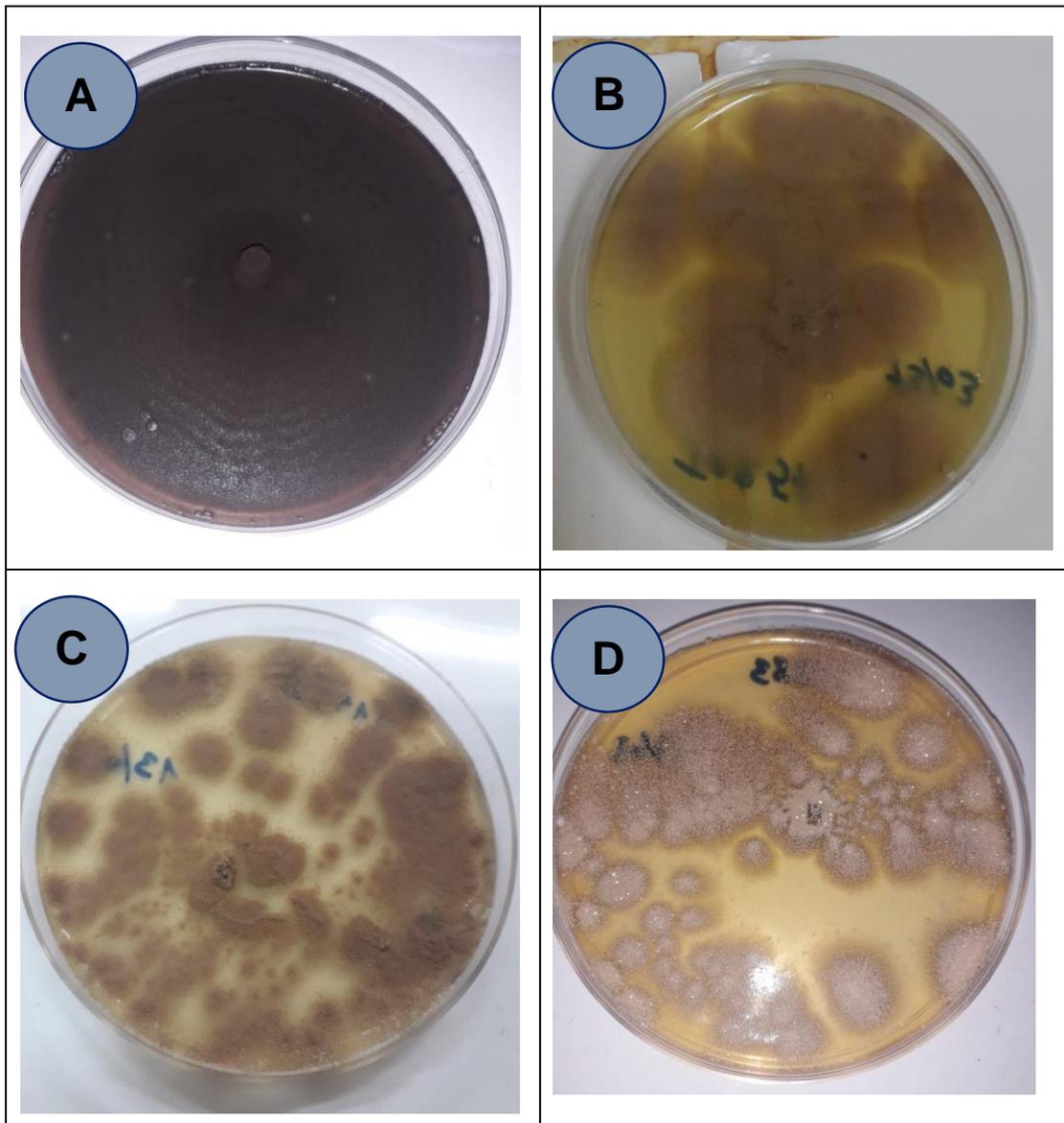


Figure 13 : Les mycoendophytes étudiés. **A :** *Botryosphaeriaceae* ; **B, C, D :** *Aspergillus Terreus*.

1.2. Matériel non biologique :

Nous avons utilisé comme matériel non biologique : Les milieux de culture (Annexe 02), les produits chimiques, la verrerie et les appareillages (Annexe 01).

2. Méthodes :

2.1. Régénération des souches fongiques :

La régénération des souches se fait sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthor et Booth, 1983) (Annexe 01), par le repiquage des disques mycéliens à partir des cultures conservées, puis incubation à 28°C pendant 7 jours.

2.2. Purification des souches fongiques :

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).

2.3. Fermentation et extraction des métabolites secondaires élaborés par les souches mycoendophytes :

Les champignons ont été mis à croître sur le milieu PDA à 28°C pendant sept jours. Des flacons de 250 ml contenant 100 ml du milieu PDB (Potato Dextrose Broth), ont été inoculés par cinq disques de culture de 7 jours à raison de quatre à six répétition pour chaque champignon. Les flacons sont fermées avec du papier aluminium et incubées à la température ambiante avec une agitation continue pendant 15 jours (figure 15,16 et 17) (Xiaoling et *al.*, 2010; Ghorri, 2015).

Après 15 jours d'incubation, le contenu est filtré en deux étapes, la première à travers une mèche à gaz stérile et la deuxième par le papier filtre stérile, pour séparer le mycélium du bouillon de culture ; ce dernier est centrifugé à 1500 tours/min pendant 20 min et le surnageant a été récupéré (figure 18 et 19) (Madki *et al.*, 2010).

Les métabolites secondaires ont été extraits par deux solvants organiques, l'acétate d'éthyle et le chloroforme ; à chaque filtrat nous avons rajouté un volume égal de solvant puis le tout est agité pendant 30 min pour avoir la séparation des métabolites.

Dans une ampoule à décanter, le mélange a été transvasé pour séparer les deux phases : La phase inorganique et la phase organique (supposée contenir les sous-produits métaboliques) ; cette dernière a été récupéré pour être concentré sous pression par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapeur du type BÜCHI) (figure 20 et 21) (Oliveira et *al.*, 2009).

Les extraits obtenus ont été séchés et conservés dans des boîtes de Pétri en vers stérile recouvertes par papier aluminium à 4°C pour être analyser après 15 jours par la chromatographie sur couche mince (CCM) et les souches qui montrent la présence d'un composé recherché ont subi une analyse par l'UV-Visible.

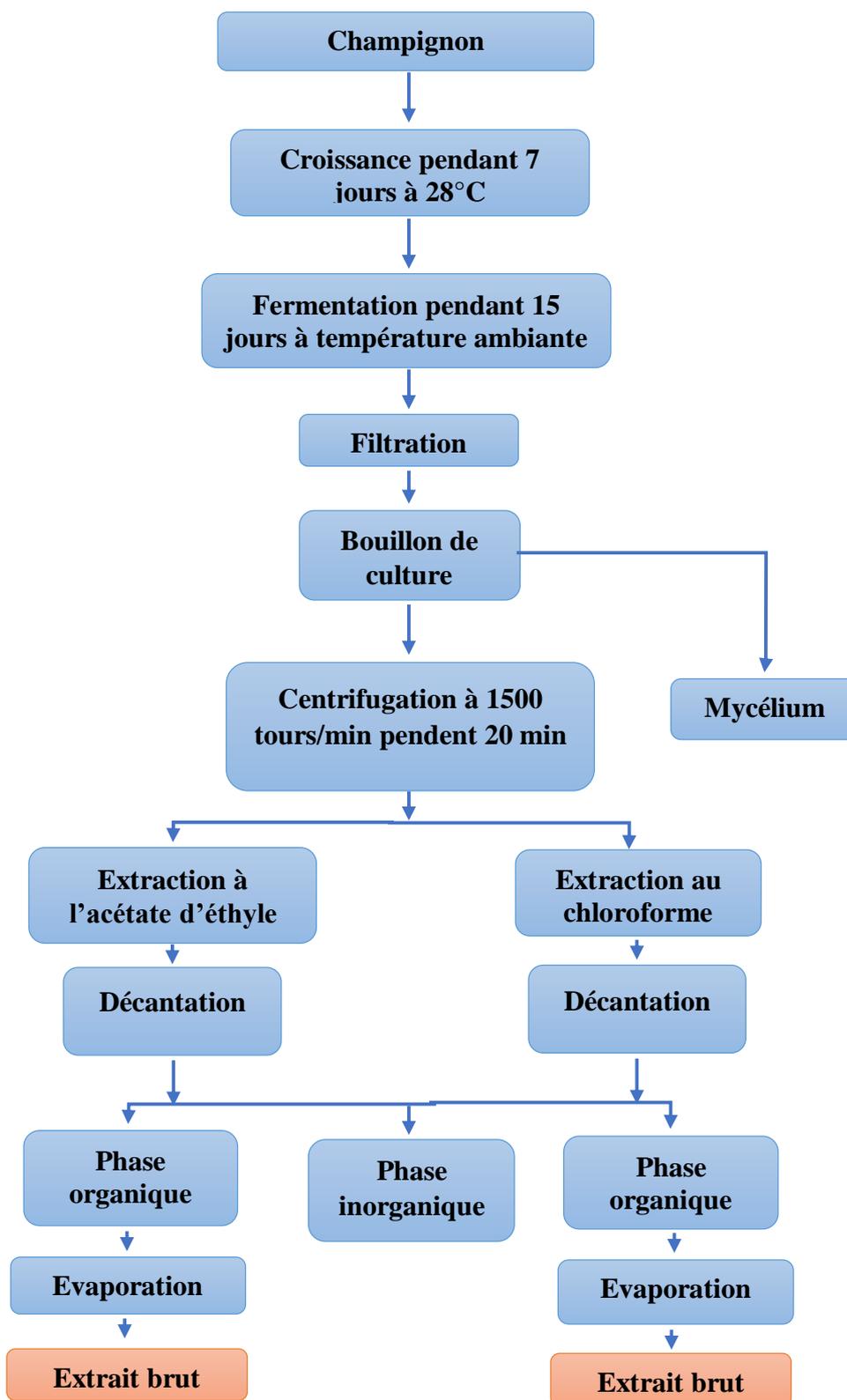


Figure 14 : Fermentation et extraction des champignons endophytes avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme (Xiaoling et *al.*, 2010).

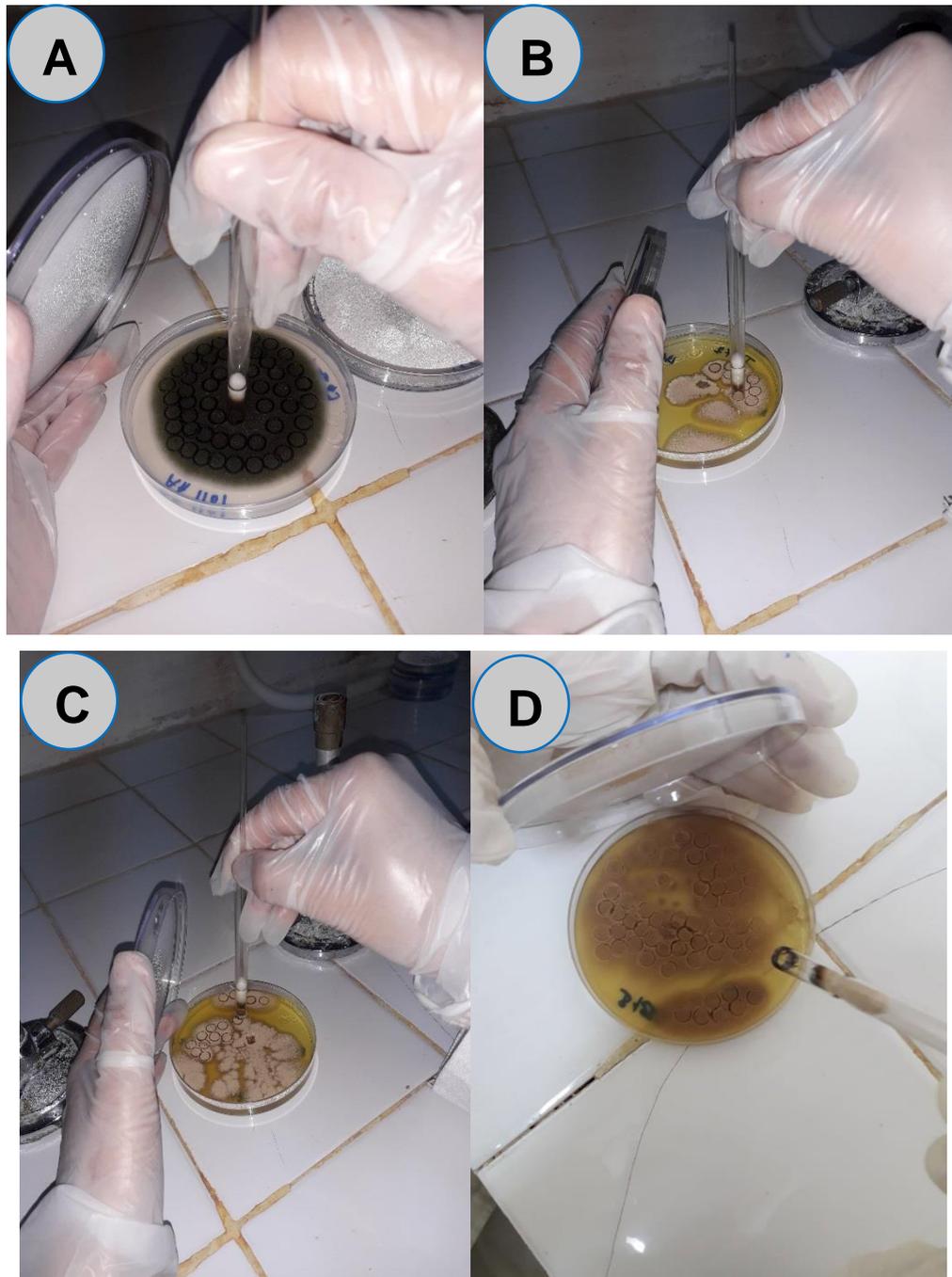


Figure 15 : Préparation des disques mycéliens. **A :** *Botryosphaeriaceae* (AA 1101(B)) ; **B, C et D :** *Aspergillus Terreus* (T 225, T 1172 et B 1283).

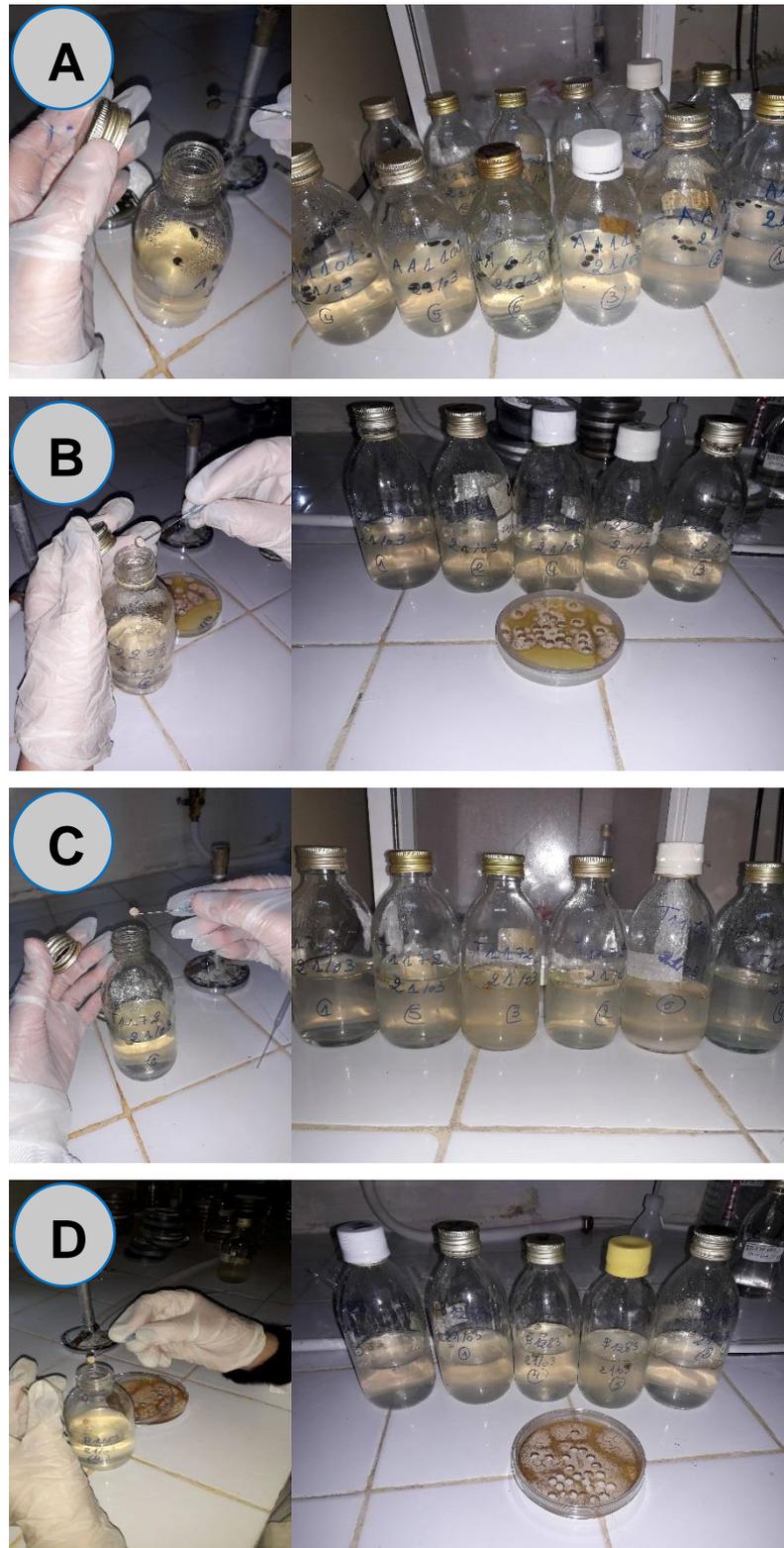


Figure 16 : Ensemencement des disques mycéliens dans le milieu PDB. **A :** *Botryosphaeriaceae* (AA 1101(B)) ; **B, C et D :** *Aspergillus Terreus* (T 225, T 1172 et B 1283).



Figure 17 : Flacons contenant les disques mycéliens déposés dans l'agitateur électrique.



Figure 18 : Filtration du bouillon de culture. **A :** Par mèche à gaz stérile, **B :** Par papier filtre stérile.



Figure 19 : Centrifugation du bouillon de culture à 1500 tours/min pendant 20 min.

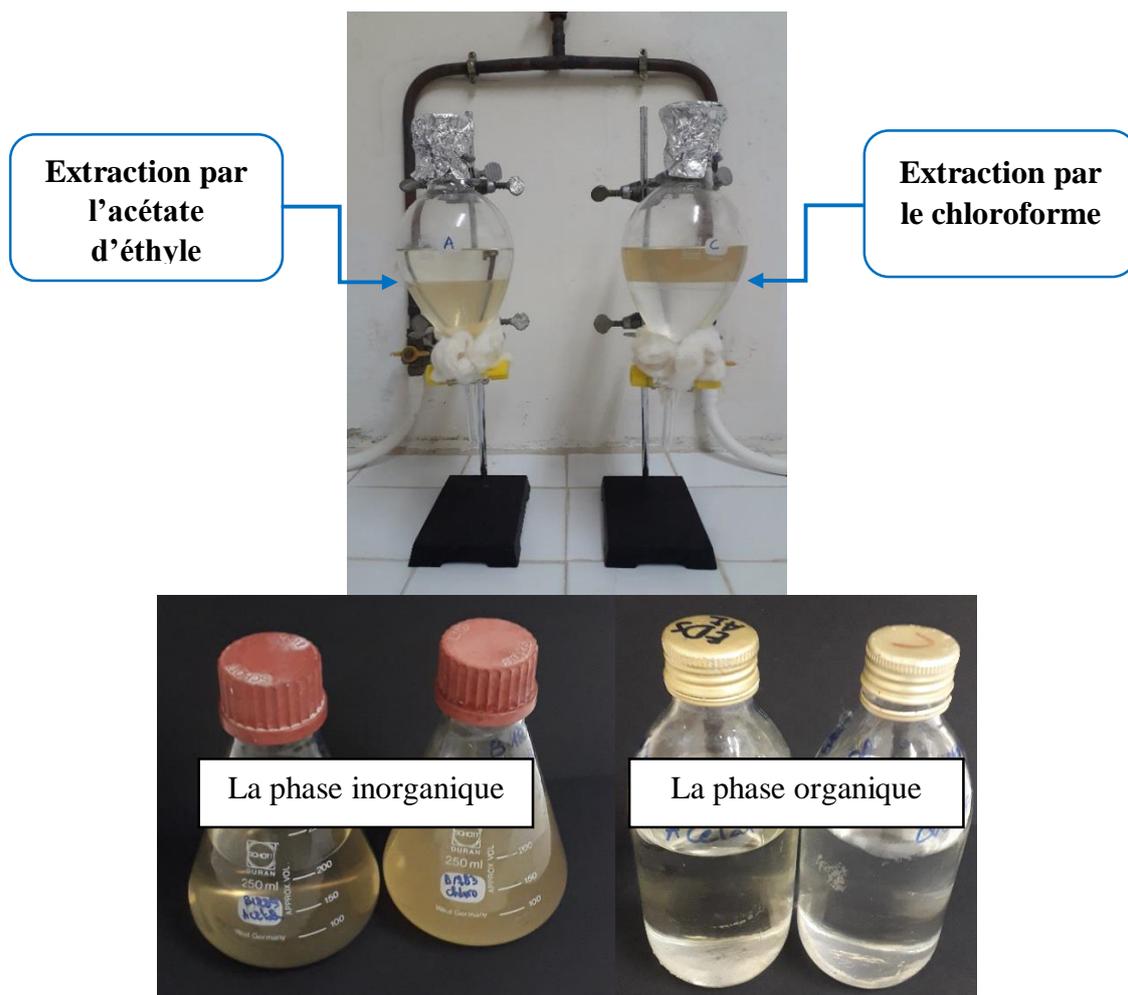


Figure 20 : Séparation du mélange (extrait + solvant) par décantation (la phase inorganique en jaune et la phase organique est transparente).



Figure 21 : Concentration de la phase organique par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapeur du type BÜCHI).

2.4. Analyse des métabolites secondaires extraits des mycoendophytes :

Puisque les souches fongiques étudiées synthétisent une mixture de métabolites secondaires, il semble impératif d'essayer plusieurs techniques analytiques pour identifier l'extrait brut (Betina, 1989).

La purification et l'identification des substances bioactives des souches fongiques ont été réalisées par la CCM et les extraits qui montrent la présence d'un composé recherché ont subi une analyse par l'UV-Visible.

2.4.1. La chromatographie sur couche mince :

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) constitue une méthode analytique de base, rapide, simple et peu coûteuse, permet une séparation efficace des métabolites secondaires et leur identification avec une bonne précision.

Le fractionnement et l'identification des métabolites secondaires, à partir des deux extraits «chloroforme et Acétate d'éthyle», a été réalisée par la chromatographie sur couche mince sur gel de silice (60 F254, 20/20 cm, 0,25mm d'épaisseur).

Les échantillons séchés (les extraits bruts) ont été dissous dans le solvant d'extraction (acétate d'éthyle ou chloroforme) à raison de 3mg/ml. Ainsi, les standards ont été préparés ; une solution de 4 mg/ml d'ampicilline dans un mélange d'acétone et acide chlorhydrique (4/1) et une autre solution de 4mg/ml de kétoconazole dans l'acétate. Puis ils ont été déposés sous forme des spots de 150 μ l à l'aide d'une micropipette à des points repères sur les plaques de CCM. Après le dépôt, les plaques ont été séchées à l'air libre (figure 22 et 23).



Figure 22 : Préparation des échantillons pour la CCM.

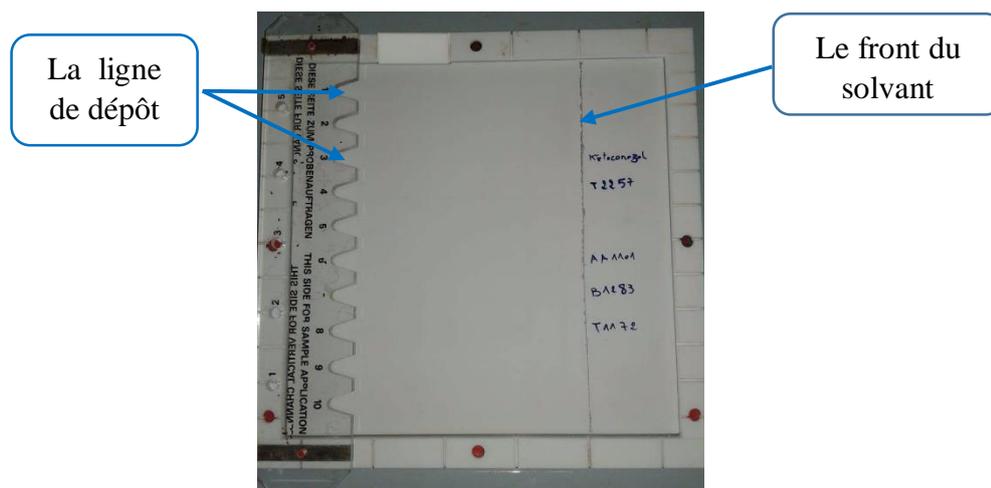


Figure 23 : Injection des échantillons dans la plaque CCM.

Les plaques ont été placées dans la cuve chromatographique en position verticale contenant l'éluant (tableau 06) (figure 24), lorsque le front du solvant se trouve à environ 3 cm de l'extrémité supérieure de la plaque ; la plaque a été retirée et séchée à l'air libre.



Figure 24 : La cuve chromatographique.

Plusieurs systèmes solvants ont été utilisés pour mieux séparer les différents composés métaboliques éventuellement présents dans les extraits (tableau 06).

Tableau 06 : Les différents systèmes solvants pour la CCM.

| | |
|--------------------------------------|--|
| Les systèmes solvants essayés | <ul style="list-style-type: none"> • A.M : acétate d'éthyle méthanol 100/15 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • A.E.T.AAG : Acétone/eau/toluène/acide acétique glacial (650/100/100/25) |
| | <ul style="list-style-type: none"> • A.AAR : Acétone/solution d'acétate d'ammonium R de 154 g/l ajustée à pH=5 avec l'acide acétique glacial R (10/90) |

Après l'élimination du solvant, les chromatogrammes sont observés sous lumière UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) et la présence des métabolites secondaire est révélée sous forme des taches.

- **La révélation chimique :**

La révélation chimique a été réalisée avec la niyhdrine révélateur des acides aminés. Après pulvérisation des plaques par le révélateur, les résultats ont été lus à chaud (5min à 100°C) et le rapport frontal (RF) a été calculé.

Le RF est le rapport de la distance entre le dépôt et la tache active sur la distance séparant le dépôt du front du solvant (figure 25).

$$\text{RF} = \frac{X}{Y} = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

$$T = \frac{0,0703}{0,7483} \times \frac{5}{20} \times \frac{10}{1} \times 99,77$$

$$T = 23,43 \%$$

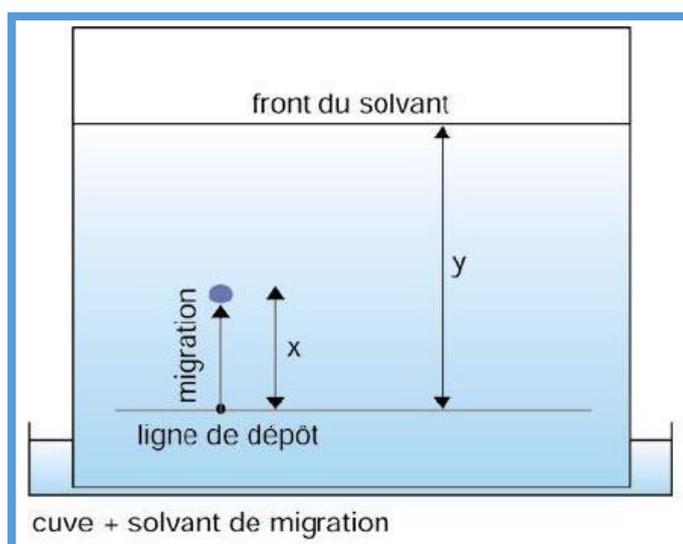


Figure 25 : Le rapport frontal RF. **X** : Distance parcourue par le constituant, **Y** : Distance parcourue par le front de l'éluant (Messioughi, 2010).

2.4.2. Identification par UV-Visible :

L'extrait brut et le standard kétoconazole ont été dilués dans le méthanol (1/10 ; 5/20), puis traversés dans une cuve en quartz pour être balayé dans la gamme de 190 à 350 et 260 à 800 nm respectivement par un spectrophotomètre UV- Visible. A l'aide de l'logiciel UV WINLAB (version : 2.85.04) nous sont capable de déterminer la présence ou l'absence du kétoconazole (un antifongique) dans l'extrait fongique en fonction des maximums d'absorbance chez le standard. La présence de la bande d'absorption maximale (λ max) du standard dans l'extrait indique partiellement la présence de kétoconazole dans notre échantillon.

On peut déterminer mathématiquement la quantité de kétoconazole dans notre extrait en calculant le titre selon la loi présente :

$$T = \frac{DO_E}{DO_S} \times \frac{C_S}{C_E} \times \text{Puissance de standard}$$

DO_E : densité optique d'échantillon, **DO_S** : densité optique du standard, **CS** : concentration du standard, **CE** : concentration d'échantillon.

2.5. Activité enzymatique :

La production de sept enzymes extracellulaires a été dépistée et déterminée pour nos souches fongiques par la digestion du substrat dissous dans des plaques de gélose.

2.5.1. Chitinase :

L'activité chitinasique des souches fongiques a été évaluée sur le milieu PDA où le glucose de ce milieu est remplacé par la chitine (Nihorimbere et *al.*, 2013) (annexe 02). Des disques mycéliens de 4 mm des souches endophytes ont été déposés dans le milieu, trois répétitions ont été effectuées pour chaque souche et une boîte non inoculée sert comme témoin. Après incubation à 28°C pendant 9 jours, la synthèse de la chitinase est révélée par la croissance rapide des champignons testés (figure 26).

2.5.2. Amylase :

L'activité amylasique a été déterminée en utilisant le milieu GYP (Glucose Yeast extract Peptone) ajusté à un pH égale à 6, auquel nous ajoutons 2% d'amidon (annexe 02) (Maria et *al.*, 2005). Nous avons déposé les disques mycéliens de 4 mm sur le milieu GYP ; à raison de trois à quatre répétitions pour chaque souche et une boîte sans inoculum sert comme témoin. Après 3 à 5 jours d'incubation à 28°C, les boîtes inoculées ont été inondées avec lugol iodine aqueux ; l'apparition d'une zone claire formée autour de la colonie révèle une réaction positive due à la présence de l'enzyme amylase (figure 27).

2.5.3. Protéase :

L'activité protéasique a été recherchée selon la méthode de Maria et *al.* (2005), dans un milieu GYP ajusté à un pH de 6, additionné de 0,4% de gélatine et de bleu de bromophénol (annexe 02). Le milieu estensemencé avec des disques mycéliens de 4 mm ; à raison de trois à quatre répétitions pour chaque souche et une boîte sans inoculum sert comme témoin. Après 3 à 5 jours d'incubation à 28°C, une zone claire formée autour de la colonie indique une activité protéasique positive (figure 27).

2.5.4. Lipase et estérase :

Pour la détection du lipase et l'estérase, nous avons utilisé le milieu PAM (Peptone Agar Medium) ajusté à un pH de 6 additionné de bleu de bromophénol, et les substrats sont respectivement le tween 20 et le tween 80 (annexe 02), qui ont été stérilisés séparément par filtration sous vide puis ajoutés au milieu à raison de 1 ml pour 100 ml du milieu (Carrim et *al.*, 2006). Nous avons déposer les disques mycéliens de 4 mm sur le milieu ; trois répétitions ont été effectuées pour chaque souche et le témoin négatif est représenté par une boîte sans inoculum. Après 3 à 5 jours d'incubation à 28°C, une zone claire formée autour de la colonie indique une activité lipasique ou estérasique positive (figure 28).

2.5.5. Phosphatase :

Le test de solubilisation du phosphate a été effectué sur le milieu Pivorskaya (PVK) additionné de bleu de bromophénol et ajusté à un pH de 6 (Pivorskaya, 1948)

(annexe 02). Des disques mycéliens de 4 mm issues de précultures ont été repiqués dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PVK ; à raison de trois à quatre répétitions pour chaque souche fongique, une boîte de Pétri sans repiquage sert comme témoin. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. La décoloration du milieu autour des colonies mycéliennes est un indicateur d'une solubilisation des phosphates (figure 29).

2.5.6. Pectinase :

La détermination de la production de pectinase a été révélée par l'utilisation de milieu M9 agar ajusté à un pH de 6,8 additionné de bleu de bromophénol, auquel nous ajoutons 10g de pectine et 1,2g d'extrait de levure (Cattelan et *al.*, 1999) (annexe 02). Nous avons déposé les disques mycéliens de 4 mm dans le milieu gélosé, à raison de trois à quatre répétitions pour chaque souche et une boîte sans champignon représente le témoin négatif. Après incubation pendant 2 jours à 28°C un halo clair autour de la colonie indique une activité positive pour la production de pectinase (figure 30).

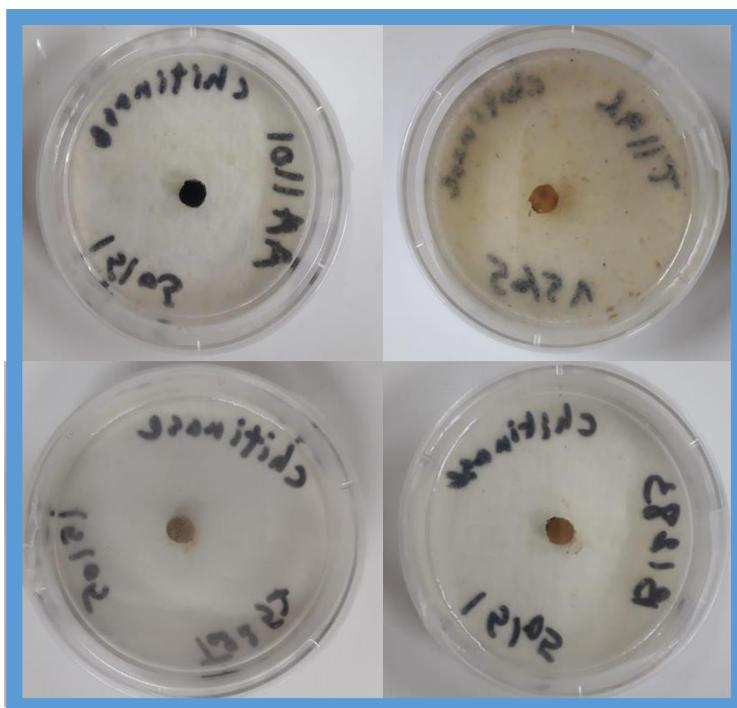


Figure 26 : Dépôt des disques mycéliens dans le milieu tests Chitinase.

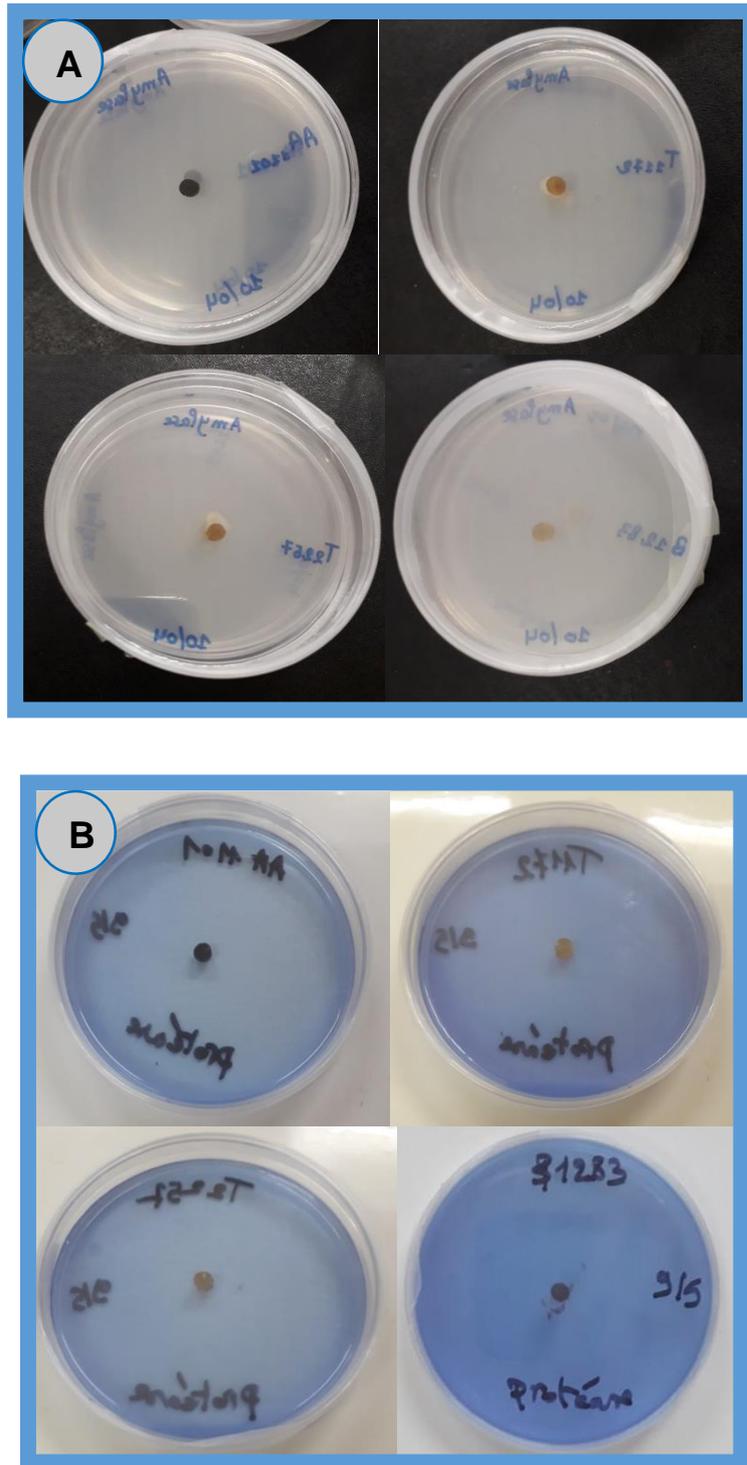


Figure 27 : Ensemencement des disques mycéliens dans les milieux tests. **A** : Amylase, **B** : Protéase.

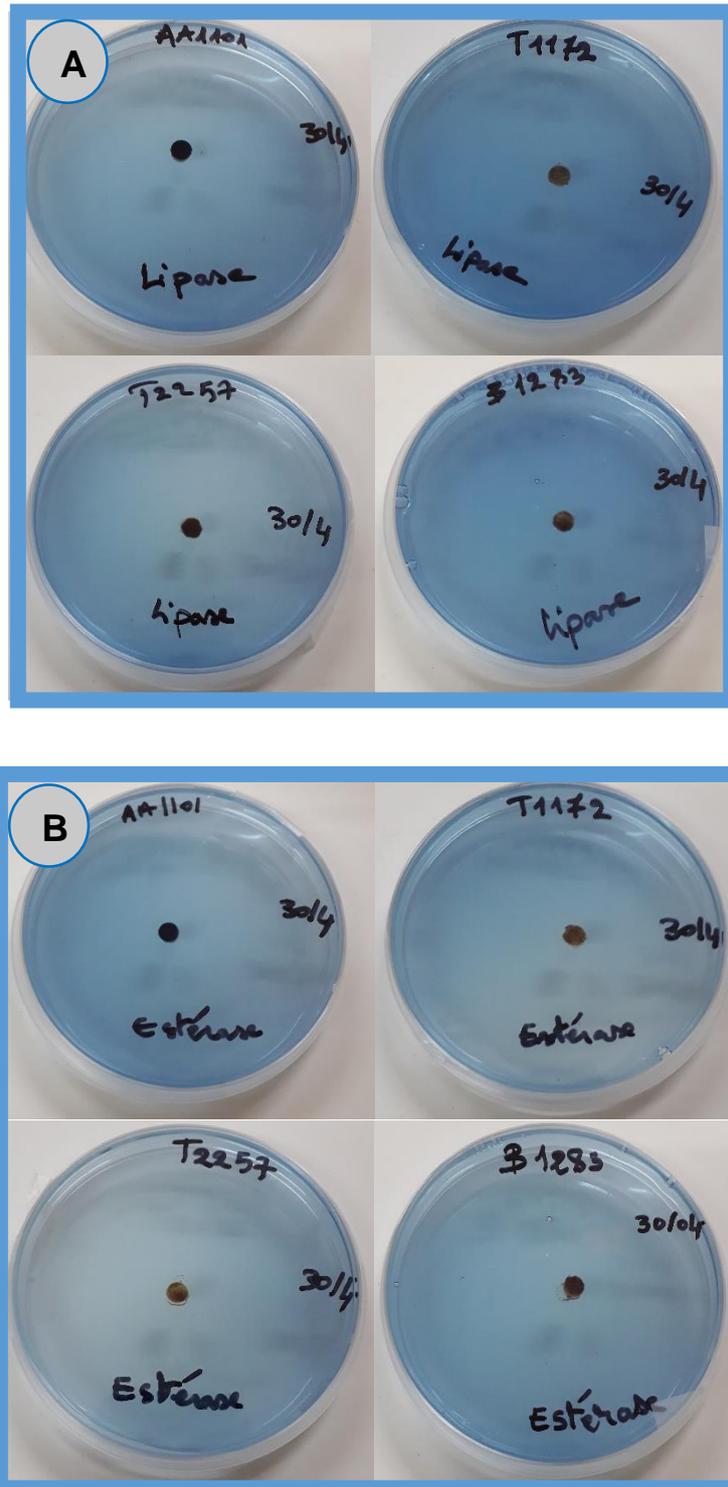


Figure 28 : Ensemencement des disques mycéliens dans les milieux tests. **A** : Lipase, **B** : Esterase .

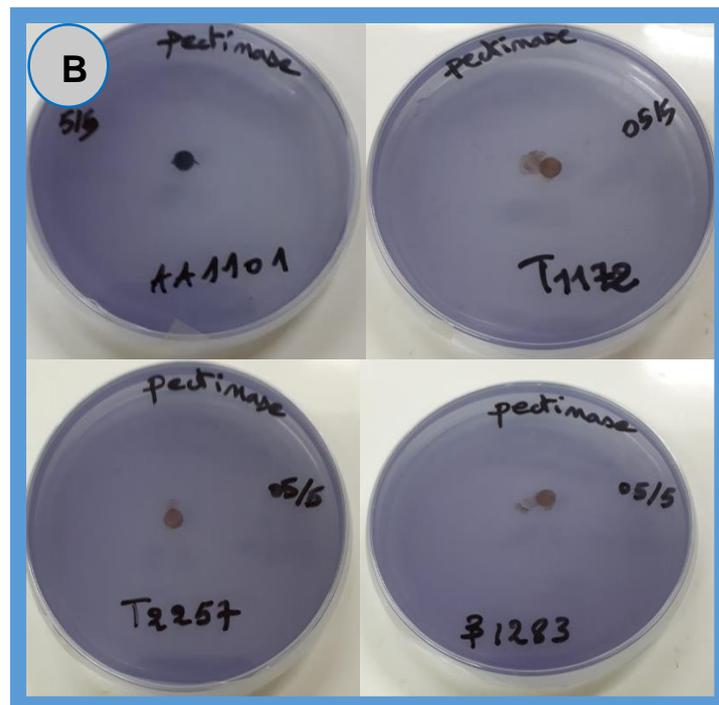
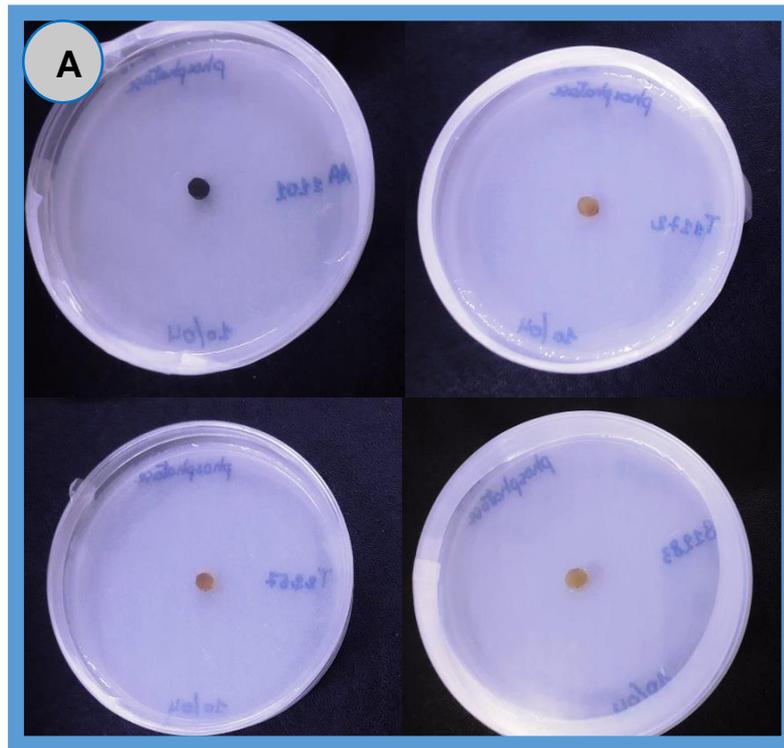


Figure 29 : Ensemencement des disques mycéliens dans les milieux tests.
A : Phosphatase, **B** : Pectinase .

1. Résultats :

1.1. Analyse des extraits fongiques par chromatographie sur couche mince (CCM) :

Pour avoir une évaluation qualitative de la composition chimique de nos extraits, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant trois systèmes solvants pour la phase mobile à différentes polarités a fins de séparer les substances actives et détecter le meilleur système de séparation tout en mettant en évidence la présence ou l'absence de deux composés, l'ampicilline (antibactérien) et le kétoconazole (antifongique).

1.1.1. Choix du système de solvant de migration :

La visualisation sous UV à 254 nm des chromatogrammes des extraits bruts développés sur les trois systèmes de solvants différents par le réactif de niydrine (révélateur des acides aminés), révèle une bonne séparation des bandes des extraits obtenus par l'acétate d'éthyle avec le système **A.E.T.AAG** : Acétone/eau/toluène/acide acétique glacial (650/100/100/25) (figure 32 et 33). En revanche, le système **A.M** : acétate d'éthyle méthanol 100/15 a permet la séparation d'un seul composé d'une seule souche d'*Aspergillus terreus* obtenus par l'acétate d'éthyle (figure 34 et 35). Ainsi, le système **A.AAR** : Acétone/solution d'acétate d'ammonium R de 154 g/l ajustée à pH=5 avec l'acide acétique glacial R (10/90) n'a pas permis la séparation des différents composés présents dans nos extraits (tableau 07) (figure 30 et 31).

Tableau 07 : Récapitulation d'efficacité des différents systèmes solvants pour la CCM. (+)séparation, (-) pas de séparation, (+/-) faible séparation.

| Systèmes solvants | Extraits obtenus par l'acétate d'éthyle | Extraits obtenus par le chloroforme |
|-------------------|---|-------------------------------------|
| A.M | + | Non testé |
| A.E.T.AAG | + | Non testé |
| A.AAR | - | - |

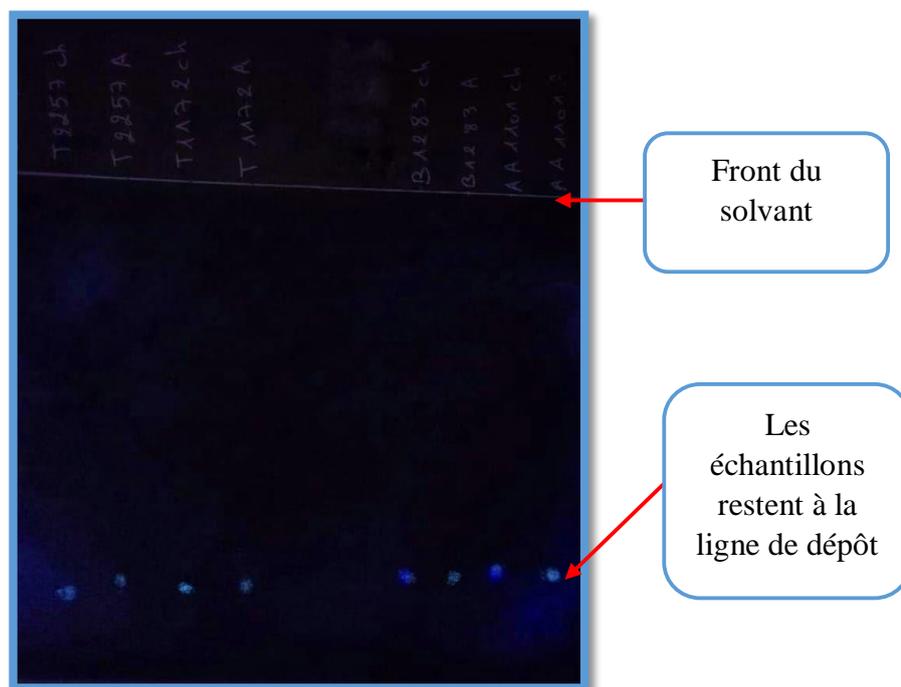


Figure 30 : Révélation des chromatogrammes (T 2257, T 1172, B 1283 et AA 1101(B)) par UV (254nm) développées dans le système solvant **A.AAR** : Acétone/solution d'acétate d'ammonium R de 154 g/l ajustée à Ph=5 avec l'acide acétique glacial R (10/90).

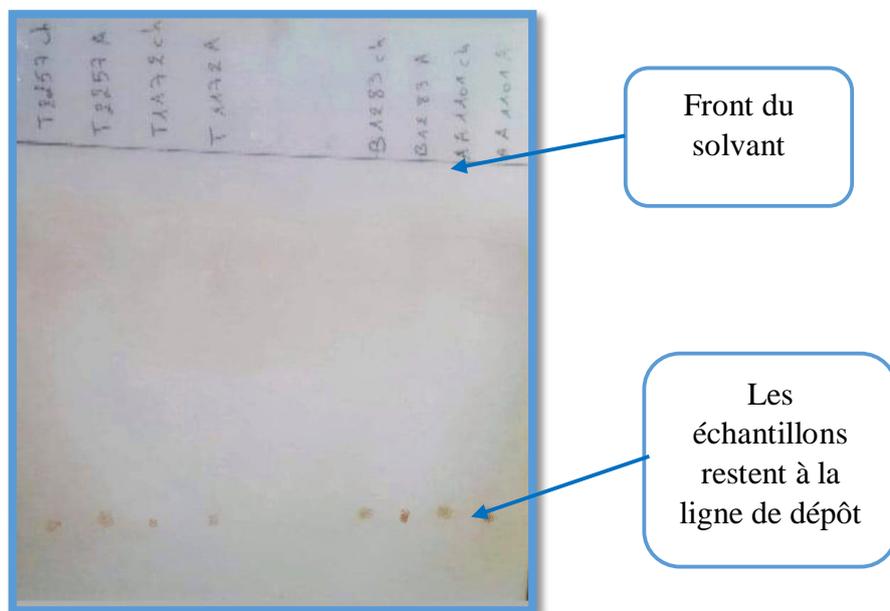


Figure 31 : Révélation des chromatogrammes (T 2257, T 1172, B 1283 et AA 1101(B)) par le réactif ninydrine développées dans le système solvant **A.AAR** :

Acétone/solution d'acétate d'ammonium R de 154 g/l ajustée à pH=5 avec l'acide acétique glacial R (10/90).

1.1.2. La révélation des composés antimicrobiens :

1.1.2.1. Révélation d'ampicilline et des acides aminés :

Après séchage des plaques à l'aire libre les différents spots des extraits d'*Aspergillus terreus* obtenus par l'acétate d'éthyle (B 1283, T 1172 et T 2257) et le spot du standard ampicilline ont été observés sous la lumière UV à 254 nm par le réactif niyhdrine (les résultats ont été lus à chaud 5 min à 100°C) (figure 03 et 04).

D'après l'observation des chromatogrammes sous la lumière UV (254 nm). Les résultats présentent une bonne migration grâce à la bonne séparation des molécules par le système solvant **A.E.T.AAG** : Acétone/eau/toluène/acide acétique glacial (650/100/100/25). Les spots obtenus sous formes de taches fluorescentes permettent de visualiser le standard après la migration et de confirmer la présence des acides aminés dans nos extraits d'*Aspergillus terreus* (tableau 08).

Le standard est représenté par une tache avec un rapport frontal égale à 0,24, et pour chaque extrait nous observons les différents métabolites qui ont été migré selon leur polarité avec l'éluant (annexe 03) (figure 32 et 33) :

- L'extrait de **T 2257** a révélé la présence d'une seule (1'') tache différente avec celle du standard (avec un rapport frontal égale à 0,84).
 - L'extrait de **T 1172** a révélé la présence de deux taches (1) et (2) avec un rapport frontal (Rf) de 0,40 et 0,84 respectivement différentes à celui du standard.
 - L'extrait de **B 1283** a révélé la présence de deux taches (1') et (2') avec un rapport frontal (Rf) de 0,40 et 0,84 respectivement différentes à celui du standard.
- Ces résultats montrent l'absence d'ampicilline et la présence des acides aminés dans nos extraits d'*Aspergillus terreus* obtenus par l'acétate d'éthyle (tableau 08).

Tableau 08 : Les résultats de détection de l'ampicilline et des acides aminés dans les extraits d'*Aspergillus terreus* obtenus par l'acétate d'éthyle.

| Les extraits d' <i>Aspergillus terreus</i> obtenus par l'acétate d'éthyle | Présence ou absence d'ampicilline | Nombre des acides aminés présents dans l'extrait |
|---|-----------------------------------|--|
| T 2257 | - | 01 |
| T 1172 | - | 02 |
| B 1283 | - | 02 |

D'après les chromatogrammes on remarque aussi l'apparition des spots dans les mêmes niveaux pour les trois extraits avec des rapports frontaux identiques (spot 1'' de **T2257**, spot 2 **T1172** et spot 2' **B1283** et aussi spot 1 et 1' de **T 1172** et **B1283** respectivement), cela est expliqué par l'existence des métabolites de la même nature dans les extraits (annexe 03).

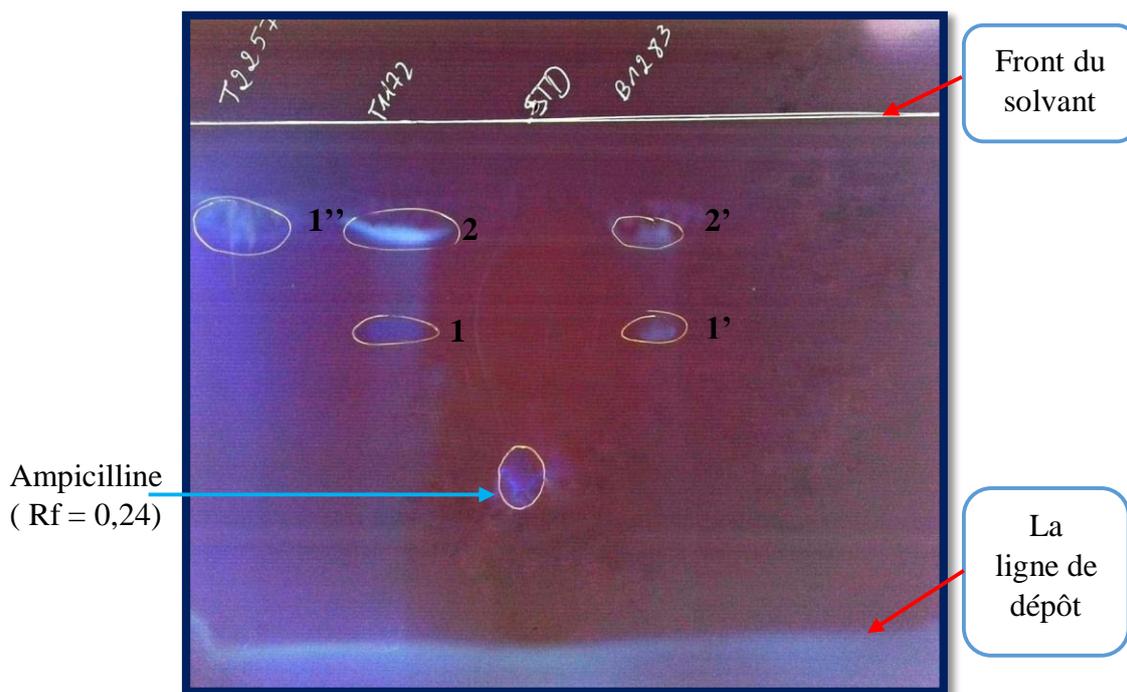


Figure 32 : Révélation des chromatogrammes des extraits d'*Aspergillus terreus* obtenus par l'acétate d'éthyle (T 2257, T 1172 et B 1283) par UV (254nm) développées dans le système solvant **A.E.T.AAG** : Acétone/eau/toluène/acide acétique glacial (650/100/100/25).

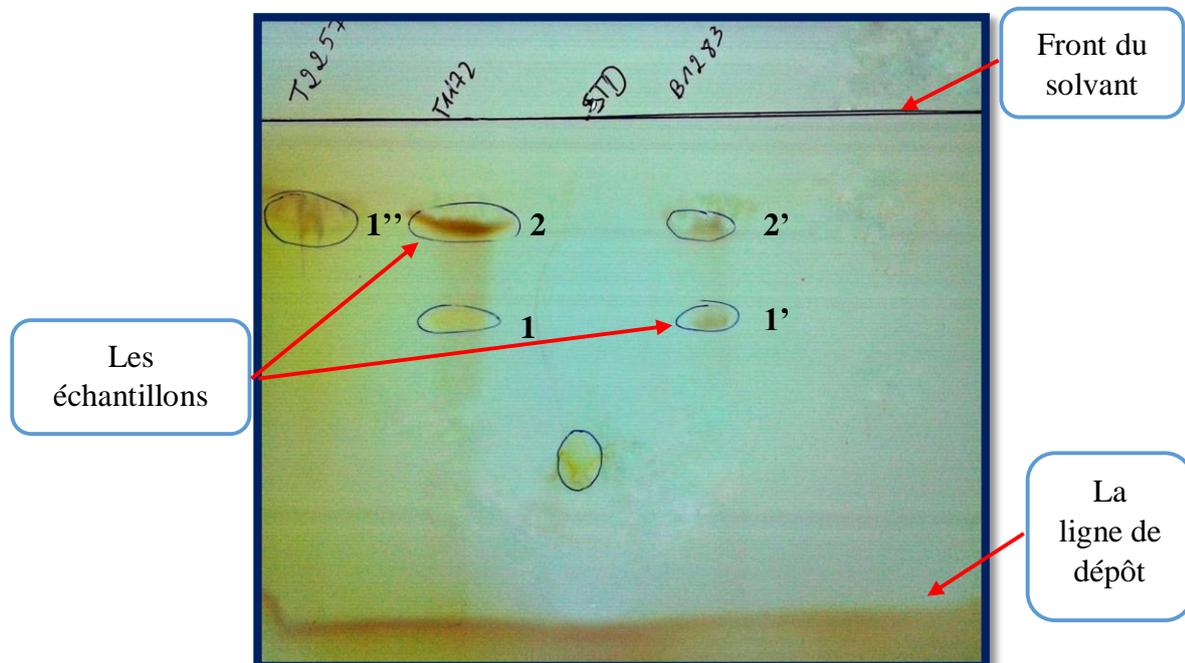


Figure 33 : Révélation des chromatogrammes des extraits d'*Aspergillus terreus* obtenus par l'acétate d'éthyle (T 2257, T 1172 et B 1283) par le réactif ninydrine développées dans le système solvant **A.E.T.AAG** : Acétone/eau/toluène/acide acétique glacial (650/100/100/25).

1.1.2.2. Révélation de kétoconazole :

Après séchage des chromatogrammes à l'aire libre la plaque de silicagel a été révélée sous la lumière UV (254nm) par le réactif niyhdriane (les résultats en été lus à chaud 5 min à 100°C).

D'après l'observation de la plaque CCM sous la lumière UV (254nm). Les résultats présentent une mal migration à cause de la mauvaise séparation des molécules par le système solvant **A.M** : acétate d'éthyle méthanol 100/15. Seulement deux spots ont été apparus, l'une du standard kétoconazole et l'autre de l'extrait de la souche B1283 d'*Aspergillus terreus* obtenu par l'acétate d'éthyle (figure 34 et 35).

L'extrait de la souche B 1283 obtenu par l'acétate d'éthyle a donné sur la plaque de CCM une seule tache fluorescente avec un rapport frontal (Rf) de 0,42 identique à celui du standard kétoconazole (figure 34).

- Ces résultats montrent la présence de l'antifongique kétoconazole dans l'extrait de la souche B 1283 obtenu par l'acétate d'éthyle. En revanche, on ne peut pas déduire la présence ou l'absence du kétoconazole dans les autres extraits à cause de la mauvaise séparation des composés actifs de nos extraits.

L'extrait de la souche B 1283 obtenu par l'acétate d'éthyle a été examiné aussi par une autre méthode analytique la spectrométrie UV-visible pour confirmer l'existence de kétoconazole et l'évaluer quantitativement.

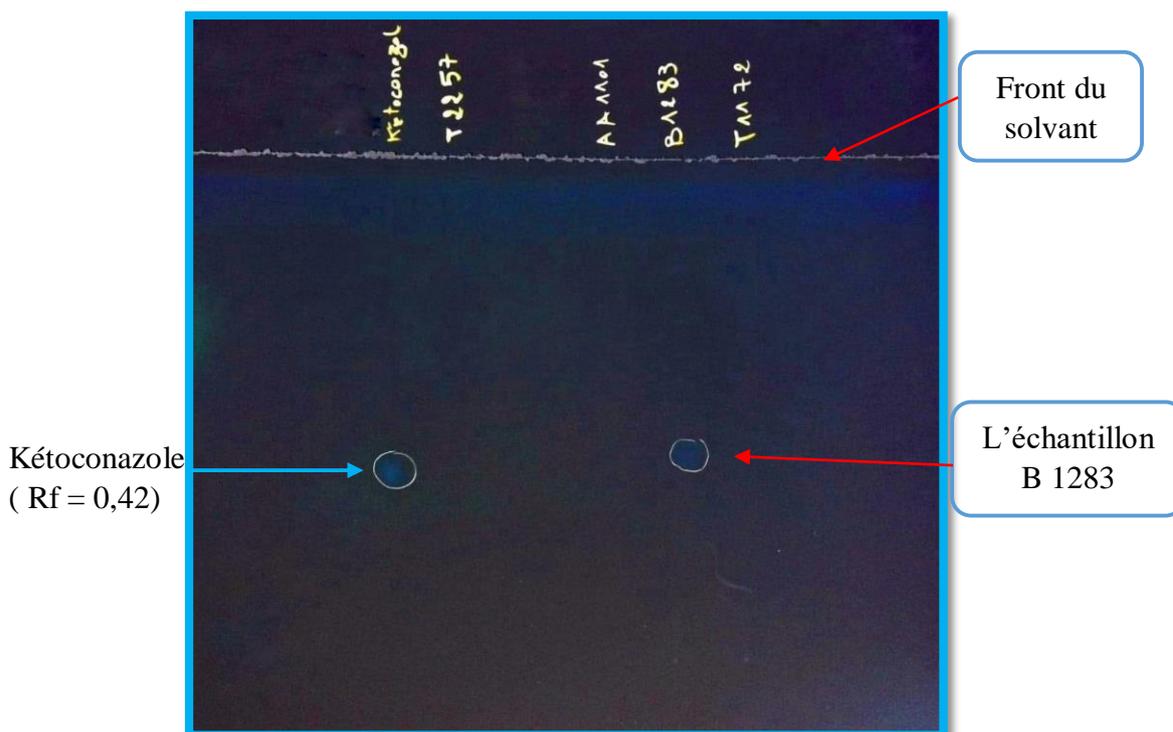


Figure 34 : Révélation des chromatogrammes des extraits obtenus par l'acétate d'éthyle (T 2257, T 1172, B 1283 et AA 1101 (B)) par UV (254nm) développées dans le système solvant **A.M** : acétate d'éthyle méthanol 100/15.

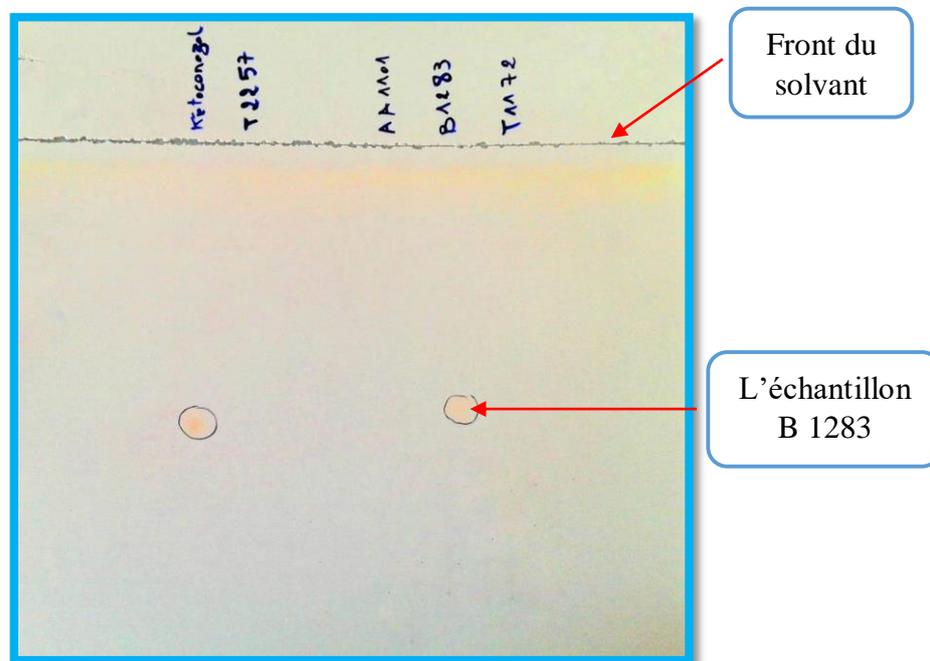


Figure 35 : Révélation des chromatogrammes des extraits obtenus par l'acétate d'éthyle (T 2257, T 1172, B 1283 et AA 1101 (B)) par le réactif ninhydrine développées dans le système solvant **A.M** : acétate d'éthyle méthanol 100/15.

1.2. Analyse de l'extrait B 1283 par spectrométrie UV-visible :

Le spectre UV-visible est déterminé, pour noter la présence ou absence de la kétoconazole dans notre extrait **B** 1283 (les produits sont dissous dans le méthanol). Le balayage spectral a été effectué entre 190 et 350nm pour l'extrait et entre 260 et 800nm pour le standard par un spectrophotomètre UV-VIS Perkin Elmer.

L'analyse du spectre UV-visible montre que le spectre d'absorption du standard obtenue à un seul pic avec une longueur d'onde maximale de 294,87nm (figure 36).

L'extrait **B** 1283 d'*Aspergillus terreus* présente un spectre caractérisé par une série de pics entre 190 et 350 nm, ce qui est traduit par l'existence de plusieurs composés. Dans cette série de pics on remarque la présence d'un pic avec une longueur d'onde de 294,46 nm (figure 37).

- Ces résultats montrent l'existence de la bande d'absorption maximale (λ max) du standard dans l'extrait ce qui indique partiellement la présence de kétoconazole dans notre échantillon.

La quantité de kétoconazole dans notre extrait est déterminée mathématiquement, et on peut dire d'une façon approximative que notre échantillon contient 23% du kétoconazole.

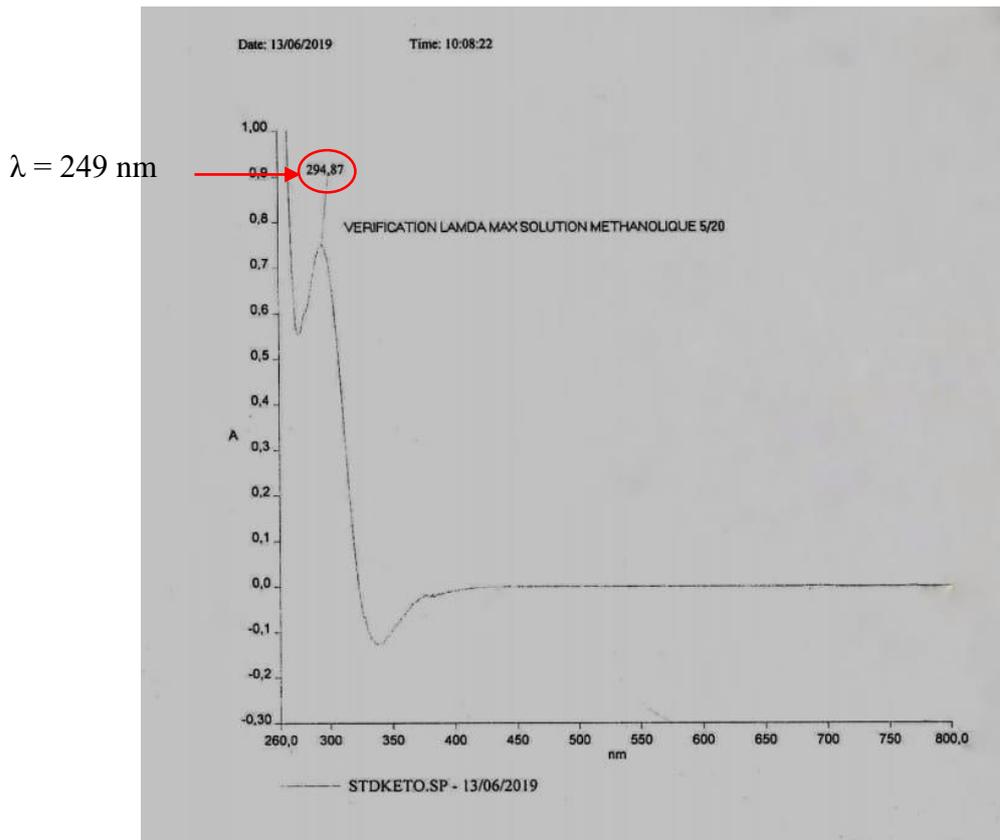


Figure 36 : Spectre d'absorption de kétéconazole.

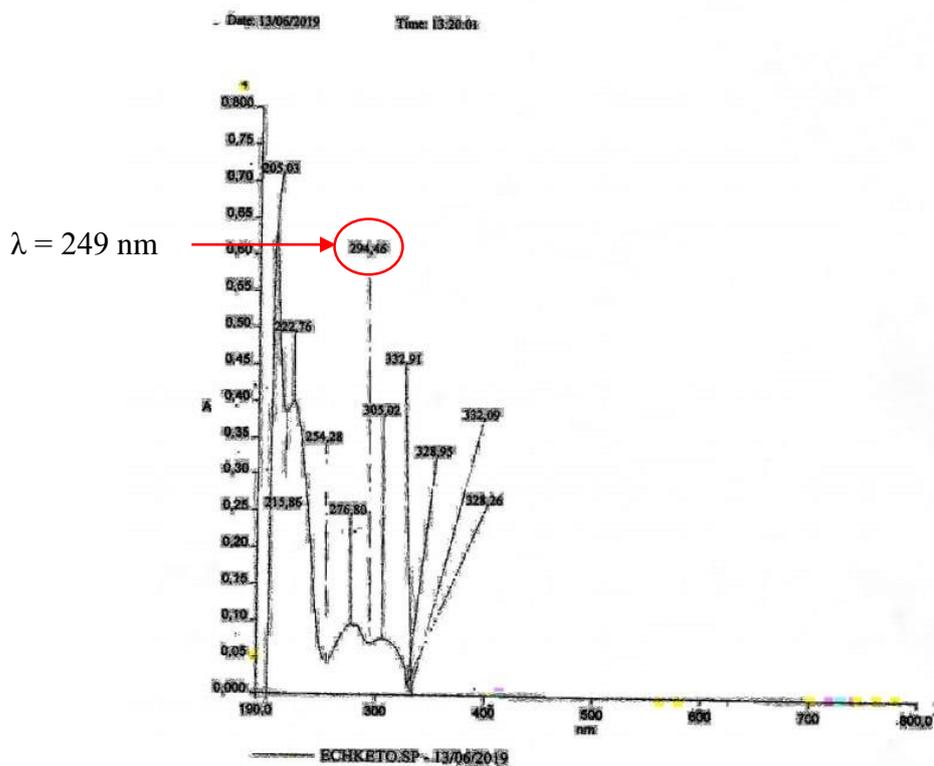


Figure 37 : Spectre d'absorption de l'extrait de la souche B 1283 d'*Aspergillus terreus* obtenus par acétate d'éthyle.

1.3.Détermination de l'activité enzymatique :

Afin d'évaluer qualitativement nos souches mycoendophytes une démonstration de la production de sept enzymes extracellulaires a été réalisé. Tous les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 09 et illustré par les figure de 39 à 45.

L'évaluation de la production de sept enzymes extracellulaires a été réalisée pour nos souches fongiques ; les résultats ont démontré que les quatre champignons endophytes produisent la chitinase. Seulement les souches d'*Aspergillus terreus* sont capables de produire la phosphatase et la protéase. Une souche d'*Aspergillus terreus* et une affiliée à la famille de *Botryosphaeriaceae* ont une activité lipasique, par contre tous les mycoendophytes ne synthétisent pas l'amylase, l'estérase et la pectinase.

Tableau 09 : Résultat des différents tests d'activités enzymatiques.

| Les activités enzymatiques | Isolats fongiques | | | |
|----------------------------|----------------------------|--------|--------|---------------------------|
| | <i>Aspergillus terreus</i> | | | <i>Botryosphaeriaceae</i> |
| | T 2257 | T 1172 | B 1283 | AA 1101(B) |
| Chitinase | + | + | + | + |
| Péctinase | - | - | - | - |
| Amylase | - | - | - | - |
| Estérase | - | - | - | - |
| Phosphatase | + | + | + | - |
| Protéase | + | + | + | - |
| Lipase | + | - | - | + |

En outre, l'activité chitinasique qui représente l'un de critère de sélection les plus importants est présente chez tous les isolats fongiques, elle a été détectée par la croissance rapide des champignons en comparaison avec leurs croissance sur le milieu PDA (tableau 10) (figure 38).

Tableau 10 : Croissance mycélienne des champignons endophytes en présence de la chitine après 10 jours.

| Souche endophytes testés | Diamètre de croissance en (cm) | |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------|
| | Sur le milieu teste | Sur le milieu PDA |
| B 1283 | 2 | 4 |
| AA 1101 (B) | 2.56 | 5 |
| T 1172 | 3 | 5 |
| T 2257 | 4 | 5 |

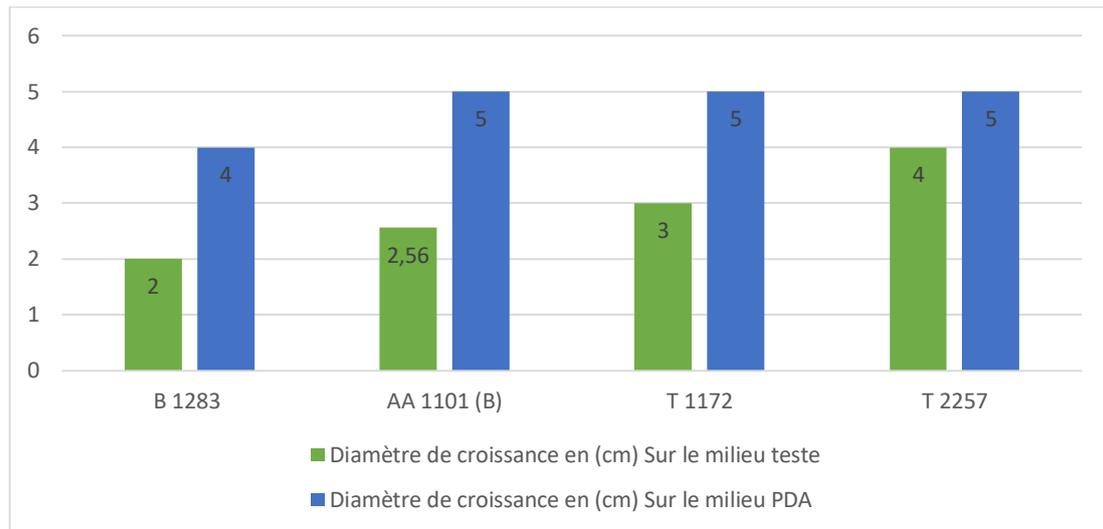


Figure 38 : Comparaison du diamètre de la croissance mycélienne des champignons endophytes en présence de la chitine et su le milieu PDA.

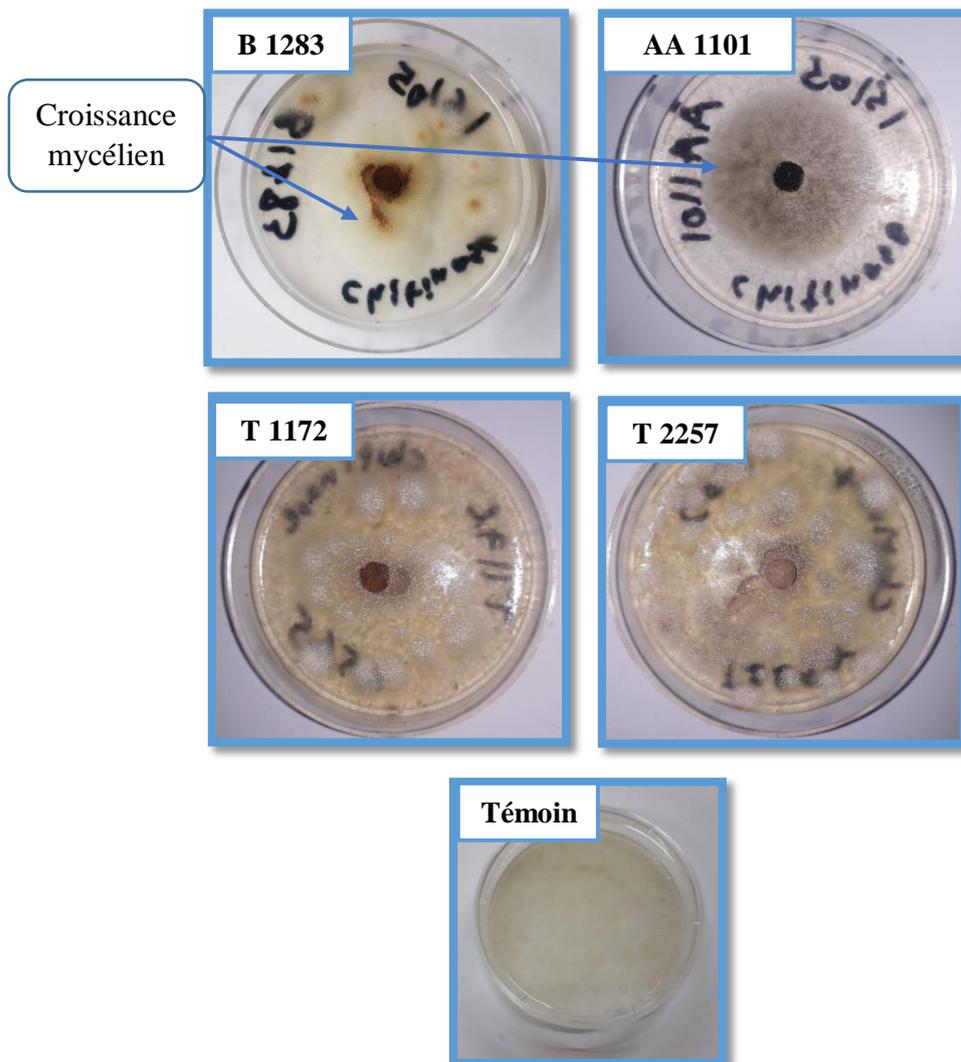


Figure 39 : Croissance mycélienne des champignons endophytes en présence de la chitine.

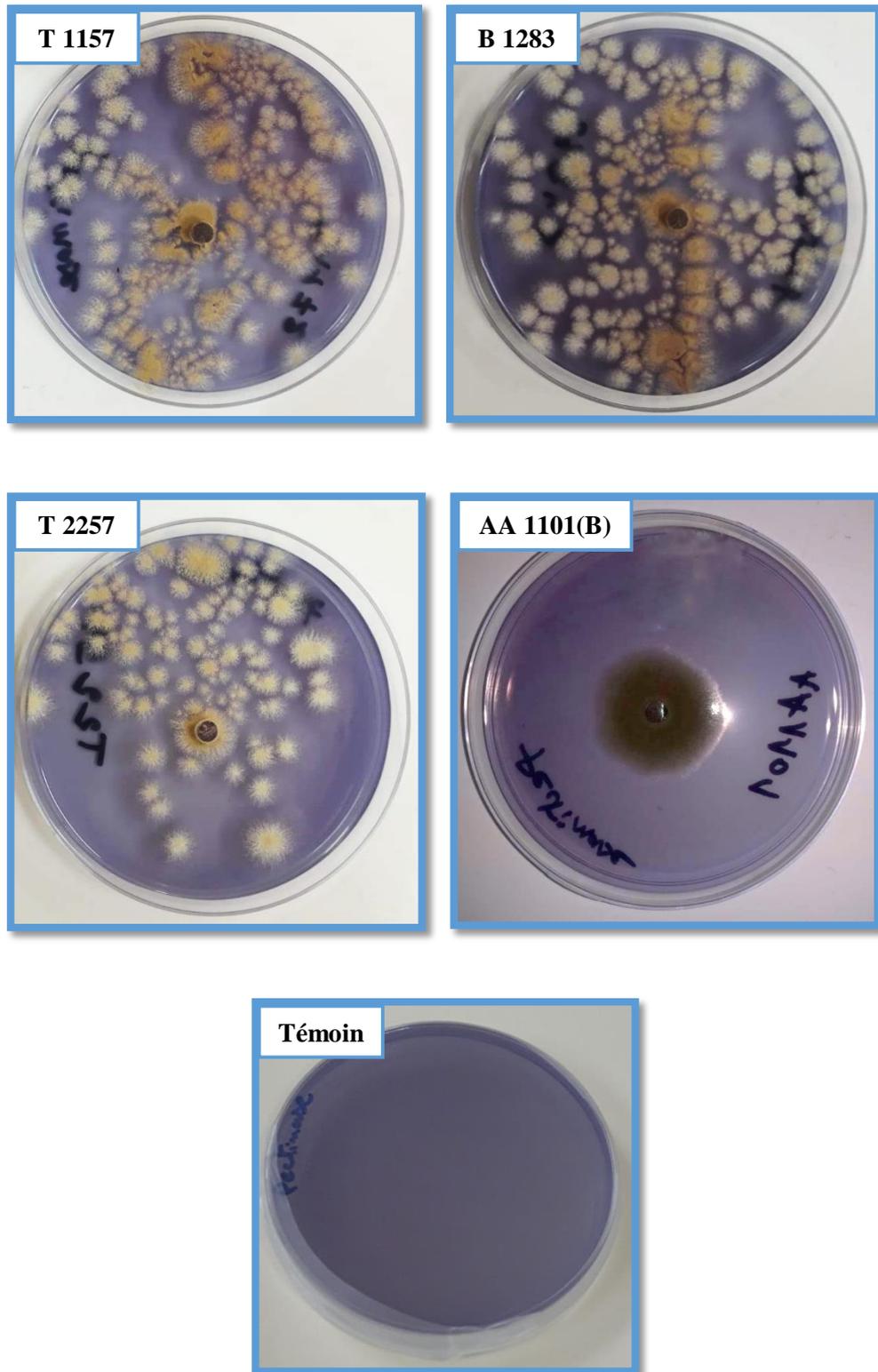


Figure 40 : L'activité pectinolytique des champignons endophytes.

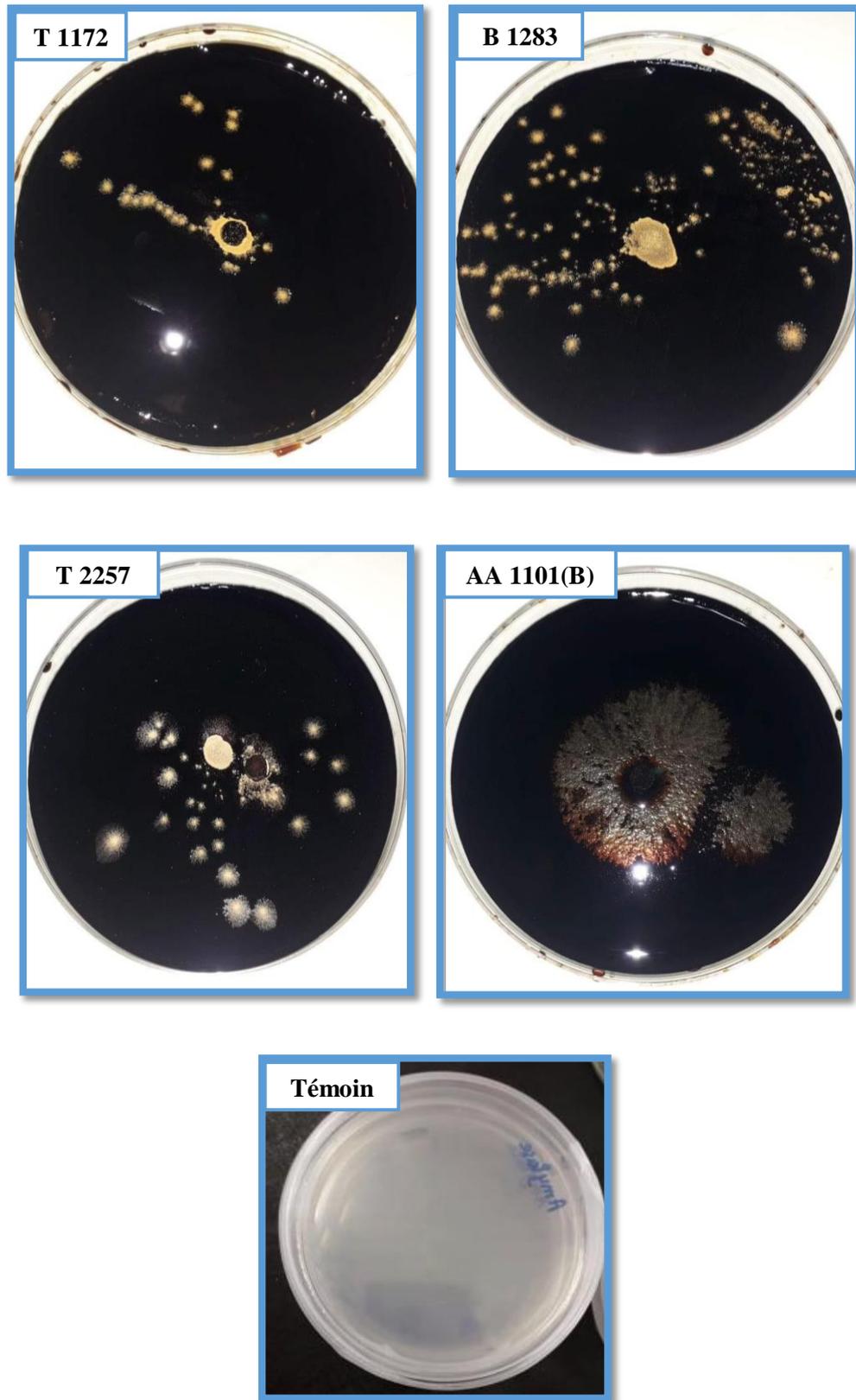


Figure 41 : L'activité amylasique des champignons endophytes.

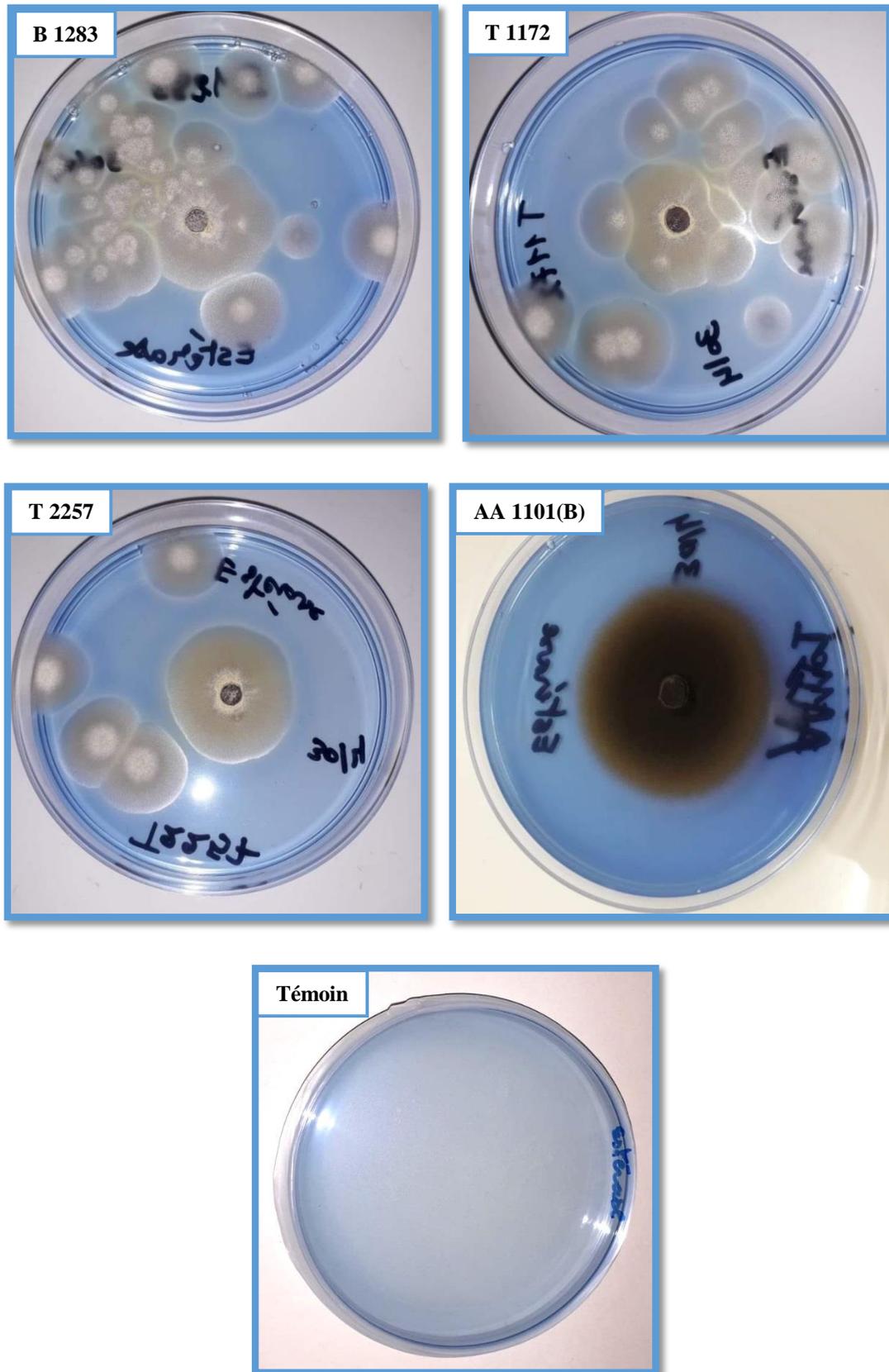


Figure 42 : L'activité estérasique des champignons endophytes.

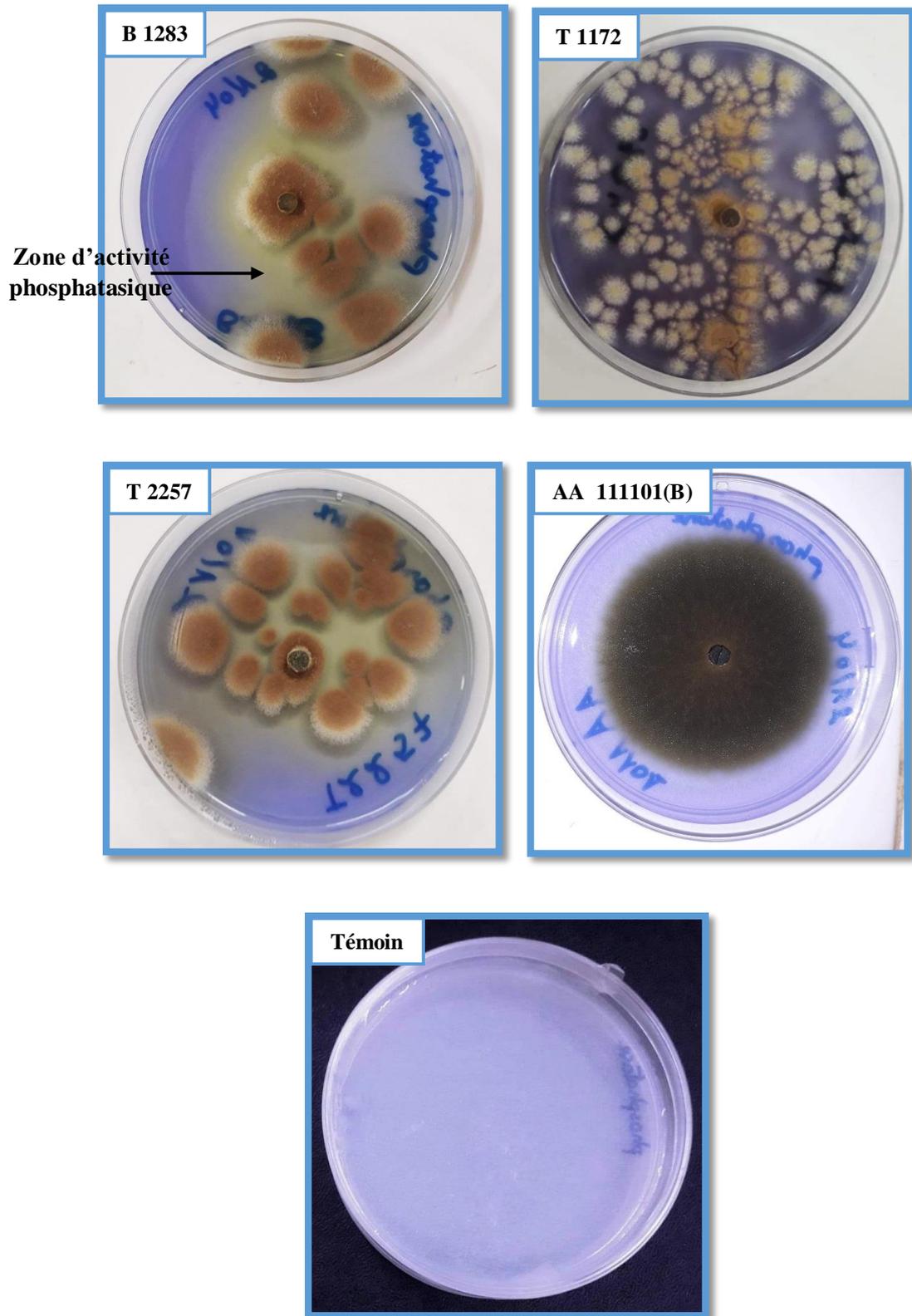


Figure 43 : L'activité phosphatasique exercée par les champignons endophytes.

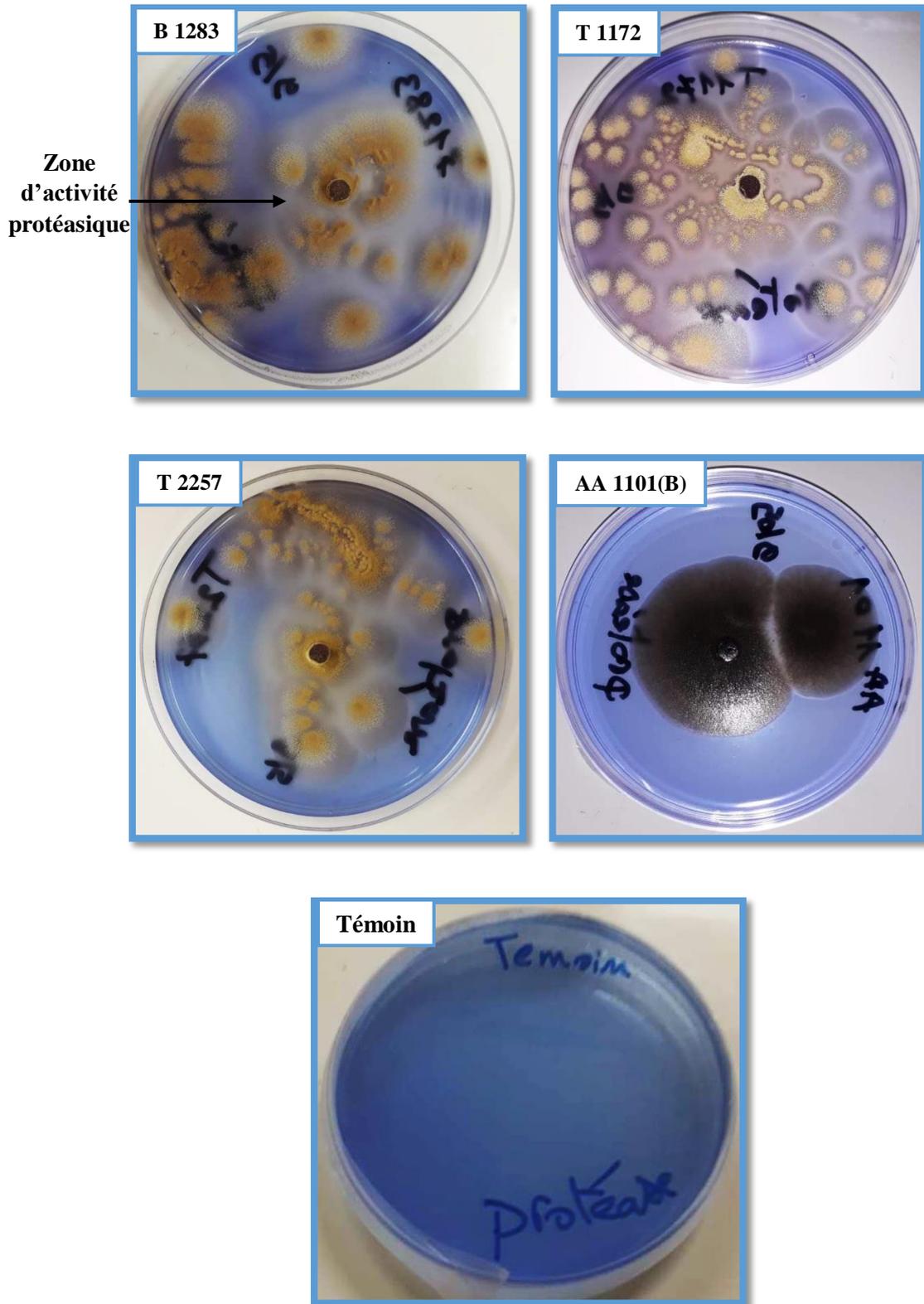


Figure 44 : L'activité protéasique exercée par les champignons endophytes.

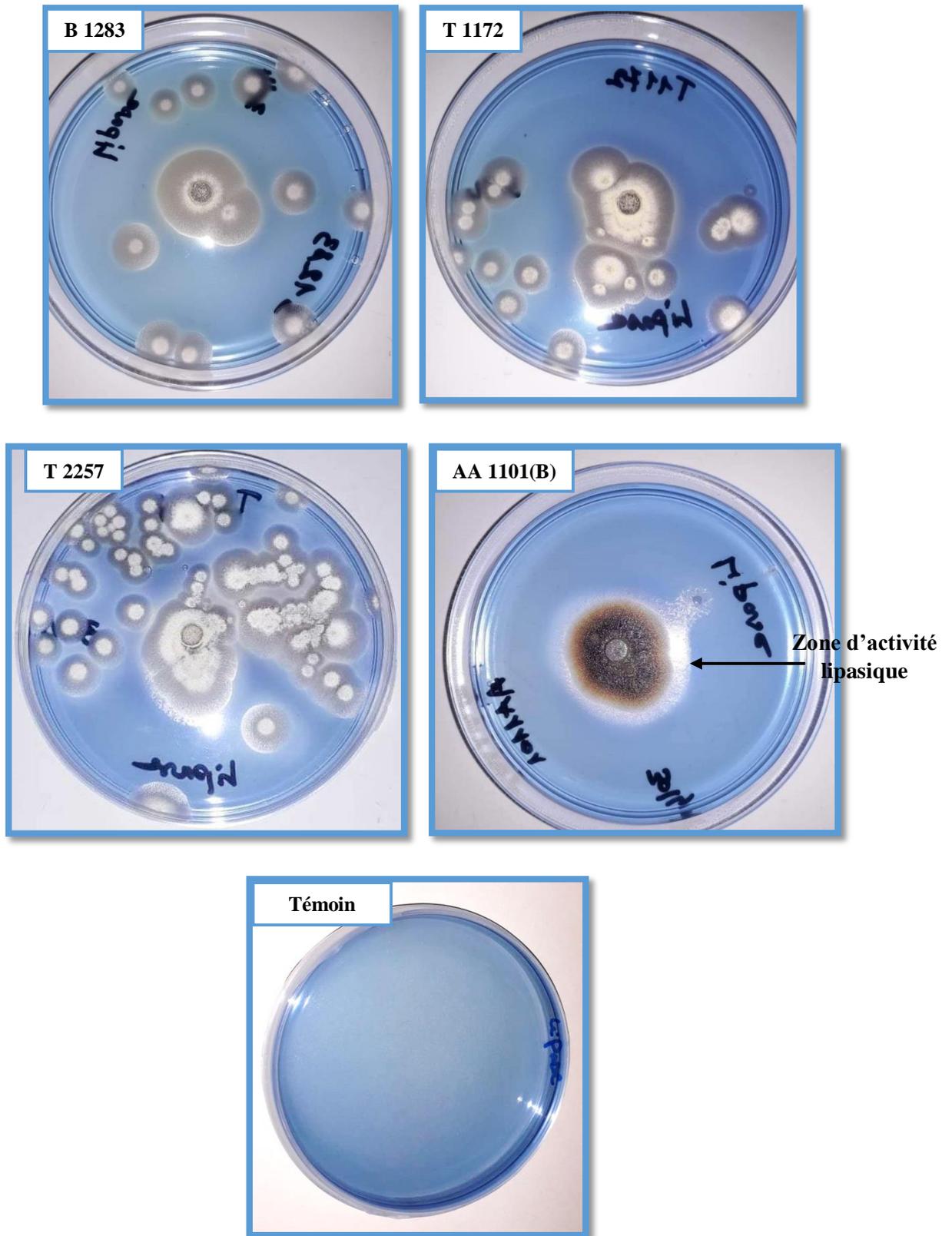


Figure 45 : L'activité lipasique exercée par les champignons endophytes.

2. Discussion :

Les métabolites secondaires des mycoendophytes constituent une source naturelle pour plusieurs substances à différentes activités thérapeutiques. *Aspergillus* et *Botryosphaeriaceae* produisent une large gamme de composés de différentes natures à activités biologiques diverses. Les extraits bioactifs de nos souches mycoendophytes ont été analysés par CCM pour les identifier. Les extraits qui montrent la présence d'un composé recherché ont subi une analyse par l'UV-Visible.

La comparaison des résultats de la CCM du standard ampicilline avec celui des composés produits par les souches d'*Aspergillus terreus* (T 2257, T 1172 et B 1283) a permis d'identifier l'absence de l'ampicilline dans nos extraits donc, les *Aspergillus terreus* ne produisent pas cet antibiotique, au contraire à l'*Aspergillus clavatonanicus* qui a montré une capacité de 3,733 % de production de l'ampicilline (Mishra et al., 2017).

En revanche, l'apparition de différentes taches après la révélation par la lumière UV et le réactif ninhydrine montre la présence des différents composés antimicrobiens de nature acides aminés ou protéine. Ce résultat est en concordance avec les travaux de Leewenhoek (1953) qui confirment la production des acides aminés par les *Aspergillus* comme la cystine ou cystéine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine, la glycine et l'alanine...etc chez *Aspergillus oryzae*. En outre Barakat et Gohar en 2012, ont montré que l'*A.terreus* ayant une activité antibactérienne et antifongique, ce qui nous a permis de supposer que ces acides aminés ont une activité antimicrobienne.

Ainsi, la comparaison du chromatogramme de la souche **B** 1283 d'*Aspergillus terreus* avec celui du standard kétoconazole a permis d'identifier la présence de ce dernier dans l'extrait avec des rapports frontaux identiques. Cet antifongique à usage topique du groupe des imidazolés possède une action antifongique puissante sur les dermatophytes (en particulier *Trichophyton sp*, *Epidermophyton sp* et *Microsporum sp*) et les levures (en particulier *Candida sp* et *Malassezia furfur*) (Cutsem JV, 1983 ; Munoz AJ, 1996 ; www.vidal.fr/substances/1956/ketoconazole).

- Donc, ces résultats montrent la capacité d'*Aspergillus terreus* à produire différents composés à activités antimicrobiennes de nature acide aminé ou protéine.

Après la détermination de la présence de kétoconazole dans l'extrait de la souche B 1283 par la CCM, une UV-visible a été réalisée pour confirmer l'existence de cette antifongique et aussi pour calculer leur pourcentage dans notre extrait.

Selon les résultats qui sont obtenus par la comparaison des deux spectres l'un du standard et l'autre de l'échantillon on peut supposer la présence environ de 23 % de kétoconazole dans notre extrait. Ce résultat est similaire avec celui de Mishra et *al.* (2017) qui ont trouvé à l'aide de la HPLC-ESI-SM la présence de 6,367 % de kétoconazole dans l'extrait d'*A.clavatonanicus* ; en remarque que le potentiel de production de kétoconazole est plus important chez *A.terreus* par rapport au *A.clavatonanicus*. La détection de tel antifongique ouvre les portes à la possibilité de l'exploitation d'*A.terreus* dans le domaine pharmacologique pour la production des nouveaux traitements d'origine naturel.

A cause du manque d'autres méthodes d'analyses tel que spectrophotométrie infra rouge, HPLC, chromatographie en phase gazeuse CPG et spectrophotométrie de masse...etc. nos résultats reste à confirmer.

Les endophytes fongiques utilisés dans ce travail ont été testés pour la production de sept enzymes. Ils ont pu utiliser la chitine comme source de carbone ce qui prouve leurs capacité de synthétiser la chitinase. En outre, la teneur de la production de cette enzyme est plus forte chez les *Aspergillus terreus* que *Botryosphaeriaceae*. Cette enzyme s'avère plus efficace dans l'évaluation de fréquence de l'intensité de colonisation des endophytes chez les graminées, les arthropodes, et les insectes (Charpentier et Percheron, 1983 ; Iverson et *al.*, 1984 ; Tsujibo et *al.*, 1993 ; Cheplick et Faeth, 2009). Donc, nos souches d'*Aspergillus terreus* ont une capacité de colonisation et de lutte biologique très importantes en comparaison avec la souche de *Botryosphaeriaceae* testé dans cette étude.

Pour l'amylase, elle se distingue comme une classe d'enzymes dont le rôle biologique est d'hydrolyser l'amidon (Mercier, 1985). Elle a des applications utiles dans le brassage, textile, détergent et industries pharmaceutiques (Asghar et *al.*, 2000). Tous les champignons endophytes testé dans notre étude, montrent une

activité amylasique négative. Malgré les *Aspergillus* sont le genre amylasique le plus répandu dans la nature, nos souches d'*Aspergillus terreus* sont incapable de produire l'amylase (Maria et al., 2005 ; Norouzian et al., 2006). Selon Asghar et al. (2000), Les différentes espèces d'*Aspergillus* tels que *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavous*, *A. tamarie*, *A. fumigatus* présentent une activité amylasique positive et ils sont fréquemment utilisé pour une production industrielle d'amylase. Dans le cas de *Botryosphaeriaceae*, notre souche ne présente aucune activité amylasique, par apport à l'étude d'Esteves et al. (2014) qui montre que 70% des *Botryosphaeriaceae* sont capables de produire l'amylase. Ainsi, *Botryodiplodia theobromae* représente une production considérable d'amylase (Cunha et al. 2003 ; Rezende et al., 2005).

Les champignons endophytes élaborent une grande variété d'enzymes que les bactéries et les protéases sont parmi les enzymes les plus importantes. Les protéases est le groupe le plus important d'enzymes produites industriellement et représente environ 60% de la valeur des ventes mondiales du total industriel enzymes (Godfrey 1996). Cependant le genre *Aspergillus* produit une variété d'enzymes protéolytiques. Par ailleurs, les trois souches d'*Aspergillus terreus* montrent une production d'enzyme protéase. Ce résultat est similaire à celui décrits par Sethi et al. (2013) qui confirme que les *A. terreus* sécrètent des quantités importantes de protéases extracellulaires. Ainsi, d'autres étude ont montré aussi que les souches d'*Aspergillus oryzae* non toxicogènes et non pathogènes produisent la protéase (Karthic et al., 2014). Par contre, notre souche de *Botryosphaeriaceae* est non productrice de protéase ce qui consiste un résultat rarement trouvé par apport à Esteves et al. (2014) qui ont trouvé que 70% des souches de *Botryosphaeriaceae* étaient capables de produire des protéases.

La lipases et l'estérases constituent deux biocatalyseurs les plus importants recherchés en biotechnologie (Pliego et al., 2015). Et dans notre étude, *A. terreus* et *Botryosphaeriaceae* sont avérés être producteurs d'une lipase extracellulaire, ce qui concentre la lumière sur ces souches pour leur utilisation dans le domaine industriel. En outre, dans l'étude de Macris et al. (1996) et Mala et al. (2007) qui décrit les souches d'*Aspergillus niger* comme productrices de lipase extracellulaire. Plusieurs auteurs ont travailler sur des champignons endophytes qui sont avéré d'être productrices de lipase, parmi eux y'a les souches *Penicillium camemberti*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium simplicissimum* et *Rhizopus sp.* (Ortiz et al., 1993 ; Leal et al.,

2000; Palma et al., 2000 ; Macedo et al., 2003 ; Diluccino et al., 2004). En revanche, les mycoendophytes testées dans notre étude ne montrent aucune activité estérasique ; par contre au *Aspergillus ochraceus* qui a été sélectionné comme producteur d'estérase (Borbón et al., 2018). Selon Blely et al. (1988) les souches de *Trichoderma reesei* et notamment les *Schizophyllum commune* possèdent une activité estérasique importante.

Les trois souches d'*Aspergillus terreus* ont utilisés le phosphate comme source de carbone ce qui prouve leurs capacité de synthétisé la phosphatase. Nos résultats montrent une similarité avec le travail de Yamada et al. (1968) qui mentionnent une grande capacité de production de l'enzyme phosphatase chez l'espèce *Aspergillus terreus*. En ce qui concerne la souche *Botryosphaeriaceae*, elle ne montre aucune activité phosphatasique. Donc, en conclut que la teneur de la production de cette enzyme est plus forte chez les *Aspergillus terreus* que *Botryosphaeriaceae*.

Par ailleurs, nos résultats indiquent que les souches d'*Aspergillus terreus* et *Botryosphaeriaceae* ne produisent pas la pectinase par apport aux *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae* et *Botryosphaeria rhodina* qui ont une forte teneur de production de cette enzymes (Saldanha et al., 2007 ; Yadav et al., 2007 ; Esteves et al., 2014).

D'après les résultats obtenus par la chromatographie sur couche mince (CCM) qui indiquent la présence des composés de natures acide aminé et/ou protéine dans nos extraits, et ainsi les tests enzymatiques réalisés ; on peut déduire que les substances polypeptidiques révélées dans les chromatogrammes sont les enzymes trouvés chez nos souches mycoendophytes (chitinase phosphatase protéase et lipase). En outre, la présence de kétoconazole dans l'extrait de la souche d'*Aspergillus terreus* (B 1283) représente un résultat exclusif à notre recherche. Donc, on conclut que les souches utilisées dans ce travail constituent un large réservoir de nouvelles molécules qui peuvent être exploité dans le futur.

Conclusion

Les métabolites secondaires d'origine naturelle constituent une énorme ressource de traitements efficace à faible toxicité et avec un impact mineur sur l'environnement, récemment les champignons endophytes ont pris de l'élan en raison de leur potentiel énorme de production d'une myriade de ces métabolites. Ils constituent une riche source de composés médicalement utiles en raison de leurs propriétés pharmaceutiques et toxicologiques. Ils sont donc considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites avec un potentiel d'exploitation dans une grande variété de domaines biotechnologique.

La présente étude s'articule autour de deux axes. Le premier vise à l'extraction et l'identification des métabolites secondaires des champignons endophytes. Le deuxième est consacré à l'estimation de leurs activités enzymatiques. La communauté fongique testé est représentée par trois souches d'*Aspergillus terreus* et une souche de *Botryosphaeriaceae*.

Les résultats de l'étude analytique par la chromatographie sur couche mince ont montrés la richesse des extraits d'acétate d'éthyle par des composés bioactif de nature acide aminée et/ou protéine, et les extraits du chloroforme ne sont pas testés à cause de la mauvaise séparation par le système solvant **A.AAR** : Acétone/solution d'acétate d'ammonium R de 154 g/l ajustée à pH=5 avec l'acide acétique glacial R (10/90). Ainsi, la détection de l'ampicilline chez les extraits d'*Aspergillus terreus* obtenus par l'acétate d'éthyle a révélé l'absence de cet antibiotique. En revanche, l'antifongique kétoconazole a été trouvé chez l'extrait de la souche (B 1283) d'*Aspergillus terreus* obtenus par l'acétate d'éthyle.

Une UV-visible a été faite pour la confirmation de résultat obtenu par la technique précédente (CCM) qui déduit la présence de kétoconazole dans l'extrait de la souche **B1283** d'*A.terreus*. Les spectres d'absorbance ont montré la présence de λ max du standard kétoconazole dans le spectre de l'extrait de cette souche, ce qui confirme partiellement la présence de cet antifongique. Un calcul mathématique a permet de déduire que cet extrait contient approximativement 23% de kétoconazole.

L'évaluation de la production de sept enzymes extracellulaires a été réalisée pour nos souches fongiques ; les résultats ont démontré que 100 % des mycoendophytes produisent la chitinase, 75 % des champignons endophytes produisent la phosphatase et la protéase, qui sont seulement les souches d'*Aspergillus terreus*. Pour la lipase, 50 % des champignons représentent une activité lipasique, par contre l'amylase, l'estérase et la pectinase ne sont pas synthétisées par les mycoendophytes testés.

Conclusion

Nous avons constaté que les champignons endophytes utilisés dans ce travail sont riches en composés polypeptidiques qui peuvent être des enzymes extracellulaires (chitinase, phosphatase, protéase et lipase). En outre, la présence de kétoconazole dans l'extrait de la souche d'*Aspergillus terreus* (B 1283) représente un résultat exclusif à notre recherche.

En se basant sur ces résultats, nos travaux représentent une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies, donc il est d'intérêt primordial de fixer les points suivants comme perspectives :

- Réalisation de plusieurs protocoles d'extractions afin d'obtenir des quantités suffisantes pour avoir la possibilité d'exploiter plusieurs techniques avec plusieurs essais.
- Utilisation d'autres systèmes solvants et d'autres révélateurs chimiques pour la chromatographie sur couche mince dans le but d'obtenir une bonne séparation et l'identification des métabolites secondaires.
- Détermination de la formule et la structure chimique de l'antifongique « Kétoconazole » présent dans notre extrait par des techniques plus avancées.
- Quantification de la production enzymatique de ces champignons endophytes.
- Détermination de l'activité antimicrobienne de nos extraits.
- Détermination du rendement des deux phases (organique et inorganique).
- Optimisation de choix des solvants d'extraction.

Référence bibliographique

Antonie van Leeuwenhoek, 1953. Etude du métabolisme d'acides aminés Chez *Aspergillus oryzae*, Volume 19 Issue I, pp245-255.

Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan G, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J, 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase and cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3957–3961.

Asghar HN, Zahir ZA, Khaliq A, Arshad M., 2000. Assessment of auxin production from rhizobacteria isolated from different varieties of rapeseed. *Pakistan J. Agric. Sci.* 37(3-4): 101-104.

Alves da Cunha MA, Barbosa AM, Giese EC, Dekker RFH., 2003. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. *J. Basic Microbiol.* 43: 385-392.

Arnold AE. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol Rev.*; 21(2-3) : 51-52.

Amit Rai, Shivshankar Umashankar, Megha Rai, Lim Boon Kiat, Johanan Aow Shao Bing, & Sanjay Swarup, 2016. Coordinate Regulation of Metabolite Glycosylation and Stress Hormone Biosynthesis by TT8 in *Arabidopsis*, 2016 Aug; 171(4): 2499–2515. Published online 2016 Jul 18.

Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris.

Brown, K.B., Hyde, K.D. and Guest, 1996. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Diversity* I: 27-51.

Bibb MJ., 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes *Curr Op Microbiol* 8, 208–215.

Référence bibliographique

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (4ème édition), Lavoisier, 915 p.

B.Suryanarayana, 2009. A Study of Phytochemical composition of a few Tribal Medicinal Plants from Sriharikota, A.P. (Pub. in International E- Journal Ethnobotanical Leaflets 13: 281-92.

Bennett, J. W., 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. PP. 1-17. In: *Aspergillus molecular Biology and Genomics*. M. Machida and K. Gomi (eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK.

Błaszcyk L, Popiel D, Chelkowski J, Koczyk G, Samuels GJ, Sobieralski K, Siwulski M., 2011. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *J Appl Genet.* **2011**;52:233–243.

B.K. Sethi, J.R. Rout, R. Das, P.K. Nanda, S.L. Sahoo, 2013. Lipase production by *Aspergillus terreus* using mustard seed oil cake as a carbon source, *Ann. Microbiol.* 63, 241–252.

Bourdel, Guillaume, 2015. Diversité des organismes endophytes dans les racines de plantes poussant en milieu contaminé en hydrocarbures. Thèse en sciences biologiques. Sous la direction de Hijri, Mohamed Université de Montréal.

Cattelan A.J, Hartel P.G, Fuhrmann J.J., 1999. Screening of plant growth – promoting rhizobacteria to promote early soybean growth . *soil Sci Soc Am J.*63:1670-1680

Clay K. and Schardl C., 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*; **160 Suppl 4**: S99-S127

Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Dai Y. and Wang X., 2009. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology*; **59**: 584-592.

Combès A., Ndoye I., Bance C., Bruzard J., Djediat C., Dupont J., 2012. Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. *PLoS ONE* 7:e47313. 10.1371/journal.pone.0047313.

Référence bibliographique

Demain AL., 1998. Induction of microbial secondary metabolism. *Internatl Microbiol* 1, 259–264.

Demain A L, 2001. Fang A. The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* (69):1-39.

Deckert R. J., Melville L. H., Peterson R. L., 2001. Structural feature of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life-cycle phase in the foliage of *Pinus strobus*. *Mycological Reserarch* 105: 991–997.

Diluccino, M., F. Capra, N.P. Ribeiro, G.D. Vargas, D.M.G. Freire, M.G. Denis and D. Deoliveira., 2004. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase.

Demain, A.L. and Sanchez, S., 2009. Microbial Drug Discovery: 80 Years of Progress. *The Journal of Antibiotics*, 62, 5-16. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2008.16>

Demain A L, Q. Luo, L. Zhang, B. Z. Shi and X. M. Song, Molecules, 2012. 17, 8554–8560. Production by solid-state fermentation of soy-cake by *Penicillium simplicissimim*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 113-180.

Deng W., Mayford M., Gage F. H., 2013. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice.

Drago HAAS, 2015. « Métabolisme secondaire de *Streptomyces ambofaciens* : exploration génomique et étude du groupe de gènes dirigeant la synthèse du sphydrofurane », these de doctorat en science de la vie et de la santé, sous la direction de Sylvie LAUTRU, paris, université paris sud ecole doctorale 426, 21p.

Dambolena, J.S., Zunino, M.P., Herrera, J.M., Pizzolitto, R.P., Areco, V.A., Zygadlo, J.A., 2016. Terpenes: natural products for controlling insects of importance to human health- a structure- activity relationship study. p17.

Daniel P.Lawrence, FrancescaPeduto Hand' W. Douglas Gubler' , Florent P.Trouillas,2017. *Botryosphaeriaceae* species associated with dieback and canker disease of bay laurel in northern California with the description of *Dothiorella californica* sp. nov. Volume 121, Issue 4, April 2017, Pages 347-360.

Référence bibliographique

Esteves A. C., Saraiva M., Correia A., Alves A., 2014. Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Can. J. Microbiol.* 60 332–42.

Evelyn Romero-Borbón, Daniel Grajales-Hernández, Mariana Armendáriz-Ruiz, LorenaRamírez-Velasco, Jorge AlbertoRodríguez-González, Luis AlbertoCira-Chávez, María IsabelEstrada-Alvarado & Juan CarlosMateos-Díaz , 2018. Type C feruloyl esterase from *Aspergillus ochraceus*: A butanol specific biocatalyst for the synthesis of hydroxycinnamates in a ternary solvent system Volume 35, September 2018, Volume 35, September 2018, Pages 1-9.

Fisher p.J., Petrini O. 1987. Location of fungal endophytes in tissues of *suaeda fruticola*: a preliminary study. *Mycological Research* 89: 246-249.

Fábio A., Proença B. & Edson R.F., 2005. *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 257–268.

Fernandes M. R. V., Costa e Silva T. A., Pfenning L. H., Da Costa-Neto C. M., Heinrich T. A., De Alencar S. M., De Lima M. A. and kegaki M., 2009. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; **45**: 678-685

Glasser L. 1987. Fourier Transforms for Chemists. Part I. Introduction to the Fourier Transform - *J. Chem. Ed.*, 64, p. A228-A233

Godfrey, T., West, S., 1996. *Industrial Enzymology*. 2nd ed. Macmillan Publisher, Inc. New York. Pp. 03-04.

Guiraud J.P., 1998. *Microbiologie alimentaire*, (edn) Dunod. Paris.

Gregory Cheplick, Stanley H Faeth., 2009. Ecology and Evolution of the Grass-Endophyte Symbiosis.

Guangquan Li, Dan He, Yongqing Qian , Buyuan Guan , Song Gao , Yan Cui, Koji Yokoyama and Li Wang, 2011. Fungus-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus terreus*, *International Journal of Molecular Sciences*, 466-476. ISSN 1422-0067.

Hendrickson L, Davis CR, Roach C, Nguyen DK, Aldrich T, McAda PC, Reeves CD., 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme Activities and multifunctional polyketide synthase gene. *ChemBiol* 6:429–439.

Référence bibliographique

Howell C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concept. *Plant Diseases*, 87: 4-10.

Hyde K. D. & Soyong K., 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, **33**: 163-173.

Huang W. Y., Cai Y. Z., Hyde K. D., Corke H. and Sun M., 2008 . Biodiversity of endophytic fungi with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 2008; **33**: 61-75

Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J., 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, 51, 409–416.

Ho YN, Mathew DC, Hsiao SC, Shih CH, Chien MF, Chiang HM, Huang CC., 2012. Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. *J Hazard Mater.* **2012**;15:43–49. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.03.035.

Hee-Soo Park, Jae-Hyuk Yu, 2017. In *Advances in Applied Microbiology*, Volume 107 pp. 1–187, ISSN 0065-2164.

Ishiuchi, K., Kubota, T., Ishiyama, H., Hayashi, S., Shibata, T., Mori, K., Obara, Y., Nakanhata, N. & Kobayashi, J., 2011. Lyconadins D and E, and complanadine E, new Lycopodium alkaloids from *Lycopodium complanatum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, Vol. 19, pp. 749-753.

Jonshton A., et Booth C., 1983. *Plant pathologist's pocket book*. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 439p.

J.C. Frisvad, J. Smedsgaard, T.O. Larsen, 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* sub genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 49 (2004), pp. 201-241.

J.Karthic, Y.Saroj, M.Naveen, T.Pramod, & K.G.Siddalingshwara, 2014. Characterization of *Aspergillus oryzae* protease through submerged fermentation, Volume 3 N 5. pp. 1023-1028.

Jorge Pliego, Juan Carlos Mateos, Jorge Rodriguez, Francisco Valero, Mireia Baeza, Ricardo Femat, Rosa Camacho, Georgina Sandoval, & Enrique J. Herrera-

Référence bibliographique

López, 2015. Monitoring Lipase/Esterase Activity by Stopped Flow in a Sequential Injection Analysis System Using *p*-Nitrophenyl Butyrate. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fs150202798>

Kimmons, C.A., Gwinn, K.D. and Bernard, E.C., 1990. Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. *Plant Disease Reporter* 74: 757- 761.

Keller NP, Turner G, Bennett JW, 2005. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol.* ; 3(12) : 937–47,

Kim H. Y., Choi G. J., Lee H. B., Lee S. W., Kim H. K., Jang K. S., Son S. W., Lee S. O., Cho K. Y., Sung N. D. and Kim J. C.,2007.Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology* 44: 337

Khan AL, Hamayun M, Kim YH, Kang SM, Lee JH, Lee IJ., 2011. Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochem.* ; 46(2) : 440–7

Khoulood Barakat, Yousry Mahmoud Gohar, 2012. Antimicrobial Agents Produced by Marine *Aspergillus terreus* var. *africanus* Against Some Virulent Fish Pathogens., 52(3):366-72.

Kusari S, Spiteller M., 2012. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics.*

Kusari S., Hertweck C. and Spiteller M., 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*, 19: 792-798.

Li J. Y., Strobel G. A., Harper J. K., Lobkovsky E. and Cllardy J.,2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Organic letters* 2000; 2: 767-770.

Liu J.Y., Song Y.C., Zhang Z., Wang L., Guo Z.J., Zou W.X. & Tan R.X., 2004. *J. Biotechnol.* 114: 279–287.

Mercier C., 1985. Starch. In: Aspinall G.O. (Ed.). *The Polysaccharides*, vol. 3, 209-282, Academic Press, London/ New York.

Martínez-Bueno M, Gálvez A, Valdivia E, Maqueda M., 1990. A transferable plasmid associated with AS–48 production in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 172, 2817–2818.

Référence bibliographique

Madeleine Charpentier, François Percheron, 1983. The chitin-degrading enzyme system of a *Streptomyces* species, Volume 15, Issue 3, Pages 289-292.

Macris, B., E. Kourentzi and D.G. Hatzinkolaou., 1996. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, 31: 807-812.

Macedo, G.A., M.M.S. Lanzano and G.M. Pastore., 2003. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. *Electr. J. Biotechnol.*, 6(1): 589-591.

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*, 1; 67-80.

Maria I. Rezende, Ana-Flora D. Vasconcelos, Renata Haddad & Robert F. H. Dekke, 2005. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (imazaquin). <https://doi.org/10.1002/jobm.200410552>

Mala, J.G., N.G. Edwinoliver, N.R. Kamini and R. Puvanakrishnan., 2007. Mixed substrate solid-state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* mtcc 2594. *J. Gen. Appl. Microbial.*, 54(4): 247-253.

Neilson K.F., 2000. Mould growth on building materials secondary metabolites. Mycotoxins and biomarkers. www.Biocentrum.Dtu.dk, Mycology, Staff Scientific staff, Neilson Kristian.

Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J. M. & Moo Young, M., 2006. *Biotechnol. Adv.* 24, 80–85.

Ortiz-vazquez, E., M. Granados-Baeza and G. Rivera-Munoz., 1993. Effect of culture conditions on lipolytic enzyme production by *Penicillium candidum* in a solid-state fermentation. *Biotechnol. Adv.*, 11: 409-416.

Oses R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E. and Rodriguez J., 2008. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*; 33: 77

Référence bibliographique

Pikovskaya R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil concentration with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* . 17: 362-370.

Petrini, Sieber, T.N., Toti, L. and Viret, O., 1992. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins I*: 185-196.

Piepersberg W, Distler J., 1997. Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In: Rehm HJ, Reed G (Geneds.); Kleinkauf H, von Döhren H. (Vol eds *Biotechnology*, 2nd edition vol 7 *Products of Secondary Metabolism*, pp. 397–488. VCH–Verlagsgesellschaft Weinheim.

Palma, M.B., A.L. Pinto, A.K. Gombert, K.H. Seitz, S.C. Kivatinitz, L.R. Castilho and D.M.G. Freire., 2000. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 84-86:1137-1146.

Pitt JI, Samson RA, Frisvad J C., 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (Samson RA, Pitt JI, eds). Harwood Academic Publishers, Amsterdam: 9–79.

Park J.H., Choi G.J., Lee H.B., Kim K.M., Jung H.S., Lee S.W., Jang K.S., Cho K.Y. & Kim J.C., 2005. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 112–117.

P. Blely, H. Schneider, 2011. Production of acetyl xylan esterase by *Trichoderma reesei* and *Schizophyllum commune*. *Canadian Journal of Microbiology* 34(6):767-772.

Petra MIKUŠOVÁ, Michael SULYOK, Antonello SANTINI and Antónia ŠROBÁROVÁ, 2014. *Aspergillus* spp. and their secondary metabolite production in grape berries from Slovakia, *Phytopathologia Mediterranea* (August 2014) Vol. 53, No. 2, pp. 311-317.

Park H, Wood MR, Malysheva OV, Jones S, Mehta S, Brannon PM, Caudill MA., 2017. Placental vitamin D metabolism and its associations with circulating vitamin D metabolites in pregnant women. *106 (6):1439-1448.* doi: 10.3945/ajcn.117.153429.

Référence bibliographique

Redecker D, Kodner R, Graham L E., 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*; 289(5486): 1920–1

Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman R S., 2003. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.*182:314–330

Rudgers JA, Mattingly W.B., Koslow J.M.2005. Mutualistic fungus promotes plant invasion into diverse communities. *Oecologia* 144:463-471.

Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman R S., 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182(2): 315

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.* ; 3(3) : 342–51

Scriban R., 1993. Biotechnologie. 4eme édition. Tech. Et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 396- 356.

Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan T J., 1998. Fungal endophytes: a continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1998; **29**: 319

Strobel GA., Miller RV, Martinez-Miller C, Condrón MM, Teplow DB, Hess WM.,1999. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology.* ; 145: 1919–26

Saar D. E., Polans N. O., Sorensen P. D. and Duvall M. R. 2001. Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter* 2001; **19**: 249-260.

Strobel G. A., 2002a. Microbial gifts from rain forests. *Can J Plant Phenol*; **24**: 14-20.

Strobel G. A., 2002b. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*; **22**: 315-333

Sanchez S, Demain AL., 2002. Regulation of Fermentation Processes Enzyme. *Microb Technol* 31, 895–906.

Référence bibliographique

Sallam HN, Sadek SS, Agameya AF., 2003. Assisted hatching – a meta-analysis of randomized controlled trials, *J Assist Reprod Genet*, vol. 20 (pg. 332-242).

Schardl C. L., Leuchtman A. and Spiering M. J.2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* 2004; **55**: 315-340.

Schulz B. and Boyle C.2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 2005; **109**: 661-686.

Spiering M. J., Moon C. D., Wilkinson H. H. and Schardl C. L.2005. Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics* 2005; **169**: 1403-1414.

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*, **2** (1): 31-82.

sallam, L .A., El-Refai, A .M.,Hamdy, A. H., El-Minofi, H. A.,& Abdel-Salam, I.S., 2003. Role of some fermentation parameters on cyclosporine A production by a new isolate of *Aspergillus terreus*. *The journal of centre and applied microbiology*,49,321-328.

Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J., 2004.Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*; **67**: 257-268.

Song Y.C., Li H., Ye Y.H., Shan C.Y., Yang Y.M. & Tan R.X., 2004. FEMS Microbiol. Lett. 241: 67–72.

Schardl C. L., Leuchtman A. and Spiering M. J., 2004. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology*; **55**: 315-340.

Suryanaryanant T. S. & Thennarasan S., 2004. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity*, **15**: 197-204.

Spiering M. J., Moon C. D., Wilkinson H. H. and Schardl C. L., 2005.Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics*; **169**: 1403-1414

Spiteller P.,2015.Chemical ecology of fungi. *Natural product reports.* ; 32(7) : 971–93

Référence bibliographique

Saldanha, T., Bragagnolo, N., 2007. Cholesterol oxidation is increased and PUFA decreased by frozen storage and grilling of Atlantic hake fillets (*Merluccius hubbsi*). **Lipids**, v. 42, n. 7, p. 671-678.

Shipunov A., Newcombe G., Raghavendra A. K. H. and Anderson C. L.2008. Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. *American Journal of Botany* 2008; **95**: 1096-1108.

Samson, R.A., Peterson, S. W., Frisvad, J.C., & Varga, J., 2011. *New species in Aspergillus section terrei* *Studies in mycology* 69, 39-55.

Sanchez JF, Somoza AD, Keller NP, Wang CC., 2012. Advances in Aspergillus secondary metabolite research in the post-genomic era. *Nat Prod Rep.* **29(3)**:351-71.

Tsujibo, I.I., I.I. Orikoshi, H. Tanno, K. Fujimoto, I.L. Miyamoto, C. Imada, Y. Okami and Y. Inamod, 1993. Cloning, sequence and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *J. Bacterial.*, 175: 176-181.

Tan R. X. and Zou W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 2001; **18**: 448-459.

Tortora J., Funk B.F. et Case Ch.I., 2003. *Introduction à la microbiologie*, (edn) ISBN.Canada.

Tabuc C., 2007. Flore fongique de différentes substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Université Bucarest. Toulouse.

Toubal Souheyla, 2017. Caractérisation de la relation chémotypes de l'Ortie- bactéries vectorisées associées et évaluation de leurs activité sur *Culex sp*, thèse de doctorat en biologie sous la direction de Mr ARAB, Boumerdas univerté M'hamed bougara, 19 p.

Valan AM, Duraipandiyam V, Agastian P, Ignacimuthu S., 2008. Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamilnadu. *J Mycologie Med.* 18:147–153.

Wilson D. and Carroll G. C.,1994. Infection studies of *Discula quercina*, and endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia* 1994; **86**: 635-647.

Webster J et Weber R.W.S. (2007). Introduction to fungi. 3rd edition. Cambridge UniversityPress. New York, pp. 286–302

Référence bibliographique

Woodruff H B., 2014. Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. *Appl Environ Microbiol.* **80(1)**:2-8.

Wang, Z., Li, H., Ke, Q., Jeong, J. C., Lee, H. S., Xu, B., 2014. Transgenic alfalfa plants expressing *AtNDPK2* exhibit increased growth and tolerance to abiotic stresses. *Plant Physiol. Biochem.* **84**, 67–77.

Xiao J, Zhang Q, Gao YQ, .2014. Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. *J Agric Food Chem.* 2014;62(16):3584–3590. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf500054f>

Yadav J, et al., 2007. A phenomics approach in yeast links proton and calcium pump function in the Golgi. *Mol Biol Cell* **18(4)**:1480-9.

Yin, Bin; Terhune, Devin Blair; Smythies, John and Meck, Warren H., 2016. Claustrium, consciousness, and time perception. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, **8**, pp. 258-267.

Zhang H. W., Song Y. C. and Tan R. X., 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*; **23**: 753-771.

Zabalgozcoa I., 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*; **6**: 138-146

Annexe 01 : Matériel de laboratoire utilisé :

Appareils :

| Nom de l'appareil | Photo (originale) | Nom de l'appareil | Photo (originale) |
|-------------------|---|-------------------|---|
| Hotte |  | Agitateur |  |
| Etuve |  | Centrifugeuse |  |
| Balance |  | Autoclave |  |

| | | | |
|----------------------------|---|----------------------------|---|
| <p>Pompe de filtration</p> |  | <p>pH mètre</p> |  |
| <p>UV-VIS Perkin Elmer</p> |  | <p>Evaporateur rotatif</p> |  |
| <p>Four pasteur</p> |  | <p>Microonde</p> |  |
| <p>Frigidaire</p> |  | <p>Plaque chauffante</p> |  |

1. Produits chimiques :

Acétate d'éthyle ($C_4H_8O_2$), chloroforme, éthanol, HCL, tween 80, tween20, glucose ($C_6H_{12}O_6$), agar, amidon ($C_6H_{10}O_5$)_n, peptone, extrait de levure, chlorure de sodium (NaCl), chlorure de calcium dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), chlorure de potassium (KCL), chlorure d'ammonium (NH_4Cl), sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$), sulfate de Magnesium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), sulfate ammonium queue, sulfate de manganèse ($MnSO_4$), sulfate de fer ($FeSO_4$), bleu de bromophénol, lugol iodine, pectine, phosphate de monopotassium (kh_2PO_4), phosphate Monosodique ($Na_2H_2PO_4$), phosphate bicalcique ($CaHPO_4$), gélatine, chitine.

2. Petits matériel consommables :

Ampoules à décanter avec des supports adéquats

Aiguilles

Ballon

Bavette

Bec Bunsen

Boite Pétri en plastique

Boite Pétri en verre

Ciseaux

Coton

Entonnoirs en verre

Eprouvettes graduées 500 ml, 100 ml et 10ml

Erlenmeyers 100 ml et 250 ml

Flacons 250 ml et 500 ml

Gants

Gaze

Mèche à gaz

Papier aluminium

Papier filtre

Papier filtre à 0,22 μm

Para-film

Pipettes pasteur

Portoir

Règle graduée

Scalpel

Seringue en plastique

Spatule

Tamis

Tubes à essai en plastique 20 ml

Annexe 02 : compositions des milieux de culture

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthor et Booth, 1983/82)

| | |
|----------------|--------------------|
| Pomme de terre | 200 g |
| Glucose | 20 g |
| Agar | 20 g |
| Eau distillé | Complété à 1000 ml |

pH = 6,5
Autoclavage 20 minutes à 120°C

Potato Dextrose Broth (PDB) (Jonsthor et Booth, 1983/82)

| | |
|----------------|--------------------|
| Pomme de terre | 200 g |
| Glucose | 20 g |
| Eau distillé | Complété à 1000 ml |

pH = 5,6
Autoclavage 20 minutes à 120°C

Glucose Yeast Extract Peptone (GYP) (Guiraud, 1998)

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

pH = 6
Autoclavage 20 minutes à 120°C

Milieu de production d'amylase (Maria et al., 2005)

Milieu GYP + 20 g d'amidon.

Milieu de production de protéase (Carrim et al., 2006)

Milieu GYP + 20 g de gélatine + 4 ml de Bleu de bromophénol.

Peptone Agar Medium

| | |
|-------------------------------------|---------|
| Peptone | 10 g |
| NaCl | 5 g |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 0,1 g |
| Agar | 16 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

pH = 6

Autoclavage 20 minutes à 120°C

Milieu de production d'estérase

Milieu peptone agar medium + tween 80 + 4 ml de Bleu de bromophénol.

Milieu de production de lipase

Milieu peptone agar medium + tween 20 + 4 ml de Bleu de bromophénol.

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 |
| MnSO ₄ | Trace |
| FeSO ₄ | Trace |
| Bleu de bromophénol | 4 ml/l |
| Eau distille | 1000 ml |

pH = 6,7

Autoclavage 20 minutes à 120°C

Milieu Minimum M9 Agar (Miller, 1974)

| | |
|----------------------------------|---------|
| Na ₂ HPO 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 20 minutes à 120°C

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

Milieu minimum M9 Agar + 10 g de pectine + 1,2 d'extrait de levure + 4 ml de Bleu de bromophénol.

Bleu de bromophénol

| | |
|-------------------------|-------------------|
| Bleu bromophénol poudre | 0,5 g |
| Ethanol | 20 ml |
| Eau distille | Complété à 100 ml |

Milieu de production de chitinase (Nihorimbere et al., 2013)

| | |
|----------------|-------------------|
| Pomme de terre | 100 g |
| Chitine | 10 g |
| Agar | 10 g |
| Eau distillée | Complété à 500 ml |

Autoclavage 20 minutes à 120°C

Annexe 03 : Résultat de la révélation des acides aminés

Tableau : les rapports frontaux des spots des extraits des souches d'*Aspergillus terreus* obtenus par l'acétate d'éthyle (les cellules colorés par la même couleur ont le même rapport frontal).

| Les extraits des souches d' <i>Aspergillus terreus</i> | Les spots | Les rapports frontaux |
|--|-----------|-----------------------|
| T 2257 | 1'' | 0,84 |
| T 1172 | 1 | 0,40 |
| | 2 | 0,84 |
| B 1283 | 1' | 0,40 |
| | 2' | 0,84 |