

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

جامعة فرحات عباس سطيف

UNIVERSITE FERHAT ABBAS –SETIF-

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER
EN MICROBIOLOGIE

Option : Génie microbiologique

Par

ZERROUG AMINA

THEME

**Métabolites secondaires bioactifs des
champignons endophytes isolés de *Retama
raetam* (Forssk.).**

Soutenu le : 03/07/2011

Devant le jury

Président :	Pr. Abdelhadi GUECHI	Prof	Université de Sétif
Encadreur :	Pr. Daoud HARZALLAH	Prof	Université de Sétif
Examineur :	Pr. Abderrahmane BAGHIANI	Prof	Université de Sétif
	Dr. Mohamed Mihoub ZERROUG	MCA	Université de Sétif

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

جامعة فرحات عباس سطيف

UNIVERSITE FERHAT ABBAS –SETIF-

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER
EN MICROBIOLOGIE

Option : Génie microbiologique

Par

ZERROUG AMINA

THEME

**Métabolites secondaires bioactifs des
champignons endophytes isolés de *Retama
raetam* (Forssk.).**

Soutenu le : 03/07/2011

Devant le jury

Président :	Pr. Abdelhadi GUECHI	Prof	Université de Sétif
Encadreur :	Pr. Daoud HARZALLAH	Prof	Université de Sétif
Examineur :	Pr. Abderrahmane BAGHIANI	Prof	Université de Sétif
	Dr. Mohamed Mihoub ZERROUG	MCA	Université de Sétif

REMERCIEMENTS

Remerciement et Louange à Dieu Seigneur des Mondes.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Pr. DAOUD HARZALLAH qui a guidé, surveillé le déroulement et l'exécution du travail de ce mémoire en me prodiguant toute aide possible, et en me consacrant beaucoup de son temps précieux,

Ma vive reconnaissance va au Pr. Abdelhadi GUECHI professeur à l'université de Sétif d'avoir accepté de présider le jury de soutenance du mémoire, ainsi qu'aux Pr. Abderrahmane BAGHIANI de l'université de Sétif et Dr. Mohamed Mihoub ZERROUG de l'université de Sétif d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Je présente ici le témoignage de ma sincère gratitude pour leur aide à L'enseignant, Dr. Abderrahmane BAGHIANI et son étudiante Meriem DJARMOUNI.

Mes sentiments de reconnaissance vont également aux collègues Nouari SADRATI et Hani BELHADJ et Ali GUEENDOZ et Walid MAAMECHE ainsi que toutes les collègues de promotion pour leur aide

DEDICACE

A mes parents sans lesquels je ne serai pas arrivée jusque là

Résumé

La présente étude a été effectuée dans le but d'évaluer l'activité antimicrobienne, antioxydante et enzymatique des champignons endophytes qui ont été isolés des rameaux de *retama raetam* Forssk., une plante de la famille des *Fabaceae* collecté de la région de Bordj Bou Arréridj (Algérie). Les extraits obtenus par l'extraction à l'acétate d'éthyle et le chloroforme des six champignons ayant eu un résultat positif au dépistage de l'activité antimicrobienne ont été testé sur douze bactéries et une levure pathogènes et deux champignons phytopathogènes par la méthode de diffusion sur disque, les zones d'inhibitions varient pour les extraits d'acétate d'éthyle entre 0 et 25mm, et entre 0 et 19 mm pour les extraits chloroformique. L'activité antioxydante des extraits d'acétate d'éthyle a été étudiée par la méthode du β carotène/acide linoléique, a montrée que 83% d'endophytes ayant une activité antioxydante. Pour l'activité enzymatique, les tests qualitatifs ont démontrés que 16.66% des champignons ont une estérase, 50% ont une protéase, 50% ont une lipase et 33.33% une amylase.

Mot clés : Champignons endophytes, métabolites secondaires, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité enzymatique, *Retama raetam* Forssk.

Abstract

This study was conducted to evaluate the antimicrobial, antioxidant and enzymatic activity of endophytic fungi isolated from *Retama raetam* Forssk., a plant of the *Fabaceae* family collected in Bordj Bou Arréridj region (Algeria). Ethyl acetate and chloroform extracts obtained from six fungi had positive antimicrobial activity results when tested against 12 pathogenic bacteria, one yeast as well as two phytopathogenic fungi using the disc diffusion method. Inhibition zones vary between 0 and 25 mm for the ethyl acetate extracts, and from 0 and 19 mm for the chloroform extracts. The antioxidant activity of the crude ethyl acetate extracts was also tested. 83% of endophytes extracts have antioxidant activity. For the enzymatic activity, 16.66% of fungi have esterase, 50% have protease, 50% have lipase and 33.33% have an amylase.

Key words: Endophytic fungi, secondary metabolites, antimicrobial activity, antioxidant activity, enzymatic activity, *Retama raetam* Forssk.

الملخص

أجريت هذه الدراسة بهدف تقدير النشاطية المضادة للميكروبات، المضادة للأكسدة و النشاطية الإنزيمية للفطريات الداخلية التي تم عزلها من نبتة *Retama raetam* Forssk. التي هي نبتة تنتمي إلى عائلة *Fabaceae* التي تم الحصول على عينات منها من ولاية برج بوعرييج (الجزائر). المستخلصات التي تم التحصل عليها عن طريق الإستخلاص بالمذيبين العضويين الإيثيل الأسيتات و الكلوروفورم للفطريات الست التي أثبتت نشاطيتها ضد ميكروبية في الإختبار الأولي، تم اختبار نشاطيتها المضادة للميكروبات على 12 بكتيريا و خميرة واحدة ممرضة و نوعين من الفطريات الممرضة للنباتات بواسطة طريقة أقراص الإنتشار على سطح الآقار. مناطق التشبيط تراوحت لمستخلصات الإيثيل أسيتات بين 0 و 25 ملم، و بين 0 و 19 ملم بالنسبة لمستخلصات الكلوروفورم. النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات الإيثيل أسيتات تمت عن طريق اختبار β -carotene/acide linolique، حيث دلت النتائج أن 83% من المستخلصات لها نشاطية مضادة للأكسدة. بالنسبة لاختبار قدرة العزلات على إنتاج الإنزيمات الخارج خلوية دلت النتائج على أنه 16.66% من العزلات تنتج إنزيم الإستيراز، 50% بروتياز، 50% لبياز و 33.33% تنتج إنزيم الأميلاز.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية، المستقلبات الثانوية، النشاطية المضادة للميكروبات، النشاطية

المضادة للأكسدة، النشاطية الإنزيمية، *Retama raetam* Forssk.

Liste des abréviations

AA%	Le pourcentage de l'activité antioxydante
Abs	Absorbance
AND r	Acide désoxyribonucléique ribosomal.
BHT	Butylated hydroxytoluene
CYA	Czapek yeast extract agar
DMSO	Dimethylsulfoxyde
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
GYP	Glucose yeast extract peptone
IAA	Indole-3-acetic acid
IPA	Indole-3-pyruvic acid
ITS	Internal transcribed spacer
MEA	Malt extract agar
NA	Nutrient agar
NaOCL	Hypochlorite de sodium
NB	Nutrient broth
nm	Nanomètre
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth
PR	Pathogenesis related
R	Rayon
SD	Standard deviation
SDA	Sabouraud dextrose agar
UFC	Unité formant colonie
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
µl	Microlitre

Liste des figures

Figure 1 : Quelques substances antibactériennes produites par les champignons endophytes	17
Figure 2 : Quelques substances antifongiques produites pas les champignons endophytes.	18
Figure 3 : Quelques substances antivirales produites pas les champignons endophytes.	19
Figure 4 : Quelques substances anticancéreuses produites pas les champignons endophytes.	21
Figure 5 : Quelques substances antioxydantes produites pas les champignons endophytes.	22
Figure 6 : Stérilisation de surface et isolement des champignons endophytes.	26
Figure 7 : Fermentation et extraction des champignons endophytes avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme.	30
Figure 8 : différentes caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques après 7 jours d'incubation à 25°C.	40
Figure 9 : Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle sur les microorganismes pathogènes (n=3, moyenne des zones d'inhibition ±SD).	42
Figure 10 : Effet de chaque extrait fongique obtenu par le chloroforme sur les microorganismes pathogènes (n=3, moyenne des zones d'inhibition ±SD).	43
Figure 11 : Quelques zones d'inhibition de différents extraits fongiques.	44
Figure 12 : Activité antioxydante des extraits d'acétate d'éthyle des champignons endophytes....	52
Figure 13 : la production des quatre enzymes extracellulaires par les six souches fongiques après cinq jour d'incubation (n=3, moyenne ± SD).	55

Liste des tableaux

Tableau 1 : L'inhibition de la croissance des bactéries et d'une levure pathogènes par les isolats fongiques (n=3, moyenne \pm SD)	36
Tableau 2 : Pourcentages d'inhibition de la croissance des deux champignons phytopathogènes en double culture (n=3, pourcentage d'inhibition).....	36
Tableau 3 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des différents isolats après 7 jours d'incubation à 25°C.....	37
Tableau 4 : Comparaison des moyennes des extraits obtenus par l'acétate d'éthyle et leurs effets sur la croissance des microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).	45
Tableau 5 : Comparaison des moyennes de l'effet combiné des extraits obtenu par l'acétate d'éthyle sur la croissance des microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).	46
Tableau 6 : Comparaison des moyennes des extraits obtenus par le chloroforme et leurs effets sur la croissance des microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).	47
Tableau 7 : Comparaison des moyennes de l'effet combiné des extraits obtenus par le chloroforme sur la croissance des microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).	48
Tableau 8 : Comparaison des moyennes des extraits d'acétate d'éthyle et chloroformiques et leurs effets sur chaque groupes de microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).	49
Tableau 9 : Comparaison des moyennes des extraits d'acétate d'éthyle et leur effet antioxydant après 24 heures (n=3, Moyenne du pourcentage d'inhibition).....	51
Tableau 10 : Comparaison des moyennes des champignons endophytes et leur production d'enzymes (n=3, moyenne de zone).....	54

Sommaire

Introduction.....	1
1 Synthèse bibliographique	4
1.1 Définition des champignons endophytes :.....	5
1.2 Diversité des endophytes :.....	5
1.3 Mode de reproduction et de transmission :	6
1.4 Interaction endophyte-hôte :.....	7
1.5 Spécificité de l'hôte :.....	8
1.6 Spécificité des tissus :	9
1.7 Rôles des champignons endophytes :.....	10
1.7.1 Rôles physiologiques des champignons endophytes :.....	10
1.7.1.1 Protection contre les microorganismes pathogènes :.....	11
1.7.1.2 Protection contre les herbivores :.....	12
1.7.1.3 Protection contre les herbivores :.....	13
1.7.2 Rôles des endophytes dans la tolérance aux stress abiotiques :.....	13
1.8 Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs :.....	15
1.8.1 Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes :.....	16
1.8.2 Champignons endophytes comme source de substances antifongiques :.....	17
1.8.3 Champignons endophytes comme source de substances antivirales :.....	19
1.8.4 Champignons endophytes comme source de substances anticancéreuses :.....	19
1.8.5 Champignons endophytes comme source de substances antioxydantes :	21
2 Matériels et méthodes.....	23
2.1 Matériels :.....	24
2.1.1 Matériel végétal :.....	24
2.1.2 Matériel microbien :	24
2.1.3 Produits chimiques :	24
2.2 Méthodes :.....	25
2.2.1 Échantillonnage :.....	25
2.2.2 Isolement :	25
2.2.3 Dépistage de l'activité antimicrobienne :	27
2.2.3.1 Préparation des microorganismes d'essai:.....	27
2.2.3.2 Double culture de diffusion sur gélose :.....	28
2.2.3.3 Double culture :.....	28

2.2.4	Identification :	28
2.2.5	Fermentation et extraction :	29
2.2.6	Activité antimicrobienne :	31
2.2.6.1	Préparation des microorganismes test :	31
2.2.6.2	Méthode de diffusion sur disques :	31
2.2.7	Activité antioxydante :	32
2.2.7.1	Méthode du β -carotène/acide linoléique :	32
2.2.8	Activité enzymatique :	32
2.2.9	Analyse statistique :	33
3	Résultats et discussion.....	34
3.1	Isolement et détermination du pourcentage de colonisation :	35
3.2	Dépistage de l'activité antimicrobienne :	35
3.3	Identification des genres fongique:	37
3.4	Détermination de l'activité antimicrobienne :	41
3.5	Test du β -carotène/acide linoléique :	51
3.6	Détermination de l'activité enzymatique :	53
	Conclusion et perspectives.....	56
	Références bibliographiques	59
	Annexes	71

Introduction

Introduction :

L'émergence de nouvelles maladies, le développement de résistances aux médicaments, l'apparition de virus mortels, les complications liées aux transplantations d'organes et l'augmentation de l'incidence des infections fongiques, ainsi que les risques de toxicité associé à l'utilisation excessive des médicaments et des antibiotiques de synthèse, pousse les chercheurs à explorer différentes sources naturelles afin d'obtenir de nouveaux médicaments qui seraient efficaces, possédant une faibles toxicité et ayant un impact mineur sur l'environnement.

Dans ce domaine, les champignons ont été largement étudiés, la première découverte été celle de la Pénicilline à partir de *Penicillium notatum* par Alexander Fleming en 1928. Après cela il y'a eu une explosion de nouvelles découvertes de molécules bioactives provenant de différents champignons tels la griséofulvine, un agent antifongique isolé à partir de *Penicillium griseofulvum* et utilisé contre les champignons de la peau, des cheveux et des ongles, la cyclosporine qui est un agent immunosuppresseur isolé à partir de *Tolypocladium niveum*...

Les champignons endophytes sont les champignons qui colonisent les tissus vivants des plantes, sans causer aucun symptôme apparent, ils sont estimés au nombre de 1.5 millions d'espèces et seulement environ 75.000 d'entre elles sont décrites (Manoharachary *et al.*, 2005). Ils reçoivent la nutrition et la protection de la plante hôte et, en retour, ils améliorent la compétitivité ainsi que la résistance de celle-ci aux différents agents pathogènes tels les bactéries, champignons, parasites, insectes... ainsi qu'aux différents types de stress abiotiques (Saikkonen *et al.*, 1998). Grâce à cette protection, les champignons endophytes ont reçu une attention considérable et sont maintenant considérés comme étant une source riche de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs (Zhang *et al.*, 2006).

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont l'objectif consiste en l'étude des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk.) une plante médicinale de la famille des *Fabaceae* ainsi que leurs différentes activités antimicrobienne, antioxydante et enzymatique.

Les plantes ont été collectées et amenées au laboratoire afin de réaliser les objectifs suivants :

- Isolement et purification des champignons endophytes
- Dépistage préliminaire afin de déterminer leurs possible pouvoir antimicrobien
- Identification des champignons ayant un résultat positif au dépistage
- Fermentation et extraction par deux solvants, l'acétate d'éthyle et le chloroforme
- Détermination de l'activité antimicrobienne des deux extraits par le test de diffusion sur disques
- Détermination de l'activité antioxydante des extraits d'acétate d'éthyle par le test du β -carotène/acide linoléique
- Dépistage par des tests qualitatifs de la production de certaines enzymes par les champignons endophytes

1 Synthèse bibliographique

1.1 Définition des champignons endophytes :

La définition la plus couramment utilisée pour décrire les endophytes est celle de Petrini (1991) qui définit les endophytes comme étant tous les microorganismes vivant dans les organes végétaux interne à un certain moment de leurs vie et peuvent coloniser les tissus végétaux internes sans causer de dommage apparents chez l'hôte (Hyde et Soyong, 2008).

Les premières descriptions de ces microbes remontent a la fin du 19^{ème} et 20^{ème} siècle (Staniek *et al.*, 2008). En 1866, Anton De Bary, inventa le terme endophytes (Moricca et Ragazzi, 2008), qui est composé de deux mots grecs, endon signifiant au sein et phyton désignant plante (Staniek *et al.*, 2008), et qui désignait tout organisme survenant dans les tissus de plantes (Hyde et Soyong, 2008).

Les champignons sont les microorganismes les plus fréquemment isolé en tant qu'endophytes (Strobel *et al.*, 2004), ce sont des champignons qui peuvent croitre de façon intra et/ou intercellulaires (Pimentel *et al.*, 2011) dans les tissus internes des plantes, sous la couche des cellules épidermiques (Moricca et Ragazzi, 2008), sans causer aucun symptôme apparent chez l'hôte (Vega *et al.*, 2008). Ils sont présents et ont été isolés de toutes les plantes déjà étudiées (Hyde et Soyong, 2008), et leurs façons de croitre asymptomatiquement dans les tissus de plantes a induit que leurs relations avec l'hôte était de l'ordre du mutualisme et de la symbiose mais leur biodiversité suggère qu'ils peuvent être également des saprophytes ou des pathogènes opportunistes (Strobel *et al.*, 2004).

On a longtemps pensé que ces champignons n'avaient aucune fonction, ni aucun intérêt; cependant, dans les dernières décennies, les recherches ont commencé à s'intéresser aux endophytes (Moricca et Ragazzi, 2008) qu'on considère maintenant comme des sources de beaucoup de composés d'intérêt tels les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticides...(Maheshwari, 2006).

1.2 Diversité des endophytes :

la plupart des champignons endophytes appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota* ; cependant certains appartiennent à d'autres taxons tels que les

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

Des estimations récentes (2007) ont démontré que plus de 90% d'espèces de champignons endophytes ne sont pas décrites (Shipunov *et al.*, 2008), et seulement 80.000 à 100.000 espèces ont été décrites en 2008 (Huang *et al.*, 2008). Seulement, l'utilisation de l'identification moléculaire pour faire la distinction entre les cultures stériles isolées au laboratoire ainsi que l'exploration de nouveaux environnements (Zabalgoeazcoa, 2008) telles les forêts tropicales qui pourraient révéler une grande diversité d'endophytes (Saar *et al.*, 2001) ont et vont permettre l'identification de nouvelles espèces (Zabalgoeazcoa, 2008).

1.3 Mode de reproduction et de transmission :

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction :

Le premier se fait par la croissance végétative des hyphes qui est complètement interne (Selosse et Schardl, 2007); ainsi les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance via les graines (Saikkonen *et al.*, 2004a). Ceci est communément appelé transmission verticale (Saikkonen *et al.*, 2004b). Et c'est le principal mode de transmission des champignons endophytes (Saikkonen *et al.*, 2010).

Le second se fait via les spores (Clay, 1986) ; ce groupe de champignons se transmet horizontalement (Saikkonen *et al.*, 2004a), c'est-à-dire le champignon peut être transmis soit par spores sexuées ou asexuées (Saikkonen *et al.*, 2004b) pour infecter d'autres plantes (Arnold *et al.*, 2003; Gallery *et al.*, 2007).

Etant donné que certains champignons peuvent produire soit des spores sexuées soit asexuées et que la reproduction sexuée nécessite des spores sexuées, elle est donc toujours

horizontale, contrairement à la reproduction asexuée qui peut se faire verticalement via les graines ou horizontalement par les spores ou éventuellement les hyphes (Saikkonen *et al.*, 2004a).

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

Pour les endophytes non systémiques des plantes ligneuses, la transmission se fait horizontalement provoquant généralement des infections locales très limitées, mais ils peuvent être trouvés aussi dans les graines et les glands (Wilson et Carroll, 1994) mais la transmission verticale est rare (Saikkonen *et al.*, 1998).

1.4 Interaction endophyte-hôte :

Les endophytes possèdent différents modes de vie, donnant différentes interactions qui sont variables d'un endophyte à un autre et d'un hôte à un autre (Zabalgoeazcoa, 2008), elles dépendent des facteurs abiotiques, des interactions avec d'autres espèces, de la géographie et de la phylogénie (Saikkonen *et al.*, 1998), et varient de l'antagonisme au mutualisme, c'est pour cette raison que la gamme d'interactions endophyte-hôte est considérée comme un continuum (Zabalgoeazcoa, 2008).

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

Certains endophytes sont des pathogènes latents, mais ne constituent pas une grande fraction des endophytes. Comme par exemple *Phomopsis citri* et *Fusicoccum aesculi* qui ont été isolée de *Citrus spp.* ainsi que *Phomopsis viticola* isolé de *Vitis vinifera*; cependant ces endophytes pathogènes ont co-évolué avec leurs hôtes et ne sont donc pas très virulents, et ne causent aucun symptôme à leurs hôtes, mais si la plante est stressée ou bien la sénescence des feuilles commence, la sporulation de ces agents pathogènes commence (Hyde et Soyong, 2008). D'autres endophytes ont été isolés à partir des tissus sains de plantes, ces même champignons sont retrouvé couramment sur des plantes sénescents. Ces endophytes sont considérés comme saprophytes latents, colonisant asymptomatiquement des espaces restreints tant que leurs hôtes se développent; dès que ces derniers sont infectés ou décèdent, ces saprophytes se développent et se reproduisent (Zabalgogazcoa, 2008). A l'autre extrémité des interactions il y a les endophytes mutualistes, qui procurent à l'hôte de nombreux avantages, tels la résistance aux stressés biotiques provoqué par des herbivores ou des parasites, ou bien abiotiques comme la sécheresse, la salinité... (Saikkonen *et al.*, 1998).

En retour, l'hôte procure à l'endophyte une protection contre la dessiccation, lui procure des éléments nutritifs, la photosynthèse et lui permet aussi en cas de transmission verticale, le passage a la prochaine génération (Zabalgogazcoa, 2008).

1.5 Spécificité de l'hôte :

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

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

plantes mais peut également se produire, mais rarement sur d'autres plantes dans le même habitat (Zhou et Hyde, 2001). Quand un champignon endophyte peut se lier avec deux espèces de plantes apparentées, mais avec une préférence pour l'une d'elle, la relation est appelée sélectivité de l'hôte. La préférence de l'hôte, quant à elle, est souvent utilisée pour indiquer la dominance ou la survenance unique d'un champignon sur un hôte particulier ; elle est aussi utilisée pour indiquer les différences dans les compositions des communautés fongiques et les fréquences d'isolement des différentes plantes hôtes (Bettucci *et al.*, 2004; Suryanarayanan et Kumaresan, 2000).

Certains champignons auraient une large gamme d'hôtes, tels *Alternaria*, *Penicillium* ou *Periformospora*, qui ont des hôtes appartenant à des genres ou des familles différentes de plantes, contrairement à d'autres endophytes comme par exemple *Neotyphodium* qui est un champignon endophyte qui a une gamme d'hôtes restreinte, elle est limitée à une ou deux espèces végétales (Zabalgogezcoa, 2008).

Nombreuses sont les études qui permettent de dire que les facteurs environnementaux, tels l'application d'engrais, le stress hydrique et des régimes d'humidité saisonnière, en plus de l'identité de l'espèce de l'hôte, peuvent avoir un effet sur les communautés des champignons endophytes (Fujimura *et al.*, 2008; Gonthier *et al.*, 2006; Seghers *et al.*, 2004; Suryanarayanan *et al.*, 2002). L'interaction de ces deux facteurs peut aussi avoir un impact significatif sur la composition endophytique; (Hoffman et Arnold, 2008) ont constaté qu'il y'avait une similitude relativement faible entre les communautés d'endophytes de différentes espèces de la famille de *Cupressaceae* qui se trouvaient dans la même localité, et entre celles de la même espèce hôte dans différentes localités, contrairement à ce qu'ils ont trouvé pour la même espèce hôte dans la même localité où ils ont observé une grande similitude.

1.6 Spécificité des tissus :

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

spécifiques tels les racines, feuilles ou brindilles, tandis que d'autres peuvent infecter plusieurs de ces pièces, comme les espèces systémiques *Neotyphodium* et *Epichloë* infectant les espaces intercellulaire des feuilles, les tiges reproductives et les graines de leurs hôte, ils peuvent être isolés a partir de différentes partie de la même plante (Zabalgoeazcoa, 2008).

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

1.7 Rôles des champignons endophytes :

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

1.7.1 Rôles physiologiques des champignons endophytes :

Les plantes sont constamment menacées par une variété d'agents comme les microorganismes tels les champignons, bactéries et virus, les herbivores et les insectes. Cependant, les plantes possèdent un vaste arsenal inductible et constitutif de mécanismes de défense contre ses agents, dont les obstacles structurels qui se renforcent rapidement lors du processus d'infection (cire, lignine, cellulose, composés phénoliques et des protéines de la paroi cellulaire) sont le type le plus performant de défense.

Les plantes abritant des champignons endophytes sont protégées aussi contre ces agents par la contribution de ces endophytes. Divers mécanismes de lutte sont utilisés par ses derniers.

Quelque uns des rôles des champignons endophytes contre ces agents sont mentionnés ci-après :

1.7.1.1 Protection contre les microorganismes pathogènes :

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

De nombreuses espèces de champignons endophytes produisent plusieurs métabolites secondaires dont des substances antibiotiques (Schulz et Boyle, 2005; Strobel, 2002b; Wang *et al.*, 2007). Parmi les premières études, al Koshino a démontré que le champignon endophyte *Epichloë typhina* de *Phleum pretense* produisait des sesquiterpènes (chokols AG) jugés être des fongitoxiques contre le champignon pathogène *Cladosporium phlei*, il y a aussi la cryptocin qui est produite par l'endophyte *Cryptosporiopsis quercina* d'une plante médicinale *Tripterigeum wilfordii*, elle a montré une puissante activité contre *Pyricularia oryzae* agent de la pyriculariose du riz (Li *et al.*, 2000).

Plusieurs extraits liquides des cultures des endophytes ont démontré une inhibition de la croissance de plusieurs espèces de champignons phytopathogènes (Inacio *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2005). (Dingle et McGee, 2003; Istifadah et McGee, 2006) ont fait l'expérience avec les endophytes du blé *Chaetomium* et *Phoma*, l'inoculation de ces champignons ainsi que l'application de leurs filtrats de cultures sur la plante ont réduit de la même façon la sévérité de la maladie foliaire causé par *Puccinia spp.* et *Pyrenophora*.

Les endophytes peuvent aussi induire ou activer des mécanismes de défenses des plantes hôtes (Arnold *et al.*, 2003). (Rodriguez *et al.*, 2004) ont observé que les mécanismes de défense étaient activés plus rapidement chez les plantes hôte que chez les autres plantes, ces mécanismes principalement impliqués dans la défense 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). Lors de l'inoculation de *Piriformospora indica*, un endophyte qui colonise les racines des plantes, une résistance contre deux champignons pathogènes vasculaire (*Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc.) et foliaire (*Blumeria graminis* (DC.) Speer) a été observée. La protection contre l'agent pathogène foliaire semble être médiée par un mécanisme de résistance induit, où il y a eu une réaction de défense impliquant la mort des cellules hôte (Waller *et al.*, 2005).

(Arnold *et al.*, 2003) ont inoculé un mélange de six endophytes fréquemment isolés à partir de *Theobroma cacao* dans les feuilles des jeunes plants de cette espèce avant de les infecter avec *Phytophthora sp.* l'agent pathogène responsable de la maladie de la pourriture brune; ils ont observé une réduction significative de l'incidence de la maladie et ses effets néfastes sur les feuilles inoculées avec les endophytes. Vu la différence de la sévérité de la maladie observée entre les feuilles inoculées et non inoculées de la même plante, l'induction d'un mécanisme de résistance de la plante ne peut être impliqué; la protection dans ce cas pourrait être le résultat d'une concurrence directe entre les endophytes et les agents pathogènes, par exemple en produisant une zone d'inhibition qui restreindrait l'entrée des autres champignons ou bien l'occupation des sites disponibles pour l'infection.

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 leurs croissances (Cao *et al.*, 2009). Récemment (Rivera-Varas *et al.*, 2007) ont démontré que le champignon endophyte *Acremonium strictum* W. Gams isolé à partir de *Dactylis glomerata* L. et autre graminées était un mycoparasite de *Helminthosporium solani* Durieu et Mont un agent pathogène de pomme de terre.

Peu de tests ont été faits sur l'influence des champignons endophytes sur les bactéries et virus phytopathogènes. Pour l'effet bactéricide, les extraits des cultures endophytes ont démontré une activité qui n'est pas différente de celle obtenue avec les champignons phytopathogènes (Wang *et al.*, 2007). (Lehtonen *et al.*, 2006) ont démontré que l'incidence plus faible du virus du nanisme jaune de l'orge sur *Lolium pratense* infecté par l'endophyte *Neotyphodium* par rapport aux plantes non infectées, est due aux alcaloïdes fongiques qui affectait la reproduction des pucerons vecteurs du virus.

1.7.1.2 Protection contre les herbivores :

Bacon *et al.* (1977), ont démontré pour la première fois la corrélation existant entre les champignons endophytes et la toxicité de leurs plantes hôtes sur les mammifères herbivores domestiques.

Plusieurs types de maladies peuvent atteindre les animaux qui ont mangé des herbes infectées par des endophytes. Un exemple de ces maladies provoquées par les endophytes est la toxicose de la fétuque élevée touchant les ruminants et les chevaux après avoir pris de la *Festuca arundinaceae* infecté par le champignon endophyte *Epichloë typhina*; des

symptômes tels que vasoconstriction, rythme cardiaque lent, suppression du système immunitaire, problèmes de reproduction atteignent les animaux (Roberts et Andrae, 2004). (Roberts *et al.*, 2005) ont démontré que cette toxicose est due à un certain nombre de composés tels l'acide lysergique, les amides et l'ergopeptine, dont de forte concentration de ce derniers on été trouvé infectant les semences et les feuilles des herbes.

1.7.1.3 Protection contre les insectes :

Certains endophytes peuvent aussi protéger leurs hôtes contre les insectes en produisant des métabolites secondaires (Clay et Schardl, 2002; Riedell *et al.*, 1999; Spiering *et al.*, 2005).

Webber (1981), a probablement été le premier à démontrer la protection des végétaux contre les insectes due à des champignons endophytes par l'exemple de l'endophyte *Phomopsis oblonga*, qui protège les ormes contre le dendroctone *Physocnemum brevilineu*, vecteur d'un champignon pathogène qui provoque la maladie hollandaise de l'orme; cet endophyte produit des composés toxiques qui auraient un effet répulsif contre ce vecteur de l'agent pathogène. Cela a été confirmé quatre ans plus tard par (Claydon *et al.*, 1985) qui ont démontré que les champignons endophytes appartenant à la famille des *Xylariaceae* synthétisaient des métabolites secondaires chez les hôtes du genre *Fagus*, ces derniers affectaient les larves des coléoptères.

La capacité des champignons endophytes à repousser les insectes et même à augmenter leurs taux de mortalité est corrélée avec leurs capacité de produire des toxines, par exemple *Acremonium lolii*, un endophyte de *lolium perenne*, produit une forte toxine lolitrem B qui provoque la réduction des attaques d'insectes, il y a aussi les toxines N-formilonine et paxiline produites par *Neotyphodium sp.* un endophyte de *Echinopogum ovatus* qui tue le charançon *Listronotus bonariensis* et autres insectes (Miles *et al.*, 1998).

1.7.2 Rôles des endophytes dans la tolérance aux stress abiotiques :

Tout au long de l'évolution, les plantes été confrontées à des conditions environnementales changeantes, les obligeant à s'adapter ou à succomber à des températures extrêmes, des insuffisances d'eau et des produits chimiques. Plusieurs études ont démontré que les plantes associées à des champignons endophytes ont été plus

tolérantes à la sécheresse, la chaleur, la toxicité des métaux et à une salinité élevée (Lewis, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2005).

Les champignons endophytes des graminées fourragères (Fétuque élevée) augmentent de manière significative la tolérance à la sécheresse de cette espèce (Clay et Schardl, 2002). La teneur en eau des graminées associées à des endophytes était plus élevée que celle des graminées dépourvues d'endophytes (Buck *et al.*, 1997; Elbersen et West, 1996). Ce phénomène peut s'expliquer par l'accumulation accrue de solutés dans les tissus des plantes infectées par les endophytes par rapport aux autres, ou par la réduction de la conductance foliaire et un ralentissement du flux de transpiration (Malinowski et Belesky, 2000), ou encore par la limitation de la germination des graines et réduire le risque de la mort de la plantules (Gundel *et al.*, 2006). De même pour la teneur en aluminium du sol, *Festuca spp.* infectée par les endophytes a démontré une plus grande tolérance à l'aluminium et une plus grande croissance par rapport à la plante non infectée (Liu *et al.*, 1996; Zaurov *et al.*, 2001).

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

Il a été démontré que l'endophyte *Piriformospora indica* protège l'orge du stress salin; l'exposition des plantes infectées pendant deux semaines au sel modéré (100 mM de NaCl) a permis d'obtenir une plus grande biomasse que celle des plantes contrôles sous les mêmes conditions, l'orge non infecté a même montré une augmentation de chlorose des feuilles et une croissance réduite des semis par rapport à l'orge infecté (Waller *et al.*, 2005).

En plus de la protection contre les agents pathogènes et la tolérance aux conditions abiotiques stressantes que les endophytes procurent à leurs hôtes, ils peuvent améliorer leur photosynthèse, par exemple quand *Agave victoria-reginae* grandit en présence du

champignon endophyte *Fusarium oxysporium*, la chlorophylle totale et la teneur en sucre augmente, entraînant une augmentation du rendement de la photosynthèse des plantes par rapport aux autres dépourvues d'endophyte (Obledo *et al.*, 2003). Ils peuvent aussi améliorer la croissance de nombreuses espèces végétales (Tan et Zou, 2001), cette amélioration de la croissance de l'hôte est due en partie à la production de phytohormones par l'endophyte, tels que l'indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-pyruvic acid (IPA), cytokines et d'autres substances de promotion de la croissance comme les vitamines, et en partie du fait que les endophytes peuvent améliorer l'absorption des éléments nutritifs par l'hôte comme la fixation de l'azote et l'assimilation du phosphore, et ils régulent les qualités nutritionnelles (Nassar *et al.*, 2005; Tan et Zou, 2001; Waller *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

1.8 Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs :

Le développement de résistance aux médicaments de plusieurs bactéries, l'augmentation de l'incidence des infections fongiques, ainsi que d'autres problèmes de santé et d'environnement, poussent à rechercher de nouvelles substances bioactives, ceux produites par des champignons endophytes, en plus d'être impliqués dans la relation hôte-endophyte, ils peuvent aussi avoir des applications en médecine, agriculture et industrie (Strobel, 2002a).

Les champignons endophytes sont considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (Strobel *et al.*, 2004; Tan et Zou, 2001), produisant le plus grand nombre de métabolites secondaires par rapport aux autres catégories de microorganismes (Zhang *et al.*, 2006), ainsi qu'une grande diversité structurale comprenant des alcaloïdes (amines, amides...), peptides, stéroïdes, terpénoïdes, phénols, quinones, composés aliphatiques, flavonoïdes etc. (Yu *et al.*, 2010).

Ces substances naturelles produites par les champignons endophytes possèdent un large spectre d'activité biologique (Zhang *et al.*, 2006), comprenant des composés antibiotiques, antifongiques, antiviraux, immunosuppresseurs, agents anticancéreux, antioxydants, insecticides et autres substances biologiquement actives (Strobel *et al.*, 2004; Strobel et Daisy, 2003).

1.8.1 Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes :

La fréquence croissante des souches pathogènes multirésistantes a limité l'effet d'un traitement antimicrobien traditionnel, ce qui implique le besoin de nouveaux agents thérapeutiques contre les maladies infectieuses (Larsen *et al.*, 2005; Strobel et Daisy, 2003).

Guanacastepenes dont Guanacastepene A (Figure 1), représentent une très grande diversité de diterpénoides, ils sont produits par un champignon endophyte non identifié isolé de *Daphnopsis americana*, et ont démontré une activité prononcée contre les souches résistantes de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium* (Brady *et al.*, 2001). Il y a aussi Chaetoglobosin A (Figure 1) et le Rhizotonic acid (Figure 1) de *Chaetomium globosum* endophyte de *Maytenus hookeri* et *Rhizoctonia sp.* endophyte de *Cynodon dactylon* respectivement, qui ont été signalés pour être actifs contre la bactérie impliquée dans l'ulcère gastrique *Helicobacter pylori* (Ma *et al.*, 2004; Tikoo *et al.*, 2000). En outre, altersetin (Figure 1), purifié à partir de l'endophyte *Alternaria sp.* qui affiche une activité puissante contre des bactéries pathogènes à Gram positif (Hellwig *et al.*, 2002).

Une nouvelle cytochalasine, phomopsichalasin a été isolée de l'endophyte *Phomopsis sp.*. Dans sa structure, le macrocycle des autres cytochalasines est remplacé par un système tricyclique, ce métabolite a démontré une activité lors des essais avec une concentration de 4 µg/disque contre *Bacillus subtilis*, *Salmonella gallinarum* et *Staphylococcus aureus* (Strobel *et al.*, 2004).

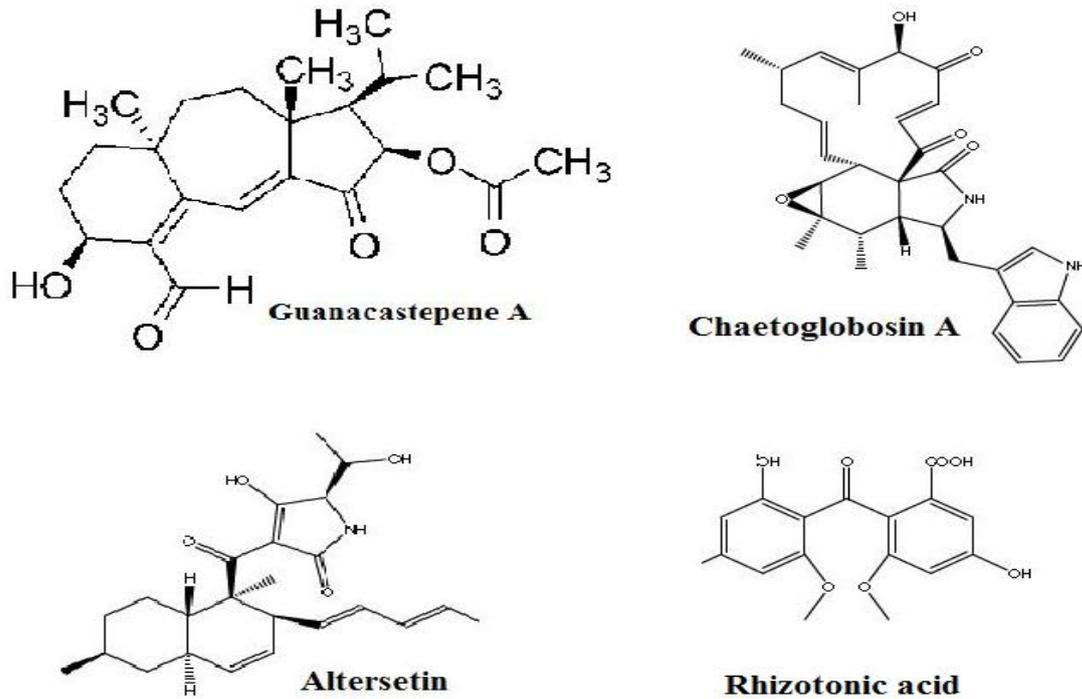


Figure 1 : Quelques substances antibactériennes produites par les champignons endophytes (Vijay *et al* 2009).

1.8.2 Champignons endophytes comme source de substances antifongiques :

En raison de l'augmentation du nombre de patients atteints du virus du sida et le nombre accru de greffés, dont le système immunitaire est affaibli, les infections fongiques sont devenues un problème de plus en plus difficile, il est donc nécessaire de trouver de nouvelles substances antifongiques pour lutter contre ces problèmes (Strobel, 2002a).

Le champignon endophyte *Cryptosporiopsis cf. quercina* isolé d'une plante médicinale originaire d'Eurasie *Tripterigeum wilfordii*, serait à l'origine de la production de cryptocandin A (Figure 2), un peptide antimycosique lié aux échinocandines et pneumocandines, et démontrant une activité contre *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea* (Strobel *et al.*, 2004). Cryptocandin et ses dérivés sont mis à l'étude pour lutter contre certain nombre de maladies fongiques de la peau et des ongles (Strobel *et al.*, 2004; Strobel, 2002a).

Il y a aussi ambuic acid (Figure2) un agent antifongique purifié à partir de plusieurs souches de *Pestalotiopsis microspora*, un endophyte commun des forêts tropicales (Li *et*

al., 2001; Strobel *et al.*, 2004). Plusieurs autres composés antifongiques ont été purifiés à partir d'une autre souche de *P. microspora* isolé de *Torreya taxifolia*, incluant pestalosite (Figure 2), un β -glucoside aromatique et deux pyrones, pestalopyrone et hydroxypestalopyrone. Une autre souche isolée de *Taxus brevifolia* produit d'autres métabolites secondaires tels pestalotiopsines A et B. Le nombre et la nature des produits purifiés à partir de ce champignon dépendent des conditions culturelles et la source végétale à partir de laquelle il a été isolé (Strobel *et al.*, 2004). Une autre espèce de *Pestalotiopsis*, *Pestalotiopsis jesteri* produit de l'hydroxyjesterone et jesterone (Figure 2) (Li et Strobel, 2001; Strobel *et al.*, 2004), ce dernier est l'un des quelques produits purifiés à partir d'endophytes où la synthèse totale d'un produit bioactif a été accomplie (Strobel *et al.*, 2004).

D'autre part, un nouvel agent antifongique CR377 a été isolé à partir du bouillon de culture du champignon endophyte *Fusarium sp.* isolé de *Selaginella pallescens* et a montré une puissante activité contre *Candida albicans* dans les essais de diffusion en gélose (Brady et Clardy, 2000).

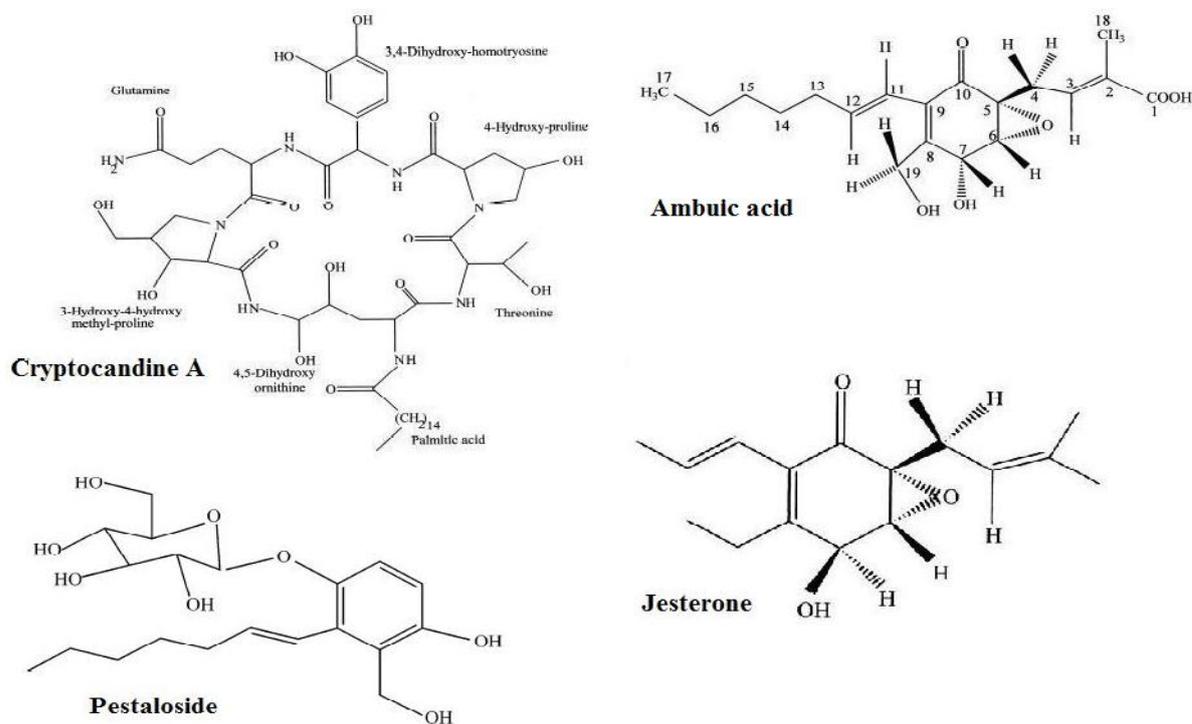


Figure 2 : Quelques substances antifongiques produites pas les champignons endophytes (Vijay *et al* 2009).

1.8.3 Champignons endophytes comme source de substances antivirales :

Comme on l'a déjà mentionné, l'émergence de résistance aux médicaments, et de l'épidémie du VIH ainsi que les infections opportunistes associées à cette dernière, tels les cytomegalovirus et polyomavirus, rend le développement de nouveaux médicaments antiviraux une priorité. Deux inhibiteurs de la protéase du cytomegalovirus, cytonics acid A et B (Figure 3) ont été isolés à partir de la culture du champignon endophyte *Cytonaema sp.* isolé du *Quercus sp.* (Guo *et al.*, 2000), il y a aussi xanthoviridicats E et F (Figure3) qui inhibent la réaction de clivage de l'intégrase du VIH-1, il a été produit par l'endophyte *Penicilium chrysogenum* (Singh *et al.*, 2003).

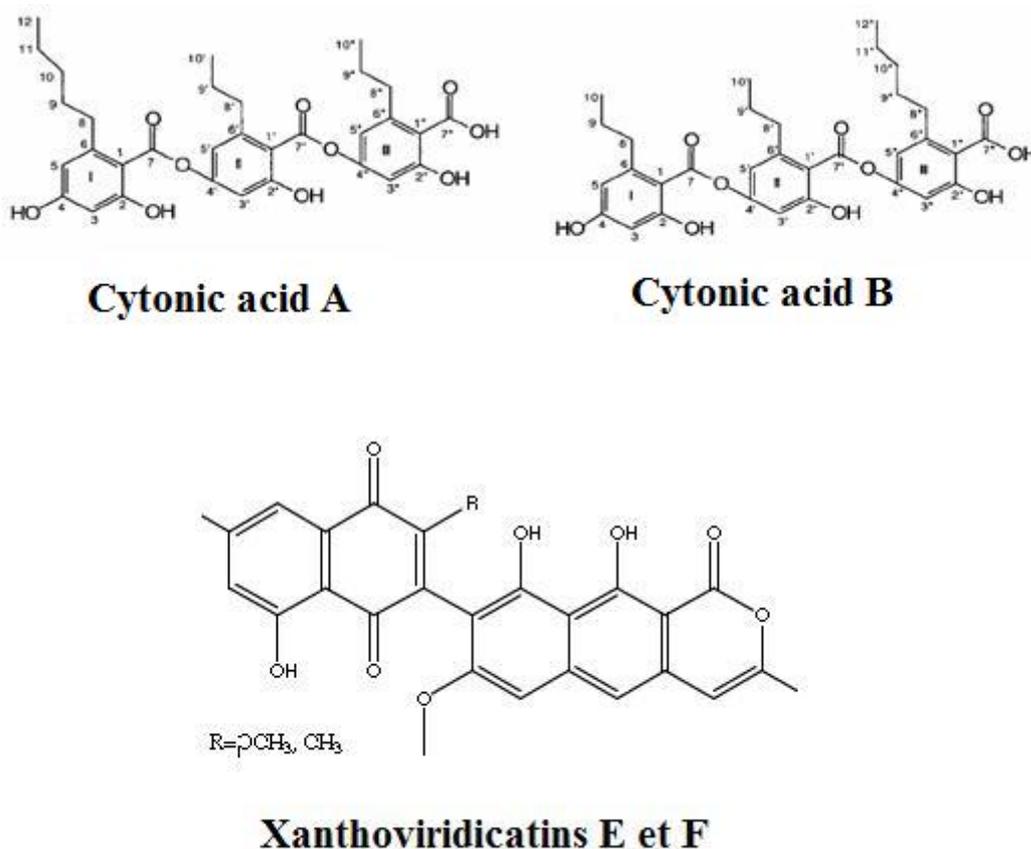


Figure 3 : Quelques substances antivirales produites pas les champignons endophytes (Vijay *et al* 2009).

1.8.4 Champignons endophytes comme source de substances anticancéreuses :

Le cancer a été considéré en 2004 comme l'une des premières causes de mort dans le monde avec environ 13% des décès totaux, il est caractérisé par une croissance incontrôlée

et une propagation des cellules anormales, qui peut entraîner la mort. Les médicaments anticancéreux présentent une toxicité non spécifique à la prolifération des cellules normales avec des effets secondaires considérables, de nombreux produits naturels de plantes ou de microorganismes ont été identifiés en tant qu'agents anticancéreux; récemment les endophytes et leurs métabolites sont étudiés pour leurs propriétés anticancéreuses (Pimentel *et al.*, 2011) quelques exemples sont cités ci-après :

Le premier médicament anticancéreux produit par les champignons endophytes est le taxol (Figure 4), un diterpénoïde qui empêche la dépolymérisation des molécules de tubuline au cours des processus de division cellulaire ce qui réduit ou interrompt leur croissance et leur propagation (Schiff et Horwitz, 1980). Isolé initialement de l'écorce de l'arbre *Taxus brevifolia* et se trouvant dans toutes les espèces d'ifs du monde, ce qui a poussé à le chercher dans les champignons endophytes de ces ifs; et il a été démontré que l'endophyte *Taxomyces andreanae* isolé de *Taxus brevifolia* le produisait.

Le taxol a été trouvé dans un certain nombre de différents genres de champignons endophytes, soit associés ou non aux ifs tels que *P. microspora* (Strobel *et al.*, 1993), *Periconia sp.*(Li *et al.*, 1998), *Taxodium distichum* (Li *et al.*, 1996), *Wollemia nobilis* (Strobel *et al.*, 1997), *Phyllosticta spinarum* (Kumaran *et al.*, 2008), *Bartalinia robillardoides* (Gangadevi et Muthumary, 2008) et *Botryodiplodia theobromae* (Pandi *et al.*, 2010).

Beaucoup d'autre métabolites produits par les plantes ont été produits aussi par les endophytes qui leurs sont associés, par exemple l'alcaloïde cytotoxique, la camptothecin isolé à l'origine de *Camptotheca acuminata* et *Nothapodytes foetida* a été identifié dans des cultures de *Entrophospora infrequens* endophyte de *Nothapodytes foetida* (Amna *et al.*, 2006). Un autre médicament anticancéreux utilisé comme traitement de certains cancers est la vincristine (Figure 4) obtenue à l'origine de *Catharanthus roseus*, et récemment il y a eu des preuves préliminaires qu'il pourrait être produit par *Fusarium oxysporium* endophyte de la même plante (Zhang *et al.*, 2006). D'autres champignons endophytes produisent des métabolites bioactifs non liés à ceux produits par leurs hôtes, comme les chaetomelic acids A et B (Figure 4) isolés de *Chaetomella acutisea* qui se sont révélés des inhibiteurs spécifiques de la protéine farnésyle transférase (Ishii *et al.*, 2000; Lingham *et al.*, 1993), une activité similaire a été observée pour les métabolites preussomerin N1, palmarumycin

CP_{4a}, et palmarumycin CP₅ produits par l'endophyte *Coniothyrium sp.* (Tan et Zou, 2001).

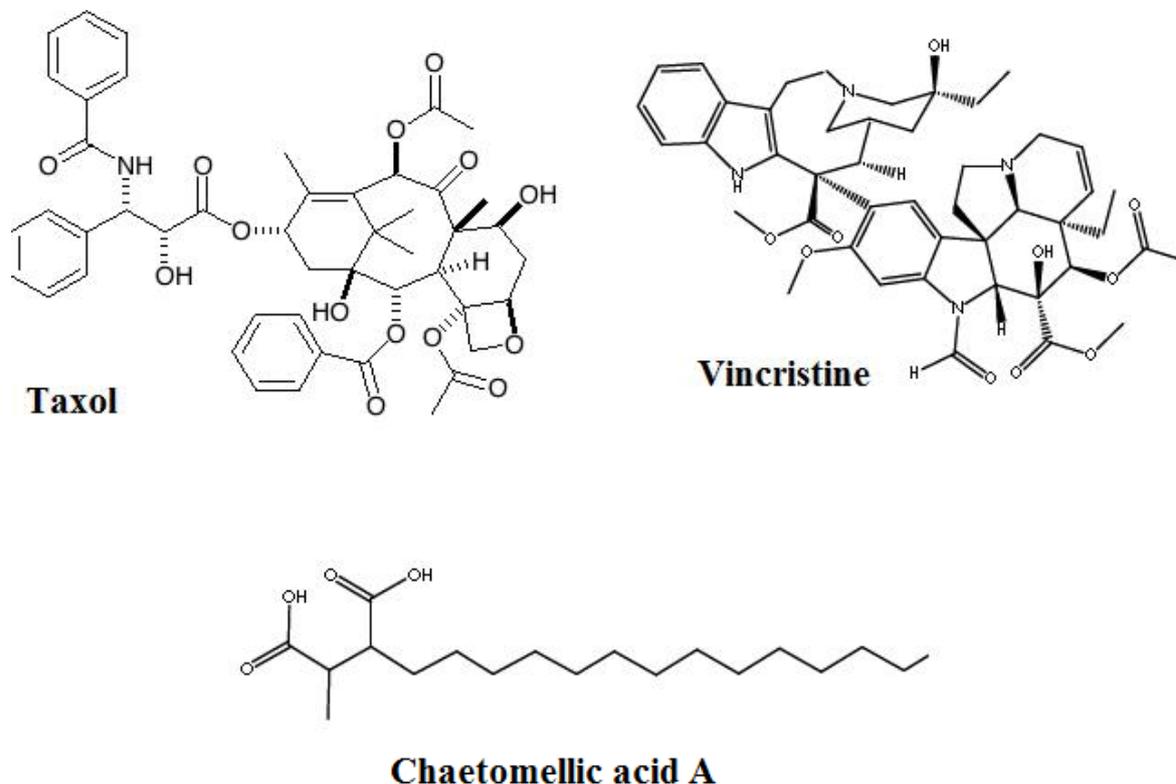


Figure 4 : Quelques substances anticancéreuses produites pas les champignons endophytes (Vijay *et al* 2009).

1.8.5 Champignons endophytes comme source de substances antioxydantes :

L'importance des composés ayant une activité antioxydante réside dans le fait qu'ils sont très efficaces contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les radicaux libres dérivés de celui ci tels les dommages de l'ADN, cancérogénèse et une dégénérescence cellulaire. Les antioxydants naturels sont généralement trouvés dans les plantes médicinales, les légumes et les fruits, et les champignons endophytes peuvent être une source potentielle de nouveaux antioxydants (Pimentel *et al.*, 2011).

Pestacin et isopestacin (Figure 5) ont été obtenues à partir de *Pestalotiopsis microspora*, un champignon endophyte isolé de *Terminalia morobensis*. (Harper *et al.*, 2003), l'activité antioxydante de l'isopestacin est attribuée au balayage à la fois des superoxydes et des radicaux libres en solution et une similarité structurale avec les flavonoïdes, celle de pestacin est attribuée principalement au clivage d'une liaison réactive C-H et dans une moindre mesure par le biais de l'abstraction de la liaison O-H (Pimentel *et al.*, 2011; Strobel *et al.*, 2004).

Deux cérébrosides isolés à partir de l'endophyte *Fusarium sp.* ont démontré une activité inhibitrice de la xanthine oxydase (Shu *et al.*, 2004). *Aspergillus niger* un endophyte de *Cynodon dactylon* aussi produit aurasperone A qui inhibe également la xanthine oxydase (Song *et al.*, 2004).

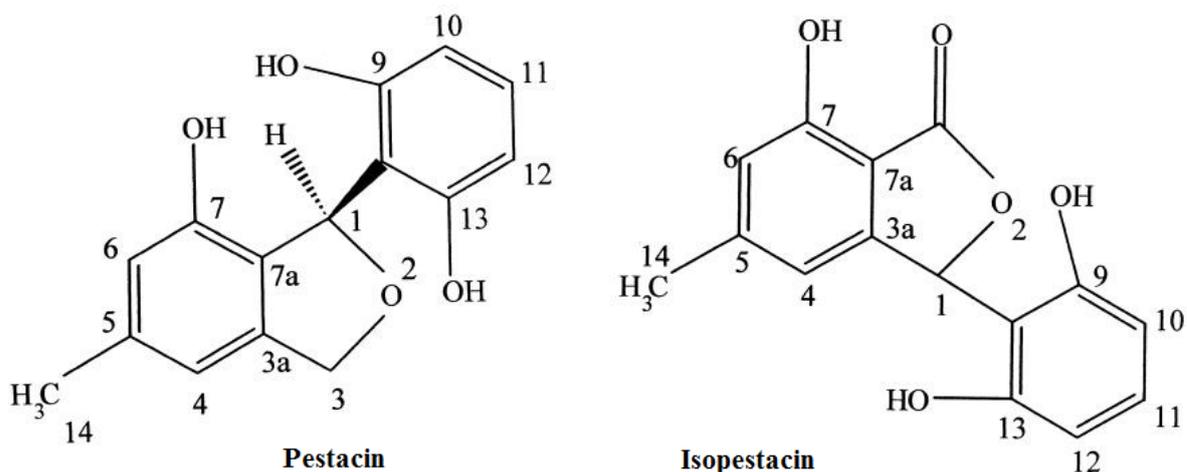


Figure 5 : Quelques substances antioxydantes produites pas les champignons endophytes (Strobel *et al.*, 2004).

2 Matériels et méthodes

2.1 Matériels :

2.1.1 Matériel végétal :

Il consiste en les rameaux de *Retama raetam* collecté en hiver 2010 dans la région de Bordj Bou Arréridj (Algérie).

2.1.2 Matériel microbien :

Le matériel microbien comprend les bactéries pathogènes et une levure provenant de l'hôpital universitaire de Sétif et des champignons phytopathogènes, l'un provenant du laboratoire de microbiologie et l'autre de l'INRA d'Alger.

Les bactéries comprennent trois à Gram positif qui sont : *Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et neuf à Gram négatif : *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas sp.*

La levure est *Candida albicans* et les champignons sont *Phytophthora infestans* et *Fusarium oxysporium fs. albedinis*

2.1.3 Produits chimiques :

- Acétate d'éthyle, chloroforme, éthanol, acide linoléique, Hydroxytoluène butylé(BHT), tween 80, tween40, tween20, hydroxyde de sodium(NaOH) proviennent de Sigma-Aldrich.
- Glucose ($C_6H_{12}O_6$), agar, acide sulfurique (H_2SO_4), chlorure de sodium (NaCl), dextrine ($C_6H_{10}O_5$)_n, phénol (C_6H_6O), chlorure de calcium dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) proviennent de Fluka
- Amidon ($C_6H_{10}O_5$)_n, diméthylsulfoxyde (DMSO) (CH_3)₂SO, dextrine ($C_6H_{10}O_5$)_n proviennent de Merck.
- Peptone de l'institut Pasteur production
- Extrait de levure, extrait de malt proviennent de Biokar diagnostics
- Sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$) de Panreac , Glycerol ($C_3H_8O_3$) de Cheminova

2.2 Méthodes :

2.2.1 Échantillonnage :

La collecte des échantillons de la plante a été faite pendant l'hiver 2010 dans la région de Bordj Bou Arréridj (Algérie). Et l'identification de l'espèce a été faite en se basant sur la flore de Quezel et Santa (1962-1963) et validée par des enseignants du laboratoire de biologie et physiologie végétale de l'Université Ferhat Abbas de Sétif.

Afin d'assurer un bon isolement des champignons endophytes, il faut choisir des plantes en bonne santé ainsi qu'un matériel végétal frais (Devaraju et Satish, 2010; Gallo *et al.*, 2008). Pour cela plusieurs plantes saines et matures ont été choisies et les échantillons ont été pris aléatoirement de différent emplacement sur les plantes, et mis dans des sacs en plastiques stériles pour les transporter jusqu'au laboratoire (Khan *et al.*, 2007). Les échantillons ainsi collectés sont préservés à une température de 4°C en attendant d'être utilisés, et ne doivent dépasser les 24 heures (Gallo *et al.*, 2008).

2.2.2 Isolement :

Les rameaux de *Retama raetam* ont été rincés sous l'eau du robinet pendant une dizaine de minutes pour les débarrasser des impuretés et les débris de la surface (Hazalin *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010), ensuite ils ont été immergés dans de l'éthanol 70% pendant 1 minute, puis dans de l'hypochlorite de sodium (NaOCL) (3%) pendant 4 minutes ; les rameaux sont ensuite remis dans de l'éthanol 70% durant 30 secondes (Pimentel *et al.*, 2006), et sont rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile pendant 1 minute chaque fois et séchés sur du papier filtre stérile (Khan *et al.*, 2010; Pimentel *et al.*, 2006).

Les rameaux sont ensuite coupés en fragments de quelques millimètres et placés aseptiquement dans des boîtes de pétri contenant du potato dextrose agar (PDA) préalablement passé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, et supplémenté aseptiquement avec 150 mg/l de chloramphénicol pour inhiber la croissance bactérienne, à raison de 5 à 6 segments par boîte, et sont mis à incubés à 28°C (Gangadevi *et al.*, 2008; Hazalin *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Pimentel *et al.*, 2006).

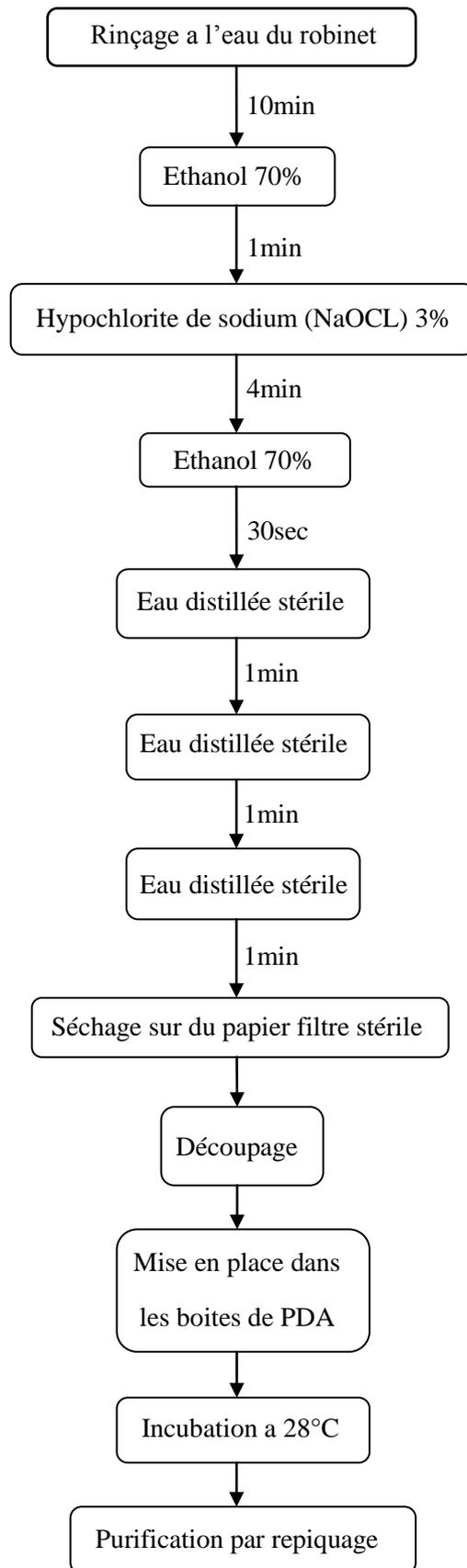


Figure 6 : Stérilisation de surface et isolement des champignons endophytes (Gangadevi *et al.*, 2008; Hazalin *et al.*, 2009; Pimentel *et al.*, 2006; You *et al.*, 2009).

Pour vérifier l'efficacité de la stérilisation et pour confirmer que les isolats provenaient des tissus internes, on a procédé à deux expériences. La première a consisté à étaler des aliquotes provenant du troisième lavage sur du PDA, et la deuxième a été de passer un segment de la plante déjà stérilisé sur la surface du PDA ; l'absence de champignons sur les milieux indique que la stérilisation de surface a été bien faite et que tout champignon épiphyte a été éliminé (Pimentel *et al.*, 2006; You *et al.*, 2009).

Les boîtes ont été contrôlées chaque jour pendant une durée maximum d'une trentaine de jours, chaque champignon poussant sur les fragments de rameaux sera isolé, purifié et conservé sur du PDA en culot à 4°C (Pimentel *et al.*, 2006).

Le pourcentage de colonisation est calculé ensuite en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de colonisation} = \frac{\text{nombre de segments colonisés par des endophytes}}{\text{nombre total de segment}} \times 100$$

(Pimentel *et al.*, 2006).

2.2.3 Dépistage de l'activité antimicrobienne :

Tous les champignons endophytes isolés ont été dépistés pour voir leur activité antimicrobienne. Pour cela deux méthodes ont été utilisées, la première est la double culture de diffusion sur gélose, et la deuxième est la technique de la double culture.

2.2.3.1 Préparation des microorganismes d'essai :

Nos champignons ont été testés contre une bactérie à gram négatif *Escherichia coli*, une à gram positif *Bacillus sp.*, et une levure *Candida albicans* et deux champignons phytopathogènes *Phytophthora infestans* et *Fusarium oxysporium* *fs. Albedinis*.

Les bactéries ont été mises à incuber à 37°C pendant deux à trois heures et la levure à 30°C pendant 24 heures, la turbidité après a été ajustée pour correspondre à 0.5 McFarland pour les bactéries, et ajustée à 10⁴ UFC/ml pour la levure (Devaraju et Satish, 2011). Les champignons ont été mis à croître sur du PDA pendant une dizaine de jours (Orole et Adejumo, 2009).

2.2.3.2 Double culture de diffusion sur gélose :

Cette technique a été décrite par (Devaraju et Satish, 2011), à partir d'une culture de huit jours sur du PDA des blocs de 6 mm de diamètre sont coupé stérilement, pour être placé sur des boîtes de nutrient agar et Sabouraud's agar déjà inoculé avec 100 µl de bactéries et de levure pathogènes. Après dix minutes passé a une température ambiante, les boîtes ont été mises a incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 28°C pendant 48 heures pour la levure.

L'expérience a été répété trois fois, et les zones d'inhibition autour des blocs de champignons indiquant l'activité antimicrobienne ont été mesurées et enregistrées.

2.2.3.3 Double culture :

L'activité antifongique a été dépistée en utilisant la technique de la double culture décrite par (Orole et Adejumo, 2009). Elle consiste à mettre un disque de 8 mm de diamètre du champignon endophyte provenant d'une culture de cinq jours sur une boîte de pétri contenant du PDA, ensuite un autre disque du même diamètre du champignon pathogène est mis a l'autre extrémité de la boîte avec une distance de 50 mm entre les deux disques. Chaque boîte ainsi que la boîte contrôle qui ne contient pas l'endophyte ont été répété trois fois, et incubé a 25°C a l'obscurité.

Après cinq jours d'incubation le rayon de chaque champignon pathogène est mesuré dans le sens du champignon endophyte, ainsi que dans les boîtes contrôles

Le pourcentage d'inhibition est mesuré par la formule suivante (Nuangmek *et al.*, 2008; Orole et Adejumo, 2009; Ting *et al.*, 2009) :

$$\text{pourcentage d'inhibition} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 étant la croissance radiale de l'agent pathogène dans le contrôle

R2 la croissance radiale de l'agent pathogène en double culture

2.2.4 Identification :

Pour l'identification des champignons, on s'est basé sur leurs caractéristiques culturelles et la morphologie des fructifications et des spores; pour cela on à utilisé les clés d'identification (Botton *et al.*, 1990; Champion, 1997; Pitt et Hocking, 1985).

Les champignons ont été mis à croître sur deux milieux, Czapek yeast extract agar (CYA) et Malt extract agar (MEA) à 25°C pendant sept jours. Après quoi, les caractéristiques suivantes ont été observées :

- Le diamètre des colonies qui a été mesuré sur le fond de la boîte
- La texture du thalle (velouté, laineux poudreux, etc.).
- La détermination de la couleur de la colonie, du revers de la culture ainsi que celle du milieu à la lumière du jour.
- La vitesse de croissance.
- L'exsudat (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien).

Les champignons ont été aussi examinés au microscope afin de déterminer le mécanisme de production de spore ainsi que les caractéristiques des spores, en préparant des frottis humides, où les échantillons ont été prélevés aussi bien des bordures des colonies où les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores est peu, et du centre des colonies pour prélever les structures renfermant des spores et où les spores sont beaucoup plus matures.

2.2.5 Fermentation et extraction :

Les champignons ainsi ayant un résultat positif au dépistage et identifiés, ont été mis à croître sur du PDA à 25°C pendant cinq jours, deux à trois pièces (0.5 x 0.5 cm) de chaque champignon ont été inoculées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 300 ml de PDB (potato dextrose broth) et répété deux fois (Xiaoling *et al.*, 2010), ils seront après incubation à 25°C pendant trois semaines avec une agitation périodique à 150 tours/minute, après ça le contenu est filtré à travers une gaze stérile pour séparer le mycélium du bouillon de culture (Barik *et al.*, 2010; Mohanta *et al.*, 2008), ce dernier est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 min, et le surnageant a été récupéré (Madki *et al.*, 2010).

L'extraction a été faite par deux solvants organiques, l'acétate d'éthyle et le chloroforme; à chaque filtrat on rajoute un volume égal de solvant et on le met sous agitation pendant deux heures, la solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décompte pour séparer les deux phases, et la phase organique a été récupérée pour être concentrée sous pression par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor du type BÜCHI) à 45°C (Mohanta *et al.*, 2008; Oliveira Silva *et al.*, 2009).

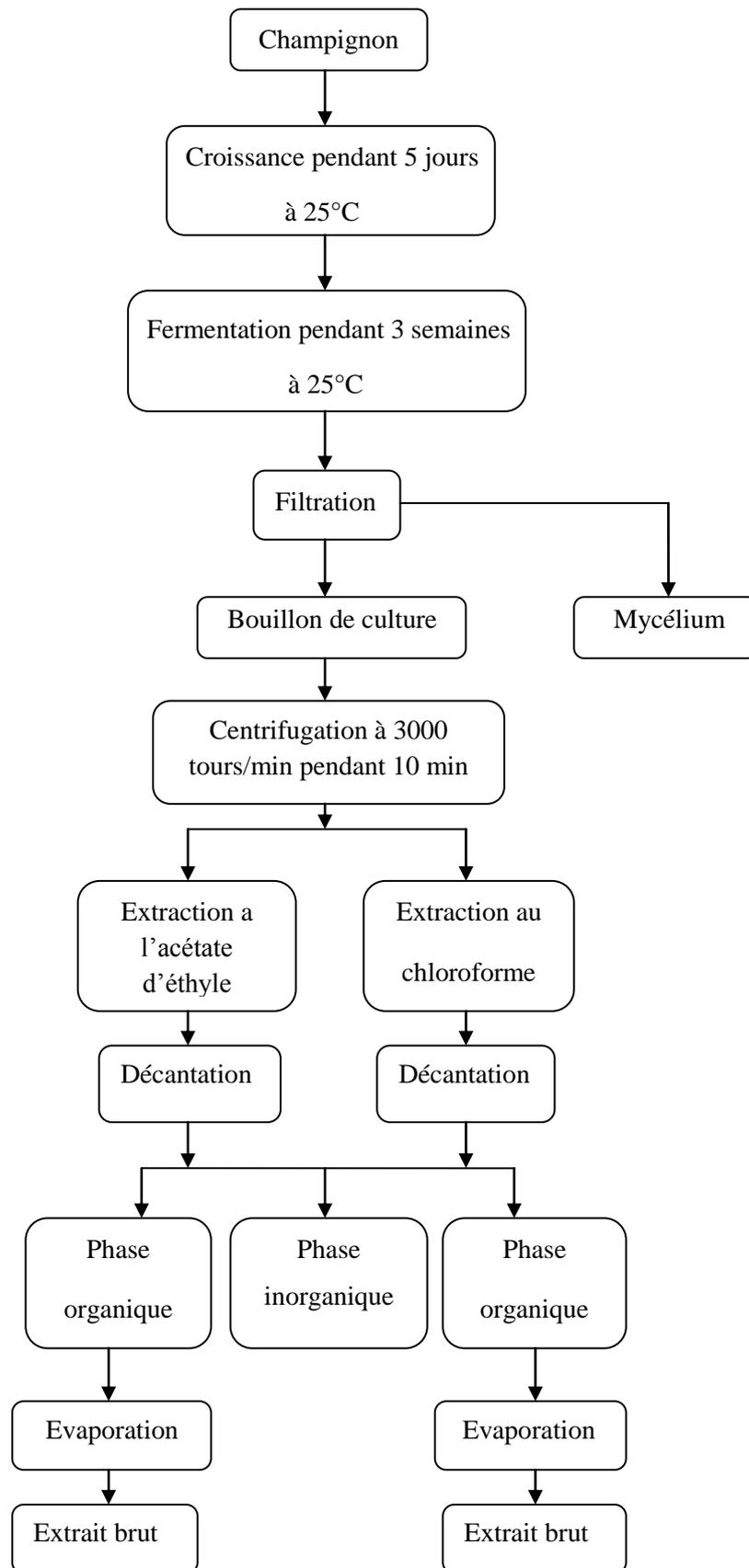


Figure 7 : Fermentation et extraction des champignons endophytes avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme (Barik *et al.*, 2010; Mohanta *et al.*, 2008; Oliveira Silva *et al.*, 2009; Xiaoling *et al.*, 2010).

2.2.6 Activité antimicrobienne :

2.2.6.1 Préparation des microorganismes test :

Les bactéries pathogènes et la levure ont été mises à croître dans du nutrient broth (NB) pendant deux à huit heures à 37°C, ensuite leurs turbidité a été ajustée à l'aide du bouillon pour obtenir une turbidité équivalente au standard de 0.5 McFarland (10^8 UFC/ml) (Chareprasert *et al.*, 2006).

Après une croissance d'une dizaine de jours sur du PDA, la surface des champignons phytopathogènes chargés de spores a été raclée à l'aide d'une tige de verre stérile en forme de L en présence de 5 ml d'eau distillée stérile (Mukhtar *et al.*, 2008). Le nombre de spores a été ajusté à l'aide d'une cellule de Malassez pour obtenir une concentration de 10^6 spores/ml (Mukhtar *et al.*, 2008; Ramasamy *et al.*, 2010).

2.2.6.2 Méthode de diffusion sur disques :

Afin de déterminer l'activité antimicrobienne des extraits obtenus par l'extraction à l'acétate d'éthyle et le chloroforme, la méthode de diffusion sur disques a été utilisée (Hazalin *et al.*, 2009). Les boîtes contenant du nutrient agar (NA) et du Sabouraud dextrose agar (SDA) ont été inoculées avec 100 µl des suspensions bactériennes et les suspensions fongiques et de levure respectivement (Mohanta *et al.*, 2008; Yamaç et Bilgili, 2006).

Chaque extrait fongique a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de façon à obtenir une concentration de 1mg/ml, 10 µl de chaque extrait ont été déposés à l'aide d'une pipette sur les disques stériles (6 mm de diamètre) placés à la surface des géloses préalablement inoculés avec les bactéries et les champignons pathogènes, le DMSO a aussi été utilisé en tant que contrôle négatif (Hazalin *et al.*, 2009).

Les boîtes ainsi terminées ont été mises pendant 2 heures à 4°C afin que les métabolites puissent diffuser ensuite elles ont été mises à incuber à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries, 30°C pendant 48 heures pour la levure et 72 heures pour les champignons.

Le diamètre des zones claires autour des disques révélant l'activité antimicrobienne des extraits ont été mesurés. Et les tests ont été effectués en triplicata (Yamaç et Bilgili, 2006).

2.2.7 Activité antioxydante :

2.2.7.1 Méthode du β -carotène/acide linoléique :

Dans cette méthode, l'activité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition des composées organiques volatiles et des hydroperoxydes à doubles liaisons conjuguées (diene conjugated hydroperoxides), qui apparaissent lors de l'oxydation de l'acide linoléique (Dapkevicius *et al.*, 1998).

Le test du β -carotène a été effectué selon la méthode de Miller, (1971) modifié par Aslan *et al.*, (2006). 0.5mg de β -carotène ont été dissous dans 1ml de chloroforme et mélangés avec 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de tween 40, le chloroforme de cette solution a été complètement évaporé à l'aide d'une rotavapor de type (BÜCHI) à 40°C. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés. Après cela, ce mélange a été divisé à raison de 2500 μ l par tube auxquels on rajoute 350 μ l d'extraits ayant une concentration constante de 2g/l, la même chose a été répétée pour les deux contrôles positive(BHT) et négatif (eau distillée, méthanol).

Les absorbances ont été lus a 490nm, après 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 24h et 48h d'incubation a température ambiante et a l'obscurité.

Le pourcentage d'inhibition des extraits antioxydant est mesuré à l'aide de la formule suivante :

$$AA\% = \frac{Abs_{test}}{Abs_{BHT}} \times 100$$

AA% : Le pourcentage de l'activité antioxydante.

Abs_{test} : Absorbance en présence de l'extrait (test).

Abs_{BHT} : Absorbance en présence du contrôle positif (BHT).

2.2.8 Activité enzymatique :

La production de quatre enzymes extracellulaires a été dépistée et déterminée pour nos souches fongiques par la digestion du substrat dissous dans des plaques de gélose selon la méthode décrite par (Maria *et al.*, 2005) pour l'amylase, protéase et la lipase et selon (Carrim *et al.*, 2006) pour l'estérase.

Pour l'amylase et la protéase, on a utilisé le milieu GYP (glucose yeast extract peptone) auquel on ajoute pour l'amylase 2% d'amidon soluble et 0.4% de gélatine stérilisé séparément (8g/100ml d'eau distillée) pour la protéase.

Pour la lipase et l'estérase, le milieu utilisé est le peptone agar medium, et les substrats sont respectivement le tween 20 et le tween 80, qui ont été stérilisés séparément et ajoutés au milieu à raison de 1 ml pour 100 ml du milieu.

Les milieux ainsi préparés, ont été ajustés à un pH de 6, inoculés avec des disques mycéliens de 3 mm, et incubés à $32\pm 2^\circ\text{C}$ pendant trois à cinq jours. L'activité lipolytique et estérasique est déterminée par la présence ou non d'une zone claire autour de la colonie, et l'activité amylolytique et protéolytique a été démontrée en inondant les boîtes avec du lugol's iodine et le sulfate d'ammonium aqueux respectivement, l'apparition de la zone claire formée autour de la colonie révèle la présence de l'enzyme.

2.2.9 Analyse statistique :

L'étude statistique a été faite en utilisant le logiciel SAS/STAT® 9.2,

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont été analysés statistiquement par le test de (two-way ANOVA) suivie de celui de Student-Newman-Keuls multip-rang test afin de comparer les moyennes des zones d'inhibition des extraits fongiques. Contrairement aux résultats des activités antioxydante et enzymatique où l'analyse a été faite par le test de (One-Way ANOVA) suivie de Student-Newman-Keuls multip-rang test, pour comparer les pourcentages d'inhibition des extraits fongique et ceux des témoins pour l'activité antioxydante, et les moyennes des zones de dégradation de chaque enzyme par les champignons pour l'activité enzymatique.

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD et les mesures ont été répétées trois fois (n=3), La différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est ≤ 0.05

3 Résultats et discussion

3.1 Isolement et détermination du pourcentage de colonisation :

Après quelques jours d'incubation, les premiers champignons endophytes commençaient à pousser à partir des segments de plantes, contrairement aux boîtes qui ont été utilisées pour vérifier l'efficacité de la stérilisation de la surface où aucun microorganisme n'a poussé, ce qui signifie que tout champignon émergeant des segments provient des tissus internes de la plante et que ce n'est pas un épiphyte. Ainsi chaque champignon a été repiqué en prélevant avec une anse stérile un fragment mycélien ou quelques spores sur du PDA neuf sans antibiotique, certains champignons ont été repiqués plusieurs fois afin de les purifier. Ainsi, les endophytes purifiés, ont été repiqués une dernière fois sur du PDA en culot pour être conservés durant 8 à 10 mois à 4°C.

A partir d'un total de 125 segments de rameaux provenant de plusieurs plantes, 10 isolats fongiques différents ont été isolés, ce qui nous a permis d'obtenir un pourcentage de colonisation égale à 8%, un pourcentage proche et comparable à celui obtenu par (Lv *et al.*, 2010) utilisant *Saussurea involucrata* KAR. et KIR. qui est de 11% et celui obtenu par (Khan *et al.*, 2010) qui a utilisé une seconde plante médicinale *Withania somnifera* (L.) Dunal. et a obtenu un pourcentage de 5.11%, la différence entre ces pourcentages peut être expliquée par la différence entre l'espèce de l'hôte, le nombre d'échantillon ainsi qu'aux milieux de culture utilisés (Gong et Guo, 2009).

3.2 Dépistage de l'activité antimicrobienne :

Après l'isolement et la purification, les isolats fongiques ont été dépistés sur leur pouvoir antimicrobien et antifongique en utilisant les techniques de la double culture de diffusion sur gélose et celle de la double culture.

Pour la première, les zones d'inhibitions autour des blocs fongiques ont été mesurées après 24 heures d'incubation, et les moyennes de celles-ci figurent dans le tableau 1.

Pour la deuxième un pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant les moyennes des rayons des champignons phytopathogènes dans les boîtes contrôles et en double culture après 5 jours d'incubation, les résultats figurent dans le tableau 2.

50% des endophytes isolés ont démontré une activité contre *Escherichia coli*, *Bacillus sp.* et *Candida albicans*, et 60% ont une activité contre *Fusarium oxysporium f. sp. albedinis* et *Phytophthora infestans*

Tableau 1 : L'inhibition de la croissance des bactéries et d'une levure pathogènes par les isolats fongiques (n=3, moyenne ± SD)

Endophytes	Zone d'inhibition (mm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Candida albicans</i>
Isolat 1	10.33±0.58	10.00±1.73	14.00±1.73
Isolat 2	10.33±1.53	12.33±1.53	14.00±1.00
Isolat 3	7.67±2.31	13.33±0.58	12.00±0.00
Isolat 4	-	-	-
Isolat 5	8.67±1.53	10.00±1.73	12.67±1.53
Isolat 6	-	-	-
Isolat 7	9.00±0.00	7.67±1.53	9.00±0.00
Isolat 8	-	-	-
Isolat 9	-	-	-
Isolat 10	-	-	-

Tableau 2 : Pourcentages d'inhibition de la croissance des deux champignons phytopathogènes en double culture (n=3, pourcentage d'inhibition).

Endophytes	Pourcentage d'inhibition (%)	
	<i>Fusarium oxysporium f. sp. albedinis</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
Isolat 1	27,78	8,11
Isolat 2	25,00	27,03
Isolat 3	33,33	29,73
Isolat 4	-	-
Isolat 5	13,89	18,92
Isolat 6	-	-
Isolat 7	30,56	24,32
Isolat 8	-	-
Isolat 9	-	-
Isolat 10	30,56	24,23

Ces résultats concordent avec ceux obtenus antérieurement par (Devaraju et Satish, 2011; Jalgaonwala *et al.*, 2010; Macia-Vicente *et al.*, 2008; Nuangmek *et al.*, 2008; Ting *et*

al., 2009), selon lesquels les endophytes peuvent avoir une activité antimicrobienne due probablement à la production de composés antimicrobiens, qui sont capables d'inhiber un large spectre de pathogènes.

3.3 Identification des genres fongique:

Le dépistage ainsi fait nous a permis de sélectionner six isolats ayant un résultat positif, afin d'approfondir notre étude; En commençant par l'identification et en s'aidant des clés d'identification de (Pitt et Hocking, 1985) et (Botton *et al.*, 1990), nous avons pu identifier nos isolats. La description de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques est résumée dans le tableau 3, et les photos sont représentées dans la figure 1.

Tableau 3 : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des différents isolats après 7 jours d'incubation à 25°C.

Genres	Descriptions
<i>Aspergillus sp. 1</i>	- Le mycélium est blanc et les têtes des conidies sont vert jaune sur CYA et vert sur MEA, le revers des boites est jaune, les colonies sont plates, veloutées et poudreuses et les diamètres varies entre 45-50 mm.
	- Le mycélium est transparent et cloisonné, conidiophores non ramifiés se terminant par des vésicules portant des métules et des phialides (tête conidienne bisériés), conidies sphériques et lisse.
<i>Aspergillus sp. 2</i>	- Les mycéliums sont blancs avec des têtes des conidies noir, le revers des boites est jaune clair, les colonies sont plates, duveteuses, sur CYA la colonie rempli la boite contrairement a celle sur MEA dont le diamètre avoisine les 40 mm.
	- Le mycélium est transparent, cloisonné, conidiophores sont long avec une paroi lisse, se terminent par des vésicules sphériques portant des métules et des phialides tout au tour de la vésicule, conidies sphériques et brunes.

- Les mycéliums sont blanc avec des têtes des conidies noir, le revers des boites est jaune clair, les colonies sont plates, duveteuses, les colonies mesure dans les environs de 35 mm de diamètre aussi bien sur CYA que MEA.

Aspergillus sp. 3

- Le mycélium est transparent, cloisonné, conidiophores sont long avec une paroi lisse, se terminent par des vésicules sphériques portant des métules et des phialides tout au tour de la vésicule, conidies sphériques et brunes.

- Le mycélium sur CYA est blanc, avec le temps il passe au bleu au centre, avec des exsudats jaune clair, le revers est orangé, la colonie est cotonneuse et le diamètre est de 22 mm. Sur MEA, le mycélium est blanc brun et bleu, le revers est jaune foncé, la colonie est cotonneuse et le diamètre est de 20 mm.

Penicillium sp.

- les hyphes sont cloisonnées transparents, conidiophores ramifiés avec des métules et des phialides formant un groupe en forme de brosse, conidies unicellulaires et rondes.

Mycélium stérile

- Mycélium stérile blanc-crème, revers crème sur les deux milieux, les colonies sont cotonneuses, le diamètre sur CYA est de 70 mm et de 54 mm sur MEA.

- Mycélium de couleur olivacé, revers olive a gris verdâtre, colonies plane veloutées, diamètres varie entre 20- 35mm.

Cladosporium sp.

- Mycélium cloisonné brun, conidiophores peu ramifiés sur de longs stipes, pigmentés, production de conidies de forme cylindrique de couleur foncé, à paroi lisse.

L'identification nous a permis de classer nos isolats dans la classe des Deutéromycètes, une classe qui est considérée parmi celles auxquelles appartient la plupart des champignons endophytes, en plus des classes des Ascomycètes et des Basidiomycètes (Saar *et al.*, 2001).

Trois des six isolats décrits ci-dessus dans le tableau 3 appartiennent au genre *Aspergillus*, un genre très diversifié comptant 180 espèces, dont certaines ayant une valeur

commerciale, médicale, ainsi que des espèces pathogènes (Lubertozzia et Keasling, 2009). *Aspergillus* est un genre capable de croître sur presque tout type d'habitat (Ilyas *et al.*, 2009), et a été déjà isolé préalablement en tant qu'endophyte à partir de plusieurs plantes médicinales dont *Clitoria ternatia*, une plante médicinale de la famille des *Fabaceae*, par (Shankar et Shashikala, 2010); il a été isolé aussi à partir de différentes plantes médicinales par (Abdel-Motaal *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2008; Ilyas *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Nagaraja et Devkar, 2010).

En plus des trois *Aspergillus* il y en a un qui appartient au genre *Penicillium*, un genre qui comporte plus de 200 espèces, certaines utilisées dans l'industrie fromagère ou pour la production de métabolites, d'autres peuvent être responsables de dégradations, c'est un genre très répandus dans la plupart des environnement terrestres (Botton *et al.*, 1990; Petit *et al.*, 2009), et il a été déjà isolé comme endophyte à partir de plusieurs plantes médicinales par (Abdel-Motaal *et al.*, 2010; Bhagobaty *et al.*, 2010; Ilyas *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Kharwar *et al.*, 2008; Mohanta *et al.*, 2008; Nagaraja et Devkar, 2010; Rakotoniriana *et al.*, 2008; Shankar et Shashikala, 2010).

Le troisième genre isolés et identifié est *Cladosporium*, un genre mondialement répandu, il groupe environ 35 espèces parasites de végétaux ou saprophytes très communs (Botton *et al.*, 1990) il a été isolé comme endophyte à partir de *Cephalotaxus mannii* par (Saithong *et al.*, 2010), et de *Acacia catechu* Willd par (Nagaraja et Devkar, 2010).

Le dernier isolat est un mycélium stérile, il a été laissé croître plus de deux mois et il n'a formé aucune forme de spores sexuées ou asexuées et son identification doit se faire moléculairement. Beaucoup de champignons stériles ont été isolés en tant qu'endophytes à partir de différentes plantes médicinales par (Huang *et al.*, 2008; Ilyas *et al.*, 2009; Jianqui *et al.*, 2008; Mohanta *et al.*, 2008).

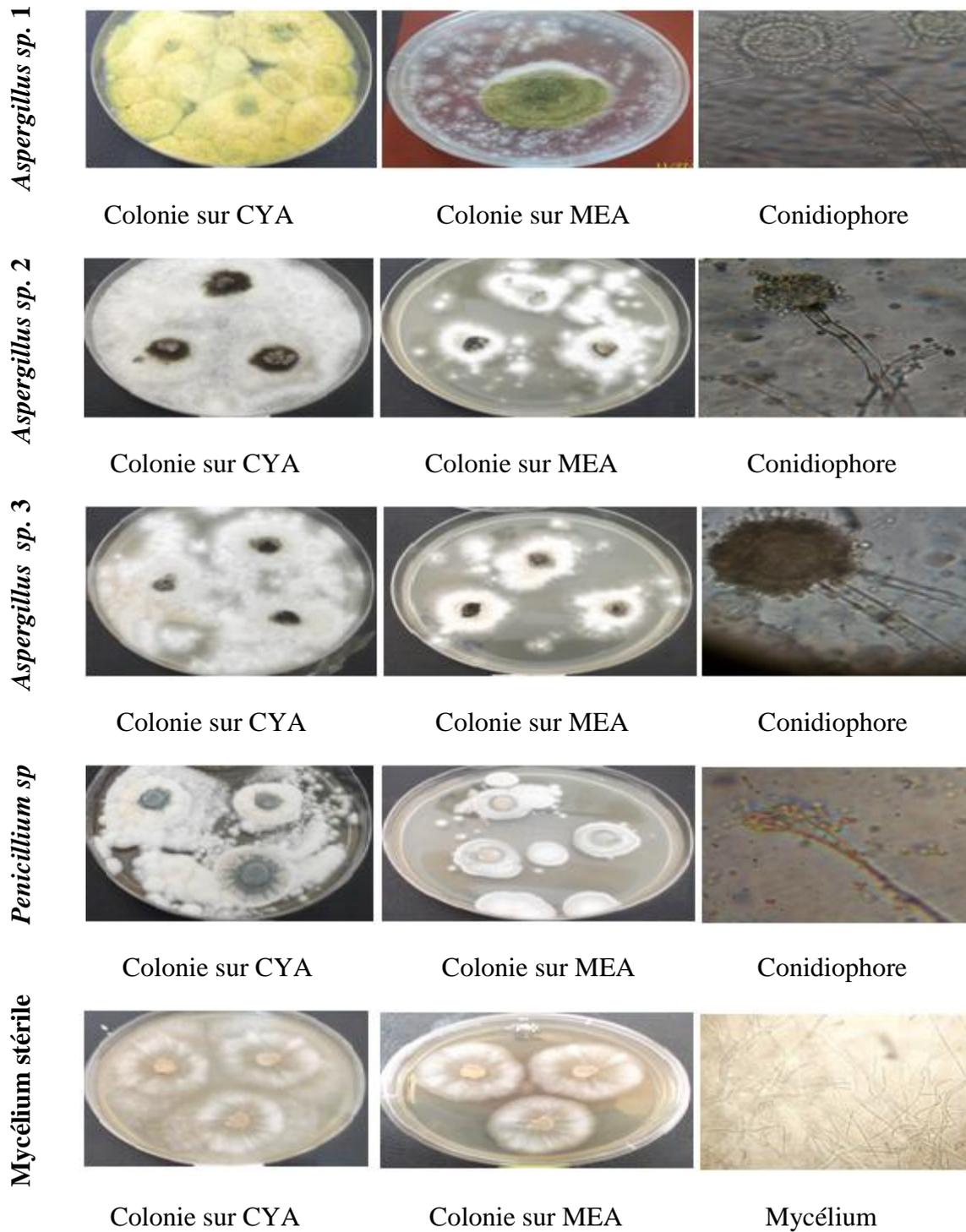


Figure 8 : différentes caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques après 7 jours d'incubation à 25°C.

3.4 Détermination de l'activité antimicrobienne :

Après fermentation et extraction à l'aide de l'acétate d'éthyle et le chloroforme, les extraits des six souches fongiques ont été examinés sur leur activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disques ; les différents extraits ont montré une activité antimicrobienne plus ou moins grande, et où les zones d'inhibition allé de 0 à 25 mm pour les extraits d'acétate d'éthyle, et de 0 à 19 mm pour les extraits chloroformiques. Les diamètres de toutes les zones d'inhibition sont résumés dans le tableau 1 de l'annexe 2

Pour les extraits d'acétate d'éthyle, l'effet le plus grand a été obtenu par l'extrait de *Cladosporium sp.* Sur le champignon phytopathogène *Phytophthora infestans* dont la zone été de 25 mm, contrairement a *Pseudomonas aeruginosa* sur laquelle les extraits de tout les champignons n'ont eu aucune effet.

Pour les extraits chloroformiques, la plus grande zone d'inhibition a été observée chez l'extrait de *Penicillium sp.*, qui a donné une zone d'inhibition de 19 mm contre *Pseudomonas aeruginosa*. Plusieurs bactéries pathogènes n'ont pas du tout été affectées par les extraits chloroformiques, dont *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* *Klebsiella pneumoniae*...

Tous les résultats obtenus par les extraits d'acétate d'éthyle et chloroforme de tous les champignons endophytes sont représentés dans les graphes des figures 2 et 3 respectivement. Ainsi que sur des photos de quelques zones d'inhibitions représentées par la figure 4.

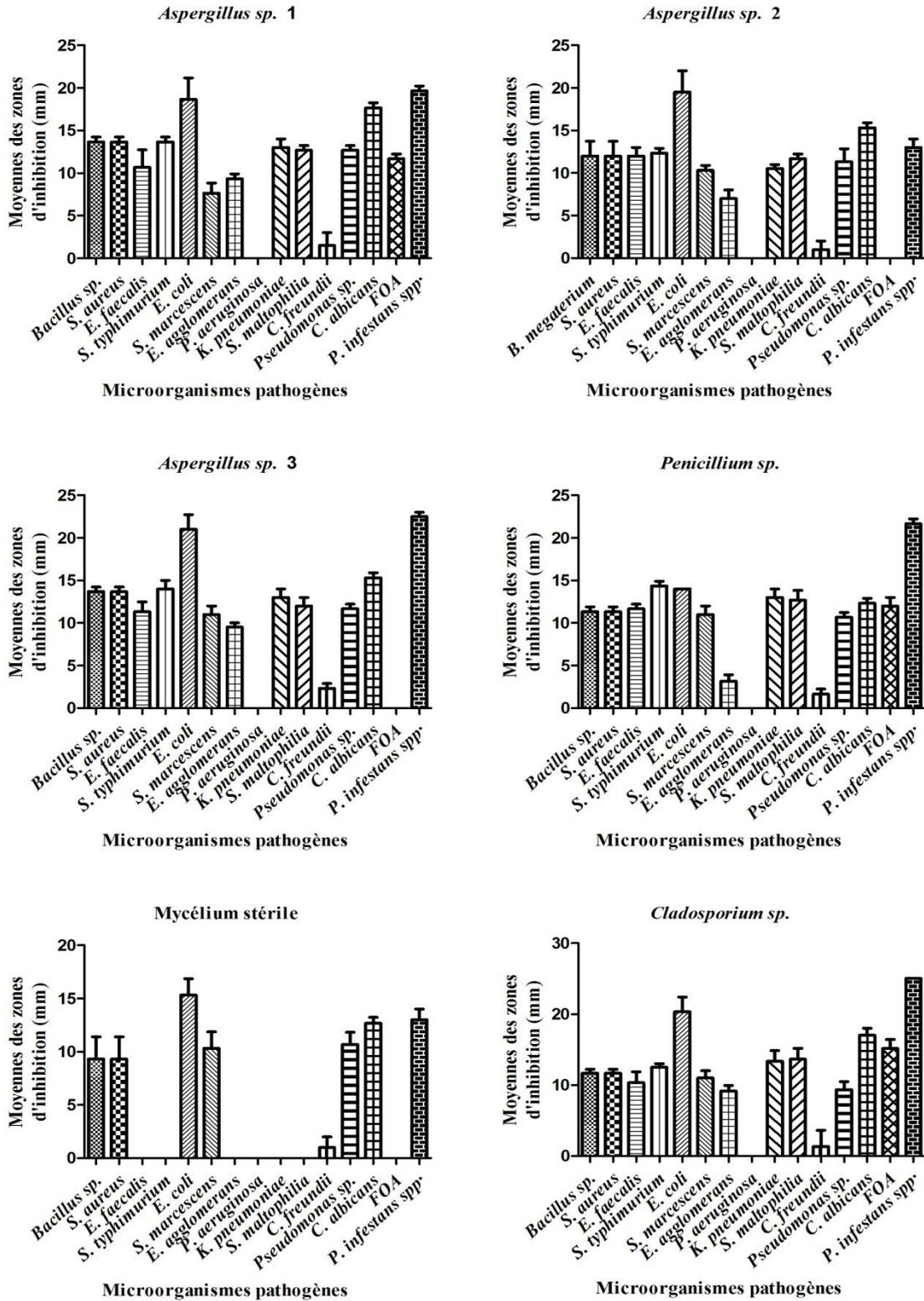


Figure 9 : Effet de chaque extrait fongique obtenu par l'acétate d'éthyle sur les microorganismes pathogènes (n=3, moyenne des zones d'inhibition \pm SD).

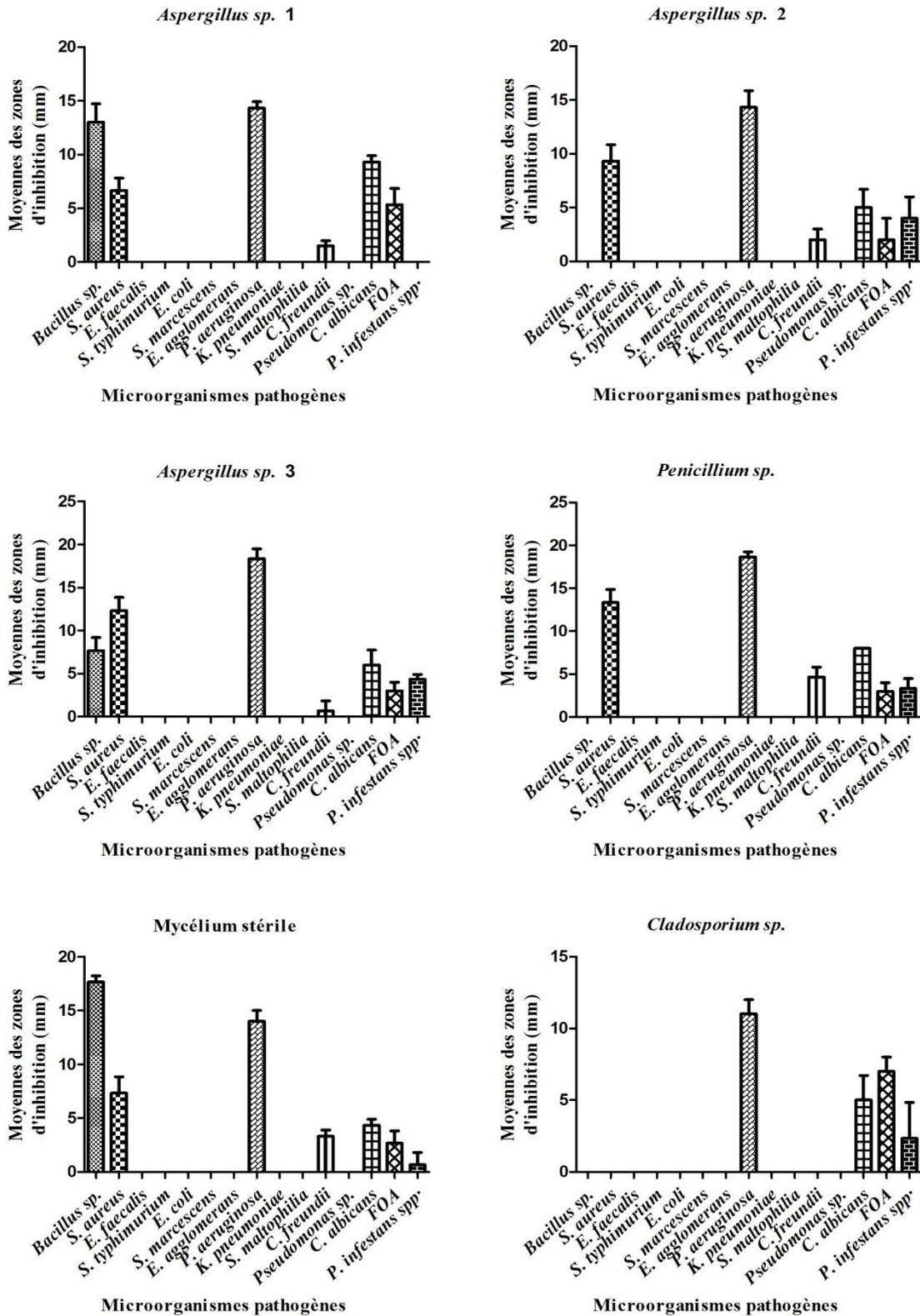


Figure 10 : Effet de chaque extrait fongique obtenu par le chloroforme sur les microorganismes pathogènes (n=3, moyenne des zones d'inhibition \pm SD).

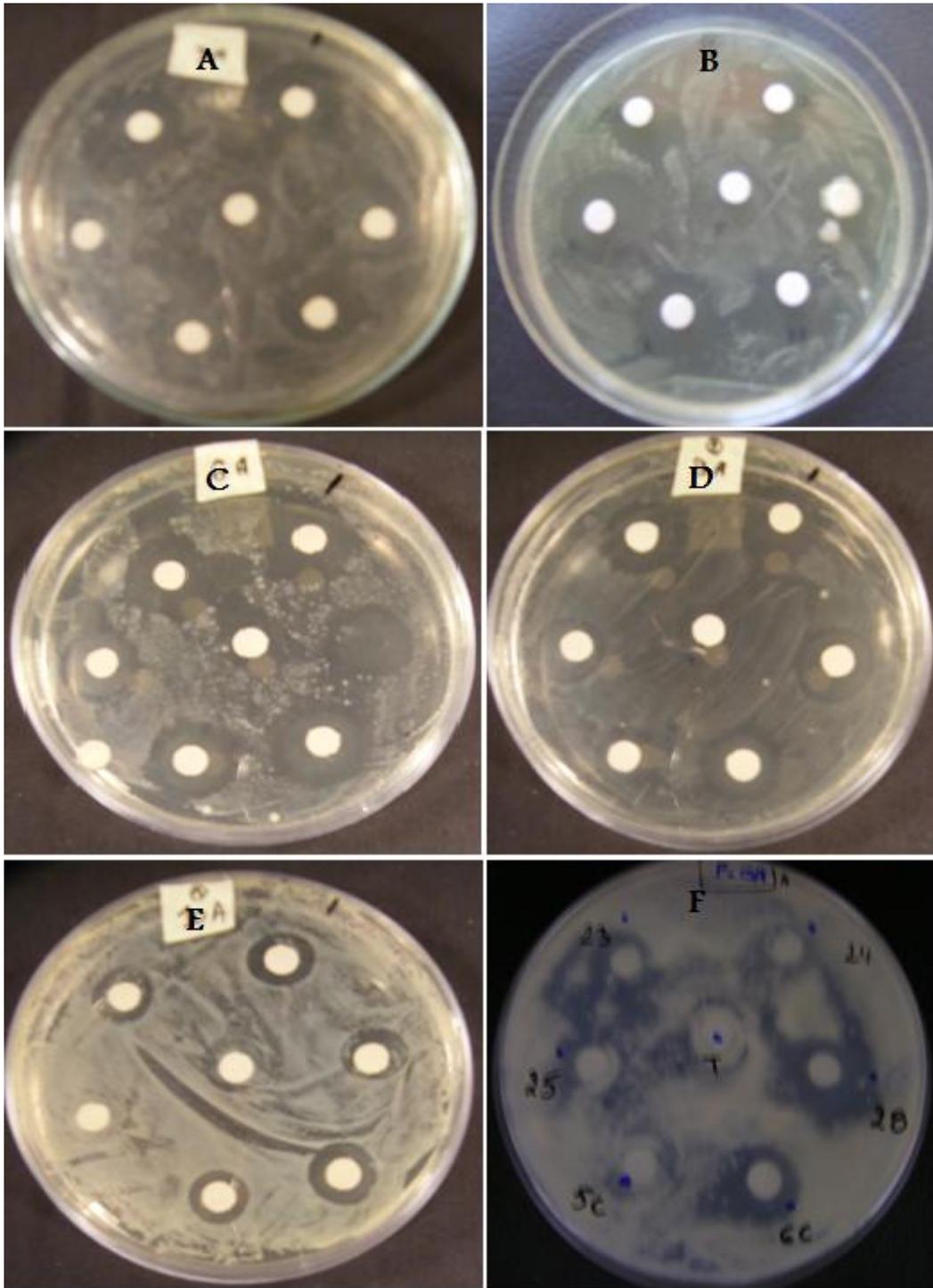


Figure 11 : Quelques zones d'inhibition de différents extraits fongiques.

A: *Staphylococcus aureus*, B: *Echerichia coli*, C : *Enterobacter agglomerans*,

D: *Candida albicans*, E: *Stenotrophomonas maltophilia*, F: *Fusarium oxysporium fs. Albedinis*

On a procédé à une analyse de variance des différents extraits fongiques obtenus avec l'acétate d'éthyle et le chloroforme et leurs effets sur la croissance des bactéries pathogènes et des champignons phytopathogènes, on a trouvé une différence significative entre les extraits fongiques d'une part et entre les bactéries pathogènes et champignons phytopathogènes d'autre part, les tableaux de l'analyse des variances figurent dans l'annexe 2.

La comparaison des moyennes des extraits fongiques obtenus par l'acétate d'éthyle et leurs effets sur la croissance des différents groupes de microorganismes pathogènes est représentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Comparaison des moyennes des extraits obtenus par l'acétate d'éthyle et leurs effets sur la croissance des microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).

Extraits d'acétate d'éthyle	Moyennes des zones d'inhibitions (mm)			
	Bactéries à Gram +	Bactéries à Gram -	Champignons	Tout les micro- organismes
<i>Aspergillus sp. 1</i>	12.6667 _a	9.9074 _a	16.333 _{a, b}	11.744 _a
<i>Aspergillus sp. 2</i>	12.0000 _a	9.2963 _a	9.444 _c	9.867 _a
<i>Aspergillus sp. 3</i>	12.8889 _a	10.5000 _a	12.611 _b	11.400 _a
<i>Penicillium sp.</i>	11.4444 _a	8.9444 _a	15.333 _{a, b}	10.722 _a
Mycélium stérile	6.2222 _b	4.1481 _b	8.556 _c	5.444 _b
<i>Cladosporium sp.</i>	11.2222 _b	10.0741 _a	19.056 _a	12.100 _a

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes

Les résultats ont démontré que pour le groupe des bactéries à Gram positif, le plus grand effet des extraits fongiques était observé chez les 3 souches d'*Aspergillus*, où les moyennes d'inhibition allaient de 12.0000 à 12.8889 mm, cette dernière a été observée chez *Aspergillus sp. 3*.

Pour les bactéries à Gram négatif, l'effet était presque le même chez tous les extraits fongiques avec le plus grand effet observé aussi chez *l'Aspergillus sp. 3* avec 10.5000 mm de moyenne d'inhibition, suivis de *Cladosporium sp.* avec une moyenne de 10.0741 mm.

L'effet des extraits fongiques observé sur les champignons dépasse celui obtenu sur les bactéries, où la moyenne des zones d'inhibitions atteignait les 19.056 mm, observé chez *Cladosporium sp.* et 16.333 chez *Aspergillus sp.1.*

En comparant les moyennes des extraits fongiques et leurs effets sur tous les microorganismes (Bactéries à Gram positif, à Gram négatif et champignons) pathogènes, on observe un effet assez proche des différents extraits avec une moyenne de 12.100 mm observée chez *Cladosporium sp.* et de 11.744 mm chez *Aspergillus sp.1.*

On a aussi comparé l'effet combiné de tous les extraits sur chaque microorganisme pathogène et les résultats sont résumés ci-dessous dans le tableau 5.

Tableau 5 : Comparaison des moyennes de l'effet combiné des extraits obtenu par l'acétate d'éthyle sur la croissance des microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).

Microorganismes pathogènes	Moyennes de zones d'inhibition (mm)			
	Bactérie à Gram+	Bactérie à Gram -	Champignons	Tous les micro-organismes
<i>Bacillus sp.</i>	11.9444 _a			
<i>Staphylococcus aureus</i>	11.9444 _a			11.0741 _b
<i>Enterococcus faecalis</i>	9.3333 _b			
<i>Salmonella typhimurium</i>		11.1389 _b		
<i>Escherichia coli</i>		18.1389 _a		
<i>Serratia marcescens</i>		10.2222 _b		
<i>Enterobacter agglomerans</i>		6.3611 _c		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		0.0000 _d		8.8117 _c
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		10.4722 _b		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		10.4444 _b		
<i>Citrobacter freundii</i>		1.4722 _d		
<i>pseudomonas sp.</i>		11.0556 _b		
<i>Candida albicans</i>			15.056 _b	
<i>Fusarium oxysporium fs. albedinis</i>			6.472 _c	13.5556 _a
<i>Phytophthora infestans</i>			19.139 _a	

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Chaque moyenne représente l'effet combiné de tous les extraits d'endophytes obtenue par l'acétate d'éthyle.

Dans le groupe des bactéries à Gram positif, *Bacillus sp.* et *Staphylococcus aureus* ont été le plus affectées et de la même façon par les extraits fongiques, avec une moyenne d'inhibition de 11.9444 mm, chez les Gram négatif, les extraits ont inhibé fortement *Echerichia coli* avec une moyenne d'inhibition qui atteint les 18.1389 mm, suivie de *Salmonella typhimurium* et *pseudomonas sp.* avec des moyennes de 11.1389 et 11.0556 mm.

Les extraits fongiques ont inhibé chaque champignon et levure différemment et où *Phytophthora infestans* a été le plus affecté avec une moyenne d'inhibition atteignant les 19.139 mm. Suivie de *Candida albicans* avec 15.056 mm de moyenne.

La comparaison de l'effet combiné des extraits fongique sur chaque groupe de microorganismes pathogènes démontre que les champignons été les plus affecté avec une moyenne d'inhibition de 13.5556 mm suivi des bactéries à Gram positif avec 11.0741 mm de moyenne et ensuite les bactéries a Gram negatif pour finir.

Les résultats de la comparaison de moyennes des extrais chloroformiques des champignons endophytes et leurs effet sur la croissance des microorganismes pathogènes sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Comparaison des moyennes des extraits obtenus par le chloroforme et leurs effets sur la croissance des microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).

Extraits chloro- formique	Moyennes des zones d'inhibitions (mm)			
	Bactéries à Gram +	Bactéries à Gram -	Champignons	Tout les micro- organismes
<i>Aspergillus sp. 1</i>	6.556 _a	1.7593 _{b,c}	4.8889 _a	5.300 _a
<i>Aspergillus sp. 2</i>	3.111 _{a,b}	1.8148 _{b,c}	3.6667 _a	6.333 _a
<i>Aspergillus sp. 3</i>	6.667 _a	2.1111 _{a,b}	4.4444 _a	6.111 _a
<i>Penicillium sp.</i>	4.444 _{a,b}	2.5926 _a	4.7778 _a	6.422 _a
Mycélium stérile	8.333 _a	1.9259 _{a,b,c}	2.5556 _a	2.156 _b
<i>Cladosporium sp.</i>	0.000 _b	1.2222 _c	4.7778 _a	2.156 _b

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes

Pour les extraits chloroformiques, le plus grand effet sur les bactéries à Gram positif a été observé avec l'extrait du mycélium stérile avec 8.333 mm de moyenne d'inhibition,

suivie de près par *Aspergillus sp. 3* et *Aspergillus sp.1* avec 6.667 mm et 6.556 mm de moyenne respectivement, pour les Gram négatif on a observé un plus grand effet des extraits de *Penicillium sp. d'Aspergillus sp. 3*, et du mycélium stérile avec respectivement 2.5926, 2.1111 et 1.9259 mm de moyennes d'inhibition.

Les champignons étaient inhibés de la même façon par tous les extraits fongiques, dont les moyennes des zones d'inhibition allaient de 4.8889 mm avec *Aspergillus sp. 1* à 2.5556 mm avec le mycélium stérile. Pour l'effet obtenu sur tous les microorganismes pathogènes, il a atteint les 6.422 mm avec l'extrait de *Penicillium sp.* et 6.333 mm pour *Aspergillus sp. 2*.

Pour l'effet combiné de tous les extraits chloroformiques sur chaque microorganisme pathogène, les résultats sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Comparaison des moyennes de l'effet combiné des extraits obtenus par le chloroforme sur la croissance des microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).

Microorganismes pathogènes	Moyennes de zones d'inhibition (mm)			
	Bactérie à Gram+	Bactérie à Gram -	Champignons	Tous les micro-organismes
<i>Bacillus sp.</i>	6.389 _a			
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.167 _a			4.8519 _a
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.000 _b			
<i>Salmonella typhimurium</i>		0.0000 _c		
<i>Escherichia coli</i>		0.0000 _c		
<i>Serratia marcescens</i>		0.0000 _c		
<i>Enterobacter agglomerans</i>		0.0000 _c		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		15.111 _a		1.9043 _b
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		0.0000 _c		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		0.0000 _c		
<i>Citrobacter freundii</i>		2.0278 _b		
<i>pseudomonas sp.</i>		0.0000 _c		
<i>Candida albicans</i>			6.2778 _a	
<i>Fusarium oxysporium fs. albedinis</i>			3.8333 _b	4.1852 _a
<i>Phytophthora infestans</i>			2.4444 _c	

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Chaque moyenne représente l'effet combiné de tous les extraits d'endophytes obtenus par le chloroforme.

Pour les bactéries à Gram positif seules *Bacillus sp.* et *Staphylococcus aureus* ont été inhibées avec des moyennes d'inhibition de 8.167 et 6.389 mm, comme pour les bactéries à Gram négatif, seulement deux bactéries ont été inhibée avec des moyennes qui ont atteints les 15.111 mm chez *Pseudomonas aeruginosa*, les 2.0278 mm chez *Citrobacter freundii*. Pour les champignons, l'inhibition la plus forte a été observée chez *Candida albicans*, elle était de 6.2778 mm, suivie de *Fusarium oxysporium fs. albedinis* avec 3.8333 mm de zone d'inhibition.

La comparaison de l'effet des extraits sur chaque groupe de microorganismes pathogènes, révèle que les bactéries à Gram positif et les champignons ont été les plus sensibles avec des moyennes d'inhibition de 4.8519 et 4.1852 mm respectivement, suivi des bactéries à Gram négatif avec 1.9043 mm de moyenne d'inhibition. Mais les résultats étaient très faibles et les moyennes ne dépassaient pas les 4.8519 mm par rapport a ceux obtenus avec l'acétate d'éthyle.

On a aussi comparé l'effet obtenu sur chaque groupe de microorganismes pathogènes par les extraits obtenus avec l'acétate d'éthyle et chloroforme, le tableau 8 résume ces résultats.

Tableau 8 : Comparaison des moyennes des extraits d'acétate d'éthyle et chloroformiques et leurs effets sur chaque groupes de microorganismes pathogènes (n=3, moyenne).

Extraits	Moyennes des zones d'inhibitions (mm)		
	Bactérie à Gram +	Bactérie à Gram -	Champignons
Extraits d'acétate d'éthyle	11.0741 _a	8.8117 _a	13.4717 _a
Extraits chloroformiques	4.8519 _b	1.9043 _b	4.1852 _b

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Pour les trois groupes de microorganismes pathogènes, les extraits obtenus avec l'acétate d'éthyle ont eu plus d'effet que ceux obtenus avec le chloroforme, où pour les bactéries à Gram positif les extraits d'acétate d'éthyle ont obtenue une moyenne d'inhibition de 11.0741 mm contrairement a celle obtenue avec les extraits

chloroformiques qui été de 4.8519 mm, la même chose été obtenue pour les Gram négatif et les champignons avec 8.8117 et 13.4717 mm respectivement pour les extraits d'acétate d'éthyle et 1.9043 et 4.1852 mm pour les extraits chloroformiques.

Plusieurs études ont démontré que des champignons endophytes isolés de différentes plantes peuvent avoir une activité antimicrobienne, ils résisteraient à l'invasion et inhiberaient une grande variété de microorganismes nocifs pour l'homme, animaux et plantes par la production de métabolites secondaires (Pimentel *et al.*, 2011; Strobel *et al.*, 2004), c'est le cas pour les 40% et 50% d'endophytes isolé à partir de *Withania somnifera* (Madki *et al.*, 2010) et à partir de *Acanthus ilicifolius* L. et *Acrostichum aureum* L. (Maria *et al.*, 2005) qui ont montré une activité contre des bactérie à Gram positif, à Gram négatif et contre des champignons pathogènes, les endophytes isolés de *Garcinia mangostana*, ont aussi démontré une activité antibactérienne (Rdji *et al.*, 2011), (Park *et al.*, 2003) ont démontré l'activité antifongique des endophytes isolés à partir de plusieurs plantes de Corée.

Le genre *Aspergillus* a déjà été isolé en tant qu'endophyte et a montré une activité contre plusieurs microorganismes pathogènes par (Madki *et al.*, 2010; Maria *et al.*, 2005), le genre *Penicillium* aussi a été isolé à partir de *Acrostichum aureum*, il a été une source de peptides qui ont permis d'inhiber *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* (Cui *et al.*, 2008), il a été aussi source de phénols inhibant *Staphylococcus aureus* et isolé de *Cerbera manghas* (Han *et al.*, 2008).

Le genre *Cladosporium* a été isolé à partir de *Withania somnifera*, et *Quercus variabilis* où il a été source de composé aliphatiques et inhibant *Candida albicans* (Madki *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2006), plusieurs mycéliums stériles ont été actifs contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Enterococcus faecalis* (Brady *et al.*, 2001; Madki *et al.*, 2010).

Les extraits d'acétate d'éthyle et de chloroforme ont démontré qu'ils avaient une plus forte activité sur les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif, qui étaient moins sensibles, ceci s'adapte aux résultats obtenus par (Sutjaritvorakul *et al.*, 2011) et par (Rdji *et al.*, 2011). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux groupes de microorganismes diffèrent morphologiquement, car les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharide portant les composant structurel lipopolysaccharides, ceci rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif, lesquelles seront plus

sensibles car ils ont seulement une couche de peptidoglycane extérieure qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (Kumara *et al.*, 2010).

La différence obtenue entre l'effet des extraits d'acétate d'éthyle et chloroformiques, sachant que chaque solvant différent permet d'extraire des composés différents peut être expliqué par le fait que les composants bioactifs n'ont pas été bien dissous ou en très petite quantité, donnant peu d'effet aux extraits chloroformiques, et le plus probable c'est que les composants bioactifs ont la polarité qui est le mieux extraite par l'acétate d'éthyle (Ogundare *et al.*, 2006).

3.5 Test du β -carotène/acide linoléique :

L'activité antioxydante des différents extraits fongiques obtenus par l'acétate d'éthyle a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la décoloration du β -carotène à 490 nm. Les résultats des pourcentages de l'activité antioxydante en fonction du temps sont représentés dans la figure 12.

L'analyse de variance de ces extraits et leur effet antioxydant nous démontre une différence significative entre les différents extraits, le tableau de l'analyse de variance figure dans l'annexe 2. La comparaison des moyennes de ces extraits et leurs effets antioxydant est représenté dans le tableau 9.

Tableau 9 : Comparaison des moyennes des extraits d'acétate d'éthyle et leur effet antioxydant après 24 heures (n=3, Moyenne du pourcentage d'inhibition).

Les échantillons	Pourcentage d'inhibition (Moyenne \pm SD)
BHT	100.000 \pm 2.183 _a
Méthanol	10.651 \pm 0,551 _d
H ₂ O	0.630 \pm 0.157 _d
EAc d' <i>Aspergillus sp. 1</i>	80.430 \pm 2,726 _b
EAc d' <i>Aspergillus sp. 2</i>	23.820 \pm 1,223 _c
EAc d' <i>Aspergillus sp. 3</i>	69.203 \pm 7,248 _b
EAc de <i>Penicillium sp.</i>	83.001 \pm 2,368 _b
EAc du Mycélium stérile	71.826 \pm 5,003 _b
EAc de <i>Cladosporium sp.</i>	81.742 \pm 3,428 _b

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes

EAc: Extrait d'acétate d'éthyle.

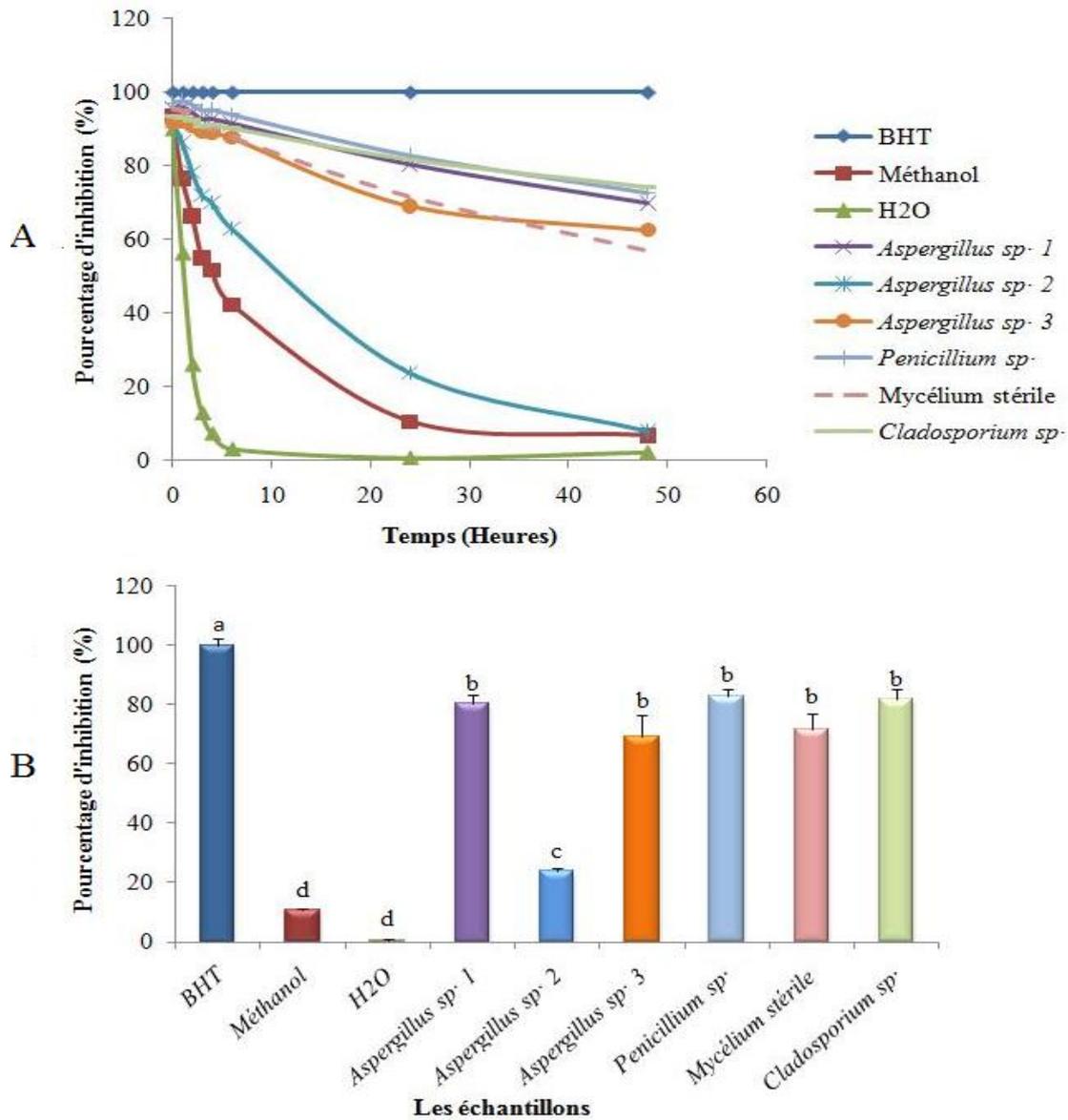


Figure 12 : Activité antioxydante des extraits d'acétate d'éthyle des champignons endophytes

(A) Activité antioxydante des extraits d'acétate d'éthyle des champignons endophytes par rapport aux témoins (BHT, Méthanol, et H₂O) par le test de β -carotène/ acide linoléique pendant 48 heures.

(B) Les pourcentages d'inhibitions des extraits d'acétate d'éthyle des champignons endophytes par rapport aux témoins (BHT, Méthanol, et H₂O) par le test de β -carotène/ acide linoléique après 24 heures.

Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3), ceux qui ont la même lettre ne sont pas significativement différents.

D'après les résultats, et après 24 heures d'incubation, alors que le contrôle positif (BHT) a donné un pourcentage d'inhibition de 100%, les pourcentages d'inhibition dépassaient les 80% avec les extraits d'*Aspergillus sp. 1*, *Penicillium sp.* et *Cladosporium sp.* avec le meilleur pourcentage d'inhibition de 83.001% obtenus par *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp. 3* a donné un pourcentage de 69.203% et le pourcentage été de 71.826 % pour le mycélium stérile, le moins bon pourcentage d'inhibition été observé chez *Aspergillus sp. 2*.

(Huang *et al.*, 2007a) ont démontré l'activité antioxydante de plusieurs champignons endophytes tels *Cladosporium sp.*, et plusieurs mycéliums stériles. Il ya aussi le genre *Aspergillus*, isolé de *Ginkgo biloba L.* qui a démontré une activité antioxydante (Qiu *et al.*, 2010). Il ya aussi (Huang *et al.*, 2007b) qui as isolé plusieurs endophytes ayant une activité antioxydante a partir de plusieurs plantes médicinales.

Plusieurs études ont montré que les composés phénoliques jouent un rôle important dans la stabilisation de l'oxydation des lipides et sont associés à l'activité antioxydante, (Huang *et al.*, 2007b) ont démontré la corrélation positive qui existe entre le contenu total en phenols et la capacité antioxydante de plusieurs endophytes isolés à partir de différentes plantes médicinales, et étant donné que l'acétate d'éthyle fais partis des solvants qui permettent d'extraire le plus de phénols (Liu *et al.*, 2007), l'activité antioxydante de nos extraits fongiques obtenus par l'acétate d'éthyle doit être du a leurs contenance en composés phénoliques.

3.6 Détermination de l'activité enzymatique :

Les tests qualitatifs permettant de démontrer la production d'enzymes extracellulaires a partir des souches fongique endophytes nous ont permis d'obtenir les résultats ainsi résumé dans le tableau 10 et la figure 13, et l'analyse de variance as démontré une différence significative entre les différents champignons endophytes et leurs production de chaque enzyme, le tableau de l'analyse de variance figure dans l'annexe 2.

Après cinq jours d'incubation les résultats ont démontré que 33.33% des champignons endophytes produisaient de l'amylase avec des zones de dégradation de l'amidon qui sont de 6.2 cm chez l'*Aspergillus sp. 1* et de 4.4 cm chez *Penicillium sp.* Pour la protéase, 50% des champignons présentaient une activité protéasique avec la plus grande zone d'activité

obtenue chez *Aspergillus sp. 2*, le même pourcentage a été obtenu avec la lipase avec la plus grande zone de dégradation qui est de 5.3 cm observé chez *Aspergillus sp. 1*. Seulement 16.66% des champignons endophytes possédaient une activité estérasique, elle a été observée chez *Aspergillus sp. 1*.

Tableau 10 : Comparaison des moyennes des champignons endophytes et leur production d'enzymes (n=3, moyenne de zone).

Endophytes	Diamètre de l'activité enzymatique (cm)			
	Amylase (Amidon)	Protéase (Gélatine)	Lipase (Tween20)	Estérase (Tween80)
<i>Aspergillus sp. 1</i>	6.2 _a	0.0 _d	5.3 _a	4.4 _a
<i>Aspergillus sp. 2</i>	0.0 _c	4.7 _b	0.0 _d	0.0 _b
<i>Aspergillus sp. 3</i>	0.0 _c	5.3 _a	0.0 _d	0.0 _b
<i>Penicillium sp.</i>	4.4 _b	2.3 _c	2.5 _b	0.0 _b
<i>Mycelium sterile</i>	0.0 _c	0.0 _d	1.9 _c	0.0 _b
<i>Cladosporium sp.</i>	0.0 _c	0.0 _d	0.0 _d	0.0 _b

Les moyennes qui ont la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Les enzymes sont des protéines essentielles pour le système métabolique de tous les organismes vivants, elles peuvent être isolées à partir d'animaux, plantes et microorganismes, ces dernières sont considérées comme de bonnes sources d'enzymes industrielles grâce à la grande diversité des enzymes qui ont été déjà trouvées (Alves *et al.*, 2002). Les enzymes fongiques ont une importance dans l'agriculture, la fabrication d'aliments (pectinase, protéase), de textiles (amylase cellulase) et du cuir (protéase, lipase) et la santé humaine car elles sont plus stables que les enzymes provenant des plantes et animaux (Maria *et al.*, 2005).

Plusieurs endophytes ont été démontré comme étant une source d'enzymes, tels *Aspergillus* qui produit de l'amylase, lipase, protéase (Maria *et al.*, 2005), ainsi que plusieurs d'autres étudié par (Alves *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005). Le type d'enzyme produit ainsi que le mode d'utilisation des substrats sont très utiles afin de déterminer le rôle fonctionnel de l'endophyte, les champignons parasites et les pathogènes latents peuvent produire de la protéase et de la pectinase, et seront plus la source de cellulase, xylanase s'ils étaient des mutualiste et des saprophytes, ces derniers peuvent aussi dégrader l'amidon stocké dans les tissus végétaux comme source de nourriture après la mort de la plante (Choi *et al.*, 2005).

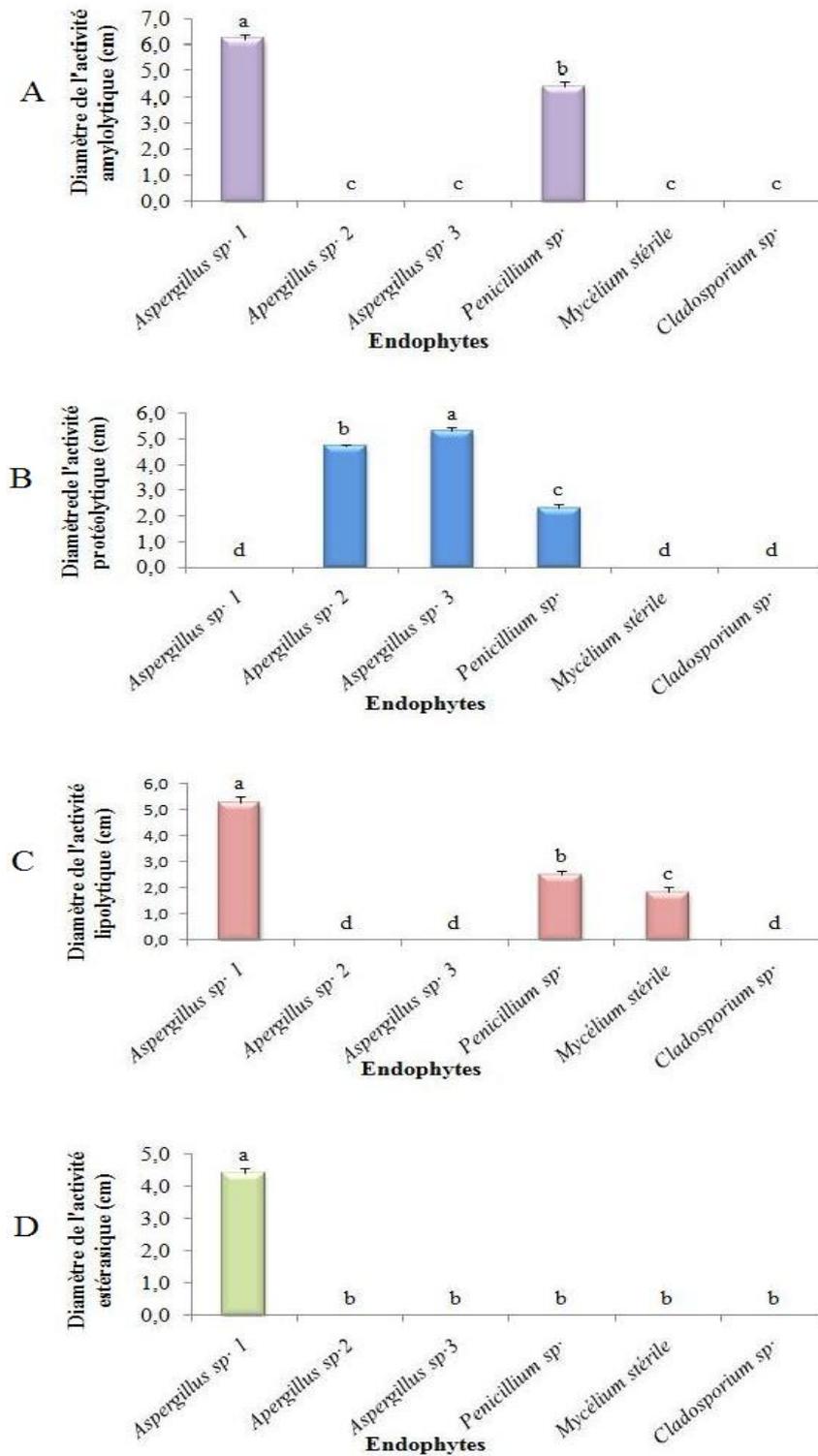


Figure 13 : la production des quatre enzymes extracellulaires par les six souches fongiques après cinq jour d'incubation (n=3, moyenne ± SD).

A: Amylase

B: Protéase

C: Lipase

D: estérase

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives :

Les champignons endophytes sont d'excellentes sources de nouveaux produits naturels bioactifs avec un potentiel d'exploitation dans une grande variété de domaines médicaux, agricoles et industriels, et bien que les travaux sur l'utilisation de cette vaste ressource de microorganismes vient de commencer, il est déjà devenu évident que ces derniers ont un grand potentiel.

Dans ce présent travail, les champignons endophytes ont été isolés à partir de *Retama raetam* (Forssk.), dix isolats fongiques ont été isolés, six d'entre eux ont démontré une activité au dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne, des isolats appartenant à la classe des deutéromycètes et un mycélium stérile.

Le test de diffusion sur disques a démontré que tous les extraits avaient une activité inhibitrice sur au minimum un ou plusieurs microorganismes pathogènes, avec une activité plus prononcée sur les bactéries à Gram positif que sur celle à Gram négatif, due à leurs différences morphologiques. Les extraits d'acétate d'éthyle avaient plus d'effet que les extraits chloroformiques, une différence qui s'explique par le fait que les deux solvants ont des polarités différentes et que celles des composants bioactifs ont été mieux extraites par l'acétate d'éthyle.

L'estimation de l'activité antioxydante des différents extraits fongiques obtenus par l'acétate d'éthyle a été évaluée par le test du β -carotène/acide linoléique. Les résultats indiquent que plus de 83% des extraits fongiques présente une activité antioxydante, une activité qu'on peut attribuer à la teneur en phénols des extraits d'acétate d'éthyle.

La production d'enzymes extracellulaires a été démontrée par des tests qualitatifs, où 33.33% des endophytes produisent de l'amylase, 50% d'eux produisent de la protéase et de la lipase, et pour l'activité estérase seulement 16.66% des champignons endophytes ont produit de l'estérase.

En perspective,

Nos travaux sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- Identification des champignons endophytes qui se fera à l'échelle moléculaire par séquençage de la sous-unité 18S et des ITS de l'ADNr puis comparaison des séquences obtenues avec les bases de données.
- Isolement, purification et identification des métabolites secondaires produits par les champignons endophytes
- Détermination de la composition, la structure, le contenu et la bioactivité des extraits de *Retama raetam* (Forssk.).
- Comparaison entre les métabolites secondaires produites par les champignons endophytes et la plante.
- Quantification de la production enzymatique de ces champignons endophytes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

- 1- **Abdel-Motaal F. F., Nassar M. S. M., El-Zayat S. A., El-Sayed M. A. and Ito S. I.** Antifungal activity of endophytic fungi isolated from egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). *Pakistan Journal of Botany* 2010; **42**: 2883-2894.
- 2- **Alva P., McKenzie E. H. C., Pointing S. B., Pena-Muralla R. and Hyde K. D.** Do sea grasses harbour endophytes? *Fungal Diversity Research Series* 2002; **7**: 167-178.
- 3- **Alves M. H., Takaki G. M. C., Porto A. L. F. and Milanez A. I.** Screening of *Mucor* spp. For the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002; **33**: 325-330.
- 4- **Amna T., Puri S. C., Verma V., Sharma J. P., Khajuria R. K., Musarrat J., Spitteller M. and Qazi G. N.** Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. *Canadian Journal of Microbiology* 2006; **52**: 189-196.
- 5- **Arnold A. E.** Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 2007; **21**: 51-66.
- 6- **Arnold A. E., Mejia L. C., Kylo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E. A.** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100**: 15649-15654.
- 7- **Aslan A., Gulluce M., Sokmen M., Adiguzel A., Sahin F. and Ozkan H.** Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla* . *Pharmaceutical Biology* 2006; **44**: 247-252.
- 8- **Bacon C. W., Porter J. K., Robbins J. D. and Luttrell E. S.** *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 1977; **34**: 576-581.
- 9- **Barik B. P., Tayung K., Jagadev P. N. and Dutta S. K.** Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity . *European Journal of Biological Sciences* 2010; **2**: 8-16.
- 10- **Bettucci L., Simeto S., Alonso R. and Lupo S.** Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. *Sydowia* 2004; **56**: 8-23.
- 11- **Bhagobaty R. K., Joshi S. R. and Kumar R.** *Penicillium verruculosum* RS7PF: A root fungal endophyte associated with an ethno-medicinal plant of the indigenous tribes of Eastern India. *African Journal of Microbiology Research* 2010; **4**: 766-770.
- 12- **Botton B. Breton A., Fevre M., Guy P.H., Iarpent J.P., Sanglier J.J., Vayssier V. and Veau,P.** Moisissures utiles et nuisibles. Importance Industrielle. Masson 1990; pp. 20-191
- 13- **Brady S. F. and Clardy J.** CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products* 2000; **63**: 1447-1448.
- 14- **Brady S. F., Bondi S. M. and Clardy J.** The guanacastepenes: a highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. *Journal of the American Chemical Society* 2001; **123**: 9900-9901.

- 15- **Buck G. W., West C. P. and Elbersen H. W.** Endophytes effect on drought tolerance in diverse *Festuca* species. In: Bacon C. W. and Hill N. S.(eds). *Neotyphodium/Grass interactions*. Plenum Press, NewYork 1997; pp. 141-143.
- 16- **Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Dai Y. and Wang X.** Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology* 2009; **59**: 584-592.
- 17- **Carrim A. J. I., Barbosa E. C. and Vieira J. D. G.** Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2006; **49**: 353-359.
- 18- **Champion R.** Identifier les champignons transmis par les semences. INRA edition 1997; p. 401.
- 19- **Chareprasert S., Piapukiew J., Thienhirum S., Whalley A. J. S. and Sihanonth P.** Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World Journal of Mycrobiology and Biotechnology* 2006; **22**: 481-486.
- 20- **Choi Y. W., Hodgkiss I. J. and Hyde K. D.** Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology* 2005; **1**: 55-66.
- 21- **Clay K. and Schardl C.** Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* 2002; **160 Suppl 4**: S99-S127.
- 22- **Clay K.** Grass endophytes. In: Fokkenna N. J. and Van Den Heuvel J.(eds). *Microbiology of the phyllosphere*, Cambridge, UK: Cambridge University Press 1986; pp. 188-204.
- 23- **Claydon N., Grove J. F. and Pople M.** Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry* 1985; **24**: 937-943.
- 24- **Cohen S. D.** Host selectivity and genetic variation of *Discula umbrinella* isolates from two oak species: analyses of intergenic spacer region sequences of ribosomal DNA. *Microbial Ecology* 2006; **52**: 463-469.
- 25- **Collado J., Platas G. and Pelaez F.** Identification of an endophytic *Nodulisporium sp* from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. *Mycologia* 2011; **93**: 875-886.
- 26- **Cui H. B., Mei W. L., Miao C. D., Lin H. P., Hong K. and Dai H. F.** Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium sp.*0935030 of mangrove plant *Acrostichum aureum*. *Chinese Journal of Antibiotics* 2008; **33**: 407-410.
- 27- **Dapkevicius A., Venskutonis R., Van-Beek T. A. and Linsen P. H.** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedure from some aromatic herbs grown in Lithuania . *Journal of The science of Food and Agriculture* 1998; **77**: 140-146.
- 28- **Devaraju R. and Satish S.** Endophytic fungi: 'Trapped' or 'hidden' store houses of bioactive compounds within plants:A Review. *Journal of Pharmacy Research* 2010; **3**: 2986-2989.
- 29- **Devaraju R. and Satish S.** Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium sp.* *Asian Journal of Experimental Sciences* 2011; **2**: 75-79.

- 30- **Dingle J. and McGee P. A.** Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research* 2003; **107**: 310-316.
- 31- **Elbersen H. W. and West C. P.** Growth and water relations of field-grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass and Forage Sciences* 1996; **51**: 333-342.
- 32- **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.** 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.
- 33- **Frohlich J., Hyde K. D. and Petrini O.** Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 2000; **104**: 1202-1212.
- 34- **Fujimura K. E., Egger K. N. and Henry G. H.** The effect of experimental warming on the root-associated fungal community of *Salix arctica*. *International Society for Microbial Ecology Journal* 2008; **2**: 105-114.
- 35- **Gallery R. E., Dalling J. W. and Arnold A. E.** Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi: a case study with Cecropia. *Ecology* 2007; **88**: 582-588.
- 36- **Gallo M. B. C., Guimaraes D. O., Momesso L. S. and Pupo M. T.** In: Saikia R., Bezbaruah, R. L., Bora, T. C. (eds). Natural products from endophytic fungi. Microbial Biotechnology. New India Publishing Agency, New Delhi, India 2008; pp. 139-168.
- 37- **Gangadevi V. and Muthumary J.** Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; **24**: 717-724.
- 38- **Gangadevi V., Sethumeenal S., Yogeswari S. and Rani G.** Screening endophytic fungi isolated from a medicinal plant, *Acalypha indica* L. for antibacterial activity. *Indian Journal of Science and Technology* 2008; **1**: 1-6.
- 39- **Ganley R. J. and Newcombe G.** Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* 2006; **110**: 318-327.
- 40- **Gong L. J. and Guo S. X.** Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology* 2009; **8**: 731-736.
- 41- **Gonthier P., Gennaro M. and Nicolotti G.** Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity* 2006; **21**: 69-80.
- 42- **Gundel P. E., Maseda P. H., Vila-Aiub M. M., Ghera C. M. and Benech-Arnold R.** Effects of *Neotyphodium* fungi on *Lolium multiflorum* seed germination in relation to water availability. *Annals of Botany* 2006; **97**: 571-577.
- 43- **Guo B., Dai J.-R., Ng S., Huang Y., Leong C., Ong W. and Karte B. K.** Cytonic acids A and B: Novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. *Journal of Natural Products* 2000; **63**: 602-604.
- 44- **Hammerschmidt R.** PHYTOALEXINS: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology* 1999; **37**: 285-306.
- 45- **Han Z., Mei W. L., Cui H. B., Zeng Y. B., Lin H. P. and Hong K.** Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium* sp. of mangrove plant *Cerbera manghas*. *Chemical Journal of Chinese Universities* 2008; **29**: 749-752.

- 46- **Harper J. K., Arif A. M., Ford E. J., Strobel G. A., Porco J. A., Tomer Jr. D. P., Oneill K. L., Heider E. M. and Grant D. M.** Pestacin: A 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* 2003; **59**: 2471-2476.
- 47- **Hazalin N. A., Ramasamy K., Lim S. M., Wahab I. A., Cole A. L. and Abdul Majeed A. B.** Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2009; **9**: 46.
- 48- **Hellwig V., Grothe T., Mayer-Bartschmid A., Endermann R., Geschke F. U., Henkel T. and Stadler M.** Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria spp.* Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *Journal of Antibiotics* 2002; **55**: 881-892.
- 49- **Hoffman M. T. and Arnold A. E.** Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research* 2008; **112**: 331-344.
- 50- **Huang W. Y., Cai Y. Z., Hyde K. D., Corke H. and Sun M.** Biodiversity of endophytic fungi with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 2008; **33**: 61-75.
- 51- **Huang W. Y., Cai Y. Z., Hyde K. D., Corke H. and Sun M.** Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (*Apocynaceae*): main constituents and antioxidant activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007a; **23**: 1253-1263.
- 52- **Huang W. Y., Cai Y. Z., Xing J., Corke H. and Sun M.** A potential antioxidant resource: Endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany* 2007b; **61**: 14-30.
- 53- **Hyde K. D. and Soyong K.** The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 2008; **33**: 163-173.
- 54- **Ilyas M., Kanti A., Jamal Y., Hertina and Agusta A.** Biodiversity of endophytic fungi associated with *Uncaria gambier roxb.* (*Rubiaceae*) from West Sumatra. *Biodiversitas* 2009; **10**: 23-28.
- 55- **Inacio M. L., Silva G. H., Teles H. L., Trevisan H. C., Cavalheiro A. J., Bolzani V. S., Young M. C. M., Pfenning L. H. and Araujo A. R.** Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandiocana* Nees (*Lauraceae*). *Biochemical Systematics and Ecology* 2006; **34**: 822-824.
- 56- **Ishii T., Hayashi K., Hida T., Yamamoto Y. and Nozaki Y.** TAN-1813, a novel Ras-farnesyltransferase inhibitor produced by *Phoma sp.* taxonomy, fermentation, isolation and biological activities in vitro and in vivo. *Journal of Antibiotics* 2000; **53**: 765-778.
- 57- **Istifadah N. and McGee P. A.** Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australasian Plant Pathology* 2006; **35**: 411-418.
- 58- **Jalgaonwala R. E., Mohite B. V. and Mahajan R. T.** Evaluation of endophytes for their antimicrobial activity from indigenous medicinal plants belonging to north Maharashtra region India. *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research* 2010; **1**: 136-141.
- 59- **Jianqui S., Liangdong G., Wei Z., Wenxiang P. and Defu C.** Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants . *Science in China Series C: Life Sciences* 2008; **51**: 751-759.

- 60- **Khan R., Shahzad S., Choudhary M. I., Khan S. A. and Ahmad A.** Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pakistan Journal of Botany* 2010; **42**: 1281-1287.
- 61- **Khan R., Shahzad S., Iqbal choudhary M., Khan S. A. and Ahmed A.** Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Pakistan Journal of Botany* 2007; **39**: 2233-2239.
- 62- **Kharwar R. N., Verma V. C., Strobel G. and Ezra D.** The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Current Science* 2008; **95**: 228-233.
- 63- **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.** Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology* 2007; **44**: 337.
- 64- **Kumara C. G., Mongollaa P., Josepha J., Nageswara Y. V. D. and Kamal A.** Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India . *Journal of Medical Mycology* 2010; **20**: 283-289.
- 65- **Kumaran R. S., Muthumary J. and Hur B. K.** Production of taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Engineering in Life Sciences* 2008; **8**: 438-446.
- 66- **Larsen T. O., Smedsgaard J., Nielsen K. F., Hansen M. E. and Frisvad J. C.** Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports* 2005; **22**: 672-695.
- 67- **Lehtonen P. T., Helander M., Siddiqui S. A., Lehto K. and Saikkonen K.** Endophytic fungus decreases plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pratense*). *Biology Letters* 2006; **2**: 620-623.
- 68- **Lewis G. C.** Effect of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. *Annals of Applied Biology* 2004; **144**: 53-63.
- 69- **Li J. Y. and Strobel G. A.** Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry* 2001; **57**: 261-265.
- 70- **Li J. Y., Harper J. K., Grant D. M., Tombe B. O., Bashyal B., Hess W. M. and Strobel G. A.** Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry* 2001; **56**: 463-468.
- 71- **Li J. Y., Sidhu R. S., Ford E., Hess W. M. and Strobel G. A.** The induction of taxol production in the endophytic fungus – *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1998; **20**: 259-264.
- 72- **Li J. Y., Strobel G. A., Harper J. K., Lobkovsky E. and Clardy J.** Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Organic letters* 2000; **2**: 767-770.
- 73- **Li J.-Y., Strobel G., Sidhu R., Hess W. M. and Ford E. J.** Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology* 1996; **142**: 2223-2226.
- 74- **Li W. C., Zhou J., Guo S. Y. and Guo L. D.** Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity* 2007; **25**: 69-80.

- 75- **Lingham R. B., Silverman K. C., Bills G. F., Cascales C., Sanchez M., Jenkins R. G., Gartner S. E., Martin I., Diez M. T., Pelaez F., Mochales, S., Yu-Lin Kong, Burg, R.W., Mainz, M. S., Huan, L., Nallin-omstead, M., Mosser, S. D., Schaber, M. D., Omer, C. A., Pompliano, D. L., Gibbs, J. B., Singh, S. B.** *Chaetomella acutiseta* produces chaetomelic acids A and B which are reversible inhibitors of farnesyl-protein transferase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1993; **40**: 370-374.
- 76- **Liu C. H., Zou W. X., Lu H. and Tan R. X.** Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology* 2001; **88**: 277-282.
- 77- **Liu H., Heckman J. R. and Murphy J. A.** Screening fine fescues for aluminium tolerance. *Journal of Plant Nutrition* 1996; **19**: 677-688.
- 78- **Liu X., Dong M., Chen X., Jiang M., Lv X. and Yan G.** Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria sp.* from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry* 2007; **105**: 548-554.
- 79- **Lubertozzia D. and Keasling J. D.** Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology Advances* 2009; **27**: 53-75.
- 80- **Lv Y. L., Zhang F. S., Chen J., Cui J. L., Xing Y. M., Li X. D. and Guo S. X.** Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the alpine plant *Saussurea involucrata*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2010; **33**: 1300-1306.
- 81- **Ma Y. M., Li Y., Liu J. Y., Song Y. C. and Tan R. X.** Anti-Helicobacter pylori metabolites from *Rhizoctonia sp.* Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia* 2004; **75**: 451-456.
- 82- **Macia-Vicente J. G., Jansson H. B., Mendgen K. and Lopez-Llorca L. V.** Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Canadian Journal of Microbiology* 2008; **54**: 600-609.
- 83- **Madki M. A., Manzoor A. S., Powar P. V. and Patil K. S.** Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; **2**: 848-858.
- 84- **Maheshwari R.** What is an endophytic fungus? *Current Science* 2006; **90**: 1039.
- 85- **Malinowski D. P. and Belesky D. P.** Adaptation of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Corp Science* 2000; **40**: 923-940.
- 86- **Manoharachary C., Sridhar K., Singh R., Adholeya A., Suryanarayanan T. S., Rawat S. and Johri N.** Fungal biodiversity: Distribution, conservation and prospecting of fungi from India. *Current Science* 2005; **89**: 58-71.
- 87- **Maria G. L., Sridhar K. R. and Raviraja N. S.** Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology* 2005; **1**: 67-80.
- 88- **Miles C. O., di Menna M. E., Jacobs S. W., Garthwaite I., Lane G. A., Prestidge R. A., Marshall S. L., Wilkinson H. H., Schardl C. L., Ball O. J. and Latch G. C.** Endophytic fungi in indigenous Australasian grasses associated with toxicity to livestock. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; **64**: 601-606.
- 89- **Miller H. E.** simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society* 1971; **48**: 91.

- 90- **Mohanta J., Tayung K. and Mohapatra U.** Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology* 2008; 5(2).
- 91- **Moricca S. and Ragazzi A.** Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology* 2008; **98**: 380-386.
- 92- **Mukhtar I.** Influence of *Trichoderma* species on seed germination in okra. *Mycopathologia* 2008; 6(1&2): 47-50.
- 93- **Nagaraja T. G. and Devkar P. G.** Seasonal occurrence of endophytic mycoflora of inner bark of medicinal plant *Acacia catechu* willd. *The Bioscan* 2010; **5**: 243-245.
- 94- **Nassar A. H., El-Tarabily K. A. and Sivasithamparam K.** Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* 2005; **42**: 97-108.
- 95- **Nuangmek W., McKenzie E. H. C. and Lumyong S.** Endophytic fungi from wild banana (*Musa acuminata* Colla) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*. *Research Journal of Microbiology* 2008; **3**: 368-374.
- 96- **Obledo E. N., Barragan-Barragan L. B., Gutierrez-Gonzalez P., Ramirez-Hernandez B. C., Ramirez J. J. and Rodriguez-Garay B.** Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2003; **74**: 237-241.
- 97- **Ogundare A. O., Adetuyi F. C. and Akinyosoye F. A.** Antimicrobial activities of *Vernonia tenoreana*. *African Journal of Biotechnology* 2006; **5**: 1663-1668.
- 98- **Oliveira Silva M. R., Sena Xisto K. and Buarque Gusumao N.** Secondary metabolites produced by endophytic fungus *Paecilomyces variotii* Bainier with antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. In: Mendez-Vilas A.(eds). Current Research Topics in Applied Microbiology: Proceedings of the II international Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (Biomicroworld2007), 2009; pp. 519-520.
- 99- **Orole O. O. and Adejumo T. O.** Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 2009; **3**: 969-973.
- 100- **Osborn A. E.** Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genet Biol* 1999; **26**: 163-168.
- 101- **Osborn A. E., Qi X., Townsend B. and Qin B.** Dissecting plant secondary metabolism constitutive chemical defences in cereals. *New Phytologist* 2003; **159**: 101-108.
- 102- **Oses R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E. and Rodriguez J.** Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity* 2008; **33**: 77-86.
- 103- **Pandi M., Manikandan R. and Muthumary J.** Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague dawley rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2010; **64**: 53.
- 104- **Park J. H., Choi G. J., Lee H. B., Kim K. M., Jung H. S., Lee S. W., Jang K. S. and Cho K. Y.** Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, and endophytic fungus of *Abies holophylla* and

its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005; **15**: 112-117.

105- **Park J. H., Park J. H., Choi G. J., Lee S. W., Jang K. S., Choi Y. H., Cho K. Y. and Kim J. C.** Screening for Antifungal Endophytic Fungi Against Six Plant Pathogenic Fungi. *The Korean Society of Mycology* 2003; **31**: 179-182.

106- **Petit P., Lucas E. M. F., Abreu L. M., Pfenning L. H. and Takahashi J. A.** Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology* 2009; **12**: 1-9.

107- **Pimentel I. C., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Stuart R. M. and Azevedo J. L.** Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian Archives Of Biology And Technology* 2006; **49**: 705-711.

108- **Pimentel M. R., Molina G., Dionisio A. P., Marostica Junior M. R. and Pastore G. M.** The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int* 2011; doi:10.4061/2011/576286

109- **Pitt J. I. and Hocking A. D.** Fungi and food spoilage. Academic Press Inc, Sydney. Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montréal, Tokyo 1985; pp. 414.

110- **Qiu M., Xie R. S., Shi Y., Zhang H. and Chen H. M.** Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Annals of Microbiology* 2010; **60**: 143-150.

111- **Quezel, P., Santa, S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1962-1963; pp. 475-476.

112- **Rakotoniriana E. F., Munaut F., Decock C., Randriamampionona D., Andriambololoniaina M., Rakotomalala T., Rakotonirina E. J., Rabemanantsoa C., Cheuk K., Ratsimamanga S. U., Mahillon J., El-Jaziri M., Quetin-Leclercq J. and Corbisier A. M.** Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008; **93**: 27-36.

113- **Ramasamy K., Lim S. M., Abu B. H., Ismail N., Ismail M. S., Ali M. F., Weber J. F. and Cole A. L.** Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. *Phytotherapy Research* 2010; **24**: 640-643.

114- **Rdji M., Sumiati A., Rachmayani R. and Elya B.** Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangostana* and their antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology* 2011; **10**: 103-107.

115- **Redman R. S., Sheehan K. B., Stout R. G., Rodriguez R. J. and Henson J. M.** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 2002; doi: 10.1126/science.1078055

116- **Riedell W. E., Kijieckhefer R. W., Haley S. D., Langham M. A. C. and Evenson P. D.** Winter wheat responses to bird cherryoat aphids and barley yellow dwarf virus infection. *Crop Science* 1999; **39**: 158-163.

117- **Rivera-Varas V. V., Freeman T. A., Gudmestad N. C. and Secor G. A.** Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. *Phytopathology* 2007; **97**: 1331-1337.

- 118- **Roberts C. A., Benedict H. R., Hill N. S., Kjallenbach R. L. and Rottinghaus G. E.** Determination of ergot alkaloid content in tall fescue by nearinfrared spectroscopy. *Crop Science* 2005; **45**: 778-783.
- 119- **Roberts C. and Andrae J.** Tall fescue toxicosis and management. *Online Crop Management* 2004; doi: 10 : 1094/ CM-2004-0427-01-MG.
- 120- **Rodriguez R. J., Redman R. S. and Henson J. M.** The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Migration and Adaptation Strategies for Global Change* 2004; **9**: 261-272.
- 121- **Saar D. E., Polans N. O., Sorensen P. D. and Duvall M. R.** Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter* 2001; **19**: 249-260.
- 122- **Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M. and Sullivan T. J.** Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1998; **29**: 319-343.
- 123- **Saikkonen K., Helander M. and Faeth S. H.** Fungal endophytes: high- hikers of the green world. In: Gillings M. and Holmes A. J.(eds). *Plant microbiology*. Garland Science 2004a; pp. 81-101.
- 124- **Saikkonen K., Wali P. R. and Helander M.** Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PLoS One* 2010; **5**(6): e11395. doi:10.1371/journal.pone.0011395.
- 125- **Saikkonen K., Wali P., Helander M. and Faeth S. H.** Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* 2004b; **9**: 275-280.
- 126- **Saithong P., Panthavee W., Stonsaovapak S. and Congfa L.** Isolation and primary identification of endophytic fungi from *Cephalotaxus mannii* trees. *Maejo International Journal of Science and Technology* 2010; **4**: 446-453.
- 127- **Schardl C. L., Leuchtman A. and Spiering M. J.** Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* 2004; **55**: 315-340.
- 128- **Schiff P. B. and Horwitz S. B.** Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 1980; **77**: 1561-1565.
- 129- **Schulz B. and Boyle C.** The endophytic continuum. *Mycological Research* 2005; **109**: 661-686.
- 130- **Seghers D., Wittebolle L., Top E. M., Verstraete W. and Siciliano S. D.** Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**: 1475-1482.
- 131- **Selosse M. A. and Schardl C. L.** Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist* 2007; **173**: 452-458.
- 132- **Shankar N. B. and Shashikala J.** Diversity and structure of fungal endophytes in some climbers and grass species of Malnad region, Western Ghats, Southern India. *Mycosphere* 2010; **1**: 265-274.
- 133- **Shipunov A., Newcombe G., Raghavendra A. K. H. and Anderson C. L.** Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. *American Journal of Botany* 2008; **95**: 1096-1108.

- 134- **Shu R. G., Wang F. W., Yang Y. M., Liu Y. X. and Tan R. X.** Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium* sp. IFB-121, an endophytic fungus in *Quercus variabilis*. *Lipids* 2004; **39**: 667-673.
- 135- **Singh S. B., Zink D. L., Guan Z., Collado J., Pelaez F., Felock P. J. and Hazuda D. J.** Isolation, structure, and HIV-1 integrase inhibitory activity of xanthoviridicatin E and F, two novel fungal metabolites produced by *Penicillium chrysogenum*. *Helvetica Chimica Acta* 2003; **86**: 3380-3385.
- 136- **Song Y. C., Li H., Ye Y. H., Shan C. Y., Yang Y. M. and Tan R. X.** Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters* 2004; **241**: 67-72.
- 137- **Spiering M. J., Moon C. D., Wilkinson H. H. and Schardl C. L.** Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics* 2005; **169**: 1403-1414.
- 138- **Staniek A., Woerdenbag H. J. and Kayser O.** Endophytes exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal of Plant Interactions* 2008; **3**: 75-98.
- 139- **Stone J. K., White J. F., Jr. and Polishook J. D.** Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills G and Foster M.(eds). *Measuring and Monitoring Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*, Elsevier Academic Press, Boston, MA 2004; pp. 241-270.
- 140- **Strobel G. A.** Microbial gifts from rain forests. *Can J Plant Phenol* 2002a; **24**: 14-20.
- 141- **Strobel G. A.** Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology* 2002b; **22**: 315-333.
- 142- **Strobel G. A., Hess W. M. and Li J.-Y.** *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany* 1997; **45**: 1073-1082.
- 143- **Strobel G. A., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhu R. S. and Hess W. M.** Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology* 1993; **142**: 435-440.
- 144- **Strobel G. and Daisy B.** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003; **67**: 491-502.
- 145- **Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J.** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 2004; **67**: 257-268.
- 146- **Suryanarayanan T. S. and Kumaresan V.** Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. *Mycological Research* 2000; **104**: 1465-1467.
- 147- **Suryanarayanan T. S., Murali T. S. and Venkatesan G.** Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany* 2002; **80**: 818-826.
- 148- **Sutjaritvorakul T., Whalley A. J. S., Sihanonth P. and Roengsumran S.** Antimicrobial activity from endophytic fungi isolated from plant leaves in Dipterocarpaceae forest at Viengsa district Nan province, Thailand. *Journal of Agricultural Technology* 2011; **7**: 115-121.
- 149- **Tan R. X. and Zou W. X.** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 2001; **18**: 448-459.

- 150- **Tikoo A., Shakri R., Connolly L., Hirokawa Y., Shishido T., Bowers B., Ye L. H., Kohama K., Simpson R. J. and Maruta H.** Treatment of ras-induced cancers by the F-actin-bundling drug MKT-077. *Cancer Journal* 2000; **6**: 162-168.
- 151- **Ting A. S. Y., Mah S. W. and Tee C. S.** Prevalence of Endophytes Antagonistic Towards *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Cubense* Race 4 in Various Plants. *Am -Eurasian J Sustain Agric* 2009; **3**: 399-406.
- 152- **VanEtten H., Temporini E. and Wasmann C.** Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2001; **59**: 83-93.
- 153- **Vega F. E., Posada F., Aime M. C., Ripoll M. P., Infante F. and Rehner S. A.** Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 2008; **46**: 72-82.
- 154- **Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Huckelhoven R., Neumann C., von W. D., Franken P. and Kogel K. H.** The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2005; **102**: 13386-13391.
- 155- **Wang F. W., Jiao R. H., Cheng A. B., Tan S. H. and Song Y. C.** Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007; **23**: 79-83.
- 156- **Webber J.** A natural control of Dutch elm disease. *Nature, London* 1981; **292**: 449-451.
- 157- **Wilson D. and Carroll G. C.** Infection studies of *Discula quercina*, and endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia* 1994; **86**: 635-647.
- 158- **Xiaoling C., Xiaoli L., Shining Z., Junping G., Shuiping W., Xiaoming L., Zhigang S. and Yongcheng L.** Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *Journal of Ecology and The Natural Environment* 2010; **2**: 017-024.
- 159- **Yamaç M. and Bilgili F.** Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. *Pharmaceutical Biology* 2006; **44**: 660-667.
- 160- **You F., Han T., Wu J. Z., Huang B. K. and Qin L. P.** Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology* 2009; **37**: 162-165.
- 161- **Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P. and Qin L.** Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* 2010; **165**(6): 437-449.
- 162- **Zabalgoeazcoa I.** Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2008; **6**: 138-146.
- 163- **Zaurov D. E., Bonos S., Murphy J. A., Richardson M. D. and Belanger F. C.** Endophyte infection can contribute to aluminium tolerance in fine fescues. *Corp Science* 2001; **41**: 1981-1984.
- 164- **Zhang H. W., Song Y. C. and Tan R. X.** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* 2006; **23**: 753-771.
- 165- **Zhou D. and Hyde K. D.** Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research* 2001; **105**: 1449-1457.

Annexes

Annexe 1**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

Glucose yeast extract peptone

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

pH 6

Potato dextrose agar (PDA)

Pomme de terre épluchées et coupées.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH 5.6

Potato dextrose broth (PDB)

Pomme de terre épluchées et coupées.....	200 g
Glucose.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH 5.6

Sabouraud dextrose agar (SDA)

Dextrose.....	40 g
Peptone.....	10 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

pH 5.6

Lugol's iodine

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

Mc Farland solution

Acide sulfurique.....	995ml
Chlorure de baryum.....	5ml

Malt extract agar (MEA)

Poudre d'extrait de malt.....	20g
Peptone.....	1g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

Czapek yeast extract agar (CYA)

K_2HPO_4	1g
Czapek concentré.....	10ml
Extrait de levure en poudre.....	5g
Sucrose.....	30g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

Czapek concentré

$NaNO_3$	30g
KCl.....	5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5g

FeSO₄.7H₂O.....0.1g

Eau distillée.....100ml

Nutrient broth (NB) :

Peptone.....10 g

Extrait de levure.....5 g

NaCl.....5 g

Eau distillée.....1000 ml

pH = 7,2

Nutrient agar (NA) :

Peptone.....10 g

Extrait de levure.....5 g

NaCl.....5 g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000ml

pH = 7,2

Annexe 2**Tableau 1 :** Analyse de variance des extraits d'acétate d'éthyle et leurs effets antioxydant (n=3, moyenne \pm SD).

	Source			
	Somme des carrés des écarts(SCE)	Degré de liberté (DDL)	Variance(S ²)	F
Total	32160.46086	26	-	-
Echantillons	31422.22770	8	3927.77846	95.77***
Erreur	738.23316	18	41.01295	-

*** significatif à 0.001(P < 0.001)

Tableau 2 : Analyse de variance des champignons endophytes et leur production d'enzymes (n=3, moyenne de zone).

Enzymes		Source			F
		Somme des carrés des écarts(SCE)	Degré de liberté (DDL)	Variance(S ²)	
Amylase (Amidon)	Total	117.3600000	17	-	-
	champignons	117.2200000	5	23.4440000	2009.49***
	Erreur	0.1400000	12	0.0116667	-
Protéase (Gélatine)	Total	91.46277778	17	-	-
	champignons	91.34944444	5	18.26988889	1934.46***
	Erreur	0.11333333	12	0.00944444	-
Lipase (Tween20)	Total	66.39777778	17	-	-
	champignons	66.19777778	5	13.23955556	794.37***
	Erreur	0.20000000	12	0.01666667	-
Estérase (Tween80)	Total	49.18277778	17	-	-
	champignons	49.13611111	5	9.82722222	2527.00***
	Erreur	0.04666667	12	0.00388889	-

*** significatif à 0.001(P < 0.001)

Tableau 3 : les zones d'inhibitions en millimètre des extraits d'acétate d'éthyle et chloroforme des champignons endophytes

µO Patho- gènes	Extraits											
	<u>Aspergillus sp.1</u>	<u>Aspergillus sp.2</u>	<u>Aspergillus sp.3</u>	<u>Penicillium sp.</u>	<u>Mycélium stérile</u>	<u>Cladosporium sp.</u>						
	Acétate d'éthyle	Chloro- forme	Acétate d'éthyle	Chloro- forme	Acétate d'éthyle	Chloro- forme	Acétate d'éthyle	Chloro forme	Acétate d'éthyle	Chloro- forme		
Ba	14	13	12	0	14	0	11	0	9	18	12	0
Sa	14	7	12	9	14	12	11	13	0	7	12	0
Ef	11	0	12	0	11	0	12	0	0	0	10	0
St	14	0	12	0	14	0	14	0	0	0	13	0
Ec	19	0	20	0	21	0	14	0	15	0	20	0
Sm	8	0	10	0	11	0	11	0	10	0	11	0
Ea	9	0	7	0	10	0	3	0	0	0	9	0
Pa	0	14	0	14	0	18	0	19	0	14	0	11
Kp	13	0	11	0	13	0	13	0	0	0	13	0
Sm	13	0	12	0	12	0	13	0	0	0	14	0
Cf	2	2	1	2	2	1	2	5	1	3	1	0
P2	13	0	11	0	12	0	11	0	11	0	9	12
Ca	18	9	15	5	15	6	12	8	13	4	17	5
FOA	12	5	0	2	0	3	12	3	0	3	15	7
Pi	20	0	13	4	23	4	22	3	13	1	25	2

Ba: *Bacillus sp.*, **Sa:** *Staphylococcus aureus*, **Ef:** *Enterococcus faecalis*, **St:** *Salmonella typhimurium*, **Ec:** *Escherichia coli*,

Sm: *Serratia marcescens*, **Ea:** *Enterobacter agglomerans*, **Pa:** *Pseudomonas aeruginosa*, **Kp:** *Klebsiella pneumoniae*,

Sm: *Stenotrophomonas maltophilia*, **Cf:** *Citrobacter freundii*, **P2:** *pseudomonas sp.*, **Ca:** *Candida albicans*, **FOA:** *Fusarium oxysporium fs.*

albedinis, **Pi:** *Phytophthora infestans*

