

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

Faculté des sciences

Département de microbiologie et biochimie

N°: .....



DOMAINE : Science de la nature et de la vie

FILIERE : Sciences biologiques

OPTION : Microbiologie Appliquée

Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique

Par :

NOURI Warda

Intitulé

**Évaluation de l'activité antibactérienne des  
champignons endophytes isolés à partir de  
*Marrubium vulgare***

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. BENSEMANE Latifa	Université de M'sila	Présidente
Mr. BENSLAMA Abderrahim	Université de M'sila	Rapporteur
Dr. AREICHE Mounira	Université de M'sila	Examinatrice

**Année universitaire : 2019 /2020**

# **REMERCIEMENT**

*Avant toute chose je tiens à remercier Dieu le tout puissant,  
pour m'avoir donné la force et la patience*

*En tout premier lieu, mes sincères remerciements sont à Mr.  
BENSLAMA Abderrahim, pour m'avoir encadré pendant mon  
mémoire de Master. Merci pour votre disponibilité, votre  
compréhension et votre gentillesse.*

*Je tiens à remercier Mme MERAH Safia qui m'a guidé et  
surveillé le déroulement et l'exécution du travail pratique de ce  
mémoire*

*Ensuite, mes remerciements les plus sincères à toutes les  
personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration  
de ce modeste travail.*

## *Dédicace*

*Avant tout je tiens dédier ce travail à...*

*A mes sœurs bien aimée : Sallam et Nadya*

*A mon cher frère Kamel : merci pour ton amour, tes encouragements et ton soutien inconditionnel durant toute ma vie, je t'aime énormément frère*

*A toutes la famille NOUIRI et REZZIG*

*A mes amies Nadine, Amel, Ibtissam et Nada*

*A tous ceux et celles que j'ai rencontrée et qui m'ont aidée durant 5 ans des études universitaires.*

*A tous mes amis de spécialités Microbiologie Appliquée de la promotion 2019-2020*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail*

*Warda.....*

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure générale d'une bactérie .....	3
<b>Figure 2</b> : La paroi d'une bactérie Gram+ .....	4
<b>Figure 3</b> : La paroi d'une bactérie Gram-.....	4
<b>Figure 4</b> : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	6
<b>Figure 5</b> : Les noms donnés à la plante <i>Marrubium vulgare L.</i> ....	8
<b>Figure 6</b> : La source naturelle Marrubiin, structure chimique et activités biologiques .....	10
<b>Figure 7</b> : Développement symbiotique d'endophytes fongiques .....	12
<b>Figure 8</b> : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes .....	12
<b>Figure 9</b> : Structure de certains composés antioxydants isolés de champignons endophytes.	15
<b>Figure 10</b> : Structures de certains métabolites secondaires pertinents sur le plan industriel utilisés comme composés anticancéreux .....	16
<b>Figure 11</b> : Structures de certains composés antiviraux isolés à partir de champignons endophytes .....	17
<b>Figure 12</b> : Structure de certains métabolites endophytes présentant des activités biologiques variables.....	17
<b>Figure 13</b> : <i>Marrubium vulgare L.</i> .....	23
<b>Figure 14</b> : Protocole expérimental.....	27

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Mécanismes de résistances aux antibiotiques .....	<b>6</b>
<b>Tableau 2</b> : Classification des champignons endophytes selon certains critères .....	<b>13</b>
<b>Tableau 3</b> : Les souches bactériennes testées.....	<b>17</b>
<b>Tableau 4</b> : Les souches fongiques obtenues .....	<b>24</b>

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**C-endophyte** : Endophyte clavicipitacée

**Cfr** : Résistance au chloramphénicol

**DES** : Dark Septate Endophyte

**HIV** : Virus de l'hépatite

**LPS** : Lipopolysccharide

***M. vulgare*** : *Marrubium vulgare L.*

**MH** : Muller Hinton

**NC-endophyte** : Endophyte non clavicipitacée

**PDA** : Potato dextrose agar

## Résumé

Le but de ce travail est l'isolement, l'identification et l'évaluation de l'activité antibactérienne des champignons endophytes à partir de la plante médicinale algérienne *Marrubium vulgare L.* L'isolement des champignons endophytes est effectué par la méthode de stérilisation de surface pour éliminer les épiphytes puis l'incubation des fragments traités selon un protocole précis. L'identification des isolats poussés nous a permis d'obtenir trois souches fongiques appartenant à trois genres : *Fusarium*, *Alternaria* et *Chaetomium*, qui se sont généralement du l'embranchement Deuteromycètes. Enfin nos résultats confirment clairement que la plante médicinale *Marrubium vulgare L.* présente un réservoir de champignons endophytes qui peut être utilisé dans différents domaines surtout les domaines pharmaceutiques.

**Mots clés :** Champignons endophytes, *Marrubium vulgare L.*, Activité antibactérienne

## **Abstract**

The aim of this work is the isolation, identification and evaluation of the antibacterial activity of endophytic fungi from the Algerian medicinal plant *Marrubium vulgare L.* The isolation of endophytic fungi is carried out by the method of sterilization of surface to eliminate epiphytes then incubation of the fragments treated according to a precise protocol. The identification of the grown isolates allowed us to obtain three fungal strains belonging to three genera: *Fusarium*, *Alternaria* and *Chaetomium*, which are generally of the Deuteromycete phylum. Finally, our results clearly confirm that the medicinal plant *Marrubium vulgare L.* presents a reservoir of endophytic fungi, which can be used in various fields, especially pharmaceutical fields.

**Key words:** Endophytic fungi, *Marrubium vulgare L.*, Antibacterial activity

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو عزل، تحديد وتقييم النشاط المضاد للبكتيريا للفطريات الداخلية من النبات الطبي الجزائري *Marrubium vulgare L*. ويتم عزل الفطريات الداخلية بطريقة تعقيم. السطح للقضاء على الفطريات الخارجية ثم احتضان الاجزاء المعالجة وفقاً لبروتوكول دقيق. سمح لنا التعرف على العزلات المزروعة بالحصول على ثلاث سلالات فطرية تنتمي إلى ثلاثة أجناس: *Fusarium*، *Alternaria* و *Chaetomium*، وهي بشكل عام من فصيلة *Deuteromycete*. أخيراً، تؤكد نتائجنا بوضوح أن النبات الطبي *Marrubium vulgare L*. يمثل خزناً للفطريات الداخلية التي يمكن استخدامها في مختلف المجالات، وخاصة المجالات الصيدلانية.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات الداخلية، *Marrubium vulgare L*. نشاط مضاد للبكتيريا

# Table des matières

Introduction .....	1
--------------------	---

## Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les bactéries .....	3
1.1. Définition d'une bactérie .....	3
1.2. Bactéries à Gram positif .....	3
1.3. Bactéries à Gram négatif .....	4
2. Généralités sur les antibiotiques .....	5
2.1. Définition des antibiotiques .....	5
2.2. Modes d'actions des antibiotiques .....	5
2.2.1. Action sur la paroi et sur la membrane cytoplasmique.....	5
2.2.2. Action sur la synthèse d'ADN et sur la synthèse protéique.....	5
2.3. Origine de la résistance.....	5
2.3.1. Résistance naturelle .....	5
2.3.2. Résistance acquise .....	6
2.4. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	6
3. Aperçu bibliographique sur la plante étudiée .....	7
3.1. <i>Marrubium vulgare L.</i> .....	7
3.2. Caractéristiques morphologiques .....	8
3.3. Ecologie et répartition géographique .....	8
3.4. Usage en médecine traditionnelle .....	8
3.5. Principes actifs .....	9
4. Généralités sur les endophytes.....	10
4.1. Définition d'un organisme endophyte.....	10
4.2. Diversité et classification.....	11
4.3. Les domaines d'application des champignons endophytes .....	12
4.4. Les activités biologiques des métabolites secondaires des endophytes .....	14

4.4.1. Champignons endophytes comme source de substances antioxydants .....	14
4.4.2. Champignons endophytes comme source de substances anticancéreux.....	14
4.4.3. Champignons endophytes comme source de substances antivirales .....	15
4.4.4. Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes .....	15

## **Partie expérimentale**

1. Matériel .....	17
1.1. Matériel végétal.....	17
1.2. Souches bactériennes.....	17
1.3. Produits chimiques .....	18
1.4. Appareillage.....	18
2. Méthodes .....	18
2.1. Échantillonnage.....	18
2.2. Isolement et purification des champignons endophytes .....	18
2.3. Identification des champignons isolés.....	19
2.4. Activité antibactérienne des champignons endophytes isolés .....	19
2.5. Fermentation et extraction .....	20
2.6. Activité antibactérienne des extraits.....	20
2.7. Analyse statistique.....	22

## **Résultats et discussions**

1. Isolement, purification et identification des champignons endophytes .....	23
---	----

## **Conclusion générale**

Conclusion.....	25
-----------------	----

Références

## **Introduction**

Le phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques et les risques de toxicité liés à l'utilisation massive de médicaments et d'antibiotiques de synthèse, ont conduit les chercheurs à trouver d'autres sources naturelles fournissant de nouveaux médicaments efficaces et peu toxiques. L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial sérieux qui a orienté la recherche pour l'identification de nouvelles biomolécules avec une large activité antibactérienne et possédant une faible toxicité (**Sagar *et al.*, 2019**).

Les endophytes sont des micro-organismes qui vivent dans les tissus végétaux, établissant des relations mutuelles, et sont très différents de ceux trouvés à la surface de la plante. La plus appropriée et la plus collective de la plupart des définitions montre les endophytes comme l'ensemble des micro-organismes qui, pendant tout ou partie de leur cycle de vie, vivent dans les tissus internes des plantes hôtes sans provoquer de maladies (**Padhi *et al.*, 2013 ; Praptiwi *et al.*, 2018**). Plusieurs études ont été menées concernant la biodiversité, la taxonomie, l'écologie et la relation symbiotique avec l'hôte. Les associations symbiotiques des champignons endophytes avec les plantes produisent des substances bénéfiques pour l'hôte. Ces endophytes protègent leurs hôtes des agents infectieux et des conditions défavorables en sécrétant des métabolites secondaires bioactifs (**Padhi *et al.*, 2013 ; Praptiwi *et al.*, 2018**). Jusqu'à présent, des études ont rapporté un grand nombre de composés bioactifs isolés à partir de champignons endophytes appartenant à plusieurs classes structurales comme les alcaloïdes, les peptides, les stéroïdes, les terpénoïdes, les phénols, les quinones et les flavonoïdes.

De nombreux composés bioactifs précieux ayant des activités antimicrobiennes, insecticides, cytotoxiques et anticancéreuses ont été découverts avec succès à partir des champignons endophytes, qui sont utilisés pour le traitement d'un certain nombre de maladies (**Joseph et Priya, 2011 ; Gouda *et al.*, 2016**). Un grand nombre de métabolites antibactériens sont identifiés dans de nombreuses espèces de champignons endophytiques à travers le monde et certains ont été approuvés comme médicaments, comme les céphalosporines et l'acide fusidique (**Ebrahimi *et al.*, 2010 ; Reygaert, 2018**). Au cours des dernières décennies, un grand intérêt s'est développé pour la recherche de médicaments antimicrobiens à partir de produits naturels en raison de la conviction que les médicaments dérivés de champignons endophytes sont sûrs par rapport aux médicaments synthétiques qui peuvent avoir des effets indésirables en plus de leur coût élevé. Les plantes médicinales sont connues pour héberger des champignons endophytes que l'on pense être associé à la production de produits pharmaceutiques.

*Marrubium vulgare L.* est l'une des plus anciennes plantes médicinales algérien appartenant au genre *Marrubium* connue pour ses propriétés thérapeutiques : antifongique, antibactérienne, insecticide et autres activités biologiques (**Moufid et Eddouks, 2012**). Dans ce contexte, nous nous intéressons à cette étude à :

- Isolement, purification et identification des champignons endophytes à partir de la plante médicinale *M. vulgare*
- Evaluation de l'activité antibactérienne des champignons endophytes sur 5 souches bactériennes
- Fermentation et extraction des métabolites secondaires à partir des champignons endophytes
- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits obtenus

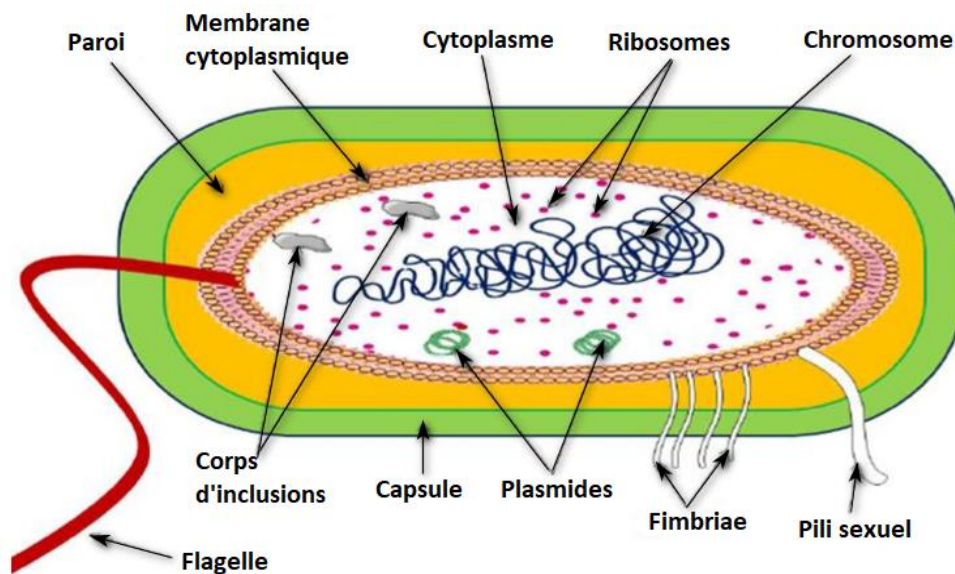
*Synthèse*  
*bibliographique*

# 1. Généralités sur les bactéries

Les micro-organismes ont un rôle indispensable dans notre vie et sont les créatures les plus précieuses de notre planète. Ils sont d'une immense importance pour l'environnement, la santé humaine et notre économie. Les microbes affectent tous les aspects de la vie sur notre planète ; sans microbes, la vie ne peut être maintenue sur terre. La majorité des microbes ont des effets bénéfiques profonds tels que la fixation des gaz atmosphériques et la conversion de matières animales et végétales mortes en substances plus simples qui peuvent être recyclées à nouveau dans l'environnement et réutilisées au début de la chaîne alimentaire (Selim *et al.*, 2017).

## 1.1. Définition d'une bactérie

Une bactérie est un être unicellulaire (procaryote) de petite taille, de morphologie variable qui présente des caractéristiques propres. La taille d'une bactérie varie entre 1 à 10  $\mu\text{m}$ . Le poids d'une bactérie est d'environ 10-12 g. Elle contient 70% d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines (55%), de lipides (10%), de lipopolysaccharides (LPS) (3%), de peptidoglycane (3%), de ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%) (Rosselló-Móra et Amann, 2015) (Figure 1).

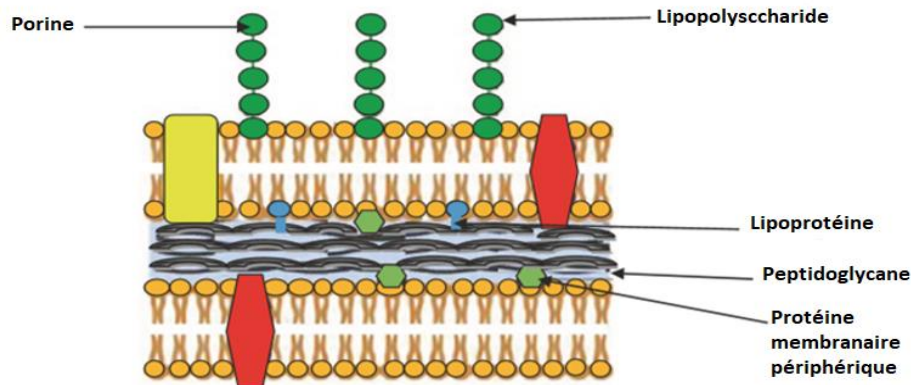


**Figure 1** : Structure générale d'une bactérie (Ladjouzi, 2013).

La bactérie possède un cytoplasme qui est entouré, comme pour n'importe quelle cellule, par une membrane plasmique. Autour de celle-ci se trouve toujours une paroi peptidique, plus ou moins épaisse. C'est l'épaisseur de cette dernière qui détermine la réaction de coloration de Gram et classifie ainsi les bactéries en deux grands groupes : les Gram positif et le Gram négatif (Kuhn, 2019).

## 1.2. Bactéries à Gram positif

Les parois cellulaires à Gram positif en général sont beaucoup plus épaisses et beaucoup moins structurées. Le principal constituant est le peptidoglycane, forme une couche épaisse. Les autres constituants sont les acides téichoïques. Les bactéries à Gram+ n'ont pas la supplémentation externe couche de membrane que les bactéries Gram-négatives font, elles partagent la une paroi cellulaire entourant la membrane cytoplasmique de la cellule. (**Figure 2**) (**Kuhn, 2019**).

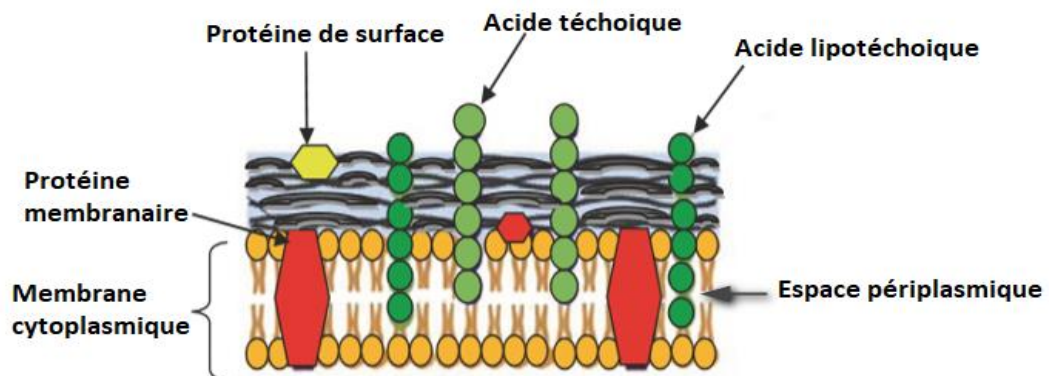


**Figure 2** : La paroi d'une bactérie Gram+ (**Sagar et al., 2019**).

## 1.3. Bactéries à Gram négatif

Les bactéries à Gram négatif sont entourées de deux membranes, la membrane cellulaire cytoplasmique et la membrane externe qui est une double couche de lipides, protéines et, du côté externe, le LPS (**Figure 3**). La paroi des Gram- est constituée d'une mince couche de peptidoglycane (**Epanand et al., 2016 ; Kuhn, 2019**).

La bactérie possède un cytoplasme qui est entouré, comme pour n'importe quelle cellule, par une membrane plasmique. Autour de celle-ci se trouve toujours une paroi peptidique, plus ou moins épaisse. C'est l'épaisseur de cette dernière qui détermine la réaction de coloration de Gram et classifie ainsi les bactéries en deux grands groupes : les Gram positif et le Gram négatif (**Kuhn, 2019**).



**Figure 3** : La paroi d'une bactérie Gram- (**Sagar et al., 2019**).

## **2. Généralités sur les antibiotiques**

### **2.1. Définition des antibiotiques**

En 1957 Turpin et Velu ont défini un antibiotique comme étant tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont son activité se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux (Yahia *et al.*, 2019).

### **2.2. Modes d'actions des antibiotiques**

#### **2.2.1. Action sur la paroi et sur la membrane cytoplasmique**

Dans les organismes à Gram+, le principal composant de la paroi cellulaire est le peptidoglycane, et chez celles à Gram-, composée principalement de LPS, recouvre une fine couche de peptidoglycane. En raison du rôle principal de la paroi, elle devient une cible intéressante pour la thérapeutique (Guilhelmelli *et al.*, 2013). Les bêta-lactames et les glycopeptides, inhibent la synthèse des peptidoglycanes (Sagar *et al.*, 2019).

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les agents qui ciblent les phospholipides peuvent altérer les propriétés de la membrane. L'une de ces manières consiste à modifier les propriétés physiques de la membrane (Epanand *et al.*, 2016).

#### **2.2.2. Action sur la synthèse d'ADN et sur la synthèse protéique**

Certains antibiotiques peuvent traverser spontanément les membranes bactériennes, ciblant les molécules intracellulaires comme les acides nucléiques et les protéines. La buforine II, une molécule de 21 acides aminés, est un exemple d'antibiotique capable de traverser la membrane sans la perméabiliser, qui s'accumule ensuite dans le cytoplasme (Guilhelmelli *et al.*, 2013).

### **2.3. Origine de la résistance**

La résistance des bactéries à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance sont portés soit sur le chromosome (résistance chromosomique), soit sur un élément mobile (résistance extra chromosomique). Elle peut être naturelle ou acquise (Carle, 2009).

#### **2.3.1. Résistance naturelle**

La résistance naturelle est une résistance intrinsèque, due essentiellement à la présence de gènes spécifiques. Les gènes de résistance sont exprimés soit d'une manière constitutive ou bien

induite en répondant à un signal enzymatique établi par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis-à-vis de l'antibiotique (Bouyaha *et al.*, 2017).

### 2.3.2. Résistance acquise

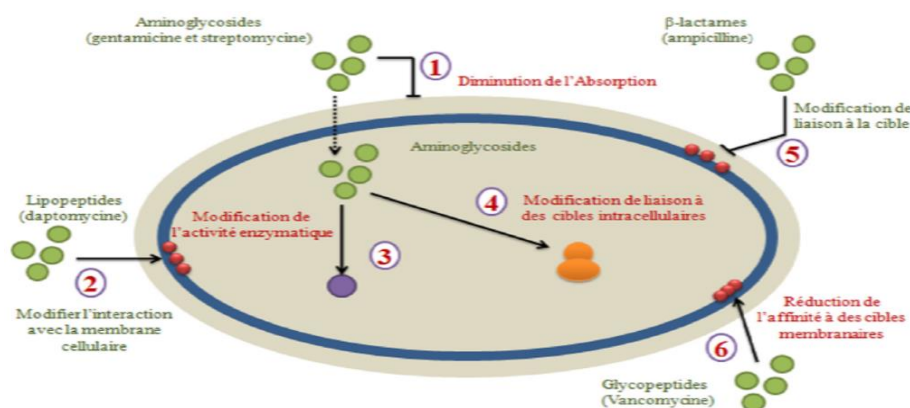
Le transfert horizontal de gènes de résistance est un large mécanisme de diffusion des gènes de résistance. Il est dû à des modifications dans le profil d'expression génique (Bouyaha *et al.*, 2017 ; Sagar *et al.*, 2019).

## 2.4. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

Le développement d'une résistance aux antibiotiques est devenu un problème global car les bactéries ont acquis une variété de mécanismes de résistance pour faire face aux conditions environnementales difficiles (Tableau 1) (Herzog et Krause, 2015 ; Sagar *et al.*, 2019). Les sites de résistance sont variables entre les espèces bactériennes et ils sont classés en plusieurs voies. Au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents (Figure 4) (Bouyaha *et al.*, 2017).

**Tableau 1** : Mécanismes de résistances aux antibiotiques (Carle, 2009).

Mécanismes de résistances	Conséquences
Inhibition enzymatique	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique ; mécanisme le plus répandu.
Réduction de la perméabilité cellulaire	Changement de perméabilité empêchant le médicament d'atteindre sa cible.
Altération des sites de liaison ciblés par l'antibiotique	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
Pompes à efflux	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif



**Figure 4** : Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyaha *et al.*, 2017).

### 3. Aperçu bibliographique sur la plante étudiée

Les plantes médicinales sont utilisées pour leurs propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine. En effet, elles sont utilisées de différentes manières, décoction, macération et infusion. Une ou plusieurs de leurs parties peuvent être utilisées, racine, feuille, fleur (**Dutertre, 2011**). D'après **Hordé (2014)**, les plantes médicinales sont utilisées par l'homme depuis près de 7 000 ans et que certains animaux les consomment aussi dans un but thérapeutique. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées à l'échelle mondiale à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains.

La famille des lamiacées comporte 260 genres et entre 6500 à 7000 espèces qui se présentent sous forme d'herbes ou arbustes. C'est une famille exceptionnellement homogène : une lamiacée est très facile à reconnaître mais elle est rare, son aire de dispersion est extrêmement étendue. Les Lamiacées sont des plantes très adaptées à la sécheresse, elles sont herbacées, annuelles ou vivaces, elles poussent quelquefois sous forme de petits arbrisseaux. Ce sont des plantes aromatiques très prisées en cosmétique, en aromathérapie et en phytothérapie (**Dutertre, 2011**).

#### 3.1. *Marrubium vulgare* L.

Le nom botanique latin de la plante "*Marrubium*" provient de "Maria urbs" une ancienne ville d'Italie (**Ahvasi et al., 2017**). (**Figure 5**).



**Nom latin :** *Marrubium vulgare* L.

**Nom français :** Marrube blanc

**Nom arabe :** Farasyun abyed,  
Hchichet elkalb

**Nom local :** Meriwa, meriout

**La drogue :** Partie aérienne

**Figure 5 :** Les noms donnés à la plante *Marrubium vulgare* L. (**Adouane, 2016**).

**Classification botanique : Selon APG III :**

Règne :	<b>Végétale</b>
Sous règne :	<b>Plantes vasculaire</b>
Embranchement :	<b>Spermatophytes</b>
Division :	<b>Magnoliophytes</b>
Classe :	<b>Magnolipsides</b>
Sous classe :	<b>Astérides</b>
Ordre :	<b>Lamiales</b>
Famille :	<b>Lamiacées</b>
Genre :	<b><i>Marrubium</i></b>
Espèce :	<b><i>Marrubium vulgare L.</i></b>

**3.2. Caractéristiques morphologiques**

*Marrubium vulgare L.* est une plante herbacée vivace à feuilles vert blanchâtre, appartenant à la famille des Lamiacées. Elle couverte d'un duvet blanc, à tiges dressées, érigées et rigides dont la hauteur se comprise entre 30 et 80 cm. Les feuilles vert blanchâtre sont arrondies, faiblement dentées et tomenteuses. Les fleurs sont blanches, en verticilles denses disposés le long des tiges. La plante dégage une odeur de thym au froissement (**Bouterfas et al., 2013**).

**3.3. Ecologie et répartition géographique**

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des lamiacées, comprenant plus de 30 espèces distribuées dans les régions d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie. L'habitat naturel du Marrube blanc est associé aux bords de chemins, près et terrains vagues. Il est lié à des sols légers, peu humides, fortement calcaires. Le Marrube préfère les endroits ensoleillés, croissant sur les champs secs et arénacés, et les bords des routes. Cette plante pousse naturellement dans les garrigues, les djebels et les friches sur des sols secs et alcalins (**Boudjlal et al., 2012 ; Bouterfas et al., 2013**).

**3.4. Usage en médecine traditionnelle**

L'usage médicinal des plantes comme analgésiques ou anti-nociceptifs en thérapie traditionnelle est estimée à environ 80% de la population mondiale. *Marrubium vulgare L.* est traditionnellement utilisée dans le traitement symptomatique de la toux et au cours des affections bronchiques aiguës et bénignes (**Uritu et al., 2018**).

Les maladies métaboliques étant le principal dilemme dans les sociétés, en prêtant donc attention à la médecine traditionnelle et plantes médicinales pour leur traitement semble nécessaire.

Cette étude soutient l'utilisation de *M. vulgare* (Ahvasi *et al.*, 2017). Aussi selon Cechinel (2018), elle est utilisée par la médecine traditionnelle pour le traitement de différents types de maladies humaines, en particulier celles liées aux voies respiratoires et inflammatoires. Plusieurs études expérimentales ont confirmé le potentiel thérapeutique de cette plante (Figure 6). Le décocté préparé à partir de la plante entière est utilisé dans l'hypertension, les diabètes et les maladies gastriques. Les fleurs seraient efficaces contre les verrues et les racines lavées et mélangées avec le beurre cuit sont recommandées pour traiter le trachome (maladie infectieuse et contagieuse de l'œil d'origine bactérienne) (Aouadhi, 2010).

### 3.5. Principes actifs

Aujourd'hui, il a été estimé que les principes actifs provenant des végétaux représentent 25 % des médicaments prescrits, soit un total de 120 composés d'origines naturelles provenant de 90 plantes différentes. Les lactones di-terpéniques notamment marrubine, responsables de l'effet expectorant et elle régularise les battements cardiaques

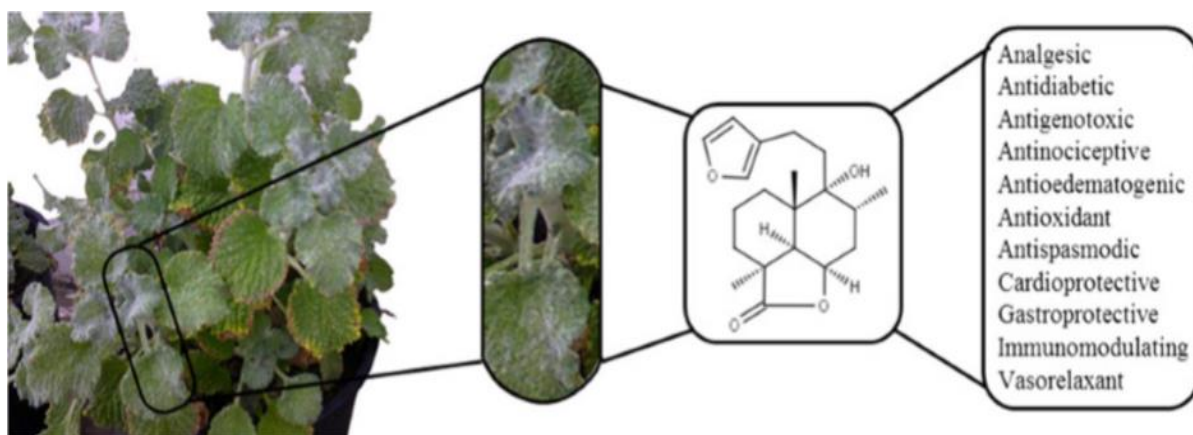
Choline et saponoside (traces)

Tanins

Acides phénols (acide caféique, chlorogénique)

Matières minérales (sels de potassium et de fer)

Huile essentielle (0.06%) (Aouadhi, 2010)



**Figure 6** : La source naturelle Marrubiin, structure chimique et activités biologiques (Martino *et al.*, 2019).

## 4. Généralités sur les endophytes

### 4.1. Définition d'un organisme endophyte

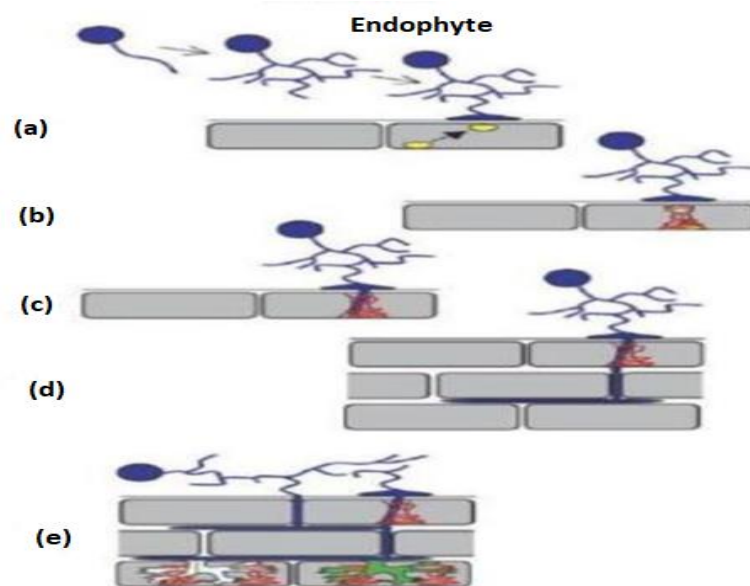
Les endophytes sont des micro-organismes bactériens ou fongiques qui colonisent les tissus végétaux sains sans provoquer de symptômes/maladies connus pour se produire partout dans les plantes. Il a été démontré que les endophytes améliorent la capacité des plantes à tolérer les stress abiotiques et biotiques existant en mutualité avec les plantes hôtes (**Jha, 2019**).

Dans l'intérêt de la découverte des médicaments à base de produits naturels, l'exploration des plantes médicinales pour les champignons endophytes est très intéressante. Les statistiques au cours des trois dernières décennies révèlent qu'environ 50% des nouveaux médicaments ont été formulés à partir de dérivés de produits naturels (**Jha, 2019**).

Les champignons étant répandus ont un continuum de modes de vie afin de survivre et de rivaliser avec d'autres systèmes de vie dans la nature (**Jha, 2019**). L'initiation d'associations endophytes fongiques à l'intérieur des racines peut altérer la composition nutritive minérale, l'équilibre des phytohormones et les constituants chimiques des exsudats racinaires et protéger la plante contre les stress abiotiques et biotiques (**Khan et al., 2017**).

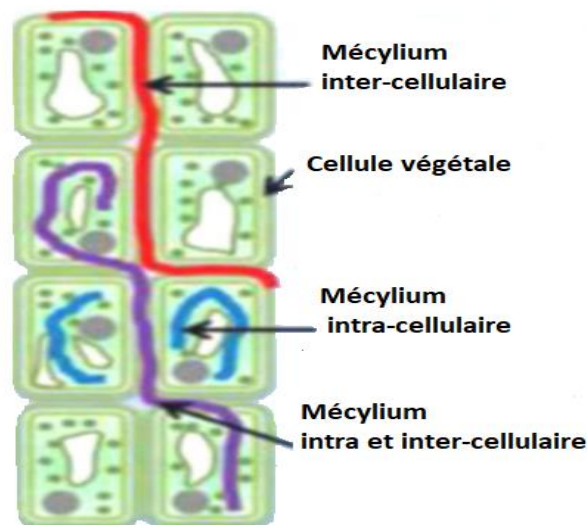
L'établissement d'une relation symbiotique entre la plante et ces champignons endophytes s'effectue en plusieurs étapes (**Figure 7**) :

- (a) Une fois que les spores germent et approchent un appareil végétatif de l'hôte, la dominance apicale est abandonnée et le branchement d'hyphes est déclenché par le 5désoxy-strigol ;
- (b) Dès le premier contact physique, le champignon forme un appressorium qui paraît induire le mouvement du noyau de la plante vers le site du contact ;
- (c) Les éléments du cytosquelette et le réticulum endoplasmique forment l'appareillage de la pré-pénétration et le long de l'axe du mouvement nucléaire ;
- (d) Quand le champignon atteint finalement le cortex intérieur, il pénètre la paroi cellulaire et forme une structure hyphale (comme un réseau filamenteux) ;
- (e) La colonisation des tissus commence. L'infection initiale est accompagnée par une induction équilibrée de gènes de la défense de la plante (**Selim et al., 2012**).



**Figure 7** : Développement symbiotique d'endophytes fongiques (Selim *et al.*, 2012).

Les champignons endophytes présentent une grande diversité. Ils sont hétérotrophes et prélèvent des nutriments à l'hôte sans que celui-ci ne présente des signes de maladie. Ils peuvent croître dans le milieu intracellulaire ou intercellulaire (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016) (Figure 8).



**Figure 8** : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes Hôtes (Abdelloui et Debih, 2019).

#### 4.2. Diversité et classification

Les champignons endophytes sont omniprésents aux plantes et la plupart appartiennent à l'embranchement d'Ascomycota ou de leurs champignons mito-sporiques, cependant certains appartiennent à d'autres taxons tels que les Basidiomycota, Zygomycota et Oomycota. Ils représentent un groupe très diversifié avec une estimation de 1.5 millions d'espèces et une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante (Vasundhara *et al.*, 2019).

Sur la base de la phylogénie et des stratégies du cycle de vie, les endophytes fongiques ont été divisés en deux groupes principaux les Clavicipitacés (C-endophytes) et non Clavicipitacés (NC-endophytes) avec des gammes d'hôtes étroites et larges, respectivement (**Tableau 2**). Le groupe C-endophytes représente un petit nombre d'espèces, exigeantes et confinées à l'herbe de saison froide et chaude. Les NC-endophytes sont très divers et sont en outre classés en trois groupes fonctionnels distincts (**Jha, 2019**).

Le premier groupe colonise les parties aériennes et souterraines des plantes (ascomycètes et basidiomycètes), tandis que les deuxième et troisième groupes sont confinés uniquement aux parties aériennes et souterraines, respectivement. La diversité du premier groupe de C-endophytes est limitée et montre une colonisation très localisée, tandis que le deuxième (ascomycètes et basidiomycètes) et le troisième (mycorhizes et cloisons sombres) ont des caractéristiques de colonisation étendue et une large gamme d'hôtes et possèdent un potentiel de transmission élevé. Par exemple, le deuxième groupe NC-endophytes colonise jusqu'à plus de 20 espèces dans une seule feuille tropicale, tandis que le troisième groupe (principalement des endophytes cloisonnés sombres ; DES) colonise jusqu'à 600 espèces végétales en larges zones géographiques (**Jha, 2019**).

**Tableau 2** : Classification des champignons endophytes selon certains critères (**Afra et al., 2017**).

Critères	Clavicipitaceae		Non Clavicipitaceae	
	Classes 1	Classes 2	Classes 3	Classes 4
La gamme d'hôtes	Étroit	Vaste	Vaste	Vaste
Tissus colonisés	Bourgeons et rhizome	Bourgeons, rhizome et racines	Bourgeons	Racines
Colonisation de la plante	Extensive	Extensive	Limitée	Extensive
Biodiversité de la plante	Faible	Faible	Haute	Inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Verticale et horizontale	Horizontale	Horizontale
Bénéfice physique	NAH	NAH/AH	NAH	NAH

\*Non adapté à l'habitat (NAH) : des avantages tels que la tolérance à la sécheresse et l'accélération de la croissance sont courants chez les endophytes, quel que soit leur habitat d'origine. \* Adapté à l'habitat (AH) : les avantages résultent de pressions de sélection spécifiques à l'habitat telles que le pH, la température et la salinité. \*(V) : verticale. \*(H) : horizontale

### **4.3. Les domaines d'application des champignons endophytes**

Les champignons endophytes ont une large application dans différents domaines. Ils ont le potentiel de produire de nombreux composés bioactifs. Les métabolites secondaires produits par les champignons endophytes ont la capacité d'agir comme agent de lutte biologique. Les champignons endophytes isolés des plantes médicinales seraient une source prometteuse pour de nombreux ingrédients pharmaceutiques (**Sudha *et al.*, 2016**). Parmi ces domaines on citer :

#### **4.3.1. L'agriculture**

L'agriculture est la principale activité économique et le moyen de subsistance de millions de personnes, en particulier dans les pays en développement. Une population croissante doit être nourrie par augmenter la production et la productivité des produits agricoles, et de nouvelles stratégies sont nécessaires. Les endophytes gagnent en importance en raison de leur rôle dans stimulation de la croissance des plantes, protection contre les stress biotiques et abiotiques et les ravageurs via modulation de la signalisation de l'hormone de croissance, augmentation du rendement des graines et de la croissance des plantes hormones (**Miliute *et al.*, 2015**).

#### **4.3.2. La biotechnologie**

Les endophytes ont une grande capacité à produire divers enzymes, qui pourraient être utilisées dans diverses applications biotechnologiques comme les applications environnementales des enzymes de dégradation, les applications médicales et la biotransformation des composés organiques avec de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes. La biotransformation peut être définie comme l'utilisation de systèmes biologiques pour produire des modifications chimiques à des composés qui ne sont pas dans leurs substrats naturels (**Pimentel *et al.*, 2011**).

#### **4.3.3. La protection de la plante**

Certains champignons endophytes identifiés dans des études précédentes, ont montré des effets positifs sur la plante hôte comme l'amélioration de la croissance ainsi que la résistance et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques, ce qui les a rendus utiles pour la plante, comme un outil d'amélioration des cultures (**Leitão et Enguita, 2016**).

D'après **Leitão et Enguita (2016)**, certains endophytes ont la capacité de synthétiser les gibbérellines, les auxines et l'acide abscissique pour améliorer la résistance des plantes dans des conditions environnementales défavorables

#### 4.3.4. Les applications médicales

Les composés naturels bioactifs produits par les endophytes présentent une utilité potentielle prometteuse dans les domaines de la sécurité et de la santé humaine, bien qu'il existe encore une demande importante de l'industrie pharmaceutique pour des produits synthétiques pour des raisons économiques et chronophages. Problèmes liés à la santé humaine, tels que le développement de la résistance aux médicaments chez les bactéries pathogènes humaines, les infections fongiques et les virus potentiellement mortels, réclamation concernant de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement efficace de maladies chez l'homme, les plantes et les animaux qui ne sont actuellement pas satisfaites (**Pimentel et al., 2011**).

#### 4.4. Les activités biologiques des métabolites secondaires des endophytes

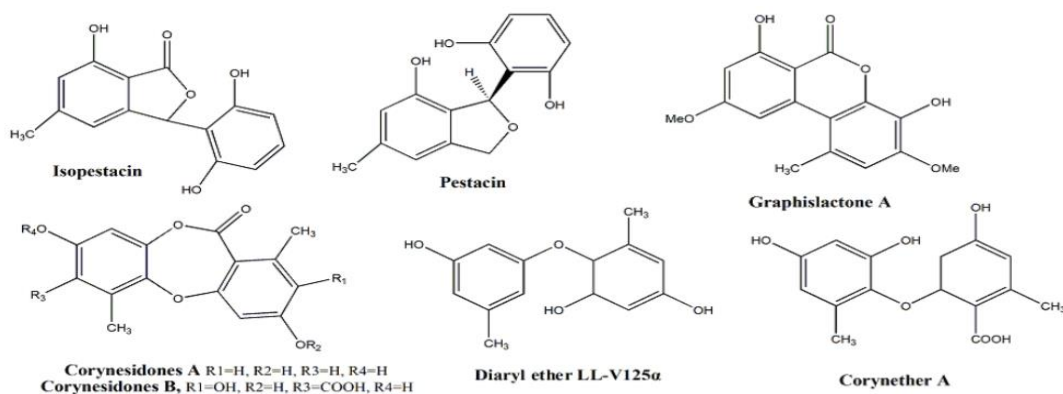
Beaucoup de champignons endophytes ont été reconnus comme sources de nouveaux métabolites d'importance pharmaceutiques. Ils ont également le potentiel de synthétiser diverses métabolites bioactives peuvent être utilisés directement ou indirectement comme agents thérapeutiques contre de nombreuses maladies (**Vasundhara et al., 2019**).

Un certain nombre de métabolites liés aux champignons endophytes ont été découverts à partir de diverses sources qui sont connues pour posséder une gamme d'activités en tant qu'agents antibactériens, antiviraux et anticancéreux (**Deshmukh et al., 2018**).

##### 4.4.1. Champignons endophytes comme source de substances antioxydants

Le stress oxydatif résulte d'un état de déséquilibre conduisant à des dommages cellulaires. Les agents antioxydants sont très importants pour piéger les radicaux libres et pour inhiber les mécanismes d'oxydation qui conduisent à des maladies dégénératives, et ils pourraient réduire le risque de maladies chroniques. L'endophyte *Chaetomium globosum* est une riche source de métabolites secondaires bioactifs, comme la Chaétopyranine qui présente des propriétés antioxydantes avec propriété d'élimination des radicaux (**Selim et al., 2016**).

La pestacine et l'isopestacine (**Figure 9**) sont des composés présentant une activité antioxydante puissante et ont été obtenus à partir de la culture du champignon endophytique *Pestalotiopsis microspora* isolé de la plante hôte *Terminalia morobensis* (**Selim et al., 2012**).

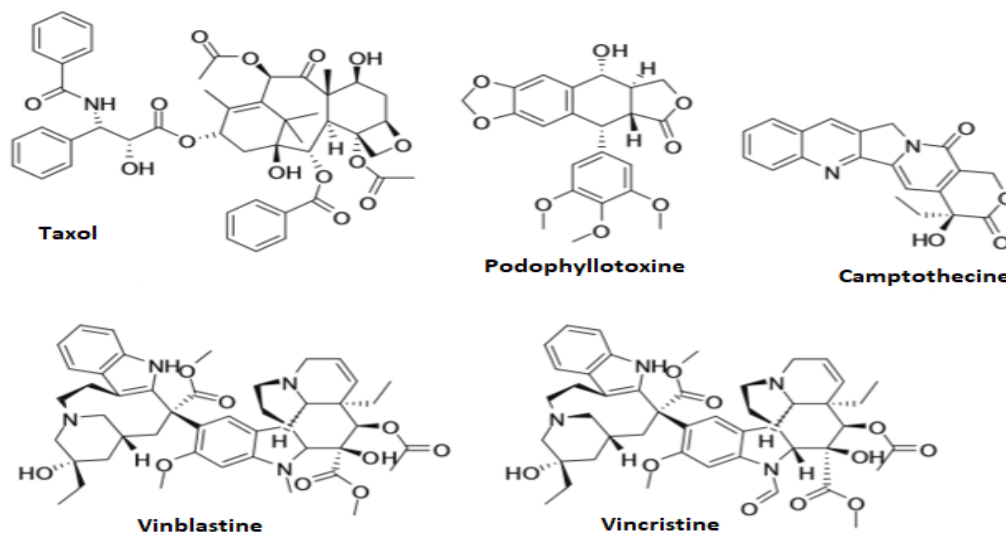


**Figure 9 :** Structure de certains composés antioxydants isolés de champignons endophytes (Selim *et al.*, 2012).

#### 4.4.2. Champignons endophytes comme source de substances anticancéreux

En vue de découvrir un nouveau composé anticancéreux naturel important, les champignons endophytes des plantes ont été reconnus comme une source importante de métabolites secondaires biologiquement actifs (Selim *et al.*, 2018).

Il existe des cas où certaines hormones et médicaments anticancéreux seront synthétisés indépendamment par l'hôte ainsi que par les endophytes par exemple, la gibbérelline. Le médicament anticancéreux Taxol est préparé à partir du champignon endophyte *Taxomyces andreanae* avec l'espèce hôte *Taxus brevifolia* (Figure 10) (Jha, 2019).

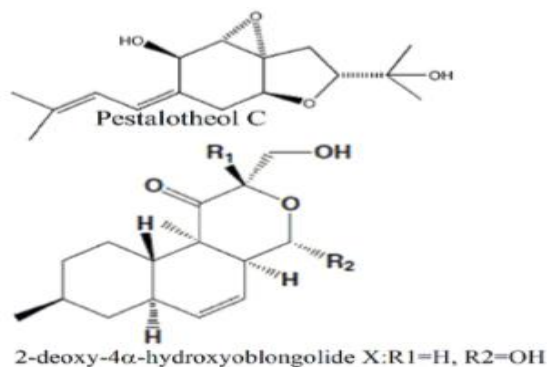


**Figure 10 :** Structures de certains métabolites secondaires pertinents sur le plan industriel utilisés comme composés anticancéreux (Selim *et al.*, 2018).

#### 4.4.3. Champignons endophytes comme source de substances antivirales

Il existe un besoin mondial de nouveaux composés antiviraux pour résoudre les problèmes de résistance aux médicaments. La résistance des maladies humaines aux antibiotiques bien connus augmente rapidement de nos jours, donc la découverte de nouveaux agents alternatifs est indispensable pour gérer ces maladies. Par exemple l'endophyte *Pleospora tarda*, de la

plante médicinale *Ephedra aphylla*, présentait une activité antivirale prometteuse (Selim *et al.*, 2018). Le pestalothéol C a été isolé de l'endophyte *Pestalotiopsis theae*, et ses propriétés anti-VIH se sont révélées (Figure 11) (Selim *et al.*, 2012).

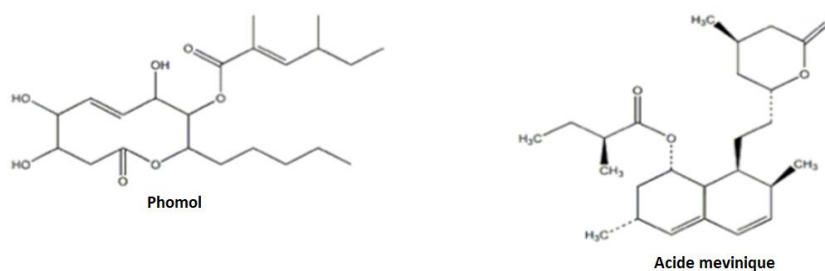


**Figure 11** : Structures de certains composés antiviraux isolés à partir de champignons endophytes (Selim *et al.*, 2012).

#### 4.4.4. Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes

La nécessité de nouvelles molécules antibactériennes pour lutter contre la variété croissante d'infections devient une tâche prioritaire. Les champignons endophytes peuvent constituer une source importante de molécules bio-thérapeutiques. Par exemple la Flavipucine a été isolée à partir de *Phoma sp.*, possède une activité contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* (Zeriguine et Belayadi, 2019).

De nombreux rapports ont indiqué que les champignons endophytes sont capables de produire des composés anti-inflammatoires, tels que le phomol et l'acide mevinique, qui avaient été isolés de la culture du champignon endophyte *Phomopsis*. Les deux composés ont montré une forte activité anti-inflammatoire (Figure 12) (Selim *et al.*, 2012).



**Figure 12** : Structure de certains métabolites endophytes présentant des activités biologiques variables (Selim *et al.*, 2012).

# *Partie expérimentale*

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel végétal

Des échantillons de *Marrubium vulgare* L. sont collectés en février 2020 à partir de la région de Berhoum M'sila, Algérie (**Figure 13**).

L'identification de l'espèce a été validée par le Docteur « SARRI Djamel » enseignants du département de biologie et physiologie végétale à l'Université Mohamed Boudiaf, M'sila.



**Figure 13 :** *Marrubium vulgare* L. (photo originale).

### 1.2. Souches bactériennes

Le matériel microbien comprend cinq bactéries pathogènes trois bactéries Gram négatif et deux bactéries Gram positif. Les souches bactériennes utilisées sont référenciées par American type culture collection (ATCC), elles sont récupérées de laboratoire interne de la microbiologie à l'université de Mohamed Boudiaf M'sila (**Tableau 3**).

**Tableau 3 :** Les souches bactériennes testées.

Souches bactériennes	Gram	Références
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853
<i>Salmonella enterica</i>	Négatif	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25924
<i>Bacillus subtilis</i>	Positif	ATCC 6633

### **1.3. Produits chimiques**

Buyanol, éthanol, hydroxyde de sodium (NaOH), chlorure d'hydrogène (HCl), Glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), Agar, Hypochlorite de sodium (NaOCl), Dimethylsulfoxyde (DMSO), Gélose Mouller Hinton (MH), Gélose PDA (potato dextrose agar), Milieu de culture PDB (Potato Dextrose Broth).

### **1.4. Appareillage**

Spectrophotomètre (SHIMADZUUVmini-1240), Incubateur (Memmert), Bain marie (Memmert), Autoclave (Pbinternational), Centrifugeuse (SIGMA), Évaporateur rotatif (BUCHI R-210).

## **2. Méthodes**

### **2.1. Échantillonnage**

Afin d'assurer un bon isolement des champignons endophytes, il faut choisir des plantes en bonne santé ainsi qu'un matériel végétal frais. Pour cela plusieurs plantes saines et mures ont été choisies et les échantillons ont été pris aléatoirement de différents emplacements sur les plantes, et mis dans des sacs en plastiques stériles pour les transporter jusqu'au laboratoire. Les échantillons ainsi collectés sont préservés à une température de 4°C en attendant d'être utilisés, et ne doivent dépasser les 24 heures (**Khan *et al.*, 2017**).

### **2.2. Isolement et purification des champignons endophytes**

Les échantillons ont été rincés sous l'eau du robinet pendant une dizaine de minutes pour les débarrasser des impuretés et les débris de la surface, 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 échantillons sont ensuite remis dans de l'éthanol 70% durant 30 secondes et sont rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile pendant 1 minute chaque fois et séchés sur du papier filtre stérile afin d'éliminer les épiphytes (**Khan *et al.*, 2017**).

Ensuite ils ont été coupés en fragments de quelques millimètres et placés aseptiquement dans des boîtes de pétri contenant de la gélose PDA préalablement passée à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, et supplémentée aseptiquement avec 150 mg/l de Gentamycine pour inhiber la croissance bactérienne, (5 à 6 segments par boîte), et sont mises à incubées à 25°C (**Khan *et al.*, 2010**).

Selon **Pimentel et al. (2006)**, pour vérifier l'efficacité de la stérilisation et pour confirmer que les isolats provenaient des tissus internes, on a procédé d'étaler des aliquotes provenant du troisième lavage sur la gélose 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. Enfin, après incubation chaque champignon pousse sera repiquer plusieurs fois jusqu'à l'obtention des cultures pure. Le pourcentage de colonisation est calculé en utilisant la formule suivante :

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

### **2.3. Identification des champignons isolés**

L'identification fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques des champignons isolés à l'état pur :

- Caractères cultureux : ce sont les critères macroscopiques tels que la vitesse de croissance, texture et couleur du thalle, odeur de l'exsudat et présence ou absence d'un pigment diffusible.
- Caractères morphologiques : c'est l'étude microscopique du mycélium, nature des organes différenciés.

### **2.4. Activité antibactérienne des champignons endophytes isolés**

Pour évaluer l'activité antibactérienne des champignons endophytes on a utilisé la méthode de cylindre d'agar (aussi connu par la technique de la double culture de diffusion). Tous les champignons endophytes isolés ont été dépistés pour voir leur activité antibactérienne on se basant sur la diffusion de leurs métabolites sur la gélose MH.

Les souches bactériennes sélectionnées ont été revivifiées dans des tubes contenant de bouillon nutritif à l'aide d'une pipette Pasteur flambée et incubées à 37°C pendant 24 heures avant d'être utilisées dans les tests de l'activité. A partir de chaque tube de bouillon nutritif mentionnant un trouble, on aensemencé par stries une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Après incubation on a raclé à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, puis on les déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne doit être bien homogénéisée et la turbidité après a été ajusté à 0.5 McFarland qui correspondre à une absorbance comprise entre 0.08 et 0.1 nm à une longueur d'onde de 620 nm (**Devraju et Satish, 2011**). La suspension bactérienne a été ensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile sur des boîtes de Pétri contenant le milieu MH. L'écouvillon a été trempé dans la suspension bactérienne, puis il est essoré on le faire tournant

sur la paroi interne de tube afin de le décharger au maximum. Le milieu MH a été frotté par des stries sèches sur la totalité de leur surface gélosée de haut en bas en tournant chaque fois la boîte 60° (**Devraju et Satish, 2011**).

- Méthode de cylindre d'Agar (technique de la double culture de diffusion)

Cette technique consiste à prélever des cylindres d'agar de 6mm de diamètre de culture jeune de champignons (de 7 jours) sur la gélose PDA et de les déposer sur un milieu MH gélosé préalablement ensemencé en surface avec les bactéries. L'ensemble est placé à une température ambiante pendant deux heures, pour permettre une pré-diffusion des substances actives sécrétées, après incubation à 37 °C pendant 24 h, les zones d'inhibition autour des cylindres sont mesurées (**Devraju et Satish, 2011**).

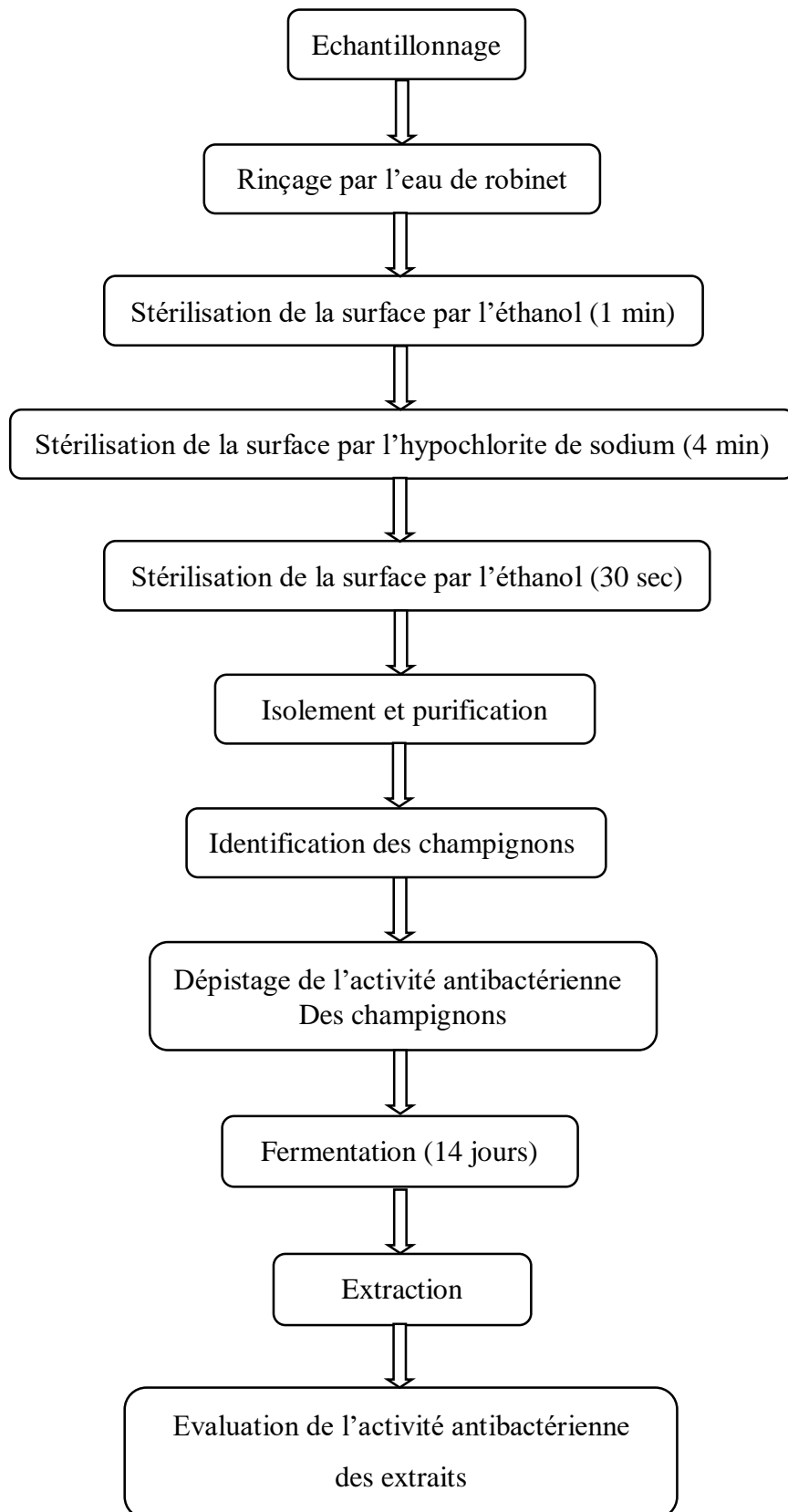
## **2.5. Fermentation et extraction**

Les champignons qui montrent une activité antibactérienne intéressante, ont été mis à croître sur PDA à 25°C pendant cinq jours, deux à trois pièces (0.5 x 0.5 cm) de quatre champignons (isolat A, B, C et D) ont été inoculées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 250 ml de PDB et incubés avec une agitation périodique pendant 14 jours à 25 °C pour la production de métabolites secondaires. Après la période d'incubation, la culture a été filtrée sur un gaz stérile. Le filtrat est centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 min, et le surnageant a été récupéré et extrait avec le même volume (v/v) du butanol puis on le met sous agitation pendant deux heures, la solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décompté pour séparer les deux phases, la phase organique a été récupéré pour être concentré en utilisant un évaporateur rotatif et les métabolites secondaires brut sec étaient obtenus (**Marcellano et al., 2017**).

## **2.6. Activité antibactérienne des extraits**

Chaque extrait fongique a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de façon à obtenir une concentration de 15 mg/ml. 10 µl de chaque extrait ont été déposés à l'aide d'une micropipette sur les disques stériles (6 mm de diamètre) (méthode de diffusion en disque) placés à la surface des géloses préalablement inoculés avec les suspensions bactériennes déjà ajustées à 0,5 McFarland où le DMSO a été utilisé en tant que contrôle négatif. Les boîtes ainsi terminées ont été mises pendant 2 heures à une température ambiante afin que les métabolites puissent diffuser ensuite elles ont été mises à incuber à 37°C pendant 24 heures (**Zhang et al., 2012**).

Après l'incubation le diamètre des zones claires autour des disques révélant l'activité antibactérienne des extraits ont été mesurés (**Figure 14**).



**Figure 14 :** Protocole expérimental (Khan *et al.*, 2017 ; Devraju et Satish, 2011 ; Marcellano *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2012).

## **2.7. Analyse statistique**

L'étude statistique a été faite en utilisant le logiciel GraphPad Prism 8.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont été analysés statistiquement par le test de Student (t teste) afin de comparer les moyennes des zones d'inhibition obtenues par les champignons endophytes isolées (la technique de cylindre d'agar) avec celle obtenues par les mêmes champignons par la technique de cylindre d'agar.

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

# *Résultats et discussions*

## 1. Isolement, purification et identification des champignons endophytes

Après une culture de 7 jours ou plus de quelques jours, la vérification du test de stérilisation a été positive ; aucun champignon n'a poussé dans les boîtes ; ce qui montre que tout champignon émergeant des segments provient des tissus internes de la plante. Tandis que la culture des segments permis d'obtenir 4 isolats fongiques d'aspects différents ce qui nous a permis d'estimer un pourcentage de colonisation de 88%, un pourcentage confirme qu'une seule plante peut être colonisée par plusieurs champignons endophytes.

Les isolats obtenus ont été repiqués plusieurs fois sur la gélose PDA afin d'obtenir des cultures pures permettant leur identification, quelle a été possible grâce à la clé d'identification de **Philippe Dufresne (2018)**.

L'identification des champignons repose sur des critères macroscopiques, microscopiques après isolation et culture sur milieux de culture. Les critères macroscopiques reposent sur l'observation des colonies et de leur couleur recto et verso, leur taille, leur relief, leur aspect (filamenteux, collant), leur transparence (opaque, translucide), l'allure des contours et la pigmentation. Les critères microscopiques sont fondés sur l'aspect morphologique des différentes structures des champignons : le type de thalle (septé ou non), la couleur des hyphes (foncées ou claires), la forme des spores, l'origine des spores (endogène ou exogène), la forme des têtes (en forme de pinceau, aspergillaire) (**Aouati et Chebil, 2018**).

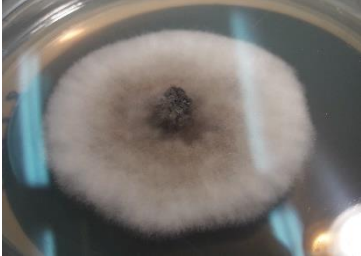
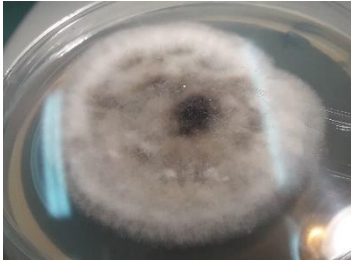
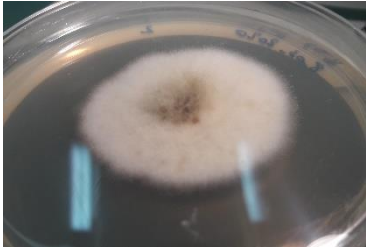

En tenant compte de leurs caractères macroscopiques et aussi microscopiques d'après des cultures de 7 jours, on a trouvé les résultats qui convient (**Tableau 4**).

Deux des quatre isolats obtenus appartiennent au genre *Altenaria* (isolat A et B) qui est un genre de champignons deutéromycètes de la famille des Dematiaceae. Ce genre renferme un grand nombre d'espèces (plus de 60) parasites ou saprophytes.

Un seul isolat (C) appartient au genre *Fusarium* a été identifié de la famille des Monaliaceae, un genre qui comporte plus de 1000 espèces. La forme endophyte de *Fusarium sp.*, a été aussi isolé à partir d'*Artemisia annua* et Pin d'Alep (**Zhang et al., 2012 ; Abdellaoui et Debih, 2019**).

Un seul isolat appartient au genre *Chaetomium* qui comporte entre 80 et 100 espèces selon les documents consultés : les données taxonomiques varient considérablement pour ce genre. L'espèce la plus connue et la plus étudiée est *Chaetomium globosum*.

**Tableau 4** : Les souches fongiques obtenues

Isolat	Caractères macroscopiques	Classification
A		Règne : Champignons Division : Deuteromycotina Classe : Hyphomycètes Famille : Dematiaceae Ordre : Moniliales Genre : <i>Alternaria</i> Espèce : <i>Alternaria sp1</i>
B		Règne : Champignons Division : Deuteromycotina Classe : Hyphomycètes Famille : Dematiaceae Ordre : Moniliales Genre : <i>Alternaria</i> Espèce : <i>Alternaria sp2</i>
C		Règne : Champignons Division : Deuteromycotina Classe : Hyphomycètes Famille : Monaliaceae Ordre : Moniliales Genre : <i>Fusarium</i> Espèce : <i>Fusarium sp</i>
D		Règne : Champignons Division : Ascomycète Classe : Euascomycetes Famille : Chaetomiaceae Ordre : Sordariales Genre : <i>Chaetomium</i> Espèce : <i>Chaetomium sp</i>

# **Conclusion générale**

## Conclusion

Malheureusement la mauvaise utilisation des antibiotiques a conduit à une émergence très inquiétante de bactéries de plus en plus résistantes ce qui constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. Toutefois, dans de nombreuses régions du monde, ce problème n'est pas encore pris avec le sérieux que les infectiologues et microbiologistes lui confèrent.

La conséquence du développement de la résistance est simple à prévoir, mais le grave qu'elle peut favoriser des processus infectieux notamment par la réduction de la capacité du système immunitaire, ce qui rend l'organisme impuissant face aux attaques bactériennes. Certains de ces effets pourraient parfois être corrigés préventivement par le respect de la dose à prendre, les moments de prise et la durée du traitement.

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. Ils sont également capables de produire un très grand nombre de métabolites secondaires de structures chimiques extrêmement différentes et possédant un spectre d'activité pharmacologique très large.

La présente étude a été effectuée dans le but d'isoler, identifier et déterminer l'activité antibactérienne des champignons endophytes isolés à partir de la plante médicinale *Marrubium vulgare L.*

L'isolement et l'identification de ces endophytes, en se basant sur leurs caractères macroscopiques et microscopiques nous a permis d'obtenir quatre isolats fongiques différents appartenant à trois genres : *Alternaria*, *Fusarium* et *Chaetomium*

Les résultats de cette étude révèlent aussi qu'une seule plante peut être colonisée par plusieurs champignons endophytes.

Finalement, en raison de l'importance de ce thème nous espérons de le compléter à l'avenir par une partie expérimentale dans laquelle on cherche beaucoup plus approfondi sur les métabolites secondaires produits par ces champignons et voir ses effets sur l'organisme et son système immunitaire en se basant sur quelques paramètres immunologiques.

## Références

- Abdellaoui, R., & Debih, R. (2019). Etude de la mycoflore endophyte du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Doctoral dissertation, Université Mohamed Boudiaf de M'Sila.
- Adouane Selma (2016). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale. P239. Mémoire du diplôme de magistère en sciences agronomiques, Université Mohamed Khider – Biskra.
- Afra Khiralla, Rosella Spina, Sakina Yagi, Ietidal Mohamed, & Dominique Laurain Mattar. (2017). Endophytic Fungi: occurrence, classification, function and natural products. In *Endophytic Fungi*, 162, 13-50.
- Ahvazi M., Balali GR., Jamzad Z., Saeidi H. (2018). A Taxonomical, Morphological and Pharmacological Review of *Marrubium vulgare* L., An Old Medicinal Plant in Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 17(65), 7-24.
- Andéol Sénéquier-Crozet, Benjamin Canard. (2016). Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. Sciences pharmaceutiques.
- Aouadhi, S. (2010). Atlas de risques de la phytothérapie traditionnelle à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Mémoire de master en toxicologie. Faculté de médecine de Tunisie.
- Aouati C., Chebil B. (2018). Criblage des activités antagoniste des quelques souches endophytes contre des champignons phytopathogènes. Thème de master. Université Oum El Bouaghi. Algérie.
- Arora, J., & Ramawat, K. G. (2017). An introduction to endophytes. In *Endophytes: biology and biotechnology*, 1-23.
- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Latreche, A., & Aouad, L. (2014). Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 12(1), 6-14.
- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Latrèche, A., & Cherifi, K. (2013). Autoécologie du Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) et caractérisation de la biodiversité végétale dans le Djebel de Tessala (Algérie nord-occidentale). In : *Ecologia mediterranea*, 39(2), 39-57.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.
- Carle, S. (2009). La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*, 42.
- Cechinel Filho, V. (2018). *Marrubium vulgare* L. In *Medicinal and Aromatic Plants of South America* (pp. 317-321). Springer, Dordrecht.

- Choumaïssa Y., Chaima S., & Hadjer G. (2019). Les antibiotiques et l'immunité. Mémoire du Diplôme de Master. Université 8 Mai 1945 Guelma.
- Deshmukh, S. K., Prakash, V., & Ranjan, N. (2018). Marine fungi: A source of potential anti-cancer compounds. *Frontiers in microbiology*, 8, 2536.
- Devaraju R., Satish S. (2011). Endophytic Mycoflora of L. and Studies on Antimicrobial Activity of its Endophytic sp. *Society of Applied Sciences*, 2, 75-79.
- Dutertre, J. M. J. (2011). Enquête prospective au sein de la population consultant dans les cabinets de médecine générale sur l'île de la réunion : à propos des plantes médicinales, utilisation, effets, innocuité et lien avec le médecin généraliste (Doctoral dissertation).
- Dutta D, Puzari KC, Gogoi R, Dutta P. (2014). Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 57(5) : 621-629.
- Ebrahimi A., Asgharian S., Habibian S. (2010). Antimicrobial activities of isolated endophytes from some Iranian native medicinal plants. *Iranian journal of pharmaceutical sciences*, 6(3): 217-222.
- Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(5), 980-987.
- Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2016). Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in microbiology*, 7(1538).
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. (2013). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in microbiology*, 4, 353.
- Herzog, K., & Krause, M. (2015, March). Résistance bactérienne : début de l'ère post-antibiotique. In *Forum Médical Suisse*, 15(12), 266-270.
- Hordé P., 2014. Plantes médicinales Consulté le 8 juillet 2015. <http://santemedecine.journaldesfemmes.com/faq/32986-plante-medicinale>
- Jha, S. (Ed.). (2019). *Endophytes and Secondary Metabolites*. Springer International Publishing.
- Jia, M., Chen, L., Xin, H. L., Zheng, C. J., Rahman, K., Han, T., & Qin, L. P. (2016). A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in microbiology*, 7(906).
- Joseph, B., & Priya, R. M. (2011). Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in. *American Journal of biochemistry and Molecular biology*, 1(3) : 291-309.
- Khan R., Shahzad S., Choudhary MI., Khan SA., Ahmad A. (2010). Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pak J Bot*, 42(2), 1281-1287.

Khan, A. L., Gilani, S. A., Waqas, M., Al-Hosni, K., Al-Khiziri, S., Kim, Y. H. & Hussain, J. (2017). Endophytes from medicinal plants and their potential for producing indole acetic acid, improving seed germination and mitigating oxidative stress. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 18(2), 125-137.

Kuhn, A. (2019). *Bacterial Cell Walls and Membranes*. 92. Springer.

Ladjouzi R. (2013). Notions de base de la bactériologie générale. Cours pédagogique au profit des étudiants de deuxième année SNV. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université de Bejaia, Algérie.

Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2016). Gibberellins in *Penicillium* strains: challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiological research*, 183, 8-18.

Marcellano JP., Collanto AS., Fuentes RG. (2017). Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from the Bark of *Cinnamomum mercadoi*. *Pharmacognosy Journal*, 9(3).

Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., & Stanys, V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(4), 465-478.

Moufid, A., & Eddouks, M. (2012). *Artemisia herba alba* : a popular plant with potential medicinal properties. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 15(24): 1152-1159.

Nouara, Zeriguine, & Ouedjdane, Belayadi (2019). Activités antibactérienne et enzymatique d'un champignon endophyte *Penicillium SP* (Doctoral dissertation).

Padhi L, Mohanta YK, Panda SK. (2013). Endophytic fungi with great promises: A review. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 3(3): 152-170.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177-192.

Pimentel IC., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Stuart RM., Azevedo JL. (2006). Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian archives of biology and technology*, 49(5), 705-711.

Pimentel MR., Molina G., Dionísio AP., Junior MRM, & Pastore GM., (2011). The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-11.

Praptiwi MR, Wulansari D, Fathoni A, Agusta A.(2018). Antibacterial and antioxidant activities of endophytic fungi extracts of medicinal plants from Central Sulawesi. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(08): 069-074.

Reygaert WC. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3): 482-501.

Roselló-Móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 209-216.

- Sagar, S., Kaistha, S., Das, A. J., & Kumar, R. (2019). Antibiotic Resistant Bacteria: A Challenge to Modern Medicine. Springer.
- Selim, K. A., El Ghwas, D. E., Selim, R. M., & Hassan, M. I. A. (2017). Microbial volatile in defense. In *Volatiles and Food Security* 135-170. Springer, Singapore.
- Selim, K. A., El-Beih, A. A., Abd El-Rahman, T. M., & El-Diwany, A. I. (2012). Biology of endophytic fungi. *Curr Res Environ Appl Mycol* 2 (1): 31–82.
- Selim, K. A., El-Beih, A. A., Abdel-Rahman, T. M., & El-Diwany, A. I. (2016). High expression level of antioxidants and pharmaceutical bioactivities of endophytic fungus *Chaetomium globosum* JN711454. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(2), 131-140.
- Selim, K. A., Elkhateeb, W. A., Tawila, A. M., El-Beih, A. A., Abdel-Rahman, T. M., El-Diwany, A. I., & Ahmed, E. F. (2018). Antiviral and antioxidant potential of fungal endophytes of Egyptian medicinal plants. *Fermentation*, 4(3), 49.
- Sudha, V., Govindaraj, R., Baskar, K., Al-Dhabi, N. A., & Duraipandiyan, V. (2016). Biological properties of endophytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.
- The Angiosperm Phylogeny Group (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105-121.
- Uritu, C. M., Mihai, C. T., Stanciu, G. D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., ... & Tamba, B. I. (2018). Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. *Pain Research and Management*.
- Vasundhara, M., Reddy, M. S., & Kumar, A. (2019). Secondary Metabolites from Endophytic Fungi and Their Biological Activities. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 237-258. Elsevier.
- Zhang H., Bai X., Wu B. (2012). Evaluation of antimicrobial activities of extracts of endophytic fungi from *Artemisia annua*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 7(2), 120-123.