

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N°:



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : MCROBIOLOGIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour l'obtention

Du diplôme de Master Académique

Par : CHEBABHA Chahira & CHABI Ibtissam

MAKHLOUF Farida & ZOURIG Chourok Mahdia

Intitulé

**Etude de l'activité antibactérienne des
champignons endophytes isolé de *Retama raetam***

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. HARRAR Abdenasser	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Dr. BENSLAMA Abderrahim	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr. GUATOUACHE Mourad	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur

Année universitaire : 2022/2023

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

A mes chers parents ; Ma mère et mon père pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements

Mes chères sœurs : Chaïma et Marwa

A mes chers frères : Zakaria et Yahia

A mon fiancé Khaled pour les encouragements et l'aide.

A tous la famille CHABI et GHAOUAS

A mes très chères copines Mouchira, Yasmine et Houda avec lesquelles j'ai traversé la plupart de mon parcours universitaire et les plus beaux souvenirs, je vous serai reconnaissant tout ce que vous avez fait pour moi, je vous souhaite à tous le succès.

A tous mes amis m'ont toujours encouragé, et qui n'ont pas changé dans leur amitié.

A mes trinôme Farida, Chorouk et Chahira

Ibtissam

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

A ma mère, source de tendresse

À mon père, la lumière de mes yeux,

*À mes frères : ACHOUR, REZKI et mes sœurs : HAYAT,
RABIAA et AHLEM, source de ma force.*

*Aux jeunes pousses : Abderrahmane, Alaa errahmane,
Djawad, Aridj*

A tous la famille CHEBABHA et BENKHALED

*À mon fiancé bien-aimé, qui me conseille d'étudier et de ne pas
manquer*

*À mes amis et proches qui m'ont donné tout ce qu'ils avaient
pour atteindre ce que je voulais et réaliser à nouveau mon
rêve*

A mes trinôme Farída, Chorouk et Ibtissam

Chahira

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

A mon cher père, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect. A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit "non" pour me faire plaisir. Ma seule sœur, la chérie de mon cœur, mon âme sœur, et mon battement de cœur et à mes frères, mon soutien et ma côte ferme qui ne tend pas et mon fiancé qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur. A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci à tous pour leur amour et leurs encouragements. Sans oublier mon ami, que ma mère n'a pas mis au monde, pour tous ses conseils chargés de prières de réussite et de réussite. Tout mon amour, mes remerciements et mes mots d'appréciation à mes amis avec qui la vie m'a réuni. Merci à eux pour leurs efforts, leur patience et leur compréhension tout au long de ce projet.

Farida

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

*Mes chères parentes, qui ne cessent de donner d'eux-mêmes
d'innombrables façons.*

*Ma mère Saaida Symbole de l'amour, de la tendresse, de la
patience et de la fidélité*

*MON Père Aïssa Qui a dédié sa vie pour moi, il m'a toujours
guidé et encouragé dans mes études.*

*Mes frères Atif et Bouzide et Akram ; mes Soeurs Hadjer et
Amal et leurs enfants.*

*Je prie Dieu le tout puissant de préserver notre attachement
mutuel et d'exaucer tous nos rêves.*

A toute la famille ZOURIG

*Mes amis qui m'encouragent et me soutiennent Je dédie ce
projet à toutes les personnes de ma vie qui touchent mon cœur.*

A mes trinômes Farida, Ibtissam et Chahira

Chorouk

REMARCIEMENT

En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force, le courage, la volonté ainsi que la patience pour dépasser toutes les difficultés. Nos premiers remerciements vont à notre encadreur BENSLEMA Abderrahim pour avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir suivi tous au long de la réalisation de ce mémoire et pour ses précieux conseils. Nous remercions HARRAR Abdenasser d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions vivement Dr. GUATOUACHE Mourad d'avoir accepté de juger ce mémoire de master. Nous tenons à remercier Mme. MERAH Safia qui nous a guidé et supervisé le déroulement et la réalisation des travaux pratiques de ce mémoire et gratitude à tous les enseignants du Département de Biochimie et Microbiologie, Université de M'sila, sans exception, pour leurs efforts d'influence et leurs efforts durant ces cinq années de formation. C'est avec grand plaisir que nous approchons de la réalisation de notre travail. Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cet humble travail.

Sommaire

Résumé.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Liste des figures	iii
Liste des tableaux.....	iv
Introduction	1
Synthèse bibliographique	1
I. Généralité sur les bactéries.....	3
I.1 Définition d'une bactérie.....	3
I.2 Bactéries à Gram positive.....	3
I.3 Bactéries à Gram négative.....	4
II. Généralité sur les antibiotiques.....	5
II.1 Définition des antibiotiques	5
II.2 Mode d'action des antibiotiques	5
II.2.1 Action sur la paroi et sur la membrane cytoplasmique.....	5
II.2.2 Action sur la synthèse d'ADN et sur la synthèse protéique	5
II.3 Origine de la résistance	6
II.3.1 Résistance naturelle.....	7
II.3.2 Résistance acquise.....	7
II.4 Les mécanismes de résistance aux antibiotiques	9
II.4.1 L'inactivation enzymatique	9
II.4.2 Pompes à efflux	9
II.4.3 Modification de la cible	10
III. Généralités sur les endophytes.....	10
III.1 Définition d'un organisme endophyte	10
III.2 Diversité et classification	11
<i>Endophytes classe 1</i> (clavicipitacés).....	12

<i>Endophytes de classe 2</i>	13
<i>Endophytes de classe 3</i>	13
<i>Endophytes de classe 4</i>	13
III.3 Les activités biologiques des métabolites secondaires des endophytes	14
III.3.1 Champignons endophytes comme source de substances antioxydantes	14
III.3.2 Champignons endophytes comme source de substances anticancéreuses	15
III.3.3 Champignons endophytes comme source de substances antivirales	15
III.3.4 Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes.....	16
Partie pratique.....	2
IV. Matériel et Méthode	17
IV.1 Matériel.....	17
IV.1.1 Matériel végétal	17
IV.1.2 Souche bactérienne.....	17
IV.1.3 Produits chimiques	18
IV.1.4 Appareillages	18
IV.2 Méthodes	18
IV.2.1 Échantillonnage	18
IV.2.2 Isolement et purification des champignons endophytes	18
IV.2.3 Identification des champignons isolés	19
IV.2.4 Activité antibactérienne des champignons endophytes isolés.....	19
IV.2.5 Fermentation et extraction	20
IV.2.6 Activité antibactérienne des extraits	20
V. Résultats et discussion.....	23
V.1 Isolement, purification et identification des champignons.....	23
V.2 Activité antibactérienne des champignons endophytes	26
V.3 Activité antibactérienne des extraites fongiques.....	29
Conclusion	32

Références bibliographiques

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو عزل والتعرف على الفطريات التعايشية للنبات الطبي الجزائري *Retama raetama* ثم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لهذه الفطريات ومستخلصاتها. من خلال العزلة والتعرف، حصلنا على أربع انواع من ثلاثة أجناس من *Aspergillus* و *Alternaria* و *Aurobasidium*. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للفطريات باستخدام تقنية اسطوانة الاجار، حيث أظهرت جميع السلالات الفطرية المعزولة نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد واحدة على الأقل من البكتيريا المختبرة، مع مناطق تثبيط تتراوح بين 12 و 25 مم. علاوة على ذلك، كان *Aspergillus niger* ذات النشاطات المضادة للبكتيريا الأعلى، وكانت مناطق التثبيط ضد بكتيريا *Staphylococcus epidermice* 29 ملم على التوالي. بعد ذلك، تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات أسيتات الإيثانول لأربعة فطريات (واحد من كل جنس) بواسطة تقنية الانتشار القرصي. أظهرت النتائج أن *Aspergillus niger* و *Alternaria alternata* لهما أكبر منطقة تثبيط تبلغ 9.5 ملم ضد *Staphylococcus aureus*. أخيراً، تؤكد نتائجنا بوضوح أن النبتة الداخلية للنبات الطبي *Retama raetama* هي مصدر للمواد المضادة للميكروبات ولديها إمكانية للتطور في المجال الصيدلاني.

Abstract

The aim of this study was to isolate and identify the endophytic fungi of the Algerian medicinal plant *Retama raetam*, and then to evaluate the antibacterial activity of these fungi and their extracts. By isolation and identification, we obtained four strains of three genera of *Aurobasidiuim*, *Alternaria* and *Aspergillus*. The antibacterial activity of the fungi was assessed by the agar cylinder technique, in which all-fungal strains isolated showed antibacterial activity against at least one of the bacteria tested, with zones of inhibition varying between 12 and 25 mm. Moreover, *Aspergillus niger* had the highest antibacterial activities, and their zones of inhibition against *Staphylococcus epidermis* were 29 mm respectively. Next, the antibacterial activity of acetate ethanol extracts of four fungi (one from each genus) was determined by the disk diffusion technique. The results showed that *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* had the largest zone of inhibition of 9.5 mm against *Staphylococcus aureus*. Finally, our results clearly confirm that the endophyte of the medicinal plant *Retama reatma* is a source of antimicrobial substances and has potential for development in the pharmaceutical field.

Résumé

Le but de cette étude est d'isoler et d'identifier les champignons endophytes de la plante médicinale Algérienne *Retama raetam*, puis d'évaluer l'activité antibactérienne de ces champignons et de leurs extraits. Par isolement et identification, nous avons obtenu quatre souches de trois genres d'*Aurobasidium*, *Alternaria* et *Aspergillus*. L'activité antibactérienne des champignons a été évaluée par la technique du cylindre de gélose, dans laquelle toutes les souches fongiques isolées présentaient une activité antibactérienne contre au moins une des bactéries testées, avec des zones d'inhibition variant entre 12 et 25 mm. De plus, *Aspergillus niger* avaient les activités antibactériennes les plus élevées, et leurs zones d'inhibition contre *Staphylococcus epidermisi* étaient respectivement de 29 mm. Ensuite, l'activité antibactérienne des extraits à l'éthanol d'acétate de quatre champignons (un de chaque genre) a été déterminée par la technique de diffusion sur disque. Les résultats ont montré que *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata* avait la plus grande zone d'inhibition de 9.5 mm contre *Staphylococcus aureus*. Enfin, nos résultats confirment clairement que l'endophyte de la plante médicinale *Retama retam* est une source de substances antimicrobiennes et a un potentiel de développement dans le domaine pharmaceutique.

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection.

C-endophyte : Endophytes clavicipitacées.

DES : Dark Septate Endophyte.

DMSO : Dimethylsulfoxyde.

MH : Muller Hinton.

MLS : Macrolide-lincosamimides-streptogramines.

NC-endophyte : Endophytes non clavicipitacées.

PDA : Gélose pomme de terre dextrose.

PDB : Bouillon de pomme de terre au dextrouse.

ROS : Espece reactif de l'oxygene.

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

Liste des figures

Figure 1: Structure générale d'une bactérie	3
Figure 2: Représentation graphique de la paroi de bactérie gram positif	4
Figure 3: Représentation de la paroi des bactéries gram négatif	5
Figure 4: les cibles d'antimicrobiens	6
Figure 5: La mutation chromosomique	7
Figure 6: Mécanismes de transfert horizontal de gènes	9
Figure 7: Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques	10
Figure 8: Les classes d'endophytes selon la localisation	14
Figure 9: Structures de certains métabolites secondaires pertinents sur le plan industriel utilisés comme composés anticancéreux	15
Figure 10: Structure de l'acide cétonique A et B	16
Figure 11: Retama retam (photo prise par les auteurs).....	17
Figure 12: Protocole expérimental.....	22
Figure 13: Les zones d'inhibition des champignons contre les souches bactériennes	28
Figure 14: Moyennes des zones d'inhibitions des champignons sur les groupes des bactéries... ..	29
Figure 15: Les zones d'inhibitions des extraits des champignons endophytes A. niger et A. alternata contre les souches bactériennes	30
Figure 16: Moyennes des zones d'inhibition des extraits par groupe des bactéries.	31

Liste des tableaux

Tableau 1: Critères symbiotiques utilisés pour caractériser les classes endophytes fongiques...	12
Tableau 2: la souche bactérienne testée.....	17
Tableau 3: Les souches fongiques endophytes identifiées.....	24
Tableau 4: Activité antibactérienne des champignons en zones d'inhibitions (mm).	26
Tableau 5: Activité antibactérienne des extraits en zones d'inhibition (mm).	30

Introduction

Introduction

Le développement de la résistance des bactéries et champignons pathogènes existants aux médicaments commerciaux est un problème pertinent auquel sont confrontés les services de santé et est devenu une préoccupation sérieuse dans le monde. Plusieurs facteurs ont favorisé ce scénario, tels qu'une utilisation extensive et souvent inappropriée d'antibiotiques, de mauvaises conditions d'hygiène, des mouvements continus de voyageurs, augmentation du nombre de patients immunodéprimés et retard dans le diagnostic des infections. En conséquence, une recherche intensive de nouveaux agents antimicrobiens efficaces est nécessaire, ce qui est facilité par l'exploration de nouvelles niches et habitats.

Une gamme d'espèces microbiennes sont connues pour être endophytes, colonisant les espaces inter- et intracellulaires des tissus végétaux sans causant des dommages apparents et semblant être associés à toutes les plantes des écosystèmes naturels (**Rodriguez et al., 2009**). Parmi micro-organismes endophytes, les champignons entretiennent une relation intime avec des plantes hôtes et peut produire des composés qui favorisent la croissance végétative, la compétitivité et la protection de l'hôte contre herbivores et pathogènes (**Porras-Alfaro et Bayman, 2011**). Les champignons endophytes représentent une grande diversité d'adaptations microbiennes qui ont évolué dans des environnements particuliers et inhabituels, ce qui en fait une excellente source d'étude et de recherche de nouveaux médicaments à des fins médicales, industrielles et agricoles (**Yu et al., 2010 ; Li et al., 2012 ; Teiten et al., 2013 ; Mapperson et al., 2014**). Ces les micro-organismes sont bien connus pour produire des substances secondaires bioactives métabolites tels que les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes, les quinones, isocoumarines, lignanes, phénylpropanoïdes, phénols et lactones (**Radic et Štrukelj, 2012 ; Deshmukh et al., 2014**). Les plantes utilisées en médecine traditionnelle ont joué un rôle très important dans la recherche de nouvelles souches bioactives d'endophytes. Champignons, car il est possible que leurs caractéristiques bénéfiques soient un résultat des métabolites produits par leur communauté endophyte.

La signification biologique de ces endophytes isolés de plantes hôtes fait l'objet de nombreux travaux scientifiques, c'est pourquoi nous nous intéressons à la recherche de l'activité antibactérienne des souches de champignons endophytes isolés de *Retama raetam* c'est un des arbustes qui poussent dans les zones désertiques d'Algérie, où ils sont couramment utilisés comme remèdes curatifs en raison de leurs propriétés antiseptiques, antipyrétiques et anti-diarrhéiques. Récemment de nombreuses études ont été menées sur les activités pharmacologiques de la plante. Les résultats ont confirmé que différentes parties de cette plante

possèdent des propriétés antioxydantes, antifongiques, antibactériennes, antivirales, et cytotoxiques. En plus le dosage chimique des principes actifs a montré que la plante est riche en flavonoïdes, en alcaloïdes et en pinitol (**Al-Sharari et al., 2020**). C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail dont les objectifs sont les suivants :

- Isolement, purification et identification des champignons endophytes de la plante médicinale *Retama raetam*.

- Evaluation de l'activité antibactérienne des endophytes.
- Fermentation et extraction des métabolites par l'éthyle d'acétate.
- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits par le test de diffusion sur disque.

Synthèse
bibliographique

I. Généralité sur les bactéries

I.1 Définition d'une bactérie

La bactérie est un micro-organisme ubiquiste, unicellulaire et sans noyau (procaryote) dont le génome est constitué d'ADN. Celui-ci consiste en un seul chromosome, et on note éventuellement la présence de plasmides (petit morceau d'ADN circulaire). L'ensemble des bactéries forme le règne des eubactéries (Eubacteria).

Les bactéries ont également une membrane cellulaire et une paroi cellulaire souvent constituées de peptidoglycane. Ensemble, la membrane cellulaire et la paroi cellulaire sont appelées enveloppe cellulaire. De nombreuses bactéries ont besoin d'une paroi cellulaire pour survivre. (Madison et Sahibjot, 2021)

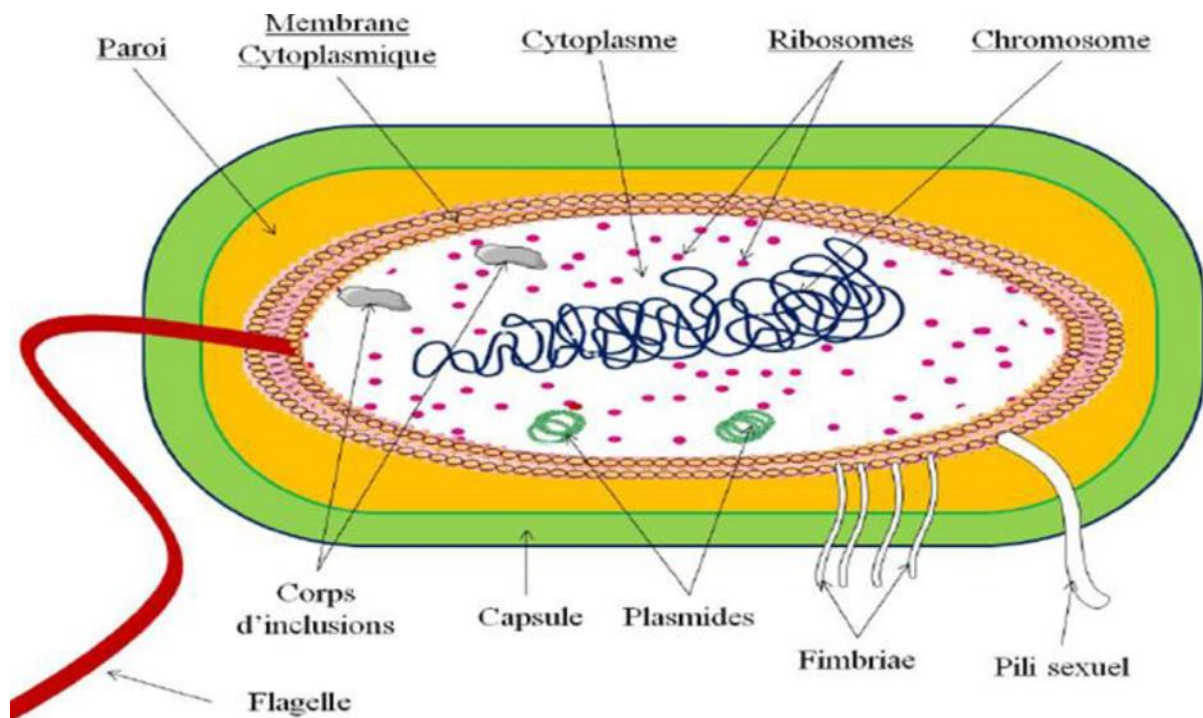


Figure 1: Structure générale d'une bactérie (Ladjouzi, 2013).

La paroi cellulaire bactérienne est constituée de peptidoglycane, une barrière protectrice essentielle pour les cellules bactériennes qui encapsule la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes à Gram positif et à Gram négatif. Le peptidoglycane est une structure rigide (Amy *et al.* 2018).

I.2 Bactéries à Gram positive

Les bactéries Gram-positives sont des bactéries qui contiennent une paroi cellulaire épaisse. N'ont pas de membrane externe, contrairement aux bactéries Gram-négatives. La paroi cellulaire

est constituée de plusieurs couches de molécules et de protéines. Il protège les bactéries contre les dommages. Couche de peptidoglycane : dans les bactéries Gram-positives, le peptidoglycane est une structure de 20 à 80 nm (nanomètre) d'épaisseur. (Figure 02) (William et al., 2022).

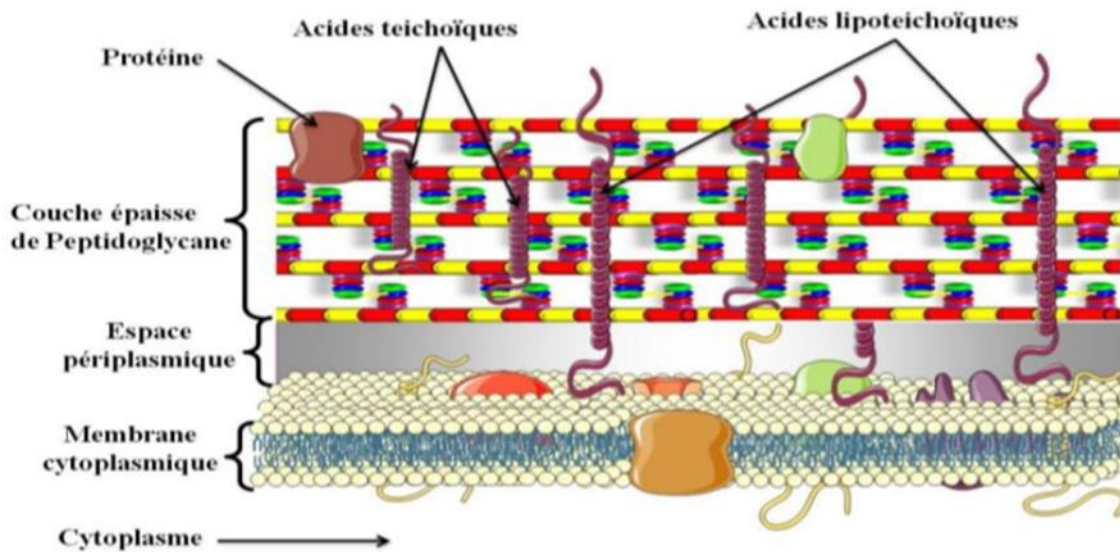


Figure 2: Représentation graphique de la paroi de bactérie gram positif (Ladjouazi ,2013)

I.3 Bactéries à Gram négative

Les bactéries Gram-négatives ont une membrane externe. Cependant, ils ont une paroi cellulaire de peptidoglycane plus mince. Les bactéries Gram-négatives ont deux membranes - une externe et une interne. Ces bactéries ont également une paroi cellulaire de peptidoglycane plus mince que les bactéries Gram-positives, qui se trouvent entre leurs deux membranes (William et al., 2022).

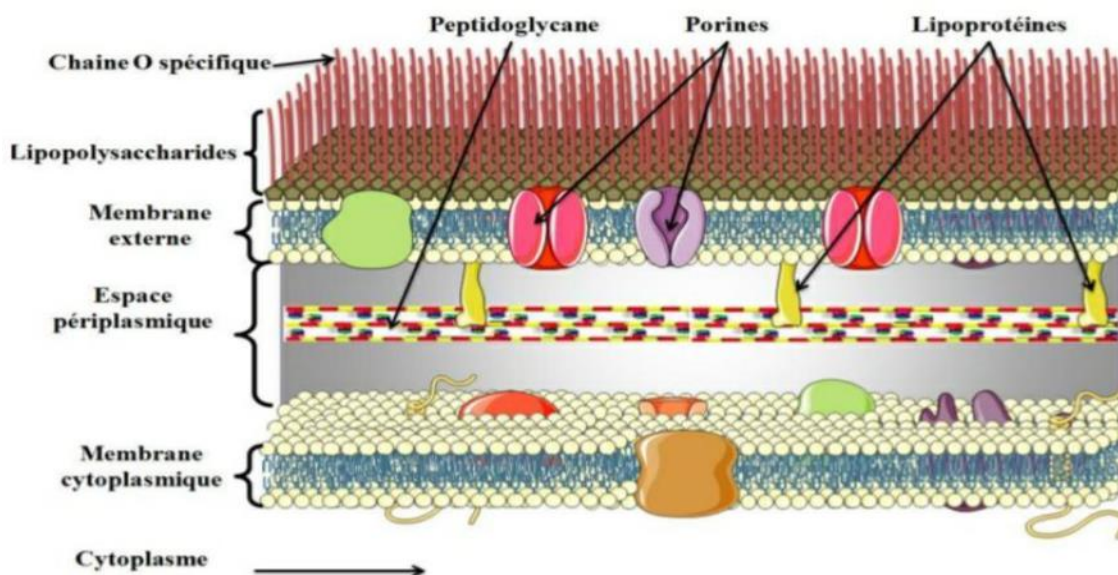


Figure 3: Représentation de la paroi des bactéries gram négatif (**Ladjouazi, 2013**).

II. Généralité sur les antibiotiques

II.1 Définition des antibiotiques

Un antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») sont des composés naturels, synthétiques et semi-synthétiques qui présentent des activités antimicrobiennes (**Catteau et al ., 2018**) qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus. (**Britannica, 2023**).

II.2 Mode d'action des antibiotiques

II.2.1 Action sur la paroi et sur la membrane cytoplasmique

Les cellules bactériennes sont entourées de parois cellulaires constituées de peptidoglycane. La biosynthèse des peptidoglycanes est essentielle à l'intégrité de la structure de la paroi cellulaire, et c'est la couche la plus externe et le composant principal de la paroi cellulaire. Des antibiotiques spécifiques interfèrent avec la biosynthèse des peptidoglycanes, détruisant ainsi l'intégrité de la paroi cellulaire. L'inhibition de la biosynthèse des peptidoglycanes de la paroi cellulaire est une cible privilégiée pour la découverte d'agents antibactériens. (**Kirmusaoğlu, 2019**).

La membrane bactérienne fournit une perméabilité sélective pour l'homéostasie cellulaire et la transduction d'énergie métabolique. Plusieurs agents antimicrobiens interfèrent avec de multiples cibles par l'interaction d'une fraction lipophile avec la membrane bactérienne, entraînant la destruction des structures membranaires et une altération fonctionnelle. (**Kirmusaoğlu, 2019**).

II.2.2 Action sur la synthèse d'ADN et sur la synthèse protéique

Les antibiotiques peuvent inhiber la réplication, la transcription et la synthèse de la folate des microorganismes. Les médicaments quinolone peuvent interférer avec la synthèse de l'ADN en inhibant la topoisomérase, une enzyme impliquée dans la réplication de l'ADN. Par exemple, la lévofloxacine de quinolone de la deuxième génération de la lévofloxacine, de la norfloxacine et de la ciprofloxacine sont actifs contre les bactéries gram-négatives et à gram-positives. Il existe également des antibiotiques qui interfèrent avec la synthèse d'ARN en inhibant les polymérases d'ARN, telles que la doxorubicine et l'actinomycine D (dactinomycine). Ils interfèrent avec les systèmes bactériens et mammifères et sont donc les plus couramment utilisés comme

médicaments antinéoplasiques et anti tumoraux, attaquant des cellules malignes en croissance rapide ainsi que des cellules normales.

La plupart des antibiotiques interfèrent avec les sous-unités 30S ou 50S du ribosome bactérien 70S pour bloquer la synthèse des protéines bactériennes. Par exemple, les tétracyclines, dont la doxycycline, empêchent la liaison de l'aminocyl-ARNt en bloquant le site A (aminocyl) du ribosome 30S. Ils sont capables d'inhiber la synthèse des protéines dans les ribosomes 70S et 80S (eucaryotes) (Figure4) (Kirmusaoglu, 2019).

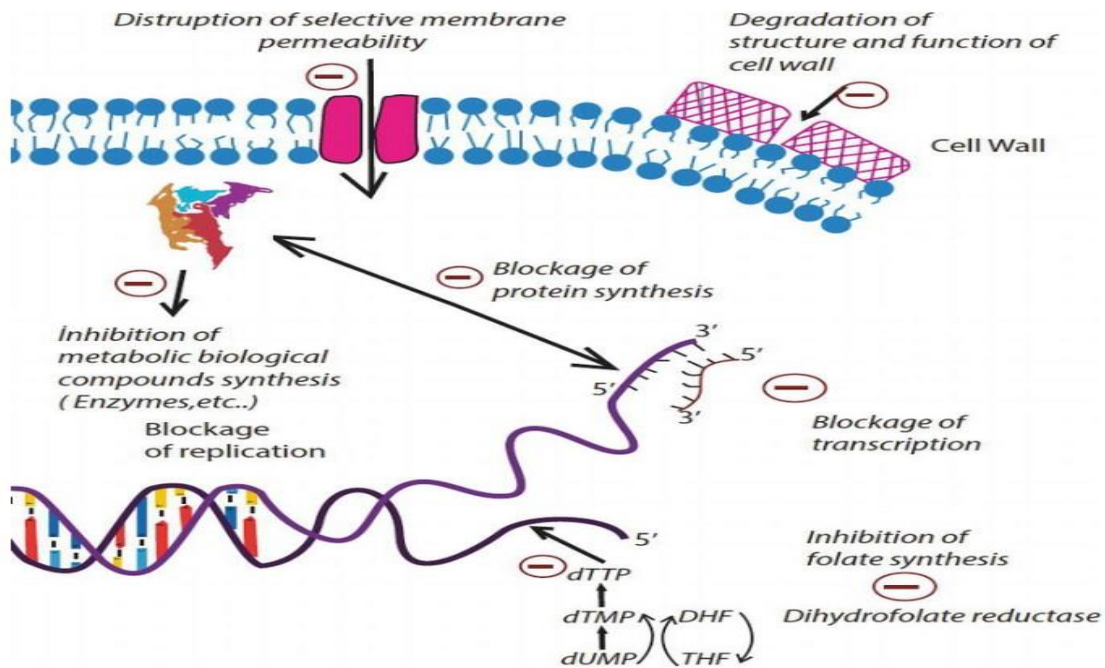


Figure 4: les cibles d'antimicrobiens (Kirmusaoglu, 2019)

II.3 Origine de la résistance

La résistance aux antibiotiques est un phénomène général observé pour toutes les espèces bactériennes donc est une résistante à plusieurs familles d'antibiotiques. En plus il a un grand pouvoir d'adaptation qui leur permet d'acquérir de nouvelles propriétés par exemple modification de leur génome ou information génétique nouvelle leur permettant de résister aux antibiotiques (Pascale, 2014). Et donc divisé La résistance bactérienne aux antibiotiques en deux origines essentielles, naturelle et acquise. Ces dernière est développée en fonction des conditions métaboliques mais la première est programmée au niveau du pool génomique (Dorothy et Julian, 2010).

II.3.1 Résistance naturelle

Les gènes naturellement présents dans le chromosome de l'hôte bactérien confèrent une résistance intrinsèque. Toutes les espèces bactériennes présentent une résistance intrinsèque à des classes d'antimicrobiens spécifiques. La biologie de ces mécanismes diffère selon les bactéries. Certaines bactéries confèrent une résistance par une expression accrue des systèmes de pompe à efflux, qui chassent les antibiotiques des cellules avant qu'ils n'atteignent l'emplacement cible, tandis que d'autres manquent de systèmes de transport appropriés. En conséquence, les antibiotiques ne peuvent pas pénétrer la paroi cellulaire et atteindre les points cibles. Plusieurs bactéries possèdent des gènes ou des enzymes qui confèrent une résistance innée aux antibiotiques (**Hasan *et al.* , 2021**).

II.3.2 Résistance acquise

La résistance acquise est un trait qui n'affecte que quelques (ou parfois plusieurs) souches d'une espèce donnée. Il est moins stable, mais généralement répandu dans le monde bactérien (**Lozniewski *et al.* , 2010**). Les bactéries peuvent développer une résistance à des antibiotiques auparavant sensibles, ce qui implique une modification génétique. Cette résistance est généralement instable. Les modifications peuvent être de deux types, l'une est une mutation spontanée et l'autre est des gènes acquis microbiens.

- Mutation chromosomique (évolution verticale)

La résistance acquise qui se développe en raison d'une mutation et d'une sélection chromosomiques est appelée évolution verticale. L'évolution verticale est strictement une question d'évolution darwinienne guidée par les principes de la sélection naturelle : une mutation spontanée dans le chromosome bactérien confère une résistance à un membre de la population bactérienne (**Ratul, 2008**).

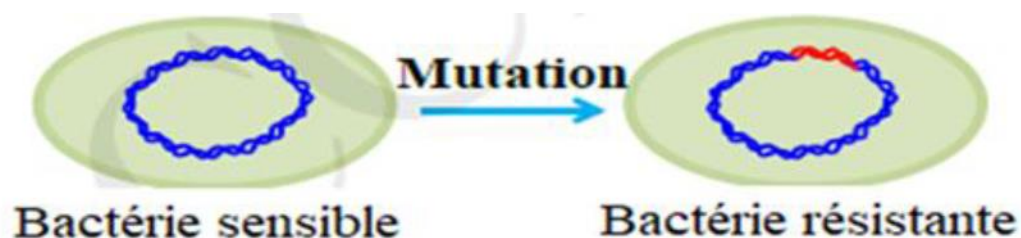


Figure 5: La mutation chromosomique (**Li *et al.* , 2019**)

- Acquisition de gènes de résistance par un autre organisme (évolution horizontale)

Les gènes de résistance aux antibiotiques sont souvent situés sur des plasmides ou des transposons et peuvent être transférés d'une cellule à l'autre par conjugaison, transformation ou

transduction. Cet échange de gènes permet à la résistance de se propager rapidement dans une population de bactéries et parmi différentes espèces de bactéries. C'est ce qu'on appelle la transmission horizontale. Ce type de résistance aux antibiotiques pose des problèmes majeurs aux médecins traitant des maladies infectieuses **(Coleman, 2014)**.

D'abord la conjugaison est une recombinaison génétique dans laquelle il y a un transfert d'ADN d'une bactérie donneuse vivante à une bactérie receveuse vivante par contact de cellule à cellule. La conjugaison est codée par des plasmides ou des transposons. Il s'agit d'une bactérie donneuse qui contient un plasmide conjugatif et d'une cellule réceptrice qui n'en contient pas. Un plasmide conjugatif est autotransmissible, en ce sens qu'il possède tous les gènes nécessaires pour que ce plasmide se transmette à une autre bactérie par conjugaison. **(Gary, 2022)**. Ensuite la transduction, implique le transfert d'un fragment d'ADN d'une bactérie à une autre par un bactériophage. Il existe deux formes de transduction : la transduction généralisée et la transduction spécialisée. Lors de la réplication des bactériophages lytiques et des bactériophages tempérés, il arrive parfois que la capsid du phage s'assemble accidentellement autour d'un petit fragment d'ADN bactérien. Lorsque ce bactériophage, appelé particule transductrice, infecte une autre bactérie, il injecte le fragment d'ADN bactérien donneur qu'il transporte chez le receveur où il peut ensuite être échangé contre un morceau d'ADN du receveur par recombinaison homologue **(Gary, 2022)**. Enfin la transformation, c'est une forme de recombinaison génétique dans laquelle un fragment d'ADN d'une bactérie morte et dégradée pénètre dans une bactérie réceptrice compétente et est échangé contre un morceau d'ADN du receveur. La transformation n'implique habituellement qu'une recombinaison homologue, une recombinaison de régions d'ADN homologues ayant presque les mêmes séquences nucléotidiques. Généralement, cela implique des souches bactériennes similaires ou des souches de la même espèce bactérienne. Les bactéries compétentes sont capables de lier beaucoup plus d'ADN que les bactéries non compétentes. Certains de ces genres subissent également une autolyse qui fournit ensuite de l'ADN pour la recombinaison homologue. De plus, certaines bactéries compétentes tuent les cellules non compétentes pour libérer l'ADN pour la transformation **(Gary, 2022)**.

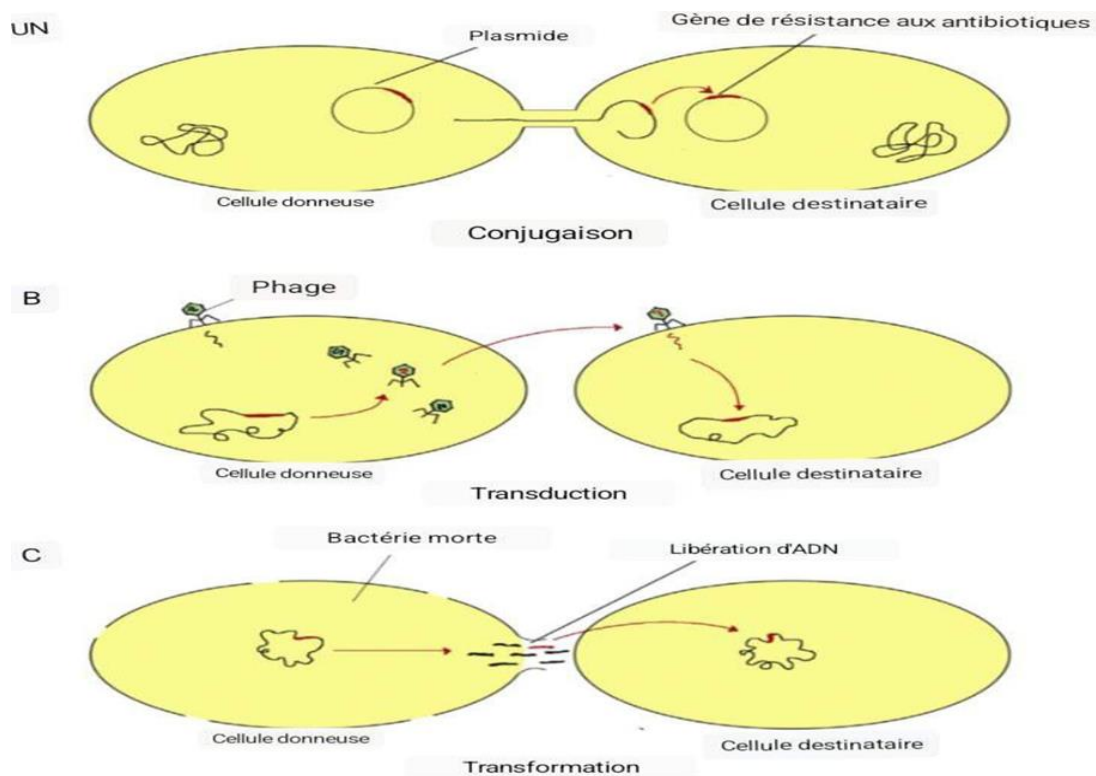


Figure 6: Mécanismes de transfert horizontal de gènes (Zheng *et al.* , 2019)

II.4 Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

II.4.1 L'inactivation enzymatique

L'inactivation enzymatique des antibiotiques représente un mécanisme majeur de résistance aux β -lactamines, aux aminoglycosides et aux phénols. Ce type de résistance s'applique également au groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines). L'enzyme modifie le noyau actif de l'antibiotique. En clivant ou en ajoutant des groupes chimiques, l'antimicrobien est empêché de se lier à sa cible et d'entraîner une perte d'activité. Ces enzymes sont souvent associées à des éléments génétiques mobiles (Muylaert et Mainil, 2012).

II.4.2 Pompes à efflux

L'efflux actif est médié par des protéines transmembranaires appelées pompes d'efflux ou transporteurs actifs, et est un type de processus utilisé par les bactéries et les cellules eucaryotes (y compris les protozoaires) pour expulser les métabolites et les composés toxiques étrangers tels que les antibiotiques et d'autres médicaments. Ces pompes à efflux ont généralement une particularité des substrats considérables dont seuls certains confèrent une résistance aux antibiotiques. La résistance résulte de la réduction des antimicrobiens dans le cytoplasme bactérien, ce qui empêche et limite les antibiotiques d'atteindre leurs cibles. En particulier, ces

pompes à efflux sont classées selon leur spécificité de substrat et la source d'énergie utilisée (Muylaert et Mainil, 2012).

II.4.3 Modification de la cible

Les cibles des antibiotiques peuvent être modification structurale ou substitution telle qu'un composé antimicrobien n'est plus capable de se lier et d'exercer son activité au niveau bactérien. La modification de cible est un mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques et est particulièrement important pour la résistance aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS chez les bactéries Gram-positives, ainsi que chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Muylaert et Mainil, 2012).

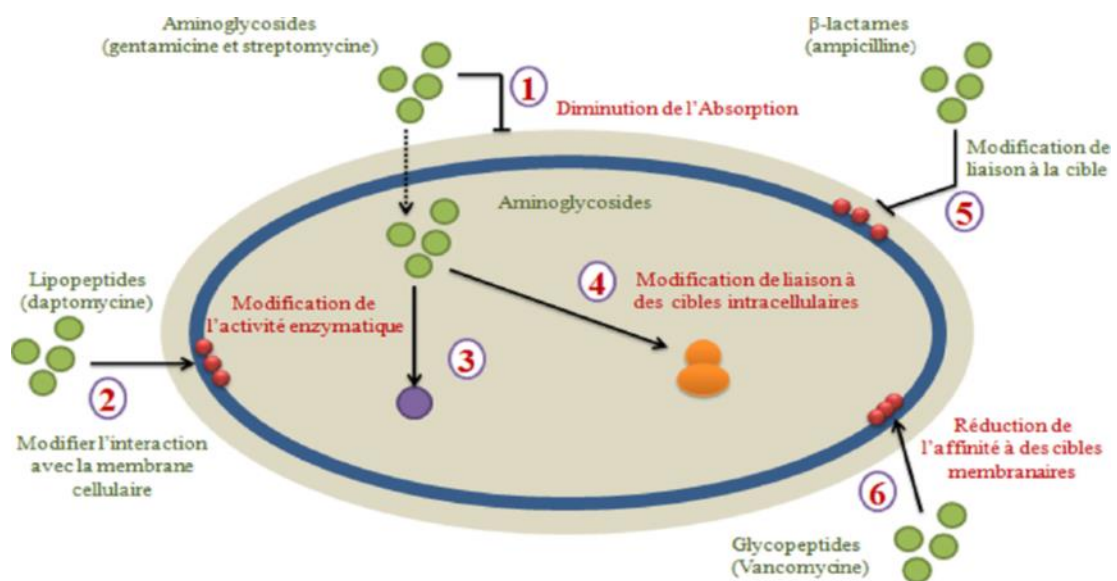


Figure 7: Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyahia *et al.*, 2017)

III. Généralités sur les endophytes

III.1 Définition d'un organisme endophyte

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. Donc tous les champignons endophytes ont des cellules hyphes qui sont en contact intime avec les cellules hôtes et sont intercellulaires (Bacon *et al.*, 2000). (Figure 8).

La plus appropriée et la plus collective des définitions désigne 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, 2018) la présence d'organismes (non pathogènes) à l'intérieur des plantes a été prononcée pour la

première fois par De **Bary (1866)**, qui a détecté la présence de cellules microbiennes dans les tissus végétaux analysés au microscope. Cependant, cette observation est restée inexplorée jusqu'à ce que la définition des endophytes soit apparue vers la fin du siècle dernier. De **Bary (1866)** a fourni la première définition d'un endophyte, car "tout organisme qui se développe dans les tissus végétaux est appelé endophyte", cependant, la définition continue de changer selon divers chercheurs.

Petrini (1991) a fourni la définition la plus appropriée pour les endophytes, c'est-à-dire tout organisme qui, à une partie de son cycle de vie, colonise les tissus internes de la plante sans causer aucun type de dommage à la plante hôte. De plus, grâce à des études approfondies de ces groupes de micro-organismes, les communautés endophytes ont été divisées en différents sous-groupes, tels que « obligatoires » ou « facultatifs », qui sont associés à tous les types de plantes (**Gouda et al., 2016**).

Le mot endophyte signifie « dans la plante » (endon Gr. = à l'intérieur, phyton = plante). Endophyte décrit des micro-organismes (bactéries et champignons) qui peuvent être détectés dans les tissus d'une plante hôte saine à un moment donné (**Al khawaldeh et al., 2020**). Représentent une composante importante de la biodiversité microbienne et ont été isolées de presque toutes les plantes (**Malfanova et al., 2013**) (**Porras et al., 2011**). De nombreux facteurs tels que les espèces hôtes, les géotypes, la localisation géographique et les organes de la plante peuvent influencer la colonisation des endophytes (**Porras et al., 2011**).

Les endophytes fongiques présentent une variété d'associations avec leurs plantes hôtes, y compris symbiotiques ou mutualistes ou antagonistes ou légèrement pathogènes. Leurs associations avec la plante hôte influencent l'écologie et l'évolution des endophytes fongiques et de leur plante hôte. La présence d'endophytes fongiques n'est pas spécifique à un hôte plutôt qu'un seul endophyte peut être l'habitant de différentes plantes hôtes. Leur distribution dans les tissus végétaux est affectée par leur capacité à utiliser les substances nutritionnelles synthétisées dans différentes parties du même hôte. Leur relation avec l'hôte varie d'un hôte à l'autre avec des facteurs écologiques et géographiques. Conditions. L'interaction entre l'endophyte fongique et l'hôte est contrôlée au niveau du gène, impliquant les gènes des deux partenaires qui sont modulés par l'environnement. (**Pandey et al., 2014**).

III.2 Diversité et classification

Vu l'importance des endophytes sont composante importante de la biodiversité microbienne et ont été isolées de presque toutes les plantes (**Malfanova et al., 2013**) (**Porras et al., 2011**). Jouez également aux champignons endophytes un rôle crucial en tant que décomposeurs, mutualistes et parasites dans les processus écologiques sur terre . Les champignons endophytes confèrent dans

leur association symbiotique à la plante hôte une amélioration de son état de santé, en synthétisant certains métabolites fonctionnels et en retour bénéficient des nutriments de la plante (Kogel *et al.*, 2006). Représentent champignons endophytes un groupe très diversifié, Il a également été apprécié avec autour 1,5 millions d'espèces et une moyenne d'environ 50 espèces d'endophytes par espèce de plante (Zabalgoeazcoa, 2008). Les endophytes fongiques les plus courants sont généralement composés de deux groupes : les clavicipitacées, comprenant les endophytes hébergés par les graminées, et les non-clavicipitacées, qui colonisent les angiospermes, les gymnospermes et les plantes non vasculaires (Chadha *et al.*, 2014). Dans le tableau suivent différentes classes des mycoendophytes sont mentionnées. Ces dernières reflètent les différences évolutives, taxonomiques, les fonctions écologiques, leur mode de transmission, ainsi que la nature de leurs hôtes (Rodriguez *et al.*, 2009).

Tableau 1: Critères symbiotiques utilisés pour caractériser les classes endophytes fongiques (Rodriguez *et al.*, 2009).

	Clavicipitacé	Non- Clavicipitation		
Critère	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Gamme d'hôte	Etroit	Large	Large	Large
Transmission	Verticale horizontal	Vertical et horizontal	Horizontal	Horizontal
Tissu(s) colonisé(s)	Pousse et rhizome	Pousse, racine et rhizome	Tirer	Racine
La colonisation	Extensif	Extensif	Limité	Extensif
Biodiversité	Faible	Faible	Haut	Inconnu
Avantages pour la forme physique NHA	NHA	NHA ET NHA	NHA	NHA

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

Endophytes classe 1 (clavicipitacés)

Les Clavicipitaceae (Hypocreales; Ascomycota) comprennent des espèces libres et symbiotiques associées à des insectes et des champignons (par exemple *Cordyceps spp.*) ou des graminées, des juncs et des carex (par exemple *Balansia spp.*), *Epichloë spp.*, et *Claviceps spp.*). La famille est

relativement dérivée des Hypocreales, une lignée bien connue pour les agents pathogènes des plantes, les saprotrophes et les endophytes, dont beaucoup produisent des composés bioactifs. Les espèces vivant dans le sol, qui comprennent certains des taxons les plus répandus géographiquement du groupe, Donc dans ces condition l'endophyte classe 1 colonisent principalement les tiges et les rhizomes. **(Rodriguez et al., 2009)**

Endophytes de classe 2

Comprend une diversité d'espèces, qui sont toutes membres du *Dikarya* (*Ascomycota* ou *Basidiomycota*). La plupart appartiennent aux *Ascomycota*, avec une minorité de *Basidiomycota*. Les membres du premier sont limités aux *Pezizomycotina*, où ils représentent plusieurs classes. Les endophytes de classe 2 au sein des *Basidiomycota* comprennent quelques membres des *Agaricomycotina* et *Pucciniomycotina*. Les endophytes de classe 2 se distinguent des autres endophytes NC car en général ils colonisent les racines, les tiges et les feuilles ; sont capables de former des infections étendues dans les plantes ; sont transmis par les téguments et/ou les rhizomes ; ont une faible abondance dans la rhizosphère; conférer des avantages de remise en forme adaptés à l'habitat en plus des avantages non adaptés à l'habitat ; et ont généralement des fréquences d'infection élevées (90 à 100 %) chez les plantes poussant dans des habitats à stress élevé (**tableau 1**). **(Rodriguez et al. 2009)**.

Endophytes de classe 3

La majorité des endophytes de classe 3 sont membres des *Dicaryomycota* (*Ascomycota* ou *Basidiomycota*), avec une concentration particulière dans les *Ascomycota*. Les *Pezizomycotina* sont particulièrement et bien représentés, bien que certains *Saccharomycotina* endophytes soient connus Higgins. Au sein de la *Pezizomycotina*, les endophytes de classe 3 sont présents parmi tous les principaux clades non lichénisés.

Fait intéressant, de nombreux agents pathogènes végétaux ascomycètes et saprotrophes sont dérivés de ces mêmes lignées. La prévalence de chaque classe dans les communautés d'endophytes diffère nettement entre, plus souvent présents endophyte classe 3 dans les tissus ligneux que dans les tissus foliaires, peuvent coloniser en grand nombre les parties aériennes d'une plante. **(Rodriguez et al., 2009)**.

Endophytes de classe 4

En étudiant et en isolant les champignons *ectomycorhiziens*, **Merlin (1922)** a observé un champignon pigmenté brun à noirâtre associé aux racines des plantes terrestres. Il a appelé ces champignons stériles associés aux racines « mycélium radicus astrovirens » (MRA). On a souvent constaté que les ARM coexistaient avec des champignons mycorhiziens et étaient

appelés champignons « *pseudomycorhiziens* ». Peu de temps après, Peyronel a signalé > 135 espèces d'angiospermes associées à des champignons pigmentés foncés dans les tissus racinaires. Actuellement, ces champignons sont appelés « endophytes septés foncés » (DSE) et sont regroupés en tant qu'endophytes de classe 4. En plus des critères énumérés dans le tableau 1, les endophytes de classe 4 (DSE) se distinguent en tant que groupe fonctionnel basé sur la présence de septa sombrement mélanisés et leur restriction aux racines des plantes. (Rodriguez *et al.*, 2009).

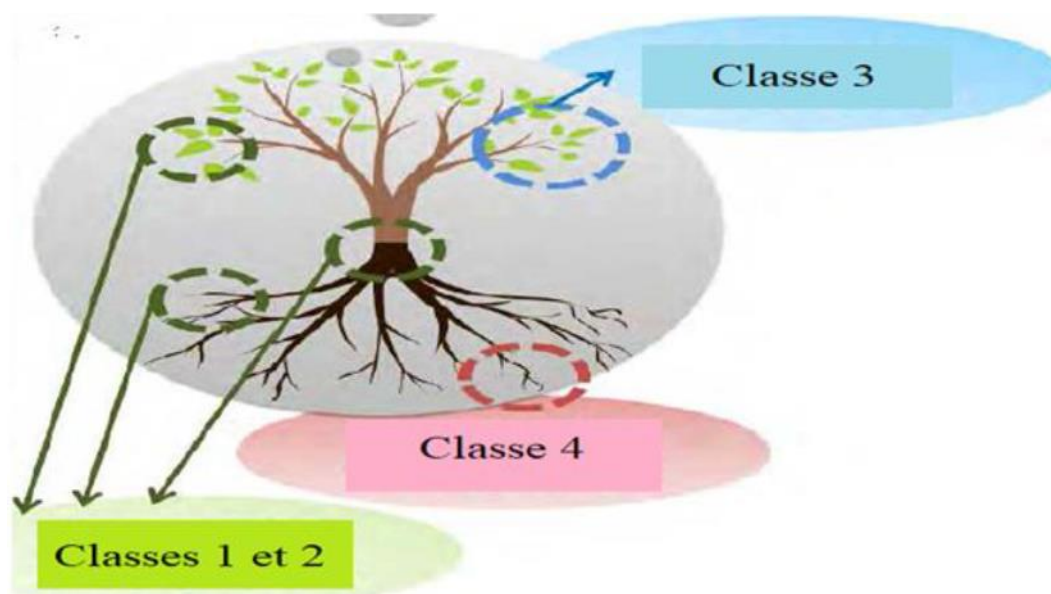


Figure 8: Les classes d'endophytes selon la localisation (Senequier-crozet et Canard, 2016)

III.3 Les activités biologiques des métabolites secondaires des endophytes

Certains métabolites secondaires présentent des activités biologiques élevées. Les composés anti tumoraux, antibactériens, anti-inflammatoires, antiviraux, antifongiques et autres ont été produits par différents champignons endophytes. Par conséquent, la variété chimique des métabolites secondaires produits par les champignons endophytes présente un avantage pour le développement de nouveaux médicaments (Zheng *et al.*, 2021).

III.3.1 Champignons endophytes comme source de substances antioxydantes

Les antioxydants sont des molécules qui protègent les cellules des dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leurs dérivés radicaux libres. Ces molécules instables sont responsables de différents effets pathologiques tels que la cancérogenèse, la dégénérescence cellulaire et les dommages à l'ADN (Belhamra et Ben Bouzid, 2021). Puissant antioxydant et piègeur de radicaux libres. Cependant, il existe de nombreux rapports et études sur les activités

biologiques des champignons endophytes, faisant état des propriétés antioxydantes de ces derniers (**Srinivasan et al., 2010**)

III.3.2 Champignons endophytes comme source de substances anticancéreuses

Le cancer est une maladie mortelle majeure dans le monde entier et plus de six millions de nouveaux cas sont signalés chaque année. La nature est une source attrayante de nouveaux composés thérapeutiques, car une énorme diversité chimique se trouve dans des millions d'espèces de plantes, d'animaux et de micro-organismes. Les composés dérivés de plantes ont joué un rôle important dans le développement de plusieurs agents anticancéreux cliniquement utiles. (**Chandra,2012**).

La recherche de nouvelles options pour la découverte de nouveaux médicaments anticancéreux, comme le paclitaxel, qui est un puissant composé anticancéreux (**Figure 10**) qui interfère avec la prolifération des cellules cancéreuses, et est produit par un certain nombre de champignons endophytes, tels que *Cladosporium*, *Microsporium* et *Periconia sp.* (**Chandra,2012**).

Les champignons endophytes ont reçu de l'importance dans ce domaine et plusieurs molécules anticancéreuses ont été isolées telles que le 4,5-Dihydroxy-3-(1-propenyl) -2-cyclopenten-1-one (terrien) produit par le champignon endophyte *Aspergillus terreuse* (JAS-2) isolé à partir de *Achyranthus aspera* et qui possède une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire du cancer du poumon (**Goutam et al., 2017**).

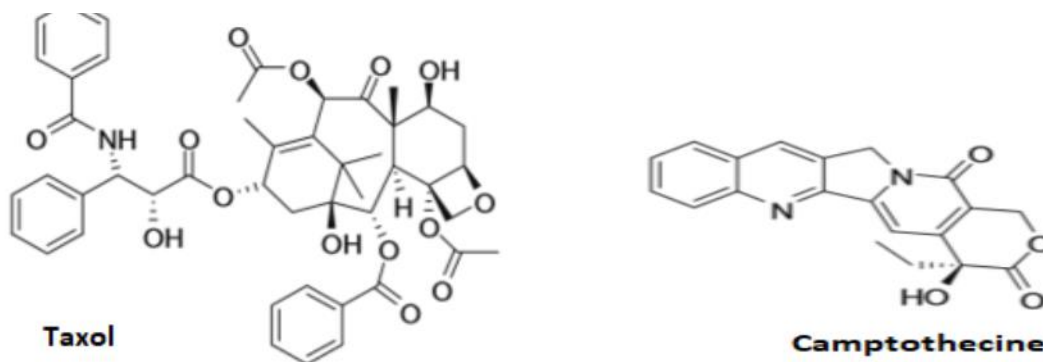


Figure 9: Structures de certains métabolites secondaires pertinents sur le plan industriel utilisés comme composés anticancéreux (**Selim et al ., 2012**).

III.3.3 Champignons endophytes comme source de substances antivirales

Une autre utilisation fascinante des produits antibiotiques issus de champignons endophytes est l'inhibition des virus. Acides cytoniques A et B deux nouveaux inhibiteurs de la protéase du cytomégalovirus humain ont été isolés de la fermentation à l'état solide du champignon endote *Cytospora sp* (**Padhi et al., 2013**).

Il y a aussi xanthoviridicats E et F qui inhibent la réaction de clivage de l'intégrase du VIH-1, il a été produit par l'endophyte *Penicillium chrysogenum* (Singh *et al.*, 2003).

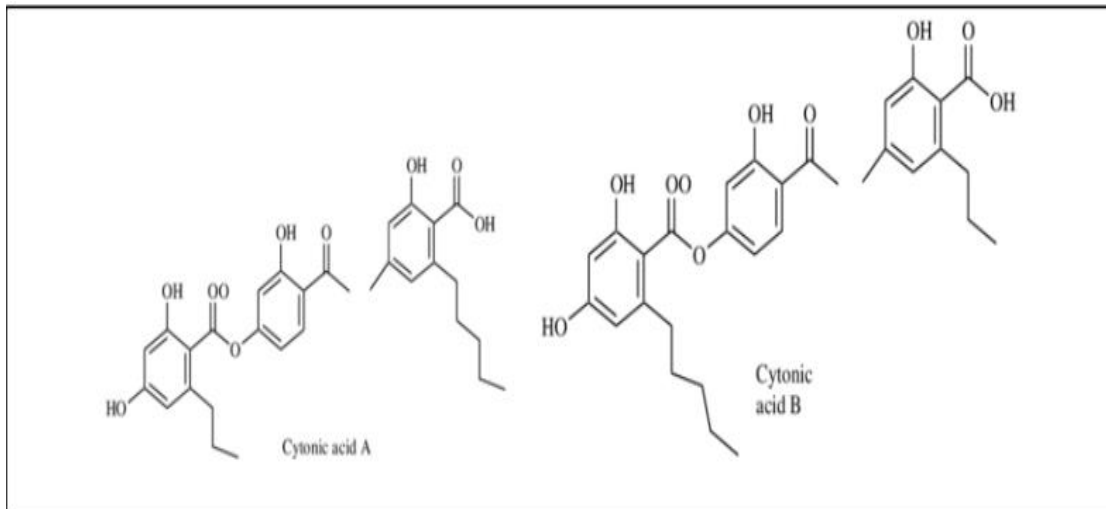


Figure 10: Structure de l'acide cétonique A et B (Ahrawel *et al.*., 2016)

III.3.4 Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes

Environ 700000 personnes sont tuées chaque année par des bactéries résistantes aux antibiotiques, et ce problème ne fera qu'augmenter si la recherche de nouvelles molécules ne s'accélère pas (Sadrati, 2021). La croissance des souches pathogènes multi-résistantes a limité l'effet d'un traitement antimicrobien traditionnel, ce qui implique le besoin de nouveaux agents thérapeutiques contre les maladies infectieuses (Zerroug, 2011).

Au cours des dernières années, la communauté scientifique a montré un fort intérêt pour l'exploration des microorganismes endophytes associés aux plantes médicinales pour des applications biotechnologiques. Actuellement, de nombreux composés antibactériens ont été isolés et caractérisés à partir de ces champignons endophytes, tels que des alcaloïdes, des peptides des stéroïdes, des terpénoïdes, des composés phénoliques, des quinine et des flavonoïdes (Zhang *et al.*, 2012)

Partie pratique

IV. Matériel et Méthode

IV.1 Matériel

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire Pédagogique du Département de Microbiologie, Biochimie à l'Université Mohamed Boudiaf, M'sila

IV.1.1 Matériel végétal

Échantillon de *Retama raetam* prélevé en février 2023 dans la région de Maadid M'sila en Algérie.



Figure 11: *Retama retam* (photo prise par les auteurs)

IV.1.2 Souche bactérienne

Le matériel microbien comprenait cinq bactéries pathogènes, trois bactéries Gram-négatives et deux bactéries Gram-positives, qui ont été récupérées du laboratoire de microbiologie interne de l'Université Mohamed Boudiaf M'sila.

Tableau 2: la souche bactérienne testée

Souche bactérienne	Gram	Référence
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC25924
<i>Staphylococcus epidermide</i>	Positif	ATCC12228
<i>Enterobacter cloacae</i>	Négatif	ATCC13047

IV.1.3 Produits chimiques

Plusieurs produits chimiques ont été utilisés dans notre étude : acétate d'éthyle, éthanol, hydroxyde de sodium (NaOH), chlorure d'hydrogène (HCl), glucose (C₆H₁₂O₆), Agar, hypochlorite de sodium (NaOCl), diméthylsulfoxyde (DMSO), Muller's Agar (MH), PDA (Potato Dextrose Agar) Gélose, milieu PDB (Potato Dextrose Broth).

IV.1.4 Appareillages

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

IV.2 Méthodes

IV.2.1 Échantillonnage

Pour garantir un bon isolement des champignons endophytes, il faut sélectionner des plantes saines et du matériel végétal frais. À cette fin, nous avons sélectionné plusieurs plantes saines et mures, prélevé au hasard des échantillons de différentes parties des plantes et les avons transportés au laboratoire dans des sacs en plastique. Les échantillons prélevés doivent être conservés à 4 °C jusqu'à leur utilisation et ne doivent pas dépasser 24 heures (**Khan et al., 2017**).

IV.2.2 Isolement et purification des champignons endophytes

Rincer les échantillons sous l'eau courante pendant une dizaine de minutes pour éliminer les impuretés et les débris de surface, puis les immerger dans l'eau.70 % d'éthanol pendant 1 minute, puis tremper dans de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) (3 %) pendant 4 minutes. Les échantillons ont ensuite été replacés dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 s et rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile pendant 1 min chacun avant d'être séchés sur du papier filtre stérile pour 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 gélose PDA préalablement passé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, et supplémenté aseptiquement avec 150 mg/l de Gentamycine pour inhiber la croissance bactérienne, (5 à 6 segments par boîte), et sont mise à incubés à 25°C. (Khan *et al.*, 2010).

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 (Pimentel *et al.*, 2006).

Enfin, après incubation chaque champignon poussé sera repiqué plusieurs fois jusqu'à l'obtention des cultures pures. Le pourcentage de colonisation est calculé selon (Pimentel *et al.*, 2006) en utilisant la formule suivante :

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

IV.2.3 Identification des champignons isolés

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

- 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.

IV.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 en se basant sur la diffusion de leurs métabolites sur la gélose Muller Hinton.

Les souches bactériennes sélectionnées ont été revivifiées dans des tubes contenant de bouillon nutritif « Nutrient broth » 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 correspond à une absorbance comprise entre 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde de 620 nm (**Devaraju et Satish, 2011**). La suspension bactérienne a étéensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile sur des boites de Pétri contenant le milieu Muller Hinton (MH). L'écouvillon a été trempé dans la suspension bactérienne, puis il est essoré on le faisant tourner sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.

Le milieu MH a été frotté par des stries serrées sur la totalité de sa surface gélosée de haut en bas en tournant chaque fois la boite 60° (**Devaraju 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 Muller -Hinton gélosé préalablementensemencé 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 (**Devaraju et Satish, 2011**).

IV.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, D et H) 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 a 5000 tours/min pendant 15 min, et le surnagent 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 décompter pour séparer la phase organique du celle aqueux. 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**).

IV.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 déposé 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 boites 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.

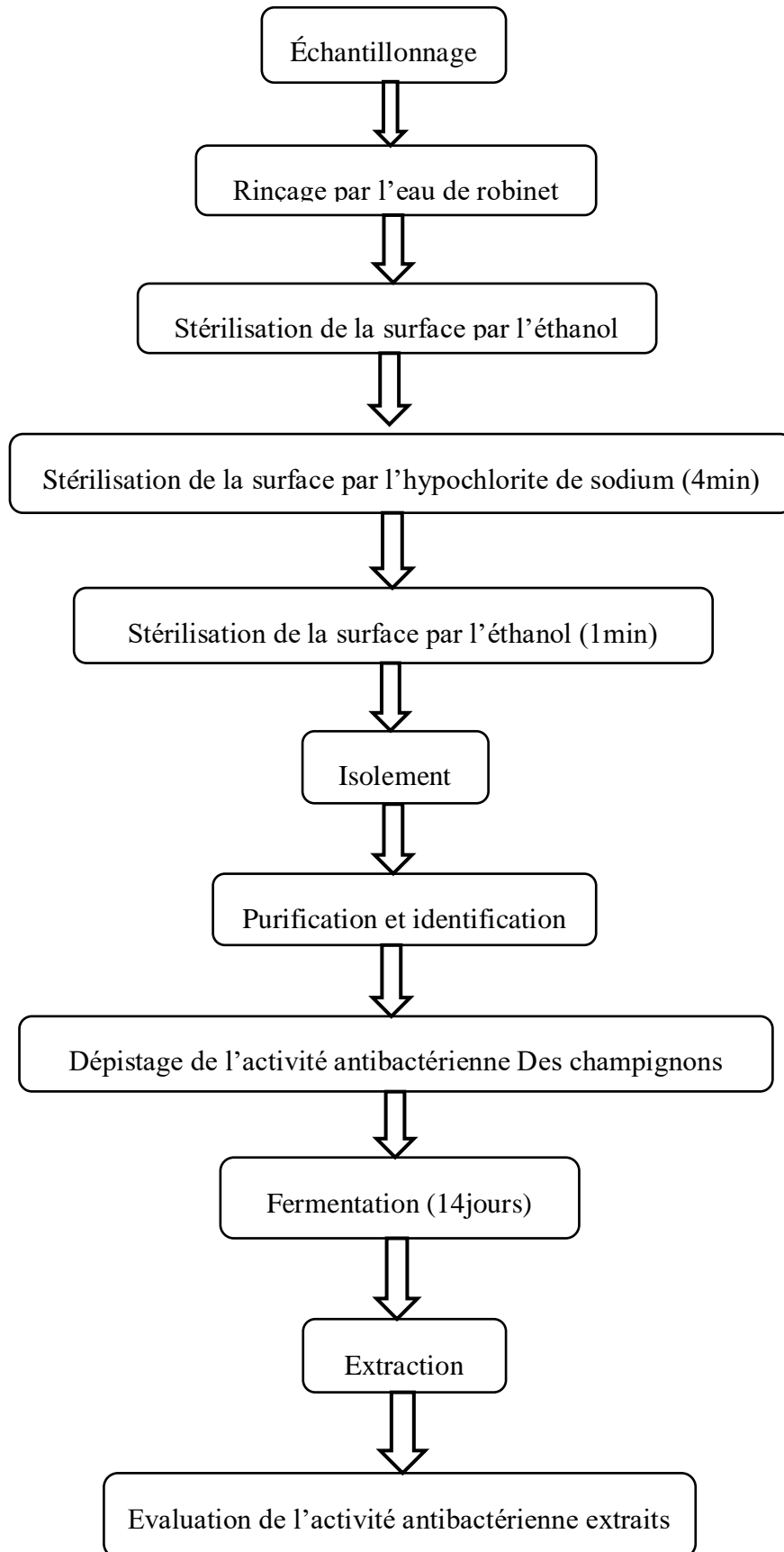


Figure 12: Protocole expérimental (Chirane *et al.* , 2020)

Résultats et discussion

V. Résultats et discussion

V.1 Isolement, purification et identification des champignons

Après 7 jours et plus dans l'incubation, on a isolé 04 fongiques différents ont poussés à partir des segments de plantes, contrairement aux boites 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.

A partir d'un total de 37 segments de la plante étudiée, 04 souches fongiques différentes ont été isolés, ce qui nous a permis d'obtenir un pourcentage de colonisation égale à 51%, un pourcentage proche et comparable à celui obtenu par (**Sadrati, 2021**) et confirme de plus qu'une seule plante peut être colonisée par plusieurs champignons endophytes.

On a cultivé ces champignons plusieurs fois sur gélose PDA fraîche afin d'obtenir des cultures pures, ce qui nous a permis de les identifier. L'identification des souches de champignons est rendue possible grâce à l'expertise pédagogique du **Dr HENDEL** au Département de Microbiologie et Biochimie de l'Université de M'sila et la clé d'identification **Philippe Dufresne (2018)**.

Après identification sur les souches fongiques endophytes, leurs caractéristiques microscopiques (couleur, aspect de colonie et le revers des boites) des cultures de 7 jours sur milieu PDA et microscopiques (forme de thalle et des spores) on a trouvé les résultats suivants (**Tableau 3**) :

Deux des quatre isolats (50%) appartiennent au genre *Alternaria* (isolats A et C), est un genre fongique omniprésent large, qui comprend des espèces saprobies et endophytes. La taxonomie d'*Alternaria* basée sur des caractéristiques morphologiques ont été résumés dans **Simmons (2007)**, dans lequel 275 espèces d'*Alternaria* ont été reconnues (**Lawrence et al., 2012**). L'*Alternaria* généralement gris, brun noirâtre noir ou noir. Mycélium immergé ou partiellement superficiel ; HYPHAE incolore brun. Stroma rarement formé. Conidiophores macronémateux, simples ou irrégulièrement ramifiés, bruns pâles, solitaires ou en fascicules. Les cellules conidiogènes intégrées, la borne devenant intercalaire, polytrétique, sympodiale ou parfois monotrétique, cicatrisée (**Woudenberg et al., 2013**).

Il y a un genre (25%) d'*Aureobasidium* des quatre isolats (isolat D). *Aureobasidium pullulans* c'est multiphasique et peut subir un changement de forme de bourgeonnement à hyphe. Son cycle de vie implique la formation de blastoconidies qui peuvent donner naissance à du promycélium qui peut soit former (i) des hyphes aériens qui produisent des chlamydospores

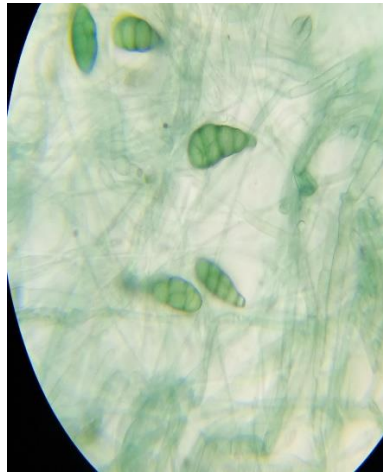
divisés par des septa (également appelés arthroconidies) qui bourgeonnent pour former des blastoconidies ou (ii) des hyphes avec des excroissances latérales de blastoconidies qui forment des chlamydospores avec de la mélanine dans leurs parois cellulaires (les chlamydospores sont libérées des hyphes et bourgeonnent pour former des blastoconidies hyalines). La couleur des colonies d'*A. pullulans* varie considérablement d'une souche à l'autre, et son expression est influencée par la température et le pH obtenu plusieurs souches d'*A. pullulans* (William, 2009). Est ubiquitaire et répandu que l'on retrouve dans des milieux aux activités aquatiques fluctuantes, comme la phyllosphère, les salles de bains, l'alimentation humaine et animale (Samson et al., 2004). Il a aussi été isolé comme endophyte donc la souche Fito_F278 d'*Aureobasidium pullulans* a été isolée des feuilles de *V. vinifera* en 2011 à l'appellation Bairrada.

Un des quatre isolats (25%) appartiennent au genre *Aspergillus* (isolats E), un genre très diversifié comporte 200 espèces, dont certaines ont une valeur commerciale et médicale. Les *Aspergillus* noirs font partie d'un groupe d'espèces appelé « section Nigri » et autrefois connu sous le nom de « *Aspergillus niger* groupe » : toutes les espèces de la section ont des têtes de conidies noires. La section Nigri inclut 15 espèces à spores noires. Les espèces du groupe *Aspergillus niger* sont des hyphomycètes anamorphes hyalins : certaines ont des formes télémorphes comprises dans les genres *Eupenicillium*, *Talaromyces*, *Hamigera* et *Trichocoma*. L'*Aspergillus niger* n'a aucune forme télémorphe connue. Le champignon endophyte *Aspergillus niger* a été isolé des racines d'*Axonopus purpusii*, un fourrage indigène du Pantanal, (Rodrigo et al., 2021).

Tableau 3: Les souches fongiques endophytes identifiées.

Isolat	Caractères macroscopiques	Caractères microscopiques	Classification
--------	---------------------------	---------------------------	----------------

A



Règne : Champignons

Division :

Deuteromycotina

Classe : Hyphomycètes

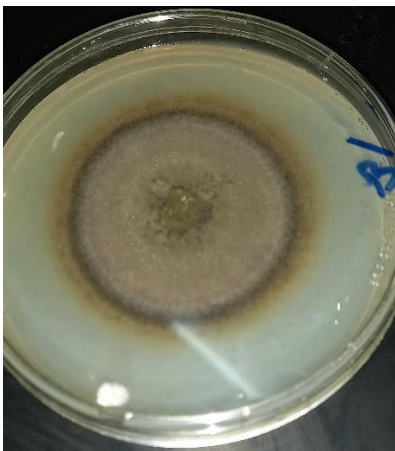
Famille : Dematiaceae

Ordre : Moniliales

Genre : Alternaria

Espèce : *Alternaria sp4*

B



Règne : Champignons

Division :

Deuteromycotina

Classe : Euascomycetes

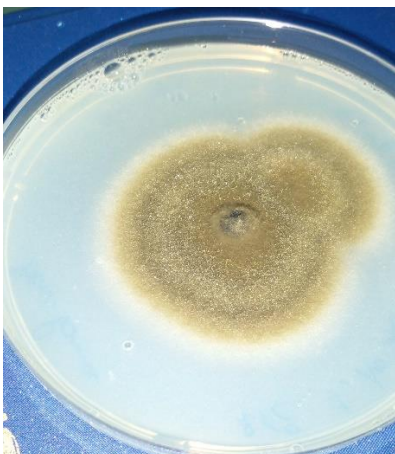
Famille : Pleosporaceae

Ordre : Pleosporales

Genre : Alternaria

Espèce : *Alternaria alternata*

D



Règne : Champignons

Division :

Deuteromycotina

Classe : Dothideomycetes

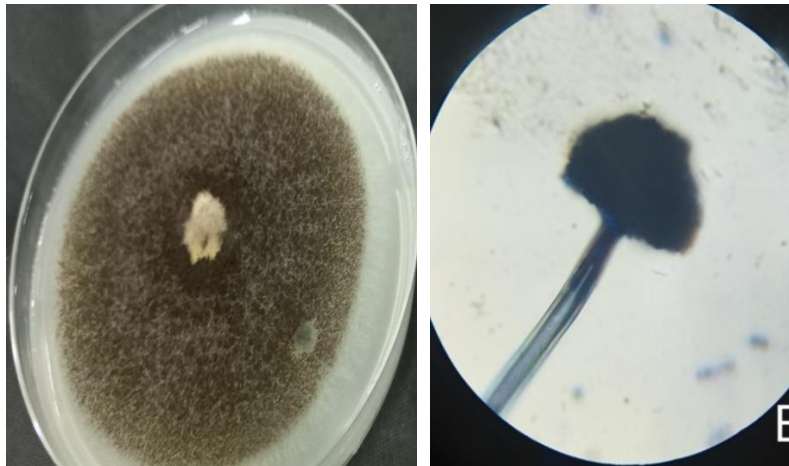
Famille : Dothioraceae

Ordre : Dothidiales

Genre : Aureobasidium

Espèce : *Aureobasidium pollulans*

E



Règne: Champignons
 Division: Deuteromycotina
 Classe : Deutéromycètes
 Famille : Moniliaceae
 Ordre : Moniliales
 Genre : Aspergillus
 Espèce : *Aspergillus niger*

L'identification nous a permis de classer nos isolats dans la classe des deutéromycètes qui est considérée parmi celles auxquelles appartient la plupart des champignons endophytes (Zabalgoeazcoa, 2008).

V.2 Activité antibactérienne des champignons endophytes

Les quatre souches isolées ont été testées par la technique de double culture de diffusion où on a déposé des cylindres de gélose portant le champignon sur la surface de MH déjàensemencé par les bactéries testées.

Les résultats montrent que tous les champignons isolés ont une activité antibactérienne bactéries testées avec un effet plus ou moins important, où les diamètres des zones d'inhibition mesurés varient entre 12.5 et 25 mm (Tableau 4). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par (Gond et al., 2011) qui a trouvé un effet antibactérien chez tous les champignons isolés à partir de plante médicinale indienne *Nyctanthes arbor-tristis*.

Tableau 4: Activité antibactérienne des champignons en zones d'inhibitions (mm).

Champignons	Les souches bactériennes (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>Alternaria alternata</i>	20.0±1.4	25.0 ±0	17 ±1.4	20.00±2.80	24 ±1.4
<i>Alternaria sp4</i>	24.5 ±0.7	12.5 ±3.5	17.5 ±3.5	20.0 ±0	23.5 ±0.7
<i>Aspergillus niger</i>	24.5 ±0.7	25 ±0	25.0 ±0	24.5 ±2.1	28.5 ±2.1

<i>Aureobasidium pullulans</i>	27.0 ±1.4	0	21.0 ±2.8	17.0 ±7	0
--------------------------------	-----------	---	-----------	---------	---

L'effet antibactérien le plus fort a été obtenu par *Aspergillus niger* contre *S. epédermidise* dont la zone d'inhibition a été de 29mm. Au contraire chez *S. aureus*, sur laquelle les champignons *Alternaria sp4* présentent la plus faible activité mesurée avec une zone d'inhibition de 12,5 mm.

Les espèces : *Alternaria alternata*, *Alternaria sp4*, *Aspergillus niger* ont montrées un effet antibactérien contre tous les bactéries (gram positif et négatif), testées avec des zone d'inhibition variant entre 12.5 à 29mm. Mais les deux champignons *Alternaria alternata* et *Alternaria sp4* montrent une même activité contre *E. cloacae* (20mm) et *P. aeruginosa* (17mm).



Escherichia coli



Enterobacter cloacae



Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus



Staphylococcus epidermidis

Figure 13: Les zones d'inhibition des champignons contre les souches bactériennes

Les résultats ont démontré aussi que pour le groupe des bactéries à Gram positif, le plus grand effet était observé chez *Aspergillus niger*, *Alternaria alternat*, où les moyennes d'inhibition allaient de 25 mm à 29 mm, cette dernière a été observée chez *Aspergillus niger*.

De plus il est remarquable que *Aureobasidium pullulans* a montré une activité antibactérienne seulement sur le groupe des bactéries Gram négatif (*E. coli*, *E. cloacea* et *P. aeruginosa*) avec une zone d'inhibition 17-27 mm. Tandis que pour le groupe des bactéries Gram positif l'effet aucun.

Et enfin les résultats montrent que le genre *Aspergillus niger* une activité impressionnante que soit sur bactéries Gram positif et soit sur les Gram négatif qui semblent plus résistants (**Figure 14**). Cette information est trouvée aussi par **Marcellano et al., 2017**.

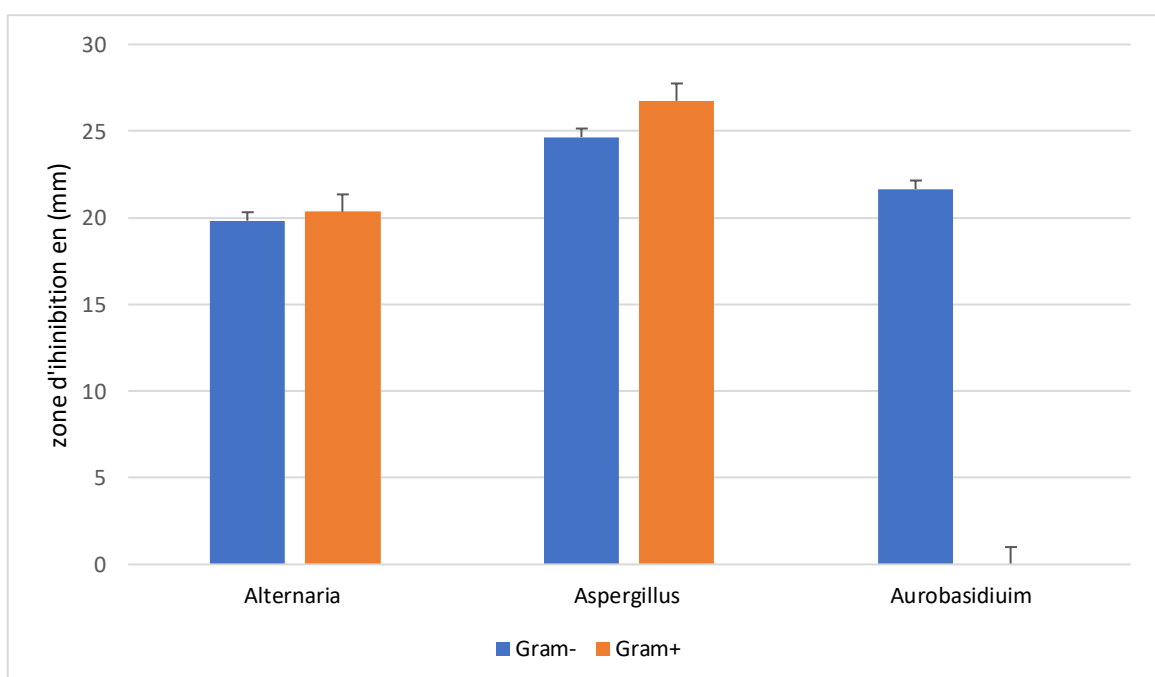


Figure 14: Moyennes des zones d'inhibitions des champignons sur les groupes des bactéries

V.3 Activité antibactérienne des extraites fongiques

Les métabolites secondaires sont des composés chimiques solubles dans les solvants organiques. Parmi les meilleurs solvants organiques on a l'éthyle d'acétate. Quatre souches fongiques (espèce pour chaque genre) ont été mises à fermenter puis extraire à l'aide d'éthyle d'acétate afin d'examiner leur activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disques. Les différents extraits ont montré une activité antibactérienne plus ou moins importante, où les zones d'inhibition allant de 7 à 11 mm.

Tableau 5: Activité antibactérienne des extraits en zones d'inhibition (mm).

Champignons	Zones d'inhibition (mm).				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aëruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. epédérmidise</i>
<i>Aspergillus niger</i>	0	9.5±2.12	7 ±0	0	0
<i>Alternaria alternata</i>	0	10±1.41	7 ±0	3.5 ±4.94	0

L'effet antibactérien le plus fort a été obtenu par l'extrait de *Aspergillus niger* et *Alternaria alternat* sur *S. aureus* dont la zone été de 9.5mm, contrairement les souches *P. aeruginosa* et *E. cloacae* on a enregistré la plus faible activité avec une zone d'inhibition de 7mm.

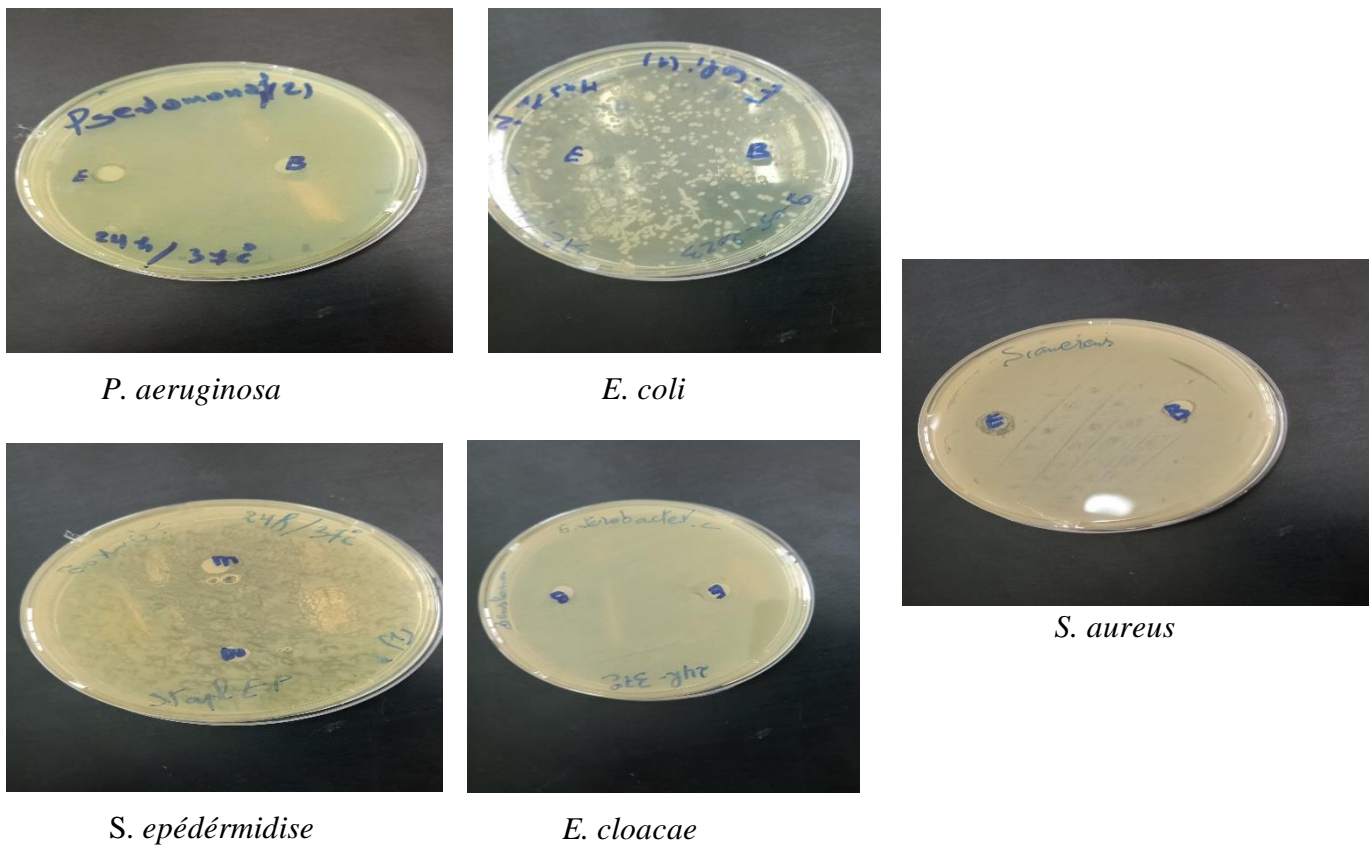


Figure 15: Les zones d'inhibitions des extraits des champignons endophytes *A. niger* et *A. alternata* contre les souches bactériennes

De plus, il est remarquable que *Aspergillus niger* n'a aucun effet ; seulement sur *S.aureus* par une zone de 9.5mm ce qui confirme les résultats obtenus par (Marcelano *et al.*, 2017) qui a trouvé le même effet d'*Aspergillus* isolé d'*Cinnamomum mercadoi* une plante endémique des Philippines.

S'avère que les bactéries à Gram positives étaient plus sensibles aux extraits que les bactéries à Gram négatives, cette différence pourrait être attribué à la différence des constituants morphologique de ces microorganismes. Les bactéries à Gram négatives possèdent une membrane externe phospholipidique contenant le lipopolysaccharide comme composant structural, ce qui rend la paroi cellulaire imperméable aux antibactériens. Tandis que les bactéries à Gram positives ne renferment qu'un peptidoglycane dans leur membrane externe, ce qui ne constitue pas une barrière imperméable efficace et les rend ainsi plus susceptibles que les bactéries à Gram négatives (Kaushik *et al.* , 2015).

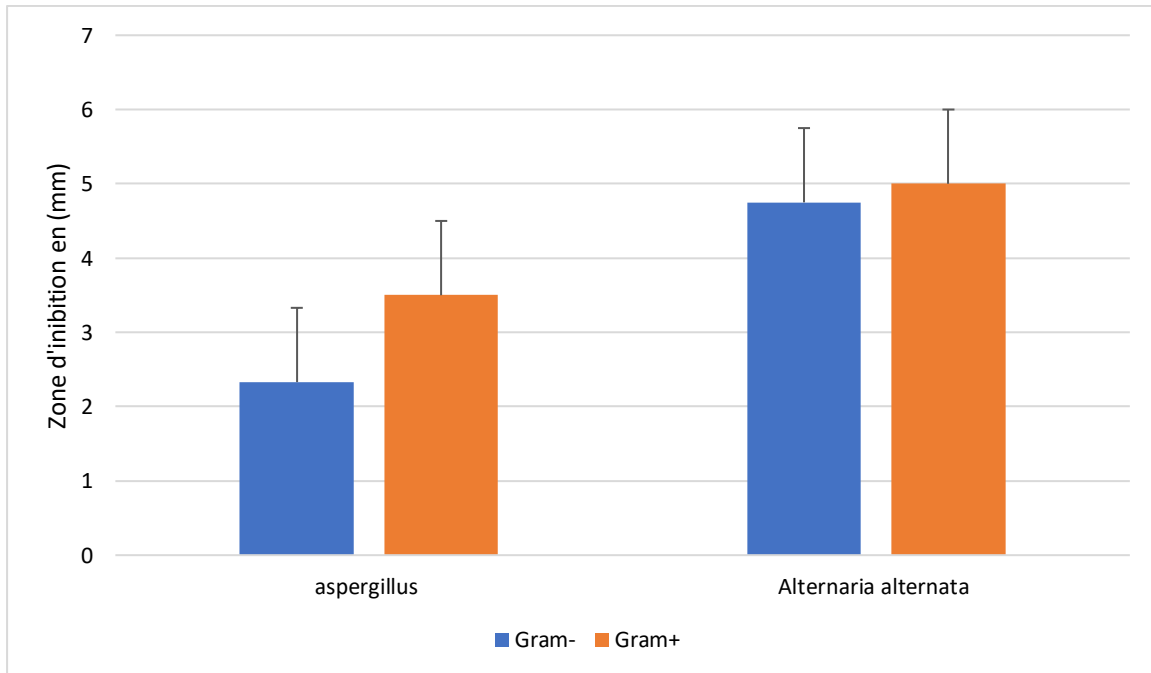


Figure 16: Moyennes des zones d'inhibition des extraits par groupe des bactéries.

Conclusion

Conclusion

La forte demande de nouveaux matériaux pour diverses applications humaines, en particulier pour le traitement des infections causées par des micro-organismes multi-résistants et certaines maladies répandues qui menacent l'humanité, a conduit à une recherche continue de nouvelle molécule bioactive.

C'est dans ce sens que s'inscrit notre travail, où on a présenté une source qui jusqu'à maintenant n'a pas été très explorée mais qui s'est révélée être une source de métabolites secondaires bioactifs qui est les champignons endophytes.

Ils sont une bonne source fiable de nouveaux composés naturels avec un haut niveau de biodiversité et peuvent également produire plusieurs composés d'importance pharmaceutique.

Dans notre travail, des champignons endophytes (*Aspergillus*, *Alternaria* et *Aurobasidium*) isolés à partir de la plante médicinale *Retama retam* ont été testés pour leurs activités antibactériennes. Nous avons mis en évidence l'effet de cette quatre champignons endophytes, les résultats de cette synthèse montrent que tous les champignons ont une activité antibactérienne, contre au moins une des bactéries testées, avec un effet plus ou moins important ou les diamètres des zones d'inhibitions mesurés varient entre 0 et 28.5mm.

L'effet antibactérien le plus fort a été marqué par *Aurobasidium pollulant* contre *E. coli* ATCC 25922, avec une zone d'inhibition de 27 mm. Au contraire pour *S.aureus* et *epédérmise*, le même champignon présente la plus faible activité mesurée avec une zone d'inhibition de 0mm. Le gerne *Aspergillus niger* a montré une activité antibactérienne sur tous les bactéries, grand zones d'inhibition avec *S.epédérmise* de 28 mm, à 25mm avec (*S. aureus*, *P. aéruginosa*) et 24.5 mm avec (*E. coli*, *E. cloacae*).

De plus, la souche *Alternaria sp4* a montré un effet sur tous les bactéries *E. coli*, *S.epédérmise*, *E. cloacae*, *P. aéruginosa* et *S. aureus*.

Enfin les résultats de la synthèse montrent que le genre *Alternaria alternata* possède une activité impressionnante contre les bactéries Gram positif (25 mm) contre *S. epédérmise* et *S. aureus*, et une zone d'inhibition moyenne de 2 mm et 1.7 contre les bactéries Gram négatif *E. coli*, *E. cloacae* et *P. aeruginosa* respectivement.

Ainsi, d'autres études doivent être mises en œuvre pour obtenir plus de précision et explorer plus en profondeur cet aspect du travail afin de permettre :

- Identification des quatre champignons ;

- Comparaison entre les métabolites secondaires produits par les champignons endophytes et la plante ;
- Extraction, purification de molécules produites par les champignons endophytes ;
- Une compréhension des synergies et des interactions qui peuvent exister entre les champignons endophytes et leur capacité à cohabiter ensemble dans la même plante ;
- Une exploitation à l'échelle industrielle des composés antibactériens.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ahrawel R.P.**, Kumar S., Sandhu S. (2016). *Endophytic mycoflora as a source of Biotherapeutic Compounds of Disease Treatment. Journal of applied pharmaceutical Science*, 6(10), 242-254.
- Alauzet, C.**, Marchandin, H., & Lozniewski, A. (2010). *New Insights Into Prevotella Diversity and Medical Microbiology. Future Microbiology*, 5(11), 1695-1718.
- Al-Khawaldeh, M. M.**, Araj, S. E., Alananbeh, K. M., & Antary, T. M. A. (2020). *Wheat cultivable fungal endophytes in Jordan. Fresenius Environmental Bulletin*, 29, 13.
- Al-Sharari, N.**, Bakhawain, A. S., & Elfeel, A. A. (2020). *Profiling and importance of underutilized neglected species of hyper arid climate of Saudi Arabia (Retama raetam-Retem): A Review. Life Science Journal*, 17(7).
- Bacon, C. W.**, & White, J. (Eds.). (2000). *Microbial Endophytes*. CRC press.
- Belhamra. E.**, Benbouzid. N. (2021). *Production de molécules à activité anticancéreuse par le champignon endophyte Taxomyces andreanea*. Master en science de la nature et de la vie. Filière science biologique. Spécialité Mycologie et Biotechnologie Fongique. Université des Frères Mentouri Constantine 1. Algérie. 70p
- Bouyahya, A.**, Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2017). *Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria. Phytothérapie*, 1-11.
- Britannica**, The Editors of Encyclopaedia. "antibiotic". (2023) Encyclopedia Britannica, <https://www.britannica.com/science/antibiotic>.
- Camotti Bastos, M.**, Rheinheimer dos Santos, D., Aubertheau, É., de Castro Lima, J. A. M., Le Guet, T., Caner, L., ... & Labanowski, J. (2018). *Antibiotics and microbial resistance in Brazilian soils under manure application. Land Degradation & Development*, 29(8), 2472-2484.
- Catteau, L.**, Zhu, L., Van Bambeke, F., & Quetin-Leclercq, J. (2018). *Natural and hemi-synthetic pentacyclic triterpenes as antimicrobials and resistance modifying agents against Staphylococcus aureus: a Review. Phytochemistry Reviews*, 17, 1129-1163
- Chadha, N.**, Mishra, M., Prasad, R., & Varma, A. (2014). *Root endophytic fungi: Research Update. J Biol Life Sci USA*, 5(2), 135-158.
- Chandra, S.** (2012). *Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 47-59.

- Chirane**, A., Merzoud, Y., & Benslama, A. (2020). *Diversity and Antibacterial Activity Of Endophytic Fungi Associated With The Algerian Medicinal Plant Artemisia herba alba*. *Journal of Applied Biological Sciences*, 14(2), 145-154.
- Coleman-Jensen**, A., Gregory, C., & Singh, A. (2014). *Household Food Security In The United States in 2013*. *USDA-ERS Economic Research Report*, (173).
- 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.
- Gary Kaiser**. *Community College of Baltimore Country (Cantonsville)-2022*
- Gond SK.**, Mishra A., Sharma VK., Verma SK., Kumar J., Kharwar RN., Kumar A. (2011). *Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from Nyctanthes arbor-tristis, a well-known medicinal plant of India*. *Mycoscience*, 53(2), 113-121.
- 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.
- Goutam**, J., Sharma, G., Tiwari, V. K., Mishra, A., Kharwar, R. N., Ramaraj, V., & Koch, B. (2017). *Isolation and Characterization of "Terrein" an antimicrobial and antitumor compound from endophytic fungus Aspergillus terreus (JAS-2) associated from Achyranthus aspera Varanasi, India*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1334.
- Hasan**, C. M., Dutta, D., & Nguyen, A. N. (2021). *Revisiting Antibiotic Resistance: Mechanistic Foundations To Evolutionary Outlook*. *Antibiotics*, 11(1), 40.
- Kaushik**, A., Aron, A., Mihreteab, S., Mohamedkassm, N., & Kidane, E. M. (2015). *Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Medicinal Plants Used by Eritrean traditional healers*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(4), 501-509.
- Khan**, R., Shahzad, S., Chaudhary, M. I., Khan, S. A., & Ahmad, A. (2010). *Communities Of Endophytic Fungi In Medicinal Plant Withania somnifera*. *Pak. J. Bot*, 42(2), 1281-1287.
- Kirmusaoglu**, S. (Ed.). (2019). *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. BoD–Books on Demand.
- Kogel**, K. H., Franken, P., & Hüchelhoven, R. (2006). *Endophyte Or Parasite–What Decides?*. *Current Opinion In Plant Biology*, 9(4), 358-363.
- Lawrence**, D. P., Park, M. S., & Pryor, B. M. (2012). *Nimbya and Embellisia revisited, with Nov. comb for Alternaria celosiae and A. perpunctulata*. *Mycological progress*, 11, 799-815.

- Lozniewski A.**, Rabaud C., Nancy. (Juillet 2010). *Résistance Bactérienne aux Antibiotiques. Infections Associées aux Soins*. CCLIN Sud-Est..1 :1-4.
- Li X.**, Gu AZ., Zhang Y., Xie B., Li D., Chen J. (2019). Sub-lethal concentrations of heavy metals induce antibiotic resistance via mutagenesis. *Journal Of Hazardous Materials*, 369, 9-16.
- Madison** Gurney-White & Sahibjot Kaur 2021 *Oliphant Science Awards*.
- Malfanova, N.**, Lugtenberg, B. J., & Berg, G. (2013). *Bacterial Endophytes: Who and Where, and What Are They Doing There?. Molecular Microbial Ecology Of The Rhizosphere*, 1, 391-403.
- Mapperson, R. R.**, Kotiw, M., Davis, R. A., & Dearnaley, J. D. (2014). *The Diversity and Antimicrobial Activity Of Preussia sp. Endophytes Isolated from Australian dry rainforests. Current Microbiology*, 68, 30-37.
- Marcellano JP.**, Collanto AS., Fuentes RG. (2017). *Antibacterial Activity of Endophytic Fungi Isolated From The Bark of Cinnamomum mercadoi. Pharmacognosy Journal*, 9(3).
- Muylaert, A.**, & Mainil, J. (2013). *Résistance bactériennes aux antibiotiques, les mécanismes et leur" contagiosité". In Annales de Medecine vétérinaire (Vol. 156)*. ULg-Université de Liège, Liège, Belgium.
- Padhi, L.**, Mohanta, Y. K., & Panda, S. K. (2013). *Endophytic Fungi With Great Promises: a Review. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 3(3).
- Pandey, P. K.**, Singh, S., Yadav, R. N. S., Singh, A. K., & Singh, M. C. K. (2014). Fungal endophytes: *Promising Tools for Pharmaceutical Science. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25(2), 128-138.
- Pascale** Lesseur *.Antibiotiques : Modes D'action, Mécanismes De La Résistance* Par, pharmacien, Paris Publié le 07/04/2014.
- Pimentel, I. C.**, Glienke-Blanco, C., Gabardo, J., Stuart, R. M., & Azevedo, J. L. (2006). *Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (Glycine max (L.) Merrill) Under Different Environmental Conditions. Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 705-711.
- Porras-Alfaro, A.**, & Bayman, P. (2011). Hidden fungi, Emergent Properties: *Endophytes and Microbiomes. Annual Review of phytopathology*, 49, 291-315.

Praptiwi, R. M., 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(8), 069-074.

Ratul Saikia • 2008 • Aperçu • Autres éditions *Microbial Biotechnology* - Page 353

Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009). *Fungal Endophytes: Diversity and Functional Roles*. *New Phytologist*, 182(2), 314-330.

Sadrati, N. (2021). *Isolement, Identification Et Culture Des Champignons Endophytes Isolés à Partir des Plantes Médicinales Algériennes Pour La Production Des Métabolites Secondaires Biologiquement Actifs* (thèse doctorat).

Samson, R.A.; Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C. (2004). *Introduction to Food- and Airborne Fungi*, 7th ed. Centraal bureau voor Schimmelcultures, Utrecht. Gunde-Cimerman N, Zalar P, Hoog GS de, Plemenitaš A (2000). *Hypersaline water in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts*. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235–240.

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.

Senequier-crozet A., Canard B. (2016). *Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique*. Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie. Université de Grenoble France.

Simmons, E. G. (2007). *Alternaria: An Identification Manual* (No. PA 632.488 S56.).

Slepecky, R. A., & Starmer, W. T. (2009). *Phenotypic Plasticity In Fungi: a Review With Observations on Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 101(6), 823-832.

Srinivasan, K., Jagadish, L. K., Shenbhagaraman, R., & Muthumary, J. (2010). *Antioxidant Activity Of Endophytic Fungus Phyllosticta sp. isolated from Guazuma tomentosa*. *Journal of Ph.*

Teiten, M. H., Mack, F., Debbab, A., Aly, A. H., Dicato, M., Proksch, P., & Diederich, M. (2013). *Anticancer Effect of Altersolanol A, A Metabolite Produced By The Endophytic Fungus Stemphylium Globuliferum, Mediated By its Pro-apoptotic and Anti-invasive Potential Via The Inhibition of NF-κB Activity*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(13), 3850-3858.

VonNussbaum•F.,Brands,M.,Hinzen,B.,Weigand,S.,andHäbich,D.(2006).

Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival ? *Angew.Chem.* 45, 5072–

5129. doi:10.1002/anie.200600350.

William C Lloyd III, MD, FACS — By Adam Rowden. *Medically reviewed* on September 29, 2022; *What is the difference between Gram-positive and Gram-negative bacteria?*.

Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria Redefined. Studies In Mycology*, 75(1), 171-212.

Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., et al. (2010). *Recent developments and future prospect of antimicrobial metabolites produced by endophytes. Microbiol. Res.* 165, 437-449. doi:10.1016/j.micres.2009.11.009.

Zabalgoitia, I. (2008). *Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens: a review. Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 138-146.

Zerroug, A. (2018). *Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de Retama raetam Forsk* (Doctoral dissertation).

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.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو عزل والتعرف على الفطريات الفطرية للنبات الطبي الجزائري *Retama retam* ثم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لهذه الفطريات ومستخلصاتها. من خلال العزلة والتعرف، حصلنا على أربع أنواع من ثلاثة أجناس من *Aurobasidium* و *Alternaria* و *Aspergillus*. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للفطريات باستخدام تقنية اسطوانة الاجار، حيث أظهرت جميع السلالات الفطرية المعزولة نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد واحدة على الأقل من البكتيريا المختبرة، مع مناطق تثبيط تتراوح بين 12 و 25 مم. علاوة على ذلك، كان *Aspergillus niger* ذات النشاطات المضادة للبكتيريا الأعلى، وكانت مناطق التثبيط ضد بكتيريا *Staphylococcus epidermis* 29 ملم على التوالي. بعد ذلك، تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات أسيتات الإيثانول لأربعة فطريات (واحد من كل جنس) بواسطة تقنية الانتشار القرصي. أظهرت النتائج أن *Aspergillus niger* و *Alternaria alternata* لهما أكبر منطقة تثبيط تبلغ 9.5 ملم ضد *Staphylococcus aureus*. أخيراً، تؤكد نتائجنا بوضوح أن النبتة الداخلية للنبات الطبي *Retama retam* هي مصدر للمواد المضادة للميكروبات ولديها إمكانية للتطور في المجال الصيدلاني.

Abstract

The aim of this study was to isolate and identify the endophytic fungi of the Algerian medicinal plant *Retama retam*, and then to evaluate the antibacterial activity of these fungi and their extracts. By isolation and identification, we obtained four strains of three genera of *Aurobasidium*, *Alternaria* and *Aspergillus*. The antibacterial activity of the fungi was assessed by the agar cylinder technique, in which all-fungal strains isolated showed antibacterial activity against at least one of the bacteria tested, with zones of inhibition varying between 12 and 25 mm. Moreover, *Aspergillus niger* had the highest antibacterial activities, and their zones of inhibition against *Staphylococcus epidermis* were 29 mm respectively. Next, the antibacterial activity of acetate ethanol extracts of four fungi (one from each genus) was determined by the disk diffusion technique. The results showed that *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* had the largest zone of inhibition of 9.5 mm against *Staphylococcus aureus*. Finally, our results clearly confirm that the endophyte of the medicinal plant *Retama retam* is a source of antimicrobial substances and has potential for development in the pharmaceutical field.

Résumé

Le but de cette étude est d'isoler et d'identifier les champignons endophytes de la plante médicinale Algérienne *Retama retam*, puis d'évaluer l'activité antibactérienne de ces champignons et de leurs extraits. Par isolement et identification, nous avons obtenu quatre souches de trois genres d'*Aurobasidium*, *Alternaria* et *Aspergillus*. L'activité antibactérienne des champignons a été évaluée par la technique du cylindre de gélose, dans laquelle toutes les souches fongiques isolées présentaient une activité antibactérienne contre au moins une des bactéries testées, avec des zones d'inhibition variant entre 12 et 25 mm. De plus, *Aspergillus niger* avaient les activités antibactériennes les plus élevées, et leurs zones d'inhibition contre *Staphylococcus épédermise* étaient respectivement de 29 mm. Ensuite, l'activité antibactérienne des extraits à l'éthanol d'acétate de quatre champignons (un de chaque genre) a été déterminée par la technique de diffusion sur disque. Les résultats ont montré que *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata* avait la plus grande zone d'inhibition de 9.5 mm contre *Staphylococcus aureus*. Enfin, nos résultats confirment clairement que l'endophyte de la plante médicinale *Retama retam* est une source de substances antimicrobiennes et a un potentiel de développement dans le domaine pharmaceutique.