

République Algérienne Démocratique et Populaire



Université Abdelhamid  
Ibn Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie

جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة والحياة



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**BENAOULA Nesrine Yousra**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES**

**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

**THÈME**

**Evaluation de l'activité antimicrobienne  
des champignons endophytes isolés des  
algues marines du littoral de Mostaganem**

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président	DJIBAOUI Rachid	Pr	U. Mostaganem
Encadrante	BENGUENAB Asma	MCB	U. Mostaganem
Examinatrice	SIDHOUM Warda	MCA	U. Mostaganem

Année universitaire 2024/2025

## ❁ Remerciements ❁

Avant tout, je rends grâce à Dieu, Le Tout-Puissant, pour m'avoir accordé la patience, la force et la volonté nécessaires à la réalisation de ce travail.

J'adresse mes remerciements respectueux à **Monsieur DJIBAOUI Rachid**, président du jury, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'évaluer ce mémoire.

Ma profonde reconnaissance va également à **Mme SIDHOUM Warda**, examinatrice, pour l'attention qu'elle a portée à ce travail et ses remarques enrichissantes.

Je tiens à exprimer ma gratitude la plus sincère à **Mme BENGUENAB Asma**, mon encadrante, pour sa disponibilité, ses conseils avisés, son accompagnement bienveillant et son encadrement constant tout au long de ce travail. Je la remercie chaleureusement pour sa confiance et ses encouragements.

Mes remerciements les plus sincères à **Monsieur Abed Arabi** pour son aide précieuse et sa disponibilité et ton aide dans les moments où j'en avais le plus besoin.

Je n'oublie pas **Mme TEHALAITI Amina**, pour son assistance précieuse, ses conseils techniques et sa présence bienveillante au laboratoire de microbiologie et de biologie végétale.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble de **mes enseignants et enseignantes** tout au long de mon parcours académique, depuis la première année jusqu'à la fin de mon cursus. Leurs enseignements, leur exigence et leur engagement ont largement contribué à ma formation et à l'aboutissement de ce travail.

À tous ceux qui ont, de près ou de loin, participé à la réussite de ce mémoire, je vous adresse mes remerciements les plus profonds.

## ❁ Dédicace ❁

Je dédie ce mémoire :

À **ma mère**,

que Dieu lui fasse miséricorde.

Même si tu n'es plus là, tu vis en moi, dans chaque pas, chaque souffle, chaque réussite.

Je sais que, de là où tu es, tu es fière de moi, comme tu l'as toujours été.

Ce mémoire te revient avant tout, car ton amour ne m'a jamais quittée.

Tu restes, à jamais, ma lumière et ma force.

À **mon père**, pour son amour, son soutien indéfectible et sa présence rassurante à chaque étape de ma vie. Merci d'avoir toujours cru en moi.

À **mes deux chères grands-mères et grand père**, pour leur tendresse infinie et leurs prières constantes, qui m'ont accompagnée tout au long de ce parcours.

À ma sœur **Imene Bouchera**, pour son affection, sa compréhension et son soutien, même à distance et même avec ses propres responsabilités. Tu as toujours su rester proche de moi.

À mon frère **Mohamed Isslem**, pour sa gentillesse et ses encouragements. Je te souhaite du fond du cœur une belle réussite dans tout ce que tu entreprendras.

À mes chères collègues **Ikram et Roukaia**, pour leur aide précieuse, leurs conseils, leur orientation, et surtout leur soutien moral. Je vous remercie chaleureusement pour avoir été là dans les moments où j'étais découragée, en pleurs ou à bout. Votre amitié a été un véritable soutien.

À toutes celles et ceux qui m'ont soutenue de près ou de loin, je vous adresse ma profonde gratitude.

# Résumé

Face à la montée des infections dues à des bactéries multirésistantes, les champignons endophytes marins apparaissent comme une source prometteuse de nouvelles molécules antimicrobiennes. Ce travail vise à explorer le potentiel antimicrobien de champignons endophytes isolés de macroalgues marines collectées sur les côtes de Mostaganem (Algérie).

Des macroalgues ont été prélevées manuellement sur trois plages (Sidi El Madjdoub, Salamandre, Sablette). Les champignons endophytes ont été isolés par culture sur milieu PDA, puis purifiés et identifiés sur la base de critères macroscopiques et microscopiques. Leur activité antimicrobienne a été d'abord dépistée contre six souches microbiennes pathogènes par un test d'antagonisme et un test de diffusion sur gélose, suivie par la fermentation en milieu liquide, l'extraction des métabolites secondaires à l'acétate d'éthyle, l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits par la méthode de diffusion des disques sur gélose et la détermination des CMI et CMB.

Sur les onze espèces d'algues testées, six ont permis l'isolement de champignons endophytes. L'analyse macroscopique et microscopique des 10 isolats endophytes purifiés a permis d'identifier des espèces appartenant aux *Penicillium* et *Aspergillus*. Quatre isolats fongiques (UR1, UR3, CR2, AL6.1) ont présenté des activités antimicrobiennes notables. Les extraits des isolats CR2 et UR3 ont présenté des activités antimicrobiennes importantes contre toutes les souches testées avec des zones d'inhibition atteignant 11,23 et 11.56 mm, respectivement. Les résultats confirment que certains champignons endophytes associés aux algues marines peuvent produire des métabolites bioactifs aux propriétés antimicrobiennes intéressantes.

**Mots clés :** Champignons endophytes marins, Macroalgues, Activité antimicrobienne, Bactéries multirésistantes, *Penicillium*, *Aspergillus*

# Abstract

In front of the rise in infections caused by multi-resistant bacteria, marine endophytic fungi are emerging as a promising source of new antimicrobial molecules. The aim of this work is to explore the antimicrobial potential of endophytic fungi isolated from marine macroalgae collected from the coasts of Mostaganem (Algeria).

Macroalgae were collected manually from three beaches (Sidi El Madjdoub, Salamandre, Sablette). Endophytic fungi were isolated by culture on PDA medium, then purified and identified with macroscopic and microscopic criteria. Their antimicrobial activity was first screened against six pathogenic microbial strains by an antagonism test and an agar plug diffusion assay, followed by fermentation in liquid medium, extraction of secondary metabolites with ethyl acetate, evaluation of the antimicrobial activity of extracts by the agar disk diffusion method and determination of Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Bactericidal concentration (MBC).

From eleven algal species tested, six enabled the isolation of endophytic fungi. Macroscopic and microscopic analysis of ten purified endophytic isolates identified species belonging to *Penicillium* and *Aspergillus*. Four fungal isolates (UR1, UR3, CR2, AL6.1) showed significant antimicrobial activity. Extracts from isolates CR2 and UR3 showed important antimicrobial activity against all the microbial strains tested, with zones of inhibition reaching 11.23 and 11.56 mm, respectively. The results confirm that some endophytic fungi associated with marine algae can produce bioactive metabolites with interesting antimicrobial properties.

**Keywords:** Marine endophytic fungi, Macroalgae, Antimicrobial activity, multi-resistant bacteria, *Penicillium*, *Aspergillus*.

## ملخص

إن ارتفاع حالات العدوى التي تسببها البكتيريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية يجعل من الفطريات الإندوفيتية البحرية مصدرا واعدة لجزيئات جديدة من مضادات الميكروبات. الهدف من هذا العمل هو استغلال الخصائص المضادة للميكروبات للفطريات الإندوفيتية المعزولة من الطحالب البحرية الكبيرة التي تم جمعها من ساحل مدينة مستغانم (الجزائر).

تم جمع الطحالب يدويًا من ثلاثة شواطئ (سيدي المجدوب، صلامندر، صابلات). تم عزل الفطريات الإندوفيتية عن طريق الزرع على وسط PDA، ثم تم تنقيتها وتحديدتها على أساس خصائصها المورفولوجية. تم فحص نشاطها المضاد للميكروبات ضد ست سلالات ميكروبية مسببة للأمراض أولاً، باستخدام اختبار التضاد واختبار الانتشار في وسط الآجار، ثم التخمر في وسط سائل، واستخلاص المستقلبات الثانوية باستخدام أسيتات الإيثيل، وتقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات باستخدام طريقة الانتشار على طبق آجار بواسطة الاقراص ومن ثم تحديد الحد الأدنى لتركيز التثبيط والحد الأدنى للتركيز القاتل للبكتيريا.

من بين أحد عشر نوعًا من الطحالب التي تم اختبارها، مكنت ستة منها من عزل الفطريات الإندوفيتية. وقد حدد التحليل العياني والمجهري لعشر عزلات فطريات إندوفيتية انتماءها إلى نوعي *Aspergillus* و *Penicillium*. أظهرت أربع عزلات فطرية (UR1، UR3، CR2، AL6.1) نشاطًا كبيرًا مضادًا للميكروبات. أظهرت المستخلصات من العزلات CR2 و UR3 نشاطًا كبيرًا مضادًا للميكروبات ضد جميع السلالات الميكروبية التي تم اختبارها، حيث بلغت أقطار مناطق التثبيط 11.23 و 11.56 مم على التوالي. تؤكد النتائج أن بعض الفطريات الإندوفيتية المرتبطة بالطحالب البحرية يمكن أن تنتج مستقلبات نشطة بيولوجيًا ذات خصائص مضادة للميكروبات مثيرة للاهتمام.

**الكلمات المفتاحية :** الفطريات الإندوفيتية البحرية ، الطحالب البحرية الكبيرة، النشاط المضاد للميكروبات، البكتيريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية، *Aspergillus* ، *Penicillium*

# Sommaire

Remerciements

Dédicace

Résumé

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale : ..... 1

## Chapitre I : Généralités sur le règne fongique

1. Introduction au règne fongique .....	3
2. Phylogénie des champignons .....	3
2.1. <i>Chytridiomycota</i> .....	4
2.2. <i>Zygomycota</i> .....	4
2.3. <i>Dikarya</i> .....	5
2.3.1. <i>Ascomycota</i> :.....	5
2.3.2. <i>Basidiomycota</i> .....	5
3. Mode de vie .....	6
3.1. Le saprophytisme .....	6
3.2. Le parasitisme .....	6
3.3. La symbiose .....	7
3.4. L'endophytisme.....	7

## Chapitre II : les champignons endophytes

1. Définition des champignons endophytes.....	8
2. Classification des champignons endophytes .....	9
3. Mode de transmission des champignons endophytes .....	11
4. Interaction endophyte - hôte .....	12
5. Les champignons endophytes et les algues marines.....	12
5.1. Les algues marines.....	12
5.2. Les mycoendophytes des algues marines .....	14

## Chapitre III : les métabolites secondaires des champignons endophytes

1. Définition des métabolites secondaires .....	15
2. Molécules bioactives des champignons endophytes .....	15
3. Mécanismes de biosynthèse des métabolites secondaires chez les champignons endophytes .....	16

4.	Activités biologiques des métabolites secondaires des champignons endophytes.....	17
4.1.	Métabolites de champignons endophytes comme agents antibactériens .....	17
4.2.	Métabolites de champignons endophytes comme agents antifongiques .....	18
4.3.	Métabolites de champignons endophytes comme agents antioxydants.....	18
4.4.	Métabolites de champignons endophytes comme agents anti-inflammatoires.....	19
4.5.	Métabolites de champignons endophytes comme agents anticancéreux .....	19

#### Chapitre IV: Matériels et méthodes

1.	Echantillonnage .....	20
1.1.	Description du site d'échantillonnage.....	20
1.1.1.	Sidi El Madjdoub .....	20
1.1.2.	La salamandre .....	21
1.1.3.	Les sablettes.....	22
1.2.	Collecte et identification des algues .....	23
2.	Isolement des endophytes.....	26
2.1.	Isolement de champignons endophytes associés aux algues marines.....	26
2.2.	Purification des isolats fongiques : .....	26
2.3.	Identification des champignons purifiée.....	26
2.3.1.	Observation macroscopique.....	26
2.3.2.	Observation microscopique .....	27
➤	Méthode de la culture sur lame.....	27
2.4.	Conservation des champignons isolés .....	28
3.	Caractérisation et préparation des souches microbiennes .....	28
3.1.	Origine des souches microbiennes.....	28
3.2.	Réactivation et ajustement de la turbidité des souches pour les essais d'activité antimicrobienne.....	29
4.	Evaluation de l'activité antimicrobienne des isolats fongiques .....	30
4.1.	Test d'antagonisme sur milieu Mueller-Hinton (MH).....	30
4.2.	Méthode des cylindres d'agar (technique de diffusion sur gélose) .....	31
4.2.1.	Préparation des mycoendophytes tests .....	31
4.2.2.	Screening de l'activité antimicrobienne des mycoendophytes .....	31
5.	Fermentation et extraction des métabolites secondaires .....	33
6.	Détermination de l'activité antibactérienne des extraits.....	35
6.1.	Méthode de diffusion des disques sur gélose.....	35
6.2.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI / CMB) des extraits .....	35
7.	Analyse statistique.....	36

## Chapitre V: Résultats et discussion

1. Isolement des champignons endophytes associés aux algues marines.....	37
3. Évaluation de l'activité anti microbienne des isolats fongique .....	44
3.1. Test d'antagonisme sur milieu Mueller-Hinton (MH).....	44
3.2. Test des cylindres d'agar (technique de diffusion sur gélose) .....	47
4. Fermentation et extraction des métabolites secondaires .....	49
5. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits .....	50
5.1. Méthode de diffusion des disques sur gélose.....	50
5.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI / CMB) des extraits .....	53
Conclusion et perspectives.....	56
Références Bibliographiques.....	58

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les différents types de mycorhizes (Selosse et Le Tacon, 1998).....	7
<b>Figure 2</b> : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes (Kusari et Spiteller, 2012). .....	8
<b>Figure 3</b> : Classification des endophytes selon Stone <i>et al.</i> (2000) .....	9
<b>Figure 4</b> : Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés (Kusari et Spiteller, 2012).....	10
<b>Figure 5</b> : Les trois types d'algues, a) vert ( <i>Ulva lactuca</i> ; b) rouge ( <i>Glacilaria SP</i> ; et c) brune ( <i>Dictiopetrie polypodiode</i> .....	13
<b>Figure 6</b> : Importance pharmaceutique des composés provenant d'endophytes (Maheshwari, 2017). .....	16
<b>Figure 7</b> : Structure chimique d'un composé antibactérien isolé à partir de champignons endophytes (Maheshwari, 2017). .....	17
<b>Figure 8</b> : Vue satellitaire du site de prélèvement : Sidi El Madjdoub .....	20
<b>Figure 9</b> : Site de prélèvement des algues (Sidi El Madjdoub) .....	21
<b>Figure 10</b> : Vue satellitaire du site de prélèvement : La salamandre .....	21
<b>Figure 11</b> : Site de prélèvement des algues (La salamandre). .....	22
<b>Figure 12</b> : Vue satellitaire du site de prélèvement (Les salettes).....	22
<b>Figure 13</b> : Site de prélèvement des algues (Les salettes) .....	23
<b>Figure 14</b> : Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de culture sur lame.....	27
<b>Figure 15</b> : Méthode de conservation des souches fongiques endophytes sur milieu PDA ...	28
<b>Figure 16</b> : Schéma descriptif de la méthode du test d'antagonisme. ....	31
<b>Figure 17</b> : Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne des mycoendophytes par la technique des cylindres d'agar .....	32
<b>Figure 18</b> : Fermentation des champignons endophytes en milieu PDB .....	33
<b>Figure 19</b> : Fermentation et extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes avec l'acétate d'éthyle .....	34
<b>Figure 20</b> : Colonies des champignons endophytes obtenus après incubation à partir des algues marines : (a) <i>Ulva lactuca</i> ; (b) <i>Coulerpa racemosa</i> ; (c) <i>Gracilaria sp</i> ; (d) <i>Ceramium sp.</i> .....	38
<b>Figure 21</b> : Observation microscopique de quelques isolats fongiques obtenus par la méthode de la culture sur lame (a) AL3.1 ; (b) AL2.1 ; (c) AL2.2 (Grossissement x100). .....	43
<b>Figure 22</b> : Activité antagoniste de <i>Penicillium chrysogenum</i> (CR2) et <i>Penicillium sp.</i> (CR1) vis-à-vis les bactéries pathogènes .....	45
<b>Figure 23</b> : Activité antimicrobienne de quelques isolats fongiques contre (a), (b) <i>Klebsiella pneumoniae</i> et (c) <i>staphylococcus aureus.</i> .....	47
<b>Figure 24</b> : Effet des extraits d'acétate d'éthyle sur les bactéries pathogènes. (S. a) : <i>S. aureus</i> , (B. c) : <i>B. cereus</i> , (K. p) : <i>K. pneumoniae</i> , (P. a) : <i>P. aeruginosa</i> , (E1, E2, E3) : Extraits de AL6.1, UR3 et CR2 respectivement, (T+) : Témoin positif Ciprofloxacine, (T-) : Témoin négatif (DMSO). .....	51

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Conditions et sites d'échantillonnage des algues collectées .....	24
<b>Tableau 2</b> : Aspect macroscopique et identité des algues collectées .....	25
<b>Tableau 3</b> : Propriétés des souches microbiennes utilisées pour l'activité antimicrobienne ..	29
<b>Tableau 4</b> : Normes utilisées dans l'expression de la sensibilité des microbes à l'antibiotique avec des disques de 6 mm de diamètre (Ravelomanantsoa, 2004). .....	32
<b>Tableau 5</b> : Résultats d'isolement des mycoendophytes à partir d'algues marines .....	37
<b>Tableau 6</b> : Aspects macroscopiques et microscopiques des mycoendophytes isolés .....	40
<b>Tableau 7</b> : Résultats du test d'antagonismes sur milieu MH.....	45
<b>Tableau 8</b> : Résultats du screening préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats endophytes par la technique des cylindres d'agar.....	47
<b>Tableau 9</b> : Rendement d'extraction des métabolites secondaires avec l'acétate d'éthyle.....	49
<b>Tableau 10</b> : Activité antimicrobienne des extraits fongiques contre diverses souches microbiennes (n=3, moyenne $\pm$ écart type).....	51
<b>Tableau 11</b> : Valeurs des CMI et CMB (mg/mL) obtenus par les extraits fongiques des isolats UR3 et CR2 contre les différentes souches pathogènes.....	53

## Liste des abréviations

**ANOVA** : Analyse de variance

**ATB** : Antibiotique

**BN** : Bouillon nutritif

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**GN**: Gélose nutritive

**MH**: Mueller-Hinton

**NPKS**: Non-reducing Polyketide Synthase

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**PDB**: Potato Dextrose Broth

**PKS**: Polyketide Synthase

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène

**TTC** : Triphényltétrazolium

**UV** : Ultrat Violet

**INTRODUCTION**

**GENERALE**

### **Introduction**

La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques constitue un enjeu majeur de santé publique mondiale. L'apparition de souches multirésistantes, compromet l'efficacité des traitements actuels et menace les progrès médicaux réalisés ces dernières décennies. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies (ONU) tirent la sonnette d'alarme sur cette crise sanitaire, qualifiée de "menace fondamentale et durable pour la santé humaine" (Ban Ki-moon, 2016).

Dans ce contexte, la recherche de nouvelles sources naturelles d'antimicrobiens s'impose comme une priorité scientifique. Si les plantes médicinales terrestres ont déjà été largement explorées, les algues marines, encore peu étudiées, offrent une alternative prometteuse. Ces organismes aquatiques hébergent une grande diversité de micro-organismes symbiotiques, dont les champignons endophytes. Ces derniers vivent dans les tissus internes des végétaux sans provoquer de dommages, tout en produisant une large gamme de métabolites secondaires bioactifs aux propriétés variées : antibactériennes, antifongiques, antioxydantes, voire antitumorales (Strobel, 2003 ; Aly *et al.*, 2011 ; Rateb et Ebel, 2011).

Les champignons endophytes marins suscitent ainsi un intérêt croissant pour la recherche pharmaceutique, en raison de leur capacité à synthétiser des molécules naturelles complexes, souvent absentes chez les organismes terrestres. Plusieurs études récentes ont montré leur efficacité contre des souches pathogènes multirésistantes (Kjer *et al.*, 2010 ; Kamat *et al.*, 2020 ; El-Bondkly *et al.*, 2021). L'exploitation de cette biodiversité marine pourrait donc représenter une voie innovante pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens.

C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail, qui vise à isoler des champignons endophytes à partir d'algues marines récoltées sur la côte algérienne. Les isolats obtenus sont cultivés en milieu liquide afin de produire des extraits riches en métabolites secondaires. Ces extraits sont ensuite testés *in vitro* contre plusieurs souches bactériennes pathogènes, dont certaines multirésistantes, afin d'évaluer leur activité antimicrobienne.

L'objectif principal de ce mémoire est donc double : d'une part, valoriser la diversité fongique associée aux algues marines comme source originale de composés bioactifs ; d'autre part, contribuer à la lutte contre l'antibiorésistance en explorant de nouvelles pistes thérapeutiques naturelles. La méthodologie mise en œuvre comprend différentes étapes, à savoir :

## **Introduction générale**

---

- Isolement et l'identification des champignons endophytes à partir des algues marines collectées depuis trois plages de la côte de Mostaganem.
- Analyse du potentiel antimicrobien des isolats fongiques purifiés vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes et une souche levurienne en appliquant deux tests préliminaires : le test d'antagonisme et la technique des cylindres d'agar.
- Fermentation en milieu liquide et extraction des métabolites secondaires produits par les isolats endophytes sélectionnés.
- Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits fongiques par le test de diffusion sur disque.

**CHAPITRE I**  
**Caractéristiques**  
**générales du règne**  
**fongiques**

### 1. Introduction au règne fongique

Les champignons constituent un groupe diversifié d'organismes et sont ubiquistes dans l'environnement. Ce groupe comprend environ 90 000 espèces, et des milliers sont décrites chaque année. On estime qu'il pourrait y avoir plus d'un million d'espèces fongiques dans le monde, ce qui fait du règne fongique l'un des plus importants de l'arbre du vivant. Ils sont très variables, car ils comprennent des organismes macroscopiques et microscopiques. Tous partagent des caractéristiques communes. Ce sont des eucaryotes hétérotrophes immobiles, dotés d'une paroi cellulaire, différente de celle des plantes par sa composition (principalement la chitine). La plupart des champignons se reproduisent par reproduction sexuée et asexuée. Bien que nous n'en soyons pas conscients, les champignons ont un impact considérable sur nos habitudes quotidiennes, et notre société et notre mode de vie seraient très différents en leur absence. Les champignons sont largement répandus dans l'environnement et leurs effets et applications bénéfiques sont multiples. Mais ces organismes sont également à l'origine de ravageurs et de maladies dévastatrices ; leur contrôle est donc indispensable en agriculture et en biomédecine (Zaragoza, 2017).

### 2. Phylogénie des champignons

Le règne des champignons englobe un large éventail d'organismes, notamment des champignons, des moisissures, des lichens et des levures, qui jouent un rôle écologique crucial dans la décomposition et le cycle des nutriments (Stajich *et al.*, 2009 ; Spatafora *et al.*, 2017). La classification actuelle du règne des Eumycota (vrais champignons, Fungi ou Eumycètes) comprend 8 embranchements, 12 sous-embranchements et 46 classes, l'ancêtre des champignons étant présumé zoosporique (Spatafora *et al.*, 2017).

L'un des systèmes de taxonomie les plus répandus pour les champignons divise le règne des champignons en six catégories. Quatre d'entre elles sont des embranchements (parfois appelés divisions, un terme plus ancien). Chaque embranchement se distingue des autres par des différences minimales, mais significatives, dans les structures utilisées par les champignons pour la reproduction sexuée. On pense que toutes les classes, ordres, familles, genres et espèces d'un embranchement partagent un ancêtre commun (Heitman *et al.*, 2018).

### 2.1. *Chytridiomycota*

L'embranchement des Chytridiomycota comprend les chytrides. Ces petits champignons ressemblent beaucoup aux plus anciens champignons fossiles connus de la période vendienne. Les scientifiques pensent que les chytrides ont probablement été le premier groupe de champignons à se développer. Les espèces de chytrides actuelles possèdent des caractéristiques ancestrales absentes des embranchements apparus plus tard (Senequier-Crozet et Canard, 2016).

Les chytridiomycètes sont des champignons unicellulaires ou filamenteux, souvent microscopiques, qui vivent majoritairement en milieu aquatique ou humide. Leur thalle peut être simple (unicellulaire) ou former un réseau de filaments (mycélium peu développé). Ils se distinguent des autres champignons par la production de spores et de gamètes flagellés, appelés **zoospores**, capables de se déplacer dans l'eau. La reproduction peut être asexuée, par libération de zoospores mobiles, ou sexuée, par fusion de gamètes flagellés. Ces caractéristiques témoignent de leur position primitive dans l'évolution des champignons, avec un mode de vie adapté à l'environnement aquatique (Alexopoulos, Mims et Blackwell, 1996).

### 2.2. *Zygomycota*

L'embranchement des Zygomycota comprend des champignons que beaucoup de gens ne trouveraient que trop familiers. Ces champignons sont les moisissures du pain, du sucre et des aiguilles – des champignons à l'aspect duveteux qui semblent apparaître de nulle part sur le pain, les fruits et autres matières organiques riches en sucre. Certaines de ces moisissures se développent très rapidement. De délicieuses fraises rouges peuvent se transformer en une nuit en d'écœurantes taches blanc bleuté. Cependant, tous les Zygomycota ne vivent pas sur les fruits. D'autres membres de cet embranchement se trouvent dans le sol, les excréments, les racines des arbres et l'intérieur des insectes (Senequier-Crozet et Canard, 2016).

Les Zygomycota sont des champignons microscopiques qui ont des filaments appelés *hyphes*, souvent sans cloisons internes (on dit qu'ils sont coenocytiques). Leur reproduction se fait de deux façons. La reproduction asexuée est la plus courante : ils produisent des spores dans des petites structures en forme de boule appelées *sporangies*. En cas de conditions difficiles, ils peuvent se reproduire sexuellement en formant une spore spéciale et résistante appelée *zygospore*, issue de la fusion de deux cellules (Alexopoulos, Mims et Blackwell, 1996; Blackwell, 2011).

### 2.3. *Dikarya*

La phylogénétique moléculaire et la génomique modernes ont considérablement fait progresser notre compréhension de l'évolution fongique, révélant qu'*Ascomycota* et *Basidiomycota* forment le sous-règne monophylétique *Dikarya* (Spatafora *et al.*, 2017). Ils présentent une phase dicaryotique particulièrement longue dans leur cycle de vie.

#### 2.3.1. *Ascomycota* :

L'embranchement des *Ascomycota* regroupe environ les trois quarts de toutes les espèces de champignons connues. Toutes les espèces de cet embranchement forment des spores reproductrices à l'intérieur de cellules spéciales appelées asques. Ces asques ont la forme de minuscules sacs, ce qui explique pourquoi les membres de cet embranchement sont parfois des champignons à sac. La majorité des espèces d'*Ascomycota* sont très petites, voire microscopiques, mais l'embranchement comprend également des champignons plus grands, comme les pézizes.

La levure utilisée depuis des millénaires pour brasser la bière et faire du pain appartient à l'embranchement des *Ascomycota*. La source de la pénicilline, un médicament vital, se trouve dans cet embranchement, tout comme le champignon qui produit l'aflatoxine, un composé cancérigène présent dans les noix et les céréales infectées.

Les champignons de cet embranchement jouent un rôle important dans la transformation des matières végétales mortes en composés chimiques réutilisables, mais ils ne s'arrêtent pas là. Dans des conditions de température et d'humidité adéquates, certains Ascomycètes peuvent ingérer de la peinture murale ou même du kérosène, car ces substances contiennent des composés carbonés que les champignons peuvent digérer (Heitman *et al.*, 2018).

#### 2.3.2. *Basidiomycota* :

Chez les Basidiomycètes, les spores se développent à la surface de cellules caractéristiques en forme de quilles de bowling ou de massues (basidium signifie « massue » en latin). Il s'agit d'un groupe varié qui comprend des levures, des champignons aquatiques et de nombreux charbons et rouilles qui attaquent les plantes.

Presque tous les champignons de grande taille appartiennent également à l'embranchement des *Basidiomycota*. Ce sont des champignons que même les non-mycologues peuvent reconnaître : les champignons, les champignons vénéneux, les vesses-de-loup et les

champignons gélatineux, qui ont une surface humide et brillante (l'oreille de bois et le beurre de sorcière sont des exemples de champignons gélatineux) (Heitman *et al.*, 2018).

### 3. Mode de vie

Les champignons présentent des modes de vie divers, allant de saprophytes à mutualistes et pathogènes (Lowe et Howlett, 2012). Leur dispersion et leur distribution sont influencées par des facteurs environnementaux et des stratégies de sporulation dépendantes du mode de vie (Pickersgill *et al.*, 2017). Les génomes fongiques fournissent des informations sur la base génétique de différents modes de vie, en particulier pour les champignons symbiotiques comme les ectomycorhizes Martin, F., et Selosse, M. A. (Plett et Martin, 2011). Les champignons s'adaptent à divers défis environnementaux, notamment la dessiccation, la disponibilité en oxygène, les températures extrêmes et la compétition (Jennings et Lysek, 1999). La compréhension des modes de vie fongiques est essentielle pour évaluer leurs rôles écologiques, prédire la propagation des agents pathogènes et résoudre les problèmes liés à la protection des cultures et au changement climatique (Pickersgill *et al.*, 2017).

#### 3.1. Le saprophytisme

Les champignons saprophytes jouent un rôle écologique fondamental en décomposant la matière organique morte (Kameswaran *et al.*, 2009), contribuant ainsi au recyclage des nutriments dans les écosystèmes. Grâce à des enzymes extracellulaires puissantes, ils dégradent des substrats complexes comme la cellulose, la lignine ou la chitine. Ce mode de vie est particulièrement répandu chez les Basidiomycètes et les Ascomycètes du sol forestier, qui transforment la litière végétale en nutriments disponibles pour d'autres organismes (Deacon, 2006).

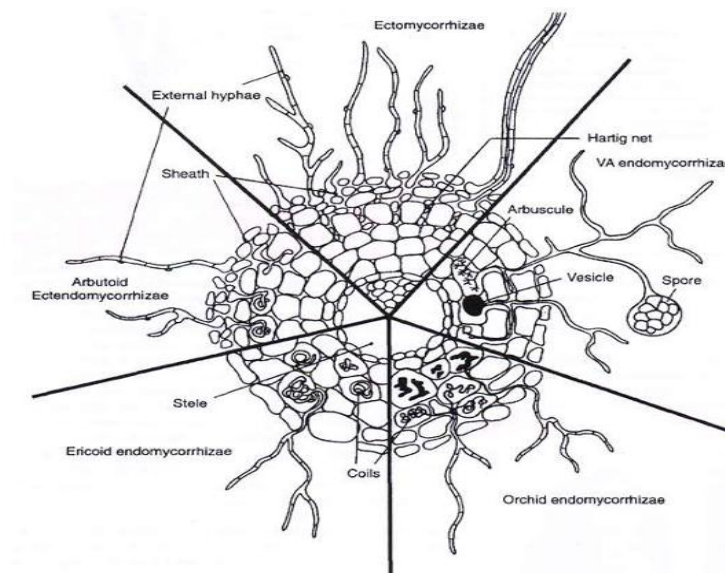
#### 3.2. Le parasitisme

Le parasitisme est un mode de vie adopté par certains champignons qui vivent aux dépens d'un hôte vivant, causant souvent des maladies. Ces champignons parasites pénètrent les tissus de l'hôte, s'en nourrissent et peuvent provoquer des dommages importants, notamment chez les plantes (comme la rouille ou le mildiou), les animaux ou même les humains. Ils sont capables de contourner les défenses de l'hôte pour survivre et se multiplier (Moore *et al.*, 2011).

### 3.3. La symbiose

Le symbiotisme caractérise une relation durable, voire indispensable et mutuellement bénéfique entre au moins deux êtres vivants, appelés symbiotes. Un exemple de symbiotisme développé par les champignons est l'association mycorhizienne. Les champignons utilisent les éléments nutritifs carbonés provenant de la photosynthèse et en retour, participent à la nutrition hydrominérale de la plante. Le symbiotisme mycorhizien est présent chez environ 95% des plantes vasculaires. Il en existe deux principaux grands types (Figure 1) :

- La symbiose ectomycorhizienne qui se caractérise par la formation du réseau de Hartig : réseau hyphal à la surface racinaire des plantes colonisées, servant de matrice d'échanges entre la plante et le champignon. Le champignon reste exclusivement extracellulaire.
- La symbiose endomycorhizienne, qui se caractérise par la formation de structures intracellulaires : les arbuscules qui sont des matrices d'échanges entre la plante hôte et le champignon et les vésicules qui sont des structures de stockage fongique. Ces dernières ne sont pas présentes dans toutes les espèces endomycorhiziennes (Senequier-Crozet et Canard, 2016).



**Figure 1** : Les différents types de mycorhizes (Selosse et Le Tacon, 1998).

### 3.4. L'endophytisme

L'endophytisme désigne un mode de vie adopté par certains champignons, caractérisé par une colonisation asymptomatique des tissus internes des plantes. Ce mode de vie fait l'objet de notre travail de recherche bibliographique.

# **CHAPITRE II**

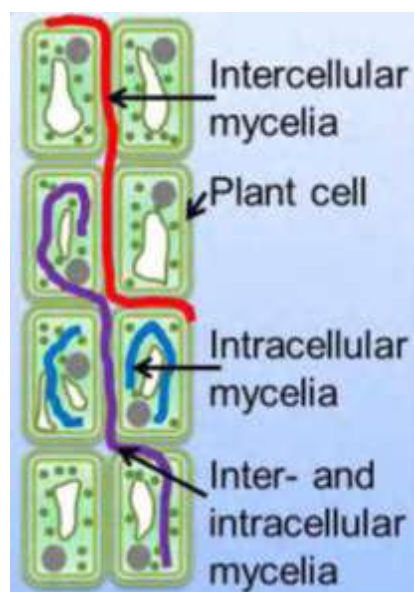
## **Champignons endophytes**

### 1. Définition des champignons endophytes

En 1884, le mot endophyte a été introduit par De Barry (1884), et certaines des premières publications sur les champignons endophytes ont été passées en revue par Freeman (1904). Au cours de la période de 1930-1990, un certain nombre de micro-organismes endophytes asymptomatiques ont été isolés à partir d'une variété de graminées et de plantes. Ces études ont encouragé l'isolement de ces micro-organismes uniques à des fins diverses, telles que l'extraction de nouveaux composés bioactifs.

Les endophytes sont un groupe de micro-organismes qui existent à l'intérieur des plantes sans provoquer aucun signe ou symptôme. De Barry (1884) a défini les endophytes comme « *toute forme vivante trouvée dans le tissu cellulaire de la plante ou les organismes qui résident dans les organes de la plante à un moment donné de leur vie et peuvent coloniser les cellules internes de la plante, les tissus sans causer de dommages à l'hôte* ». Une autre définition des endophytes donnée par Cabral et al. (1999) « *les endophytes sont les micro-organismes isolés des tissus internes de la plante sans aucun symptôme* ».

Les champignons sont le groupe le plus dominant des endophytes, ils colonisent les espaces intercellulaires et intracellulaires internes des plantes pendant au moins une partie de leur cycle de vie (figure 2), sans provoquer de maladies à leurs hôtes (Kusari et Spiteller, 2012).

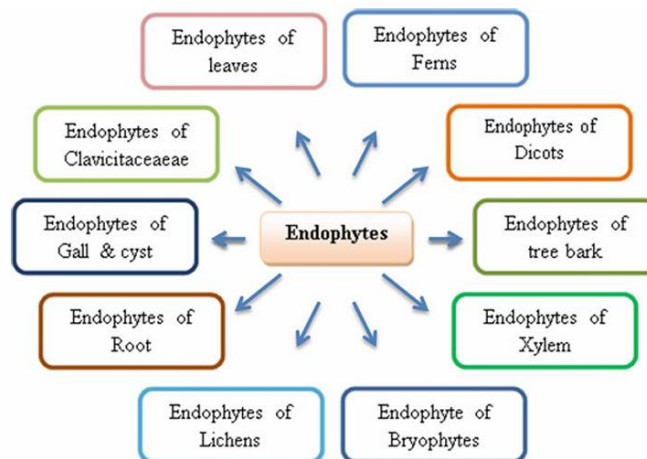


**Figure 2** : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes hôtes (Kusari et Spiteller, 2012).

## 2. Classification des champignons endophytes

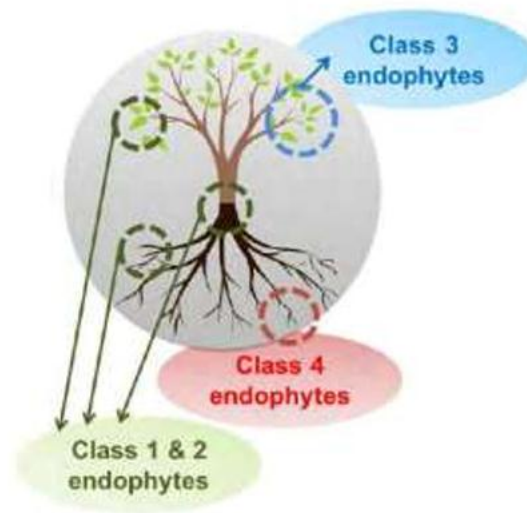
La classification des champignons endophytes est un domaine de recherche actif et en évolution, reflétant leur immense diversité et leurs rôles écologiques variés. Il n'existe pas une classification unique et universelle, mais plutôt différentes approches basées sur divers critères.

Stone *et al.* (2000) ont classé les endophytes en plusieurs catégories en fonction de leur localisation dans les organes végétaux qui appartiennent à des classes distinctes, comme les champignons endophytes des dicotylédones, des bryophytes, des fougères, des lichens, etc. (figure 3).



**Figure 3 :** Classification des endophytes selon Stone *et al.* (2000)

Rodriguez *et al.* (2009) ont reclassé les champignons endophytes sur la base de leur rôle et de l'endroit où ils ont été isolés du matériel végétal (figure 4) et ont classé les endophytes en quatre classes sous deux principaux groupes : les endophytes Clavicipitaceae (Classe 1) et les non-Clavicipitaceae (Classe 2, 3 et 4).



**Figure 4 :** Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés (Kusari et Spiteller, 2012)

Les endophytes de la **classe 1** sont constitués par des champignons appartenant à la famille des Clavicipitaceae (Ascomycota) (Sung *et al.*, 2007). Ce sont des endophytes systémiques qui colonisent principalement les graminées (Poaceae) et se transmettent souvent verticalement via les graines. Ils augmentent souvent la biomasse des plantes, augmentent la spécificité pour survivre dans des conditions de tolérance à la sécheresse et secrètent des produits chimiques toxiques qui sont nocifs pour les animaux de pâturage. Par conséquent, ces groupes de champignons aident leurs hôtes à se défendre contre les animaux qui broutent et d'autres organismes.

La classe **II** des champignons endophytes est un type spécial d'endophytes qui se développent à la fois dans les tissus supérieurs et souterrains de leurs hôtes et se transmettent aussi bien verticalement qu'horizontalement. Ils comprennent des champignons appartenant plus généralement aux *Ascomycota* et certains aux *Basidiomycota*. Ces types d'endophytes ont également le potentiel de fournir à l'hôte une tolérance au stress spécifique à l'habitat contre le pH, la température et la salinité (Maheshwari, 2017).

La classe **III** comprend principalement des champignons appartenant aux *Ascomycota* ou *Basidiomycota*. Ces endophytes qui sont caractérisés sur la base de leur présence principalement dans les tissus aériens, de la transmission horizontale et du modèle de localisation excédentaire. Ils induisent une résistance systémique chez leurs hôtes et les protègent contre les herbivores, les insectes et les agents pathogènes (Terhonen *et al.*, 2019).

La classe **IV**, quant à elle, regroupe des endophytes bruns cloisonnés appartenant principalement aux *Ascomycota*, se transmettant horizontalement et se limitent aux racines de leurs hôtes, et protègent ces derniers des pathogènes en réduisant la disponibilité en carbone dans le milieu (Mishra *et al.*, 2015 ; Hardoim *et al.*, 2015).

### 3. Mode de transmission des champignons endophytes

Les champignons endophytes utilisent généralement deux modes de transmission : la transmission verticale et la transmission horizontale.

Dans **la transmission verticale** les champignons endophytes sont transférés des plantes maternelles à la descendance en pénétrant leurs hyphes dans l'embryon des graines. La graine est donc le principal mécanisme par lequel la progéniture est infectée (Gagic *et al.*, 2018).

Lorsque les graines germent dans des conditions appropriées, les champignons endophytes entrent dans les plantes nouvellement formées pendant la germination de ces dernières, réalisant ainsi la transmission des champignons endophytes du parent à la progéniture (Hodgson *et al.*, 2014).

**La transmission horizontale**, quant à elle, se produit entre les plantes individuelles en développant des spores asexuées ou sexuées (Suryanarayanan, 2013). Ces spores pénètrent dans la plante hôte par des ouvertures naturelles ou artificielles (Soares *et al.*, 2017). Les spores en germination pénètrent dans une plante hôte, en traversant l'épiderme ou la cuticule, par digestion enzymatique (Petrini *et al.*, 1992).

#### 4. Interaction endophyte - hôte

Selon Schulz et Boyle (2005), les champignons endophytes établissent plusieurs types de relation avec leurs hôtes, allant du mutualisme, à l'antagonisme en passant par le commensalisme. La relation asymptomatique entre l'endophyte et son hôte est alors expliquée par une relation d'antagonisme équilibré, où le système immunitaire de l'hôte s'active dès l'entrée du champignon endophyte pour le contrer et limiter son développement ; en réponse à 7 Revue bibliographique cela, l'endophyte synthétise des métabolites secondaires, le protégeant contre les défenses de l'hôte. Dans cet équilibre entre la virulence fongique et la défense des plantes, les deux partenaires tirent profit l'un de l'autre, le champignon tire ses nutriments de son hôte, et il lui procure à son tour une protection contre divers stress aussi bien biotiques qu'abiotiques. Dans le cas où un déséquilibre se produit, dû à différents facteurs tels que les facteurs environnementaux, l'état nutritionnel des deux partenaires etc., l'hôte peut alors entraîner la mortalité de l'endophyte ou au contraire des symptômes de maladie apparaissent sur l'hôte à cause de l'endophyte (Sadрати, 2021).

#### 5. Les champignons endophytes et les algues marines

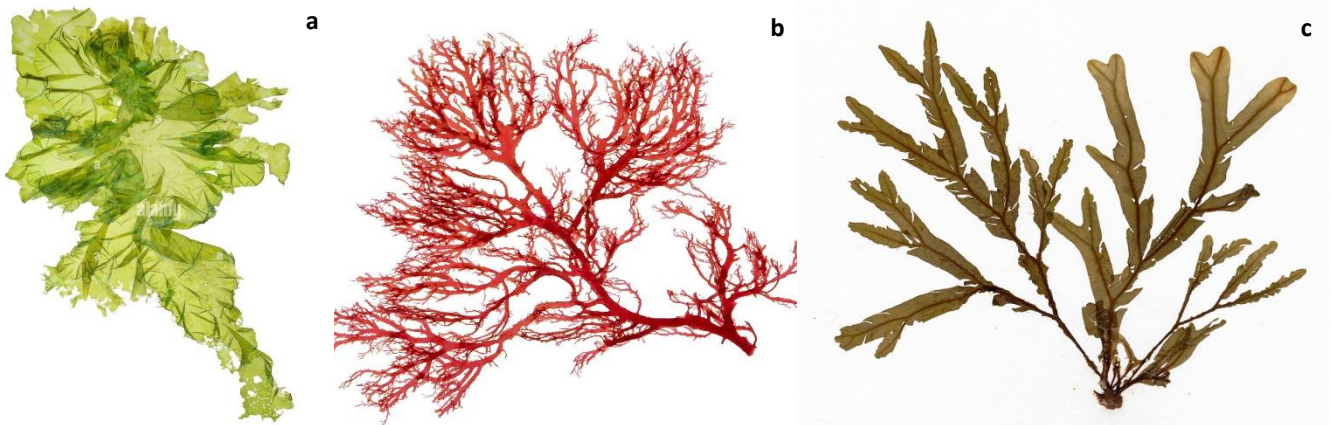
##### 5.1. Les algues marines

Les côtes marines ainsi que les océans possèdent les plus grandes richesses sur cette terre parmi lesquelles les algues. Ces entités constituent exclusivement la masse végétale des eaux marines. Elles sont définies comme étant des organismes photosynthétiques simples, typiquement autotrophes, pluri ou unicellulaires et sont considérées comme source de vie dans l'océan puisqu'elles y produisent l'oxygène. Elles sont considérées parmi les organismes végétaux les plus anciens sur ce monde (Cabioc'H *et al.*, 2006)

Les algues sont caractérisées par leur thalle, qui est un appareil végétatif uni- ou pluricellulaire, ne possédant ni racine, ni tige et ni feuille. Ces thalles présentent une taille variable de moins d'un micromètre à plusieurs dizaines de mètres. On distingue donc les macros et les micros algues. (Floc'h, 2010)

**Les macroalgues** possèdent généralement un appareil végétatif clairement distinguable à l'œil nu et sont fixées sur un substrat rocheux à travers des crampons qui sont souvent recouverts de sécrétions riches en polysaccharides, Ces macroalgues peuvent, elles-même, constituer un substrat pour de nombreuses communautés animales. La partie foliacée du thalle des macroalgues appelée fronde peut être sous forme de filaments, cordons ou lanières (Faller, 2011).

Les macroalgues comprennent une partie des algues vertes (phylum des chlorophytes) renfermant des chlorophylles (figure 5.a), les algues rouges (phylum des rhodophytes) chez lesquelles deux pigments – phycoérythrine et phycocyanine – dominant (figure 5.b) et les algues brunes (classe des phéophycées) qui contiennent de la fucoxanthine (figure 5.c) (Babich *et al.*, 2022).



**Figure 5 :** les trois types d'algues, a) vert (*Ulva lactuca* ; b) rouge (*Gracilaria SP* ; et c) brune (*Dictyota polyodiode*)

### 5.2. Les mycoendophytes des algues marines

Les mycoendophytes des algues marines sont des champignons microscopiques, principalement appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ou *Cladosporium*, qui vivent de manière endosymbiotique au sein des tissus de macroalgues rouges, brunes ou vertes, sans provoquer de symptômes pathologiques visibles chez leur hôte (Zuccaro *et al.*, 2008 ; Nicoletti et Andolfi, 2020). Ces symbiotes fongiques jouent un rôle écologique clé en conférant aux algues une résistance accrue face aux agents pathogènes marins ainsi qu'aux stress abiotiques tels que les variations de salinité, de température ou de lumière (Raghukumar, 2017). En plus de leur rôle protecteur, ces champignons produisent une grande variété de métabolites secondaires bioactifs notamment des composés antibactériens, antifongiques, antiviraux, antioxydants et cytotoxiques présentant un intérêt notable pour la recherche pharmaceutique, cosmétique et biotechnologique (Nicoletti et Andolfi, 2020 ; Jones *et al.*, 2013). Plusieurs études ont ainsi identifié des molécules issues de mycoendophytes marins susceptibles d'être exploitées dans le développement de nouveaux médicaments ou agents thérapeutiques. Par ailleurs, leur potentiel en bioremédiation notamment dans la dégradation des polluants marins, ainsi que leur capacité à renforcer la résilience des cultures d'algues en fait des alliés prometteurs pour une aquaculture durable (Raghukumar, 2017). Malgré ces perspectives, les mycoendophytes marins demeurent encore sous-étudiés par rapport aux endophytes terrestres, ce qui représente un vaste champ de recherche pour l'exploration de la biodiversité fongique marine et de ses applications.

**CHAPIITRE III**  
**Les métabolites secondaires des**  
**champignons endophytes**

L'étude systématique des métabolites secondaires fongique a commencé en 1922 sous la direction d'Harold Rais trick qui a fini par caractériser plus de 200 métabolites produits par les moisissures. Une étude bibliographique récente sur les métabolites fongiques a examiné 1500 composés déjà isolés. Entre 1993 et 2001, cette étude a montré que plus de la moitié de ces molécules avaient une activité antibactérienne, antifongique ou antitumorale. Etant donné l'accent mis sur l'activité physiologique, une méthode de classification courante des métabolites secondaires consiste à définir leur impact sur les intérêts humains, par exemple les toxines végétales, les hormones de croissance et les produits pharmaceutique (Keller *et al.*, 2005).

### **1. Définition des métabolites secondaires**

De nombreux champignons sont capable de produire des composés appelés métabolites secondaires, leur particularité est que leur production n'est pas nécessaire à la croissance des microorganismes, leurs structures et leurs activités biologique sont très diverses, ils sont généralement secrétés sous la forme d'un mélange qui constitue une structure chimique unique (Boiron, 1996).

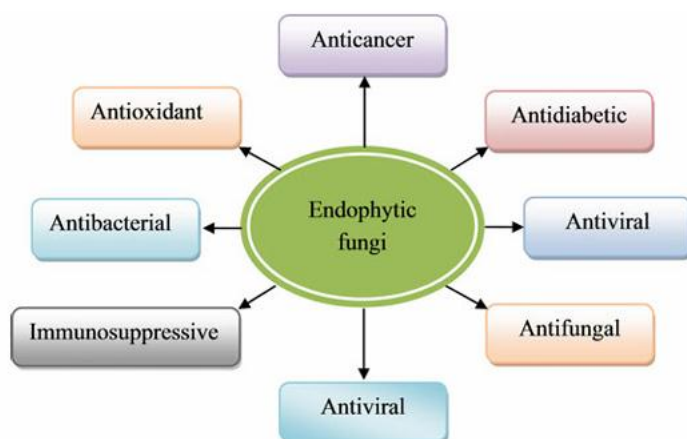
Les métabolites secondaires sont des composés qui ne jouent pas un rôle essentiel dans le métabolisme de base des champignons, ces composés sont habituellement fabriqués pendant l'idiophase et ont des structures chimiques hautement diversifiées, certains métabolites sont spécifiques pour une ou deux espèces tandis que d'autres peuvent être produits par des genres différents (Adams, 2002).

Certaines conditions environnementales peuvent affecter la production des métabolites secondaires, comme la composition du milieu de culture, l'activité de l'eau, la valeur de pH, la température, la teneur en oxygène et la présence d'organisme concurrents (Johanning *et al.*, 2002).

### **2. Molécules bioactives des champignons endophytes**

La déforestation excessive et l'extinction de quelques espèces végétales importantes ont entraîné la perte de préparations médicinales et de médicaments utiles pour les industries pharmaceutiques. En outre, l'extraction de nouveaux composés à partir de plantes pour les utiliser dans l'industrie pharmaceutique est un processus long, coûteux et laborieux. Par conséquent, l'exploitation des champignons endophytes pour la production de composés bioactifs similaires est apparue comme une voie alternative car quelques gènes impliqués

dans les voies de biosynthèse de la production de métabolites secondaires chez les plantes semblent également exprimables dans les champignons endophytes et les bactéries (Keller et *al.*, 2005). Les endophytes sont des usines biochimiques à l'intérieur des plantes qui sécrètent des métabolites naturels et qui ont un faible effet toxique sur les organismes supérieurs (Owen et Hundley, 2004). Les micro-organismes endophytes ont fourni une variété de nouveaux métabolites bioactifs avec une structure inimitable, synthétisés via diverses voies de biosynthèse. Les composés bioactifs isolés à partir de ces champignons endophytes n'ont pas seulement des propriétés sensorielles, mais contiennent également des propriétés intéressantes telles que des propriétés antivirales, antibactériennes, antifongiques, de réduction des graisses somatiques, antioxydantes, de régulation de la tension artérielle et anti-inflammatoires, ce qui indique l'importance pharmaceutique de ces composés, comme le montre la figure 6.



**Figure 6 :** Importance pharmaceutique des composés provenant d'endophytes (Maheshwari, 2017).

### 3. Mécanismes de biosynthèse des métabolites secondaires chez les champignons endophytes

La biosynthèse des métabolites secondaires chez les champignons endophytes repose sur l'activité de voies métaboliques spécialisées, distinctes du métabolisme primaire. Ces composés sont souvent produits en réponse à des conditions de stress ou à la compétition avec d'autres micro-organismes. Les principales familles de métabolites secondaires incluent les polycétides, les terpénoïdes, les alcaloïdes et les peptides non ribosomiques, chacun étant synthétisé par des enzymes spécifiques. Par exemple, les polyketide synthases (PKS) et les non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) sont des enzymes clés dans la formation de

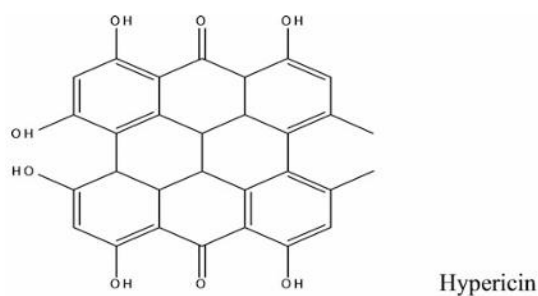
nombreuses molécules bioactives. Ces enzymes sont codées par des gènes regroupés en clusters, c'est-à-dire des ensembles de gènes contigus qui collaborent pour produire un métabolite spécifique. La régulation de l'expression de ces gènes dépend de plusieurs facteurs, dont le type de substrat, la composition du milieu de culture, le pH, la température, ou encore la présence de compétiteurs (Debbab *et al.*, 2011 ; Brakhage, 2013).

### 4. Activités biologiques des métabolites secondaires des champignons endophytes

Les endophytes et les champignons associés aux organismes marins, tels que les algues, sont reconnus pour leur capacité à produire une large variété de métabolites secondaires bioactifs. Ces composés naturels présentent un grand intérêt en pharmacologie, notamment pour leurs activités antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antitumorales, antioxydantes ou immunosuppressives (Debbab *et al.*, 2011).

#### 4.1. Métabolites de champignons endophytes comme agents antibactériens

Récemment, parmi les micro-organismes, les champignons ont été reconnus comme l'une des meilleures ressources pour de nouveaux composés bioactifs (Samuel *et al.*, 2011). La pénicilline a été la première et la plus importante découverte qui a permis d'obtenir une action efficace contre les bactéries Gram positives (Demain et Sanchez 2009). L'extrait brut d'*Aspergillus ochraceus* et *Penicillium citrinum* a montré des propriétés antibactériennes à large spectre, inhibant les germes en développement, en particulier *Pseudomonas aeruginosa*. L'hypericine (Figure 7), un composé dérivé de la naphthodianthrone, et l'émodine (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>), que l'on pense être le principal précurseur de la synthèse de l'hypericine, dans un champignon endophyte isolé d'une plante médicinale, ont une activité antimicrobienne contre un certain nombre de bactéries et de champignons, comme *Staphylococcus* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteric*, *Escherichia coli* et les organismes fongiques *Aspergillus niger* et *Candida albicans* (Kusari *et al.* 2012).



**Figure 7 :** Structure chimique d'un composé antibactérien isolé à partir de champignons endophytes (Maheshwari, 2017).

### 4.2. Métabolites de champignons endophytes comme agents antifongiques

Les scientifiques tentent de concevoir de nouveaux moyens pour augmenter la production alimentaire, la population mondiale étant en expansion. Malheureusement, de graves pertes sont causées par les champignons phytopathogènes. L'application de fongicides synthétiques est considérée comme l'une des solutions les plus employées, pour lutter contre ces maladies. L'activité antifongique des champignons endophytes est différente, selon les isolats. Certains ont montré un spectre antifongique plus large sur la croissance du mycélium de la plupart des champignons phytopathogènes testés (Chang Hong *et al.*, 2001). De ce fait et grâce à la richesse en métabolites antifongiques, les mycoendophytes représentent une source importante de métabolites bioactifs (Karaoui, 2017). A titre d'exemple, une étude reposant sur l'isolement des champignons endophytes à partir des feuilles de citron montre que 3 d'entre eux, à savoir : *Colletotrichum*, *Alternaria* et *Nigrospora* sont dotés d'un effet antifongique variable vis-à-vis de *Penicillium digitatum*, avec un taux d'inhibition supérieur à 60% (Guerbouz et Khoudour, 2020).

### 4.3. Métabolites de champignons endophytes comme agents antioxydants

Une substance antioxydante est toute substance qui retarde ou qui empêche la détérioration, le dommage ou la destruction par oxydation (Dekkers *et al.*, 1996). Il s'agit de plusieurs substances organiques, ces composés naturels ayant une activité antioxydante ont été explorés dans les organismes marins (Lee *et al.*, 2003 ; Ha *et al.*, 2013). Ces composés sont des ingrédients naturels intéressants dans plusieurs domaines, comme les conservateurs alimentaires, les ingrédients fonctionnels pour inhiber l'action des espèces réactives de l'oxygène (ROS), prévenant les dommages oxydatifs associés à plusieurs maladies (Lordan *et al.*, 2011), ou encore les cosmétiques pour se protéger contre les dommages oxydatifs associés à l'irradiation UV et au photo vieillissement (Pallela, 2014).

Les champignons endophytes jouent un rôle important dans la production de précieux composés bioactifs antioxydants. Theantana *et al.* (2011) ont isolé trente-neuf champignons issus de cinq plantes médicinales thaïlandaises, qui ont produit des composés phénoliques. Les composés phénoliques sont des antioxydants très importants et possèdent un pouvoir réducteur très élevé. Certains composés, tels que les polysaccharides isolés de champignons filamenteux marins comme *Penicillium sp* ont également été identifiés comme agents antioxydants.

### **4.4. Métabolites de champignons endophytes comme agents anti-inflammatoires**

Les maladies inflammatoires sont aujourd'hui l'une des pathologies les plus courantes, il est donc nécessaire de trouver de nouvelles sources d'agents anti-inflammatoires. Une étude récente des champignons marins a identifié 133 métabolites anti-inflammatoires, polycétides et terpénoïdes. Cependant le potentiel anti-inflammatoire des lipides d'origine fongique a été peu étudié, même si de fortes propriétés anti-inflammatoires ont été trouvées dans des fractions lipidiques du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Tsoupras, *et al.*, 2022). Les phlorotannins individuels isolés des algues brunes *Ecklonia sp.* Et *Eisenia sp.* Présentent une forte activité anti-inflammatoire par l'inhibition de la production de NO induite par le LPS (Jung *et al.*, 2013)

### **4.5. Métabolites de champignons endophytes comme agents anticancéreux**

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde en raison de son taux d'incidence élevé. Les cellules malignes tuent 15 millions de personnes par ans, et ce chiffre est en augmentation. Le cancer peut être traité avec des produits chimiques naturels sûrs, biocompatibles, moins toxiques et plus résistants provenant d'organismes endophytes. Ces produits chimiques naturels sont des alternatives au traitement du cancer par rapport aux médicaments chimio thérapeutiques. Ces substances chimiques naturelles sont anticancéreuses et peuvent contrôler de nombreuses tumeurs malignes. En raison de leur abondance, ils peuvent être utilisés pour traiter le cancer. Les champignons endophytes ont été associés à la production du médicament anticancéreux paclitaxel (Kousar *et al.* 2022). Le paclitaxel traite le sarcome de Kaposi, le cancer de la prostate, du poumon et de l'ovaire (Weaver, 2014).

# Chapitre IV

## **Matériel et méthodes**

Cette étude a été réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie (N°3) et au niveau du laboratoire de recherche de Microbiologie et Biologie végétale à l'université Abd Elhamid Ibn Badis de Mostaganem site Ex-INES.

L'objectif de la présente étude est l'isolement et l'identification des champignons endophytes à partir des macroalgues marines afin d'exploiter leur potentiel antimicrobien contre des bactéries et une levure caractérisée par leur pathogénicité et par leur résistance aux antibiotiques.

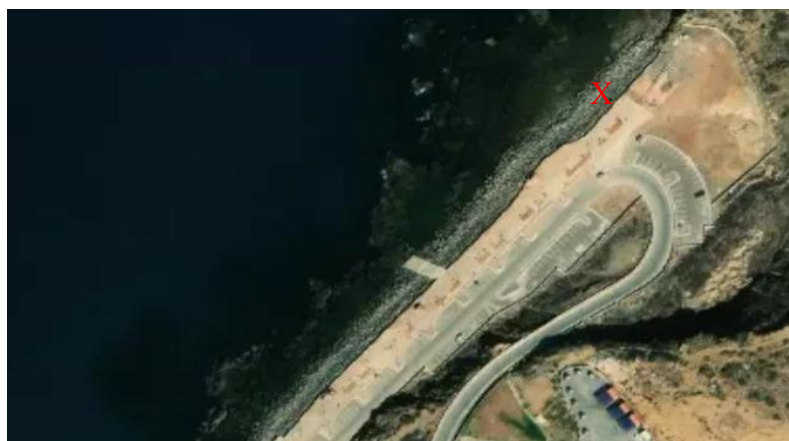
## **1. Echantillonnage**

### **1.1. Description du site d'échantillonnage**

Dans le cadre de cette étude, différentes espèces d'algues marines fraîches ont été collectées dans le but d'isoler des champignons endophytes. Les prélèvements ont été effectués dans trois sites côtiers de la wilaya de Mostaganem (Algérie), à savoir : la plage de Sidi El Madjdoub, la plage de Salamandre et la plage des Sablettes.

#### **1.1.1. Sidi El Madjdoub**

La plage de Sidi Madjdoub, située à environ 1 km à l'est du port de Mostaganem (coordonnées GPS : 36°02'285"N, 0°08'005"E) (figure 8), s'étend sur près de 3 kilomètres. Réputée pour son paysage naturel préservé, ses eaux tranquilles et son sable fin, elle attire aussi bien les habitants que les visiteurs. Au-delà de son attrait touristique, cette plage présente un écosystème intertidal riche en algues et micro-organismes, offrant un terrain propice à l'étude de la biodiversité fongique. Ces caractéristiques en font un site privilégié pour la recherche de champignons aux propriétés antibactériennes ou antifongiques.



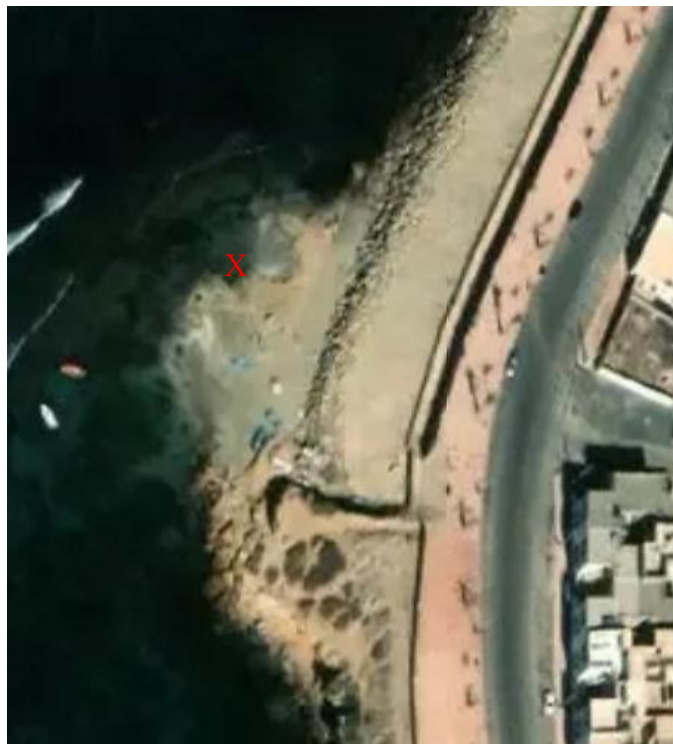
**Figure 8** : Vue satellitaire du site de prélèvement : Sidi El Madjdoub



**Figure 9** : Site de prélèvement des algues (Sidi El Madjdoub)

### 1.1.2. La salamandre

La Salamandre se situe à ( $35^{\circ} 55' 13.78''N$  ;  $0^{\circ}03'21.63''E$ ) (figure10). Se caractérise par une action hydrodynamique continue due au mouvement des vagues et de la houle. A plus de 10 m de profondeur, les dépôts sont constitués de roches et des blocs qui forment des cavités qui sont des habitats pour toutes sortes d'espèces, c'est un habitat très riche et diversifiés et son existence est dominé par des accumulations d'algues photophiles régulées par la transmission lumineuse pour cette raison il est très sensible à la turbidité de l'eau (Haddouche et Bainine, 2017).



**Figure 10** : Vue satellitaire du site de prélèvement : La salamandre



**Figure 11:** Site de prélèvement des algues (La salamandre).

### 1.1.3. Les sablettes

Cette plage se trouve dans le golfe d'Arzew, à seulement 5 km du centre-ville de Mostaganem (figure12). Réputée pour son sable fin et doré, elle attire de nombreux touristes grâce à son cadre naturel préservé. Ses coordonnées géographiques sont 35.9515°N, 0.1093°E (selon l'INVRST en Algérie, 2013).



**Figure 12:** Vue satellitaire du site de prélèvement (Les sablettes).



**Figure 13:** Site de prélèvement des algues (Les sablettes)

### **1.2. Collecte et identification des algues**











Les algues naturellement fixées aux roches, ont été prélevées manuellement, depuis les endroits côtiers, durant les mois de février, mars et avril (tableau 1), puis placées dans des boîtes contenant de l'eau de mer afin de préserver leur fraîcheur. Elles ont ensuite été transportées au laboratoire pour être traitées dans les meilleures conditions.

Les algues ont été soigneusement observées et identifiées. L'identification a été effectuée sur la base de critères morphologiques macroscopiques (forme, couleur, texture) et, si nécessaire, par observation microscopique (Kim, 2011 ; Guiry *et al.*, 2014). Les différentes espèces identifiées sont présentées dans le tableau 2.

**Tableau 1** : Conditions et sites d'échantillonnage des algues collectées

<b>Code d'algue</b>	<b>Date et heure de prélèvement</b>	<b>Site de prélèvement</b>	<b>Etat de la mer</b>
<b>AL11</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 09-03-2025</li> <li>▪ 15.00 pm</li> </ul>	Sablette	Peu agitée
<b>AL10</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 09-03-2025</li> <li>▪ 15.00 pm</li> </ul>	Sablette	Peu agitée
<b>UR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 16-03-2025</li> <li>▪ 11.00 am</li> </ul>	Sidi El Madjdoub	Agitée
<b>CR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 16-03-2025</li> <li>▪ 11.00 am</li> </ul>	Salamandre	Mer agitée
<b>AL5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 20-03-2025</li> <li>▪ 11.44 am</li> </ul>	Sablette	Calme
<b>AL1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 06-04-2025</li> <li>▪ 18.07 pm</li> </ul>	Sidi El Madjdoub	Agitée
<b>AL2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 06-04-2025</li> <li>▪ 19.30 pm</li> </ul>	Salamandre	Agitée
<b>AL3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 06-04-2025</li> <li>▪ 19.30 pm</li> </ul>	Salamandre	Agitée
<b>AL6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 06-04-2025</li> <li>▪ 19.30 pm</li> </ul>	Salamandre	Agitée
<b>AL7</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 06-04-2025</li> <li>▪ 19.30 pm</li> </ul>	Salamandre	Agitée

**Tableau 2 :** Aspect macroscopique et identité des algues collectées

		
<p><b>AL1:</b> <i>Dictiopetria polypodiode</i></p>	<p><b>AL2:</b> <i>Ceramium sp</i></p>	<p><b>AL3:</b> <i>Padina sp</i></p>
		
<p><b>UR :</b> <i>Ulva Lactuca</i></p>	<p><b>AL5:</b> <i>Glacilaria sp</i></p>	<p><b>AL6 :</b> <i>Peyssonnelia sp</i></p>
		
<p><b>AL7 :</b> <i>Jania Rubens</i></p>	<p><b>CR :</b> <i>Coulerpa Racemosa</i></p>	<p><b>AL10 :</b> <i>Asparagopsis armata</i></p>
		
<p><b>AL11 :</b> <i>Codium fragile</i></p>		

## 2. Isolement des endophytes

### 2.1. Isolement de champignons endophytes associés aux algues marines

La méthodologie générale utilisée pour l'isolement des champignons endophytes est celle décrite par Kumari *et al.* (2018). En bref, les échantillons d'algues ont été lavés à l'eau de mer stérile. Ensuite, ils ont été rincés à l'éthanol à 70 % pendant 60 s, puis à l'hypochlorite de sodium à 0,4 % pendant 30 s. Deux lavages à l'eau de mer stérile de 60 s chacun ont été effectués, puis les échantillons ont été tamponnés avec un papier absorbant stérile. L'algue a été coupée aseptiquement en segments d'environ 1,0 à 2,0 cm à l'aide d'une lame stérile et cinq morceaux ont été déposés sur des boîtes de pétrie contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) supplémentées en chloramphénicol (250 mg/L). Les boîtes ont été incubées pendant 7 jours à l'obscurité à  $28 \pm 2$  °C. Pour assurer une croissance exclusive des champignons endophytes, des gouttes du dernier rinçage à l'eau de mer ont été étalées sur des boîtes de PDA (Kamat *et al.*, 2020)

Pour chaque algue étudiée, les taux de colonisation (la fréquence d'isolement) ont été calculés selon Petrini et Fisher. (1988) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Fréquence (\%)} = \left( \frac{\text{Nombre de fragments ayant donné lieu à une colonie}}{\text{Nombre total de fragments mis en culture}} \right) \times 100$$

### 2.2. Purification des isolats fongiques :

Suite à une incubation de sept jours. Les champignons émergents ont été numérotés et purifiés en utilisant la technique des stries. Par la suite, les boîtes ont été incubées à 28°C pendant une durée de 5 à 7 jours. Cette méthode a facilité l'obtention de cultures pures à partir de diverses colonies isolées. Il est toujours nécessaire de procéder à un repiquage en cas de contaminations (Tan *et al.*, 2018).

### 2.3. Identification des champignons purifiée

L'identification des isolats fongiques est basée sur des études macroscopiques et microscopiques (Botton *et al.*, 1990 ; Visagie *et al.*, 2014; Carmen et Sciortino, 2017).

#### 2.3.1. Observation macroscopique

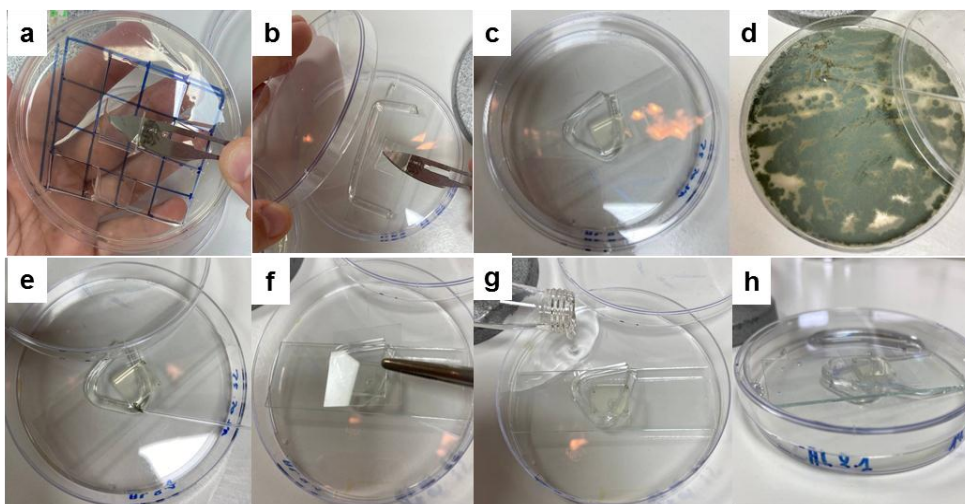
Il est nécessaire de caractériser les isolats sur milieu PDA par l'aspect de colonies qui sert de critère essentiel pour l'identification à l'œil nu des champignons filamenteux, il se forme des colonies cotonneuses, veloutées, poudreuses, ou granuleuses. La couleur des colonies est un facteur d'identification essentiel. Les couleurs les plus courantes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le brun et le noir. Les pigments peuvent être modifiés (Botton *et al.*, 1990).

### 2.3.2. Observation microscopique

L'identification du genre fongique est basée sur la structure du mycélium (cloisonné ou non cloisonné), le type des spores, leur forme et leur couleur. L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle en utilisant le colorant Rouge Congo si nécessaire, l'examen à l'objectif x40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (Chabasse *et al.*, 2002).

#### ➤ Méthode de la culture sur lame

La technique de culture sur lame a été également réalisée pour une bonne visualisation des organes de fructification (Harris, 1986). Cette technique consiste à déposer une tige de verre en U dans le fond d'une boîte de pétrie. Sur ce chevalet, une lame porte objet stérile est placée, puis un carré de gélose Sabouraud (15x15 mm) d'environ 5 mm d'épaisseur est fixé au-dessus (figure 14.a et b). Les côtés du bloc de gélose sont ensuite inoculés avec les spores de la culture à examiner (figure 14.d et e). L'ensemble est recouvert d'une lamelle stérile (figure 14.f) et déposé dans une boîte de pétrie contenant un peu d'eau distillée stérile (figure 14.g). La boîte est incubée à 25°C, puis examinée après l'apparition de spores sur la culture en déposant la lamelle sur une goutte de colorant posée sur une lame propre. Le carré de gélose a été aussi examiné sous microscope (grossissement x10 et x40). Les genres sont déterminés par les caractères cultureux et microscopiques en se référant au manuel de Barnett et Hunter (1972).



**Figure 14 :** Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de culture sur lame

## 2.4. Conservation des champignons isolés

Les isolats fongiques purs sont conservés pour une courte durée à 4°C sur gélose PDA incliné (figure 15), les cultures sont repiquées tous les 6 mois dans des milieux neufs.



**Figure 15 :** Méthode de conservation des souches fongiques endophytes sur milieu PDA

## 3. Caractérisation et préparation des souches microbiennes

### 3.1. Origine des souches microbiennes

Les souches microbiennes pathogènes utilisées dans cette étude appartiennent au laboratoire de recherche de microbiologie et biologie végétale de l'Université de Mostaganem. Elles comprennent six bactéries pathogènes et une levure opportuniste (*Candida albicans*) (tableau 3), elles ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des champignons endophytes isolés d'algues marines.

Ces souches ont été conservées sur des tubes inclinés contenant de la gélose nutritive (GN) à 4 °C jusqu'à leur réactivation.

**Tableau 3.** Propriétés des souches microbiennes utilisées pour l'activité antimicrobienne

Le code	Souche bactérienne	Référence	Description	Gram
S2	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	Bactérie sporulée responsable d'intoxications alimentaires par production de toxines.	Gram (+)
S3	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Cocci pouvant causer des infections cutanées et des intoxications alimentaires.	
S4	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659	Bactérie mobile, fréquemment impliquée dans les infections urinaires.	Gram (-)
S7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 25922	Bacille encapsulé responsable d'infections respiratoires et nosocomiales.	
S8	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 13316	Bactérie opportuniste pouvant provoquer des infections urinaires ou respiratoires.	
S9	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC 27853	Bactérie très résistante, souvent responsable d'infections nosocomiales graves.	
S10	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Levure pathogène responsable de candidoses superficielles ou systémiques.	

### 3.2. Réactivation et ajustement de la turbidité des souches pour les essais d'activité antimicrobienne

Avant toute évaluation de l'activité antimicrobienne des isolats fongiques, une étape indispensable de réactivation et de standardisation des souches microbiennes a été réalisée. Cette procédure a permis d'obtenir des cultures fraîches et standardisées, nécessaires pour assurer la reproductibilité et la validité des tests. Pour cela, une petite quantité de chaque souche a été prélevée à l'aide d'une anse stérile à partir des tubes de conservation sur GN,

puis ensemencée dans un bouillon nutritif (BN). Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 18 à 24 heures (Ouzid, 2018).

Une fois l'incubation terminée, une culture fraîche a été obtenue. Celle-ci a ensuite été ajustée à la concentration standard de 0,5 sur l'échelle de McFarland, correspondant à environ  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, en utilisant un spectrophotomètre.

L'ajustement de la densité cellulaire a été réalisé comme suit :

- Pour les souches bactériennes, la lecture s'est faite à une longueur d'onde de 625 nm, en utilisant comme blanc un tube contenant uniquement du bouillon BN.
- Pour la levure *Candida albicans*, la lecture s'est effectuée à 540 nm.

Le calibrage a permis l'homogénéisation des suspensions avant ensemencement sur boîte de gélose MH (Mueller-Hinton) pour les tests antimicrobiens.

#### **4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des isolats fongiques**

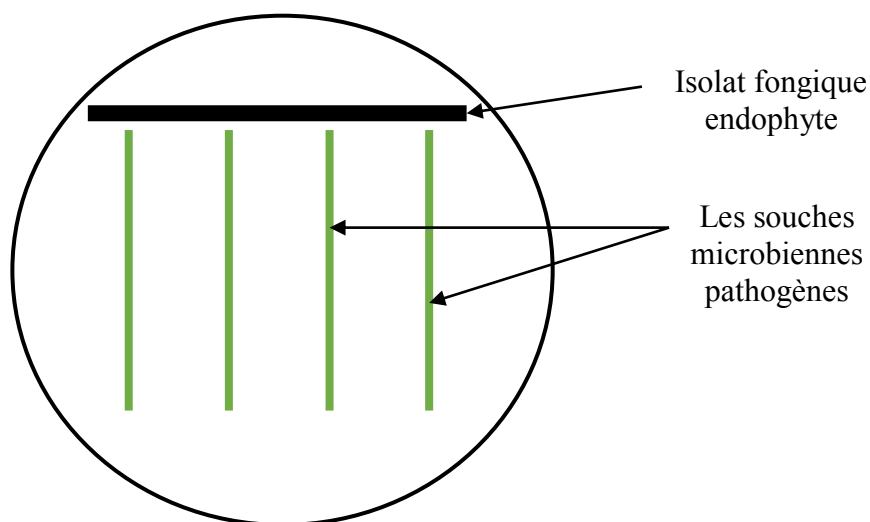
Deux méthodes ont été utilisées pour le criblage préliminaire des activités antibactériennes et anti-levuriennes des champignons endophytes isolés. La première est le test d'antagonisme sur milieu MH et la deuxième est la méthode de cylindre d'agar (la technique de diffusion sur gélose).

##### **4.1. Test d'antagonisme sur milieu Mueller-Hinton (MH)**

Le test d'antagonisme sur milieu Mueller-Hinton (MH) a été réalisé afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des isolats fongiques contre différentes souches bactériennes. La procédure consiste à ensemencer chaque isolat fongique en un seul trait sur la surface du milieu MH, suivi d'une incubation de 3 à 5 jours à 28 °C pour permettre le développement du champignon.

Par la suite, les souches bactériennes ainsi que la levure *Candida albicans* ont été ensemencées perpendiculairement au trait de croissance fongique (figure16). Après 24 heures d'incubation, l'activité antagoniste a été évaluée en mesurant la zone d'inhibition, c'est-à-dire la distance entre le bord du champignon et celui de la croissance bactérienne (Zainee *et al.*, 2021).

Ce test a permis d'évaluer de manière qualitative l'effet antimicrobien des isolats fongiques sur un panel de sept souches. Les résultats obtenus sont déterminants pour sélectionner les isolats les plus prometteurs en vue d'analyses plus approfondies.



**Figure 16 :** Schéma descriptif de la méthode du test d'antagonisme.

#### **4.2. Méthode des cylindres d'agar (technique de diffusion sur gélose)**

Cette technique a été décrite par Mandeel *et al.* (1998). Les cultures de 8 jours de mycélium sont utilisées pour tester leur pouvoir antimicrobien.

##### **4.2.1. Préparation des mycoendophytes tests**

Les champignons endophytes préalablement isolés, identifiés et purifiés ont été repiqués aseptiquement entre deux becs benzène, dans des boîtes de Pétri contenant du PDA, exempt d'antibiotique et incubées à température ambiante, pendant 8 jours.

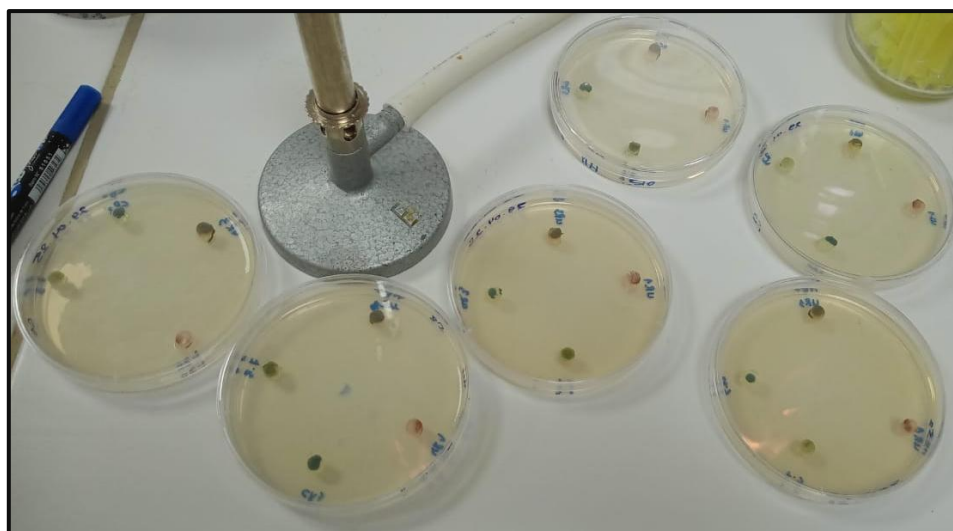
##### **4.2.2. Screening de l'activité antimicrobienne des mycoendophytes**

Tout d'abord, les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton (MH) ont été préparées. Ensuite les tubes contenant la souche bactérienne ont été agités au vortex. Un écouvillon a été trempé dans la suspension bactérienne, puis essoré de manière à éliminer l'excédent. La souche bactérienne a été étalée sur toute la surface du milieu Mueller-Hinton en stries serrées, en veillant à passer également sur les bords de la boîte de Pétri, afin de s'assurer que toute la surface est étalée (Ouzid, 2018).

Des disques de 6 mm de diamètre, prélevés à partir d'une culture de huit jours de mycoendophytes, ont été déposés sur la gélose MH à l'aide d'une pince stérile (Mandeel *et al.*, 1998). Un disque d'antibiotique le ciprofloxacine a été déposé dans chaque boîte comme témoin pour les souches bactériennes et l'econazole a été utilisé contre la levure *Candida albicans*.

Les boîtes de Pétri ont été laissées 30 mn à température ambiante, pour permettre la diffusion des métabolites bioactifs sécrétés par les mycoendophytes, puis mises à incuber à 37°C pendant 24 h. Les diamètres des zones d'inhibition autour des blocs de gélose correspondant à l'activité antimicrobienne ont été mesurés en mm, puis consignés (Karaoui, 2017).

Dans ce test, les disques des quatre mycoendophytes ont été disposés ensemble dans chaque boîte inoculée par les souches bactériennes (Figure 17).



**Figure 17 :** Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne des mycoendophytes par la technique des cylindres d'agar

La sensibilité des souches bactériennes testées vis-à-vis des champignons endophytes et de l'antibiotique est estimée, en mesurant la zone d'inhibition autour de chaque disque après 24 h et 48 h d'incubation. La présence de zones d'inhibition est observée autour des disques des mycoendophytes, produisant des métabolites antibactériens actifs contre la souche test. Plus cette zone est grande, plus l'activité antibactérienne est importante. Le tableau 4 permet d'évaluer le degré de sensibilité des bactéries à un antibiotique donné et de qualifier par conséquent le spectre d'action de l'antibiotique vis-à-vis des bactéries.

**Tableau 4 :** Normes utilisées dans l'expression de la sensibilité des microbes à l'antibiotique avec des disques de 6 mm de diamètre (Ravelomanantsoa, 2004).

Diamètre de la zone d'inhibition	Sensibilité des bactéries
$Z.I < 7$	Résistant
$7 < Z.I < 9$	Sensible
$Z.I > 9$	Très sensible

### 5. Fermentation et extraction des métabolites secondaires

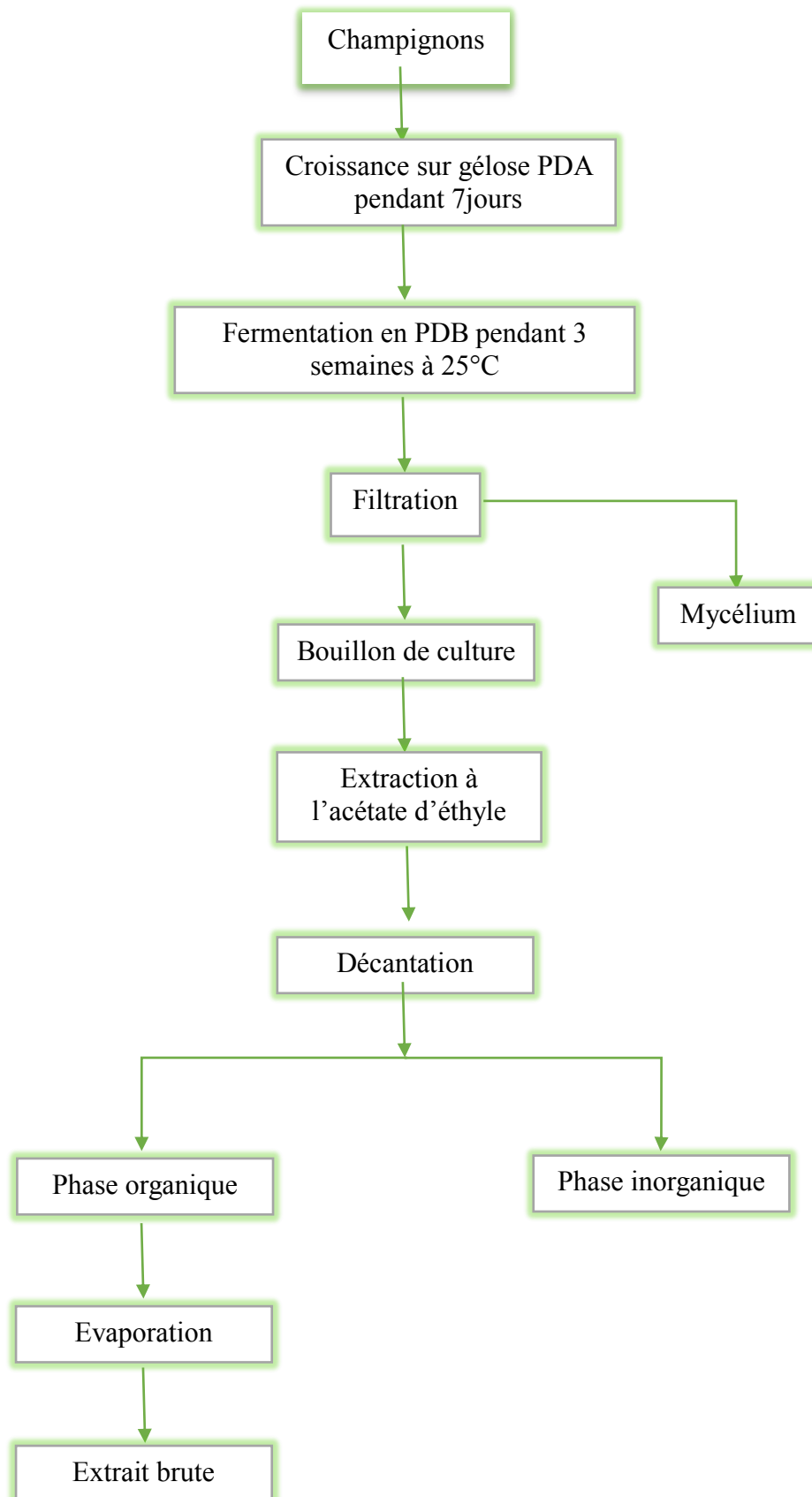
Quatre souches fongiques jugées comme étant les plus actives suite à des tests d'activités antimicrobiennes concluants, ont été sélectionnées pour la poursuite du travail.

Les champignons ainsi ayant un résultat positif au dépistage et identifiés, ont été mis à croître sur du PDA à 25°C pendant cinq jours, quatre pièces de 6 mm de diamètre de chaque champignon ont été inoculées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 250 ml de PDB (Potato Dextrose Broth) (Xiaoling *et al.*, 2010). Les erlenmeyers inoculés sont ensuite incubés à 25°C pendant trois semaines avec une agitation périodique à 120 tours/minute (figure 18). Après la période d'incubation, le contenu est filtré à travers une gaze stérile pour séparer le mycélium du bouillon de culture (Barik *et al.*, 2010; Mohanta *et al.*, 2008).



**Figure 18** : Fermentation des champignons endophytes en milieu PDB

L'extraction des métabolites secondaires sécrétés a été faite par un solvant organique, l'acétate d'éthyle ; en ajoutons au filtrat un volume égal de solvant et on le met sous agitation pendant 24 heures, la solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décanter pour séparer les deux phases, et la phase organique a été récupéré pour être concentré sous pression par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C (Mohanta *et al.*, 2008 ; Oliveira Silva *et al.*, 2009) (figure 19).



**Figure 19 :** Fermentation et extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes avec l'acétate d'éthyle

## 6. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits

### 6.1. Méthode de diffusion des disques sur gélose

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

Chaque extrait fongique a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de façon à obtenir une concentration de 30 mg/ml, 15 µl de chaque extrait ont été déposés à l'aide d'une micropipette sur les disques stériles (6 mm de diamètre) placés à la surface des géloses préalablement inoculés avec les souches, un disque imprégné par le DMSO a été utilisé en tant que contrôle négatif et Les ATB Céproflaxacine et Econazole ont été utilisés comme contrôle positif (Hazalin *et al.*, 2009).

Les boîtes ainsi préparées ont été mises à 4°C pendant 2 heures afin de permettre aux métabolites de se diffuser, ensuite elles ont été mises à incuber à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries, et à 30°C pendant 48 heures pour la levure.

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

### 6.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI / CMB) des extraits

Les CMI des extraits ont été déterminées en utilisant la méthode de macro-dilution en série dans le bouillon nutritif (Saha et Rahman, 2008). On procède à une dilution successive par progression géométrique à raison de 2 des extraits bruts concentrés. Chaque extrait brut a été dilué en série de 30mg/mL. Les inoculas ont été préparés dans le bouillon nutritif et standardisés à 0,5 McFarland. Un volume de 50 µl de suspension bactérienne a été ajouté dans chaque puits, à l'exception des témoins négatifs. Les ATB Céproflaxacine et Econazole ont été utilisés comme témoin positif. Du DMSO à 30 % et des extraits sans suspension bactérienne ont été utilisés comme témoins négatifs. Les plaques ont été incubées à  $35 \pm 2$  °C pendant 24 heures. (De Zoysa *et al.*, 2019).

Ensuite, 0,4% de TTC (triphenyltetrazolium chloride) préparé a été ajouté pour chaque puits. La CMI (concentration minimale inhibitrice) a été définie comme la concentration la

plus faible de la préparation d'extraits dans laquelle aucune croissance bactérienne ne s'est produite indiquée par la décoloration des puits.

L'examen de la CMB (concentration minimale bactéricide) consiste à transférer 5  $\mu$ L de chaque puits incolore dans des boîtes de pétri contenant la gélose Müller-Hinton puis un étalement en un strie a été réalisé. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. La croissance des colonies sur les boîtes de pétri a été vérifiée après cette période.

La CMB a été définie comme étant la plus faible concentration d'extrait qui a entraîné une inhibition complète de la croissance bactérienne (Berche *et al.*, 1991).

### **7. Analyse statistique**

Le test de l'activité antimicrobienne des extraits de l'acétate d'éthyle des isolats fongiques a été réalisé en triplicata, les résultats sont exprimés sous forme de moyennes et de leurs écarts types.

L'analyse ANOVA à un facteur (One-way ANOVA) suivie par le test post-hoc de Tukey a été réalisée pour comparer les moyennes des zones d'inhibition des extraits fongiques vis-à-vis les souches microbiennes pathogènes testées.

Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées à l'aide de logiciels IBM SPSS Statistics 26. Pour tous les tests, la signification statistique a été définie au seuil de probabilité de 5% ( $p \leq 0.05$ ).

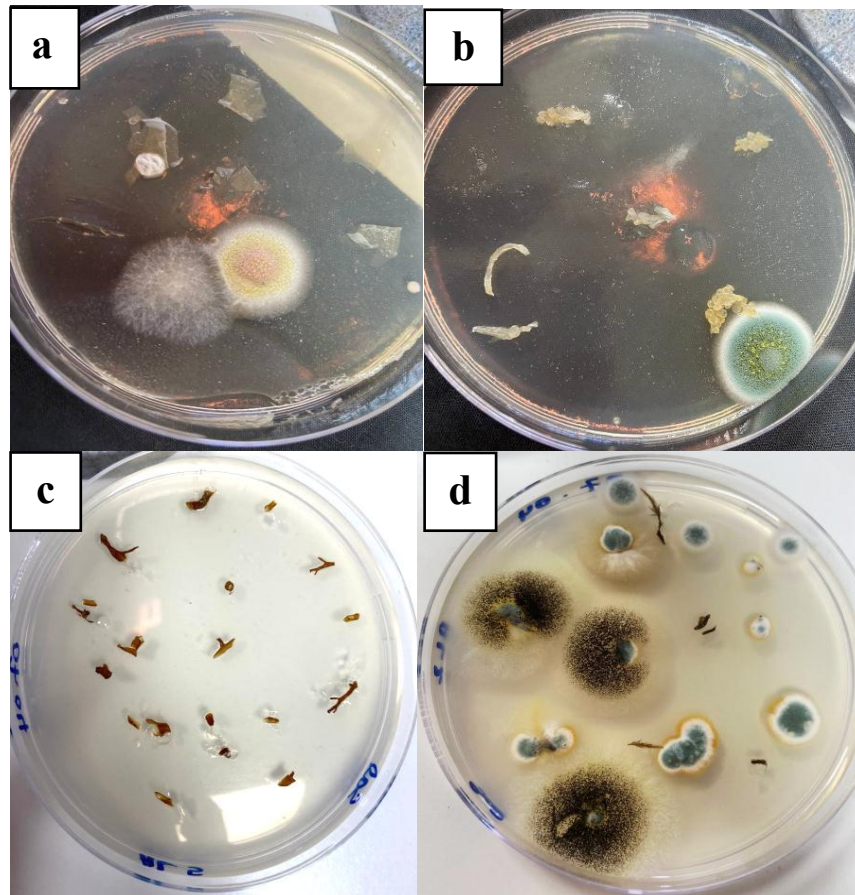
CHAPITRE V  
Résultats  
Et  
Discussion

### 1. Isolement des champignons endophytes associés aux algues marines

L'isolement des champignons endophytes à partir des algues collectées a été effectué sur le milieu PDA. Après incubation, le nombre de colonies fongiques obtenues à partir des fragments d'algues mises en culture a été comptabilisé afin d'évaluer la fréquence de colonisation des champignons endophytes. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 5 suivant :

**Tableau 5** : Résultats d'isolement des mycoendophytes à partir d'algues marines

Espèce d'algue	Le nombre total des colonies apparus dans chaque boîte	Aspect des colonies	Fréquence de colonisation (%)
<i>Ulva lactuca</i>	3	Colonies blanches filamenteuses, blanche rigide et colonie brune avec un contour blanc	42,86 %
<i>Coulerpa racemosa</i>	2	Colonie bleu-vert	13 %
<i>Ceramium SP</i>	2	Colonie noire poudreuse et colonie verte à bord blanc avec halo jaune	20,00 %
<i>Glacilaria SP</i>	0	Aucun développement fongique observé	0,00 %
<i>Codium fragile</i>	0	Aucun développement fongique observé	0,00 %
<i>Jania Rubens</i>	9	Colonies blanches filamenteuses et colonie verte à bord blanc	45 %
<i>Peyssonnelia sp</i>	2	Colonie noire poudreuse	22 %
<i>Padina sp</i>	3	Colonies vertes à bord blanc	27,27%
<i>Asparagopsis armata</i>	0	Aucun développement fongique observé	0,00 %
<i>Dictiopetrie polypodiode</i>	0	Aucun développement fongique observé	0,00 %



**Figure 20** : Colonies des champignons endophytes obtenus après incubation à partir des algues marines : (a) *Ulva lactuca* ; (b) *Coulerpa racemosa* ; (c) *Gracilaria sp.*; (d) *Ceramium sp.*

Aucune croissance de champignons n'a été enregistrée sur les milieux de culture utilisés pour le contrôle de l'efficacité de la stérilisation de surface. Ceci confirme l'efficacité des étapes utilisées dans le processus de stérilisation pour se débarrasser des microorganismes de surface (Epiphytes) et de leurs spores, et que les isolats obtenus peuvent être considérés comme étant des champignons internes (Endophytes) pour les algues étudiées.

L'analyse de la fréquence de colonisation des champignons endophytes dans les différentes espèces d'algues étudiées révèle une variabilité notable selon l'espèce. *Ulva lactuca* présente la fréquence de colonisation la plus élevée avec 42,86 %, ce qui suggère une forte capacité de cette algue à héberger des champignons endophytes. *Ceramium sp.* Suit avec une fréquence de 20 %, tandis que *Coulerpa racemosa* montre une fréquence plus faible de 16,67 %. Enfin, aucune souche fongique endophyte n'a été isolée à partir des algues *Gracilaria sp.*, *Codium fragile*, *Dictiopetrie polypodiode* et *Asparagopsis armata*. Cette absence pourrait être liée à des conditions spécifiques défavorables à l'établissement d'endophytes dans cette algue ou à des composés inhibiteurs présents dans ses tissus.

Dans l'étude de Mathan *et al.* (2013), la fréquence d'isolement de champignons endophytes à partir d'*Ulva lactuca* est de 30 %, soit légèrement inférieure à celle observée dans la présente étude (42,86 %). Concernant les espèces de *Gracilaria*, trois types ont été étudiés, toutes présentant des fréquences comprises entre 40 et 50 %, alors que dans notre cas, aucun isolat fongique n'a été récupéré à partir de *Gracilaria* sp. Egalement pour le genre *Codium*, Mathan *et al.* ont rapporté une fréquence élevée de 80 %, tandis que dans notre étude, *Codium* sp. n'a donné aucun résultat positif (0 %).




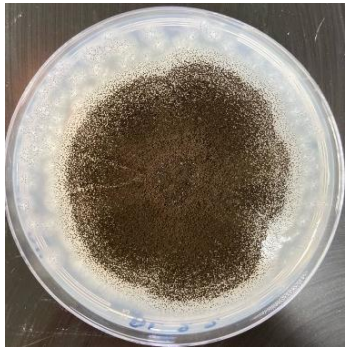
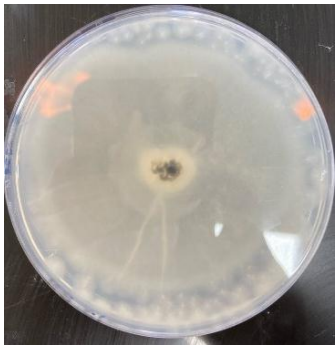



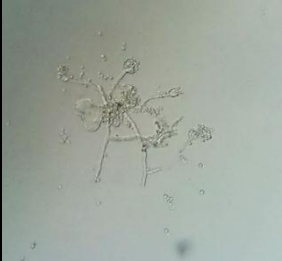
Les différences observées entre notre étude et celle de Mathan *et al.* (2013) peuvent être interprétées à la lumière de plusieurs facteurs. La fréquence élevée observée chez *Ulva lactuca* dans notre étude pourrait s'expliquer par des conditions environnementales plus favorables ou par une plus grande diversité fongique dans le site de prélèvement. À l'inverse, l'absence d'isolats fongique chez les algues *Gracilaria* sp. et *Codium* sp., pourtant productives dans l'étude de Mathan, peut être due à des variations entre les différentes espèces de la même algue, à la saison de collecte, ou due aux conditions microbiologiques du milieu marin local. Ces écarts soulignent l'importance du contexte écologique et des paramètres méthodologiques dans l'étude des communautés endophytes marines.

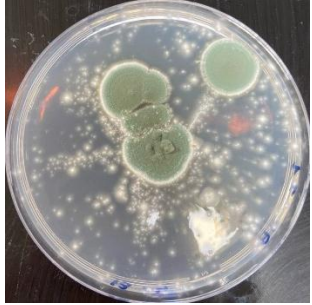



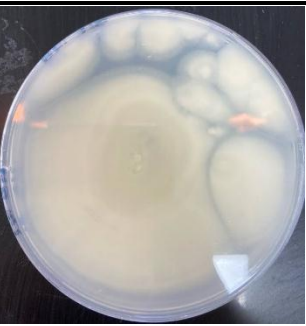
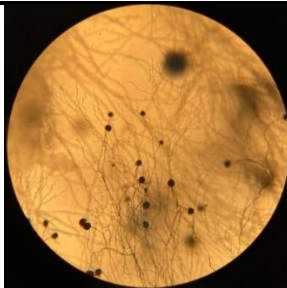
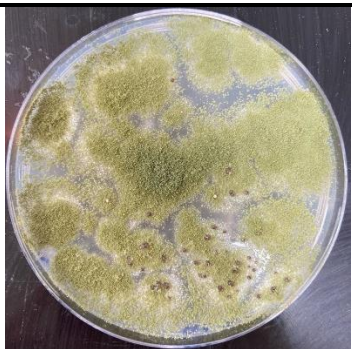



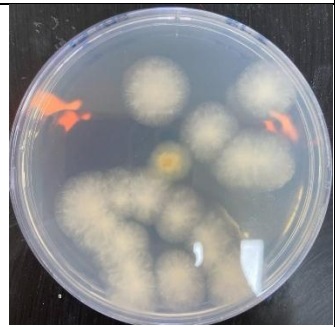

## **2. Identification des champignons endophytes isolés**



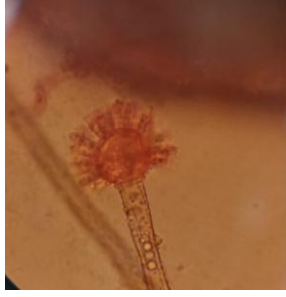
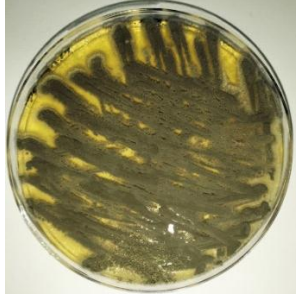

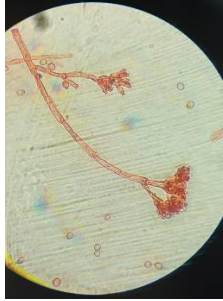


Un ensemble de 10 isolats fongiques endophytes différents a été obtenu après la purification de l'ensemble des colonies apparues dans l'étape d'isolement.

L'identification des champignons purifiés repose sur des critères macroscopique et microscopique (quelques champignons ont été utilisés le colorant rouge Congo). Elle permet d'identifier deux genres différents : *Penicillium* et *Aspergillus* (Tableau 6) (Pitt et Hocking, 2009).

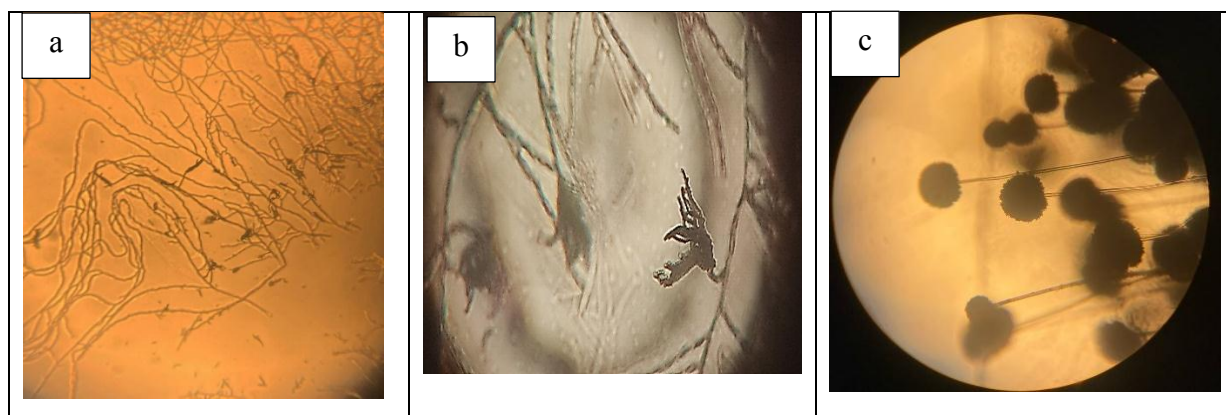
Tableau 6 : Aspects macroscopiques et microscopiques des mycoendophytes isolés

Code d'isolat	Observation Macroscopique		Observation Microscopique	Identité présumée
	Recto	Verso		
AL 2.1				<i>Penicillium SP</i>
AL 2.2				<i>Aspergillus SP</i>
AL 3.1				<i>Penicillium sp</i>

<p><b>AL 7.1</b></p>				<p><i>Penicillium sp</i></p>
<p><b>AL 7.2</b></p>				<p><i>Aspergillus SP</i></p>
<p><b>AL 7.3</b></p>				<p><i>Aspergillus flavus</i></p>
<p><b>CR1</b></p>				<p><i>Penicillium sp</i></p>

UR 1				<i>Aspergillus terreus</i>
CR 2				<i>Penicillium chrysogenum</i>
UR3				<i>Penicillium sp</i>

L'analyse microscopique des lamelles obtenus par la méthode de la culture sur lame après 4 jours d'incubation a permis également d'identifier le genre de quelques isolats (figure 21).



**Figure 21:** Observation microscopique de quelques isolats fongiques obtenus par la méthode de la culture sur lame (a) AL3.1 ; (b) AL2.1 ; (c) AL2.2 (Grossissement x100).

L'isolement des champignons endophytes à partir de différentes espèces d'algues a permis d'obtenir une diversité fongique notable.

Parmi les souches isolées à partir d'*Ulva lactuca*, l'un des champignons identifiés appartient au genre *Aspergillus*, plus précisément à l'espèce *Aspergillus terreus* (UR1). Ce résultat corrobore les travaux de Noor *et al.* (2024), qui ont également isolé *A. terreus* en tant que champignon endophyte associé à *Ulva* sp. Dans la région du golfe du Bengale. Cette similitude suggère que *Ulva* sp. Peut constituer un habitat favorable à certaines espèces fongiques spécifiques, indépendamment des conditions géographiques. La présence récurrente d'*A. terreus* dans ce type d'algue pourrait indiquer une relation écologique stable entre cette espèce fongique et l'hôte algal, potentiellement fondée sur des échanges de métabolites ou une adaptation environnementale.

Plusieurs recherches ont montré que les algues rouges hébergent une diversité importante de champignons endophytes. L'étude de Felício *et al.* (2015) menée sur des algues rouges a permis d'isoler plusieurs souches fongiques, appartenant principalement au genre *Penicillium*, qui ont démontré des activités antibactériennes, antifongiques et cytotoxiques. D'autre part, nos résultats confirment ces observations : à partir d'échantillons d'algues rouges, plusieurs espèces ont été isolées, dont *Penicillium* spp. (AL7.1), *Aspergillus flavus* (AL7.3) et *Aspergillus niger* (AL 6.1). Cette similarité de genres isolés entre les deux études suggère que les algues rouges représentent un environnement favorable à la colonisation par des champignons endophytes dotés d'un fort potentiel métabolique. Cela confirme également que certains genres, comme *Penicillium*, sont largement répandus dans les algues marines, et probablement bien adaptés à ce type d'habitat.

Dans l'étude menée par Deutsch *et al.* (2021), les chercheurs ont isolé des champignons endophytes à partir de plusieurs espèces d'algues marines collectées sur différents sites géographiques. Les algues étudiées incluaient *Ulva sp.*, *Padina pavonica*, *Gracilaria sp.* et *Jania rubens*. Les résultats ont révélé une variabilité marquée selon le site d'échantillonnage. Par exemple, *Ulva sp.* obtenus premier site n'a permis d'isoler aucun champignon endophytes alors que d'autre échantillons obtenus depuis deux autres sites ont permis d'isoler un et deux isolats différents. En comparaison, mes travaux ont permis d'isoler trois souches fongiques distinctes à partir de l'algue verte *Ulva lactuca*, ce qui montre une richesse fongique plus marquée. Cette différence pourrait être liée à la nature de la zone d'échantillonnage, au climat local, ou aux conditions abiotiques spécifiques (salinité, température, pollution, etc.) qui influencent fortement la colonisation endophyte.

### 3. Évaluation de l'activité anti microbienne des isolats fongique

Les champignons endophytes ont été dépistés pour leur pouvoir antimicrobien en utilisant deux méthodes. La première est le test d'antagonisme sur milieu MH et la deuxième est la méthode de cylindre d'agar.

#### 3.1. Test d'antagonisme sur milieu Mueller-Hinton (MH)

Le test d'antagonisme réalisé sur le milieu MH, selon la méthode du *cross-streak*, a permis une estimation préliminaire de l'activité antimicrobienne de ces isolats fongiques marins. Les résultats ont révélé une variabilité de la réponse bactérienne en fonction des isolats testés (tableau 7) (figure 22). La souche 3 (*S. aureus*) a présenté une croissance ralentie au contact du mycélium des isolats endophytes AL2.1 et AL6.1, et une sensibilité marquée face aux isolats AL2.2, AL3.1, AL7.3, CR1, CR2 et UR1. Une croissance très lente a été observée avec les isolats AL7.2, UR3 et CR2, traduisant une inhibition partielle. La souche 4 (*P. mirabilis*), quant à elle, s'est révélée résistante face aux isolats AL2.1, UR1, UR3, CR2 et AL7.2, tandis qu'une inhibition a été notée avec AL2.2 (zone de 8,47 mm), AL6.1 (3,84 mm), AL7.3 (13,26 mm) et surtout CR2 (15,59 mm). Les souches S7, S8 et S9 se sont montrées globalement résistantes, à l'exception de S9 qui a présenté une croissance ralentie avec AL7.3. La souche S10 (*C. albicans*) a été résistante à AL2.1, AL2.2, et AL6.1, avec une croissance ralentie en présence de AL3.1, AL7.2 et UR1, et une sensibilité nette aux isolats AL7.3, UR3 et CR2. Ces résultats confirment le potentiel inhibiteur de certains champignons endophytes marins, révélant leur capacité à limiter la croissance de diverses souches pathogènes grâce à un contact direct sur milieu solide.

Tableau 7 : Résultats du test d'antagonismes sur milieu MH

Isolats Fongiques \ Souches microbiennes	S3	S4	S7	S8	S9	S10
AL2.1	CR	R	R	R	R	R
AL2.2	S	ZI = 8.47 mm	R	R	R	R
AL3.1	S	R	R	R	R	CR
AL6.1	CR	ZI = 3.84 mm	R	R	R	R
AL7.2	CTR	R	R	R	R	CR
AL7.3	S	ZI = 13.26 mm	R	R	CR	S
CR1	S	ZI = 15.59 mm	R	R	R	ZI = 13.01 mm
UR1	S	R	R	R	R	CR
UR3	CTR	R	R	R	R	S
CR2	CTR	R	R	R	R	S

R : résistante, S : sensible (absence de croissance), CR : croissance ralentie, CTR : croissance très ralentie, ZI : zone d'inhibition.

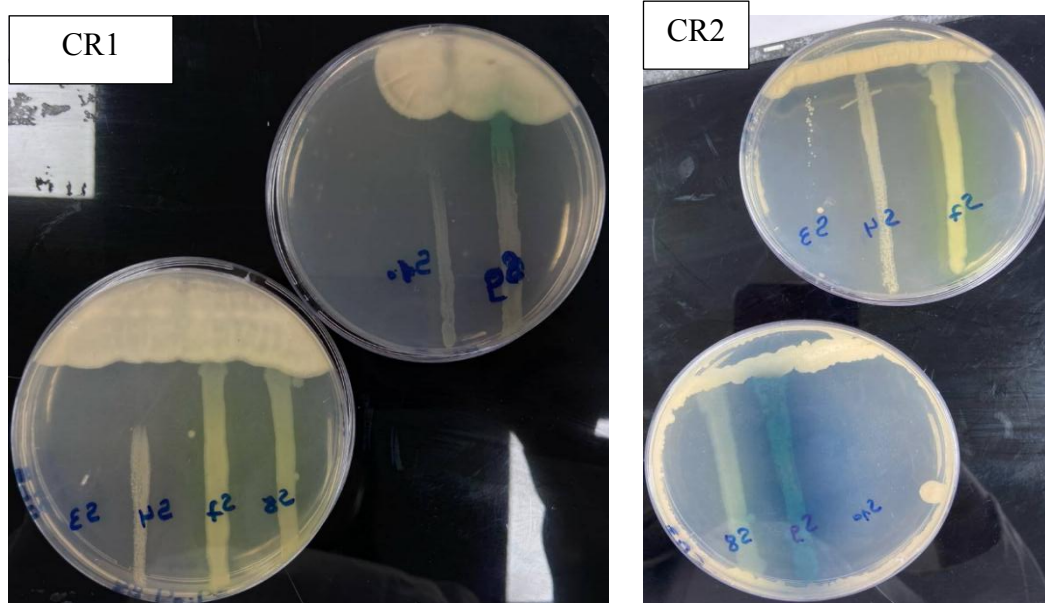


Figure 22 : Activité antagoniste de *Penicillium chrysogenum* (CR2) et *Penicillium sp.* (CR1) vis-à-vis les bactéries pathogènes

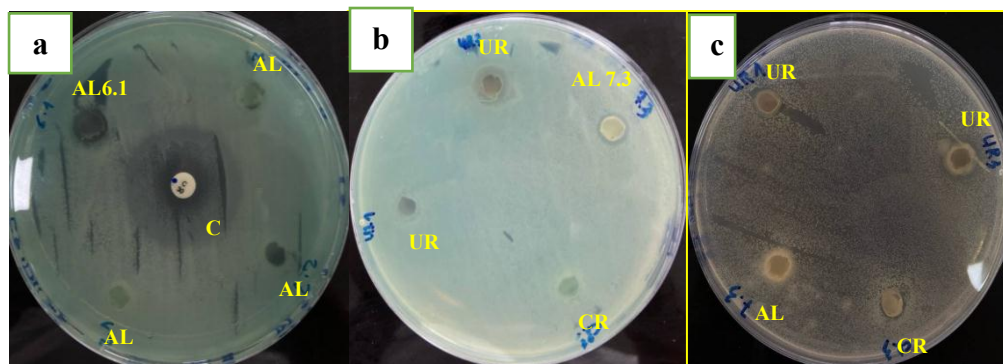
Ces résultats montrent le potentiel des champignons endophytes marins en tant que sources d'agents antimicrobiens actifs contre des bactéries pathogènes. En particulier, *Staphylococcus aureus* (souche 3) s'est révélée la plus sensible, suggérant qu'elle pourrait être un bon modèle pour détecter l'activité antibactérienne. L'absence de croissance ou la croissance très réduite face à plusieurs isolats fongiques indique la présence probable de métabolites secondaires bioactifs diffusés dans le milieu capable d'inhiber des bactéries résistantes.

La variation des zones d'inhibition observée pour certaines souches témoigne de la diversité d'action des champignons endophytes selon la souche bactérienne ciblée. De plus, la résistance de certaines souches (7, 8, 9) face à la majorité des champignons testés peut refléter un profil de multirésistance ou un manque d'affinité des métabolites produits. Ces données soutiennent l'idée que les champignons endophytes issus d'algues pourraient être une source prometteuse de nouvelles molécules antimicrobiennes, capables de cibler spécifiquement certaines souches pathogènes, notamment en contexte de résistance (Strobel et Daisy, 2003).

Les résultats obtenus dans notre étude peuvent être comparés à ceux rapportés par Zainee *et al.* (2021), qui ont évalué l'activité antibactérienne de champignons endophytes isolés d'algues marines par la méthode du cross-streak sur gélose Mueller-Hinton. Dans leur travail, *Aspergillus terreus* a montré une forte inhibition de *S. aureus* et une inhibition modérée de *K. pneumoniae*, indiquant un large spectre d'action. Ces observations concordent avec nos résultats, où l'isolat UR1 (identifié comme *A. terreus*) a exercé une action inhibitrice notable contre la souche S3 (*S. aureus*), traduite par une zone d'inhibition ou une croissance ralentie, tandis que la souche S7 (*K. pneumoniae*) est restée résistante, confirmant son comportement habituellement tolérant vis-à-vis des composés fongiques. De même, l'isolat AL6.1, correspondant à *A. niger*, a également induit une inhibition modérée de *S. aureus* dans notre étude, ce qui est cohérent avec les résultats de Zainee *et al.*, qui ont attribué cette activité à la production de métabolites secondaires par *A. niger*. En revanche, bien que CR2 ait montré une inhibition partielle de certaines souches dans notre test, son identification comme *P. chrysogenum* n'est pas totalement alignée avec l'étude de Zainee *et al.*, où cette espèce n'a démontré aucune activité significative contre *S. aureus* ni *Klebsiella*. Ces comparaisons renforcent la validité de notre protocole et mettent en évidence la concordance entre certaines de nos observations et les travaux antérieurs portant sur les champignons endophytes marins.

### 3.2. Test des cylindres d'agar (technique de diffusion sur gélose)

Un autre test préliminaire de l'activité antimicrobienne a été réalisé sur les dix isolats fongiques endophytes. Ces isolats ont été testés contre sept souches bactériennes, en utilisant la méthode de diffusion des cylindres d'agar sur gélose MH (figure 23).



**Figure 23** : Activité antimicrobienne de quelques isolats fongiques contre (a), (b) *Klebsiella pneumoniae* et (c) *staphylococcus aureus*.

**Tableau 8** : Résultats du screening préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats endophytes par la technique des cylindres d'agar

Isolats fongiques	Zones d'inhibition (mm)						
	S2	S3	S4	S7	S8	S9	S10
AL2.1	0	0	0	0	0	0	0
AL2.2	0	0	0	0	0	0	0
AL3.1	0	06.65	0	0	0	0	0
AL6.1	07.19	09.26	12.88	07.57	10.19	0	09.20
AL6.2	0	0	0	0	0	0	0
AL7.2	0	0	0	0	0	0	0
AL7.3	0	0	0	06.95	0	0	0
CR1	0	0	0	0	0	0	0
UR1	12.22	06.11	0	06.28	0	0	0
UR3	09.16	08.37	0	08.35	0	0	0
CR2	13.93	07.01	0	0	0	0	0
ATB*	20	18.9	25.8	22	29.2	24	28.61

\*Le Ciprofloxacine est utilisé contre les souches bactérienne alors que le Econazole est utilisé contre la levure *Candida albicans*.

Les résultats obtenus (tableau 8) montrent que certains isolats fongiques testés ont générés des zones d'inhibition comprises entre 5 et 13.93 mm, alors qu'aucune inhibition n'a été observée chez d'autres isolats fongiques.

Quatre champignons se sont démarqués par leur capacité à inhiber la croissance bactérienne de manière efficace. Il s'agit des isolats codés AL6.1, UR1, UR3 et CR2. Ces isolats ont généré des zones d'inhibition notables contre *staphylococcus aureus* (S3), celui d'AL6.1 a montré la plus large zone d'inhibition (9,23 mm), suivi par UR3 (8,37 mm), CR2 (7,01 mm), AL3.1 (6,65 mm) et UR1 (6,11 mm).

Ces observations rejoignent partiellement les résultats obtenus par Mathan et al. (2013), qui, à partir de champignons endophytes isolés d'algues telles que *Caulerpa racemosa*, ont rapporté des zones d'inhibition contre *S. aureus* majoritairement supérieures à 10 mm, traduisant une activité plus forte. Toutefois, leur étude mentionne également des isolats montrant une activité intermédiaire, avec des zones d'inhibition entre 5 et 10 mm, similaires à celles obtenues dans notre travail. Cela montre que les champignons endophytes issus d'algues marines présentent un potentiel antibactérien contre *S. aureus*.

La croissance de la souche *B. cereus* (S2) a été également inhibée par les quatre isolats fongiques signalés plus haut, et une sensibilité élevée ( $ZI > 9$ ) de cette bactérie a été notée contre les isolats endophytes UR1, UR3 et CR2 avec des zones d'inhibition de 12.22, 09.16 et 13.93 mm de diamètre, respectivement. Des résultats similaires ont été notés par Sadrati, 2021 qui a obtenu des zones d'inhibition importantes des isolats fongiques endophytes contre *B. cereus* en appliquant la même méthode des cylindres d'agar. Une autre recherche menée par Ouzid. 2018 a également enregistré la sensibilité de cette bactérie aux disques de deux champignons endophytes *Penicillium* et *Aspergillus*.

La troisième souche pathogène qui a montré une sensibilité modérée vis-à-vis quatre isolats fongiques (AL6.1, AL7.3, UR1 et UR3) est *K. pneumoniae*.

L'isolat AL6.1 (*A. niger*) a montré une inhibition notable contre toutes les souches microbiennes testées à l'exception de la bactérie *P. aeruginosa* (S9) qui a montré une résistance vis-à-vis tous les isolats testés. Cette résistance a été déjà enregistrée précédemment dans des recherches similaires (Sadrati, 2021 ; Allal et Hamma, 2019).

Des recherches précédentes portées sur des endophytes appartenant aux *Aspergillus* ont montré leur efficacité contre des souches pathogènes. Sadrati *et al.* (2020) ont étudié l'activité

antimicrobienne d'un isolat endophyte identifié comme *Aspergillus neobridgeri* PLR9. Leur étude a rapporté une forte activité contre *E. coli* (16 mm), *S. aureus* (15 mm) et *B. cereus* (10 mm) et une inhibition modérée contre *P. aeruginosa* (8 mm), mais aucune activité contre *C. albicans*.

Enfin, une période d'incubation plus lentes des champignons endophytes sur gélose PDA pourrait être nécessaire pour avoir une activité antibactérienne avec les isolats qui n'ont montré aucune inhibition vis-à-vis les souches pathogènes testés ou pour avoir des zones d'inhibition plus grandes pour les autres isolats potentes. Cette suggestion peut être confirmée par les travaux de Sadrati. 2021 qui a obtenu des zones d'inhibition allant jusqu'à 28 et 30 mm contre *S. aureus* et *B. cereus*, respectivement en utilisant des cylindres d'agar contenant des isolats fongiques endophytes incubés sur gélose PDA pendant 14 jours.

Suite à ces résultats, les quatre champignons endophytes AL6.1, UR1, UR3 et CR2 ont été sélectionnés pour le reste du travail.

#### 4. Fermentation et extraction des métabolites secondaires

Après 24h d'incubation sous agitation périodique, les extrait de l'acétate d'éthyle obtenues ont été évaporés dans un évaporateur rotatif sous vide à une température de 45°C, jusqu'à l'obtention d'une croute sèche avec des rendements différents (tableau 9).

**Tableau 9 :** Rendement d'extraction des métabolites secondaires avec l'acétate d'éthyle

Extrait	Isolats fongiques	Rendement (mg)
Extrait 1	AL6.1	07,7
Extrait 2	UR3	90,0
Extrait 3	CR2	150,0
Extrait 4	UR1	01,0

Le tableau 9 montre une variation importante dans la capacité des différents champignons endophytes à produire des métabolites secondaires. L'extrait obtenu à partir du champignon CR2 présente le rendement le plus élevé (150 mg), suivi par UR3 (90 mg) et AL6.1 (7,7 mg), tandis que l'extrait 4 de la souche UR1 affiche un rendement négligeable (1 mg).

Concernant l'exploitation des métabolites secondaires, l'extraction des composés bioactifs a été réalisée par macération à l'acétate d'éthyle, comme décrit dans l'étude de Noor *et al.* (2024). Cependant, ces auteurs ont obtenu un rendement d'extrait suffisant pour tester

l'activité antibactérienne contre plusieurs souches pathogènes, dont *S. aureus* et *P. aeruginosa*, l'extrait 4 (UR1) obtenu dans cette étude présentent un rendement très faible, limitant leur utilisation pour les tests d'activité antimicrobienne. Ce faible rendement pourrait être attribué à divers facteurs, notamment la quantité initiale de biomasse fongique, les conditions de culture, ou encore la souche fongique elle-même, qui pourrait produire des métabolites en très faible concentration. Malgré cela, l'isolement d'*A. terreus* reste prometteur, car cette espèce est bien documentée pour son potentiel antimicrobien. Des optimisations futures des conditions de fermentation ou un changement de solvant pourraient améliorer le rendement d'extraction et permettre une meilleure valorisation de cette souche.

## **5. Détermination de l'activité antimicrobienne des extraits**

### **5.1. Méthode de diffusion des disques sur gélose**

Les résultats obtenus montrent que l'activité antimicrobienne des extraits fongiques varie en fonction de l'isolat endophyte utilisé et de la souche microbienne testée (figure 24). Les diamètres des zones d'inhibition mesurés vont de 0 à  $11,56 \pm 0,58$  mm (tableau 10).

L'étude statistique montre qu'il y avait une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les effets antimicrobiens des extraits fongiques testés et l'antibiotique utilisé, et cela pour la majorité des souches microbiennes testées. Cependant, aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) n'a été marquée pour l'effet antibactérien des extraits 2 et 3 contre les souches S3, S4 et S9. Ces extraits (2 et 3) ont donné une activité inhibitrice contre toutes les souches pathogènes testées. Les isolats fongiques produisant ces deux extraits sont des espèces du genre *Penicillium*.

L'extrait 3 (CR2) s'est révélé le plus efficace, avec des zones d'inhibition allant jusqu'à  $11,23 \pm 0,49$  mm contre la souche S2. L'extrait 2 (UR3) a également présenté une activité importante, atteignant un maximum de  $11,56 \pm 0,58$  mm contre la souche S3, tandis que l'extrait AL6.1 s'est avéré globalement peu actif, avec des inhibitions faibles ou nulles selon les souches.

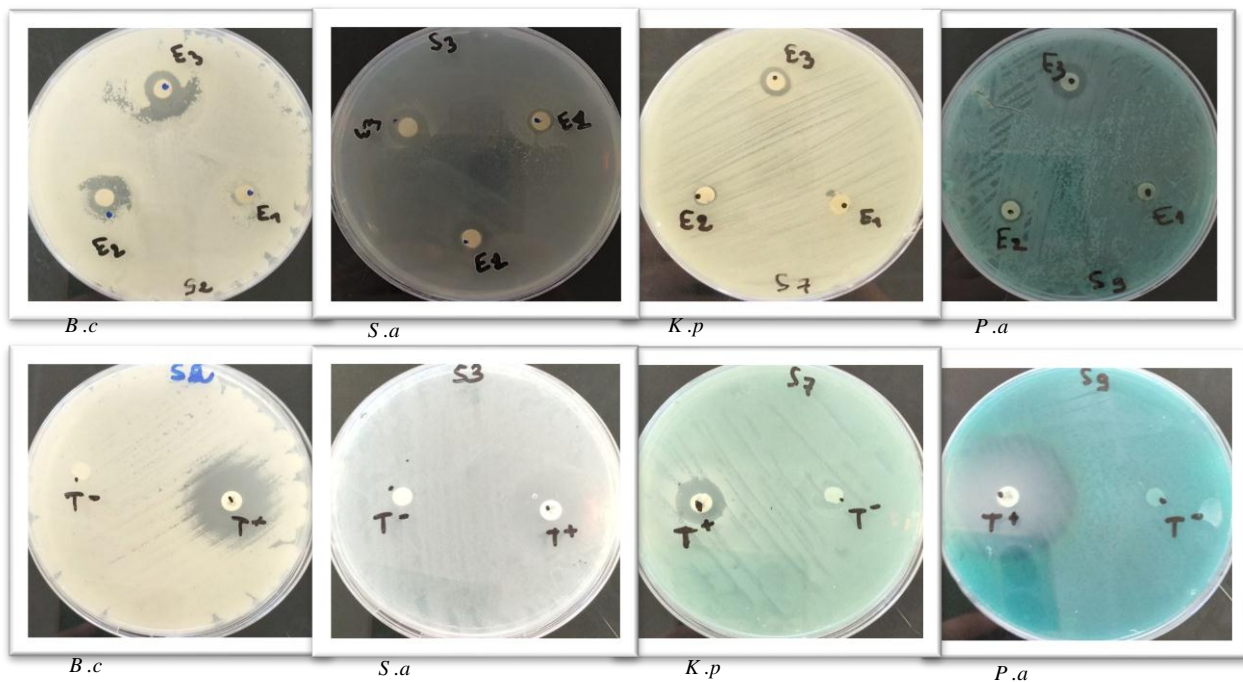
La sensibilité la plus marquée a été observée chez les souches S2, S3 et S10, ce qui suggère une certaine sélectivité des métabolites produits par les champignons endophytes. Ces résultats confirment que certains isolats fongiques issus d'algues marines possèdent un potentiel intéressant en tant qu'agents antimicrobiens naturels.

**Tableau 10 :** Activité antimicrobienne des extraits fongiques contre diverses souches microbiennes (n=3, moyenne  $\pm$  écart type)

Souches pathogènes	Extrait 1 (AL6.1)	Extrait 2 (UR3)	Extrait 3 (CR2)	ATB*
S2	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	9.80 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	11,23 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>	20 $\pm$ 0 <sup>d</sup>
S3	4,73 $\pm$ 4,09 <sup>a</sup>	11.56 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>	10.83 $\pm$ 0.70 <sup>b</sup>	18.9 $\pm$ 0 <sup>c</sup>
S4	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	8.06 $\pm$ 1.77 <sup>b</sup>	9.83 $\pm$ 2.45 <sup>b</sup>	25.8 $\pm$ 0 <sup>c</sup>
S7	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	6.16 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	9.00 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	22 $\pm$ 0 <sup>d</sup>
S8	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	5.73 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	9.06 $\pm$ 0.90 <sup>c</sup>	29.2 $\pm$ 0 <sup>d</sup>
S9	1,96 $\pm$ 3,40 <sup>a</sup>	6.83 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	8.76 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>	24 $\pm$ 0 <sup>c</sup>
S10	4.96 $\pm$ 4,32 <sup>a</sup>	9.86 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	10.80 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	28.61 $\pm$ 0 <sup>b</sup>

Les moyennes portant des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Tukey ( $p < 0,05$ )

\*Le Ciprofloxacine est utilisé contre les souches bactériennes alors que le Econazole est utilisé contre la levure *C. albicans*.



**Figure 24 :** Effet des extraits d'acétate d'éthyle sur les bactéries pathogènes. (S. a) : *S. aureus*, (B. c) : *B. cereus*, (K. p) : *K. pneumoniae*, (P. a) : *P. aeruginosa*, (E1, E2, E3) : Extraits de AL6.1, UR3 et CR2 respectivement, (T+) : Témoin positif Ciprofloxacine, (T-) : Témoin négatif (DMSO).

Dans l'étude menée par Noor *et al.* (2024), l'activité antimicrobienne d'extraits fongiques issus de champignons endophytes marins a été évaluée contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Deux isolats fongiques, UE2 et UE5, ont été testés. L'extrait de l'isolat UE2 n'a montré aucune inhibition contre les deux souches, indiquant une absence d'activité antibactérienne. L'isolat UE5, quant à lui, présenté une activité modérée contre *S. aureus*, avec des zones d'inhibition comprises entre 5 et 10 mm, mais aucune inhibition n'a été observée contre *P. aeruginosa*.

Dans notre étude, les extraits UR3 et CR2 ont montré des zones d'inhibition respectives de 11,56 mm et 10,83 mm contre *S. aureus* ce qui reflète une activité plus marquée que celle rapportée pour UE5. L'extrait AL6.1 a affiché une activité plus faible (4,73 mm), se situant dans la même gamme que celle de UE5. Concernant *P. aeruginosa* (S9), nos extraits ont présenté des inhibitions faibles mais bien présentes, avec 8,76 mm pour CR2, 6,83 mm pour UR3, et 1,96 mm pour AL6.1, alors qu'aucune activité n'a été observée contre cette souche dans l'étude de Noor *et al.* Ces résultats suggèrent que les extraits testés dans notre travail, en particulier l'extrait 3 (CR2), présentent un spectre d'activité plus large, incluant *P. aeruginosa*, et une efficacité supérieure contre *S. aureus* par rapport à ceux rapportés par Noor *et al.* (2024).

Kamat *et al.* (2020) ont enregistré des zones d'inhibition importante chez 12 extraits fongiques contre *P. aeruginosa* allant de 17 à 24 mm, alors que pour la souche *S. aureus* uniquement 3 extraits des 12 testés ont montré une activité antibactérienne.

Dans une autre recherche menée par Wu *et al.* (2020), l'extrait d'acétate d'éthyle à 10% d'un endophyte fongique isolé d'une plante médicinale, identifié comme *Penicillium sp* a montré une zone d'inhibition de 10.57 mm contre *B. cereus* et 0 mm contre *P. aeruginosa*.

Les différences entre les résultats obtenus dans notre étude et ceux dans les autres travaux cités peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs. La première cause probable réside dans la diversité des isolats fongiques : chaque souche possède un potentiel métabolique spécifique influençant sa capacité à produire des composés antimicrobiens. De plus, l'origine écologique des algues hôtes, les conditions de culture des champignons, ainsi que la méthode d'extraction utilisée (type de solvant, durée de fermentation) jouent un rôle déterminant dans la composition et l'efficacité des extraits. Enfin, la variabilité des souches bactériennes testées, notamment en termes de résistance naturelle ou acquise, peut également expliquer les réponses différentes observées face aux mêmes types d'extraits.

L'activité antimicrobienne remarquable des extraits 2 et 3 contre toute la souche testée peut être expliquée par la faite de leur production par des espèces de *Penicillium*, qui sont bien connus comme producteurs d'une grande variété de métabolites secondaires (Grijseels *et al.*, 2017). Les pénicillines font partie de la classe des  $\beta$ -lactamines et sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire depuis leur introduction en 1941. Leur mode d'action est l'inhibition de la formation des liaisons croisées des peptidoglycanes qui affaiblit la paroi cellulaire bactérienne. Par conséquent, les bactéries seront vulnérables à la lyse cellulaire causée par la pression osmotique (Ratnam *et al.*, 2014).

## 5.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI / CMB) des extraits

Le test de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en microplaque a été réalisé pour évaluer l'activité antibactérienne de deux extraits fongiques endophytes : Extrait 2 (l'isolat UR3) et Extrait 3 (l'isolat CR2). Les dilutions des extraits ont été préparées de manière décroissante, de 30 mg/mL à 0,058 mg/mL, et testées contre les sept souches microbiennes pathogènes. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 11 et l'aspect macroscopique des microplaques est présenté dans l'Annexe 2.

**Tableau 11** : Valeurs des CMI et CMB (mg/mL) obtenus par les extraits fongiques des isolats UR3 et CR2 contre les différentes souches pathogènes

Souches pathogènes	Extrait 2 (UR3)		Extrait 3 (CR2)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
S2	0,468	1,875	0,937	3,75
S3	0,234	1,875	0,937	0,937
S4	1,875	3,75	0,937	0,937
S7	3,75	3,75	0,937	1,875
S8	1,875	3,75	0,937	1,875
S9	1,875	3,75	0,937	0,937
S10	0,937	1,875	0,937	0,937

En général et en ce qui concerne les résultats de la CMI, les extraits des isolats UR3 et CR2 ont montré des profils antibactériens différents contre la plupart des espèces bactériennes, où les valeurs des CMI variaient de 0,234 et 3,75 mg/mL, à l'exception de la levure *C. albicans* qui était inhibé à 0.937 mg/mL par les deux extraits.

Les résultats ont montré une activité plus différenciée pour Extrait 2, dont la CMI la plus basse a été enregistrée contre S3 (0,234 mg/mL), suivi de S2 (0,468 mg/mL) et S10 (0,937 mg/mL). Les souches S4, S8 et S9 ont montré une sensibilité intermédiaire (CMI = 1,875 mg/mL), tandis que S7 s'est avérée la plus résistante (CMI = 3,75 mg/mL). En revanche, l'extrait 3 a présenté une activité uniforme contre l'ensemble des souches testées, avec une CMI constante de 0,937 mg/mL, indiquant un spectre d'action régulier mais moins ciblé comparé à Extrait 2. Ces résultats mettent en évidence la variabilité des métabolites produits par les champignons endophytes et soulignent le potentiel pharmacologique différentiel selon les espèces fongiques.

Le test de la concentration minimale bactéricide (CMB) a été mené en parallèle du test de la CMI, afin de déterminer la capacité des extraits à tuer complètement les souches pathogènes testées (tableau 11). L'extrait 2 (UR3) a présenté deux valeurs de CMB 1,875 et 3,75 mg/mL, avec une efficacité bactéricide modérée contre *B. cereus* (S2), *S. aureus* (S3) et *C. albicans* (S10), les trois ont été éliminées à 1,875 mg/mL. Pour les souches *P. mirabilis* (S4), *K. pneumoniae* (S7), *C. freundii* (S8) et *P. aeruginosa* (S9), la CMB a été plus élevée (3,75 mg/mL), indiquant une plus grande résistance.

Quant à l'extrait 3 (CR2), il a montré une activité bactéricide plus ciblée. Les souches S3, S9 et S10 ont été éradiquées à une CMB de 0,937 mg/mL, ce qui reflète une efficacité notable à faible concentration. Les souches S7 et S8 ont nécessité 1,875 mg/mL, tandis que S2 a été la plus résistante, avec une CMB de 3,75 mg/mL. Ces résultats soulignent le profil bactéricide plus puissant et sélectif de l'extrait de CR2, notamment contre certaines souches pathogènes cliniquement préoccupantes.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits fongiques UR3 et CR2, obtenus à l'acétate d'éthyle à partir de champignons endophytes marins identifiés comme des espèces du genre *Penicillium*, a permis de mettre en évidence un pouvoir inhibiteur et bactéricide important contre plusieurs souches pathogènes. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues dans ce travail sont, dans la majorité des cas, inférieures à celles rapportées dans l'étude de dos Santos *et al.* (2015), qui ont testé des extraits à l'acétate d'éthyle issus de champignons endophytes terrestres isolés des feuilles d'*Indigofera suffruticosa*. Cette étude a enregistré une CMI de 0,39 mg/mL contre la souche *S. aureus*, particulièrement plus élevée à celle obtenue par l'extrait UR3 (0,234 mg/mL) contre la même souche. De même, pour *K. pneumoniae*, l'extrait CR2 a démontré une CMI de 0,937 mg/mL, nettement plus faible que

celle observée dans l'étude citée (3,12 mg/mL), mettant en évidence une efficacité significative contre cette bactérie opportuniste Gram-négative. Une tendance similaire a été observée pour *P. aeruginosa*, avec une CMI de 0,937 mg/mL (CR2), contre 1,56 mg/mL pour NsEAE. Cette différence traduit une activité inhibitrice plus marquée de l'extrait marin, probablement due à la nature particulière des métabolites produits dans l'environnement marin.

Sur le plan bactéricide, les résultats sont tout aussi prometteurs. L'extrait CR2 a montré une CMB de 0,937 mg/mL contre *S. aureus*, ce qui est inférieur à celle rapportée par dos Santos *et al.* (3,12 mg/mL). L'écart est encore plus significatif pour *P. aeruginosa*, pour laquelle la CMB observée avec l'extrait CR2 est de 0,937 mg/mL, contre 12,5 mg/mL dans l'étude citée. De même, pour *K. pneumoniae*, la CMB de l'extrait CR2 (1,875 mg/mL) demeure bien inférieure à celle de NsEAE (12,5 mg/mL).

Ces résultats suggèrent que les champignons endophytes marins, et plus particulièrement les extraits CR2 et UR3, produisent des métabolites bioactifs dotés d'un fort potentiel inhibiteur et bactéricide à faibles concentrations, surpassant dans certains cas ceux issus de champignons endophytes terrestres. L'environnement marin, riche en conditions de stress et en compétition interspécifique, pourrait expliquer la production de composés secondaires plus puissants. Ces observations renforcent l'intérêt des champignons endophytes marins comme source prometteuse de nouvelles molécules antimicrobiennes, particulièrement efficaces contre des souches pathogènes multirésistantes.

Les résultats obtenus confirment la capacité des champignons endophytes marins à produire des métabolites secondaires aux propriétés antibactériennes notables. Les extraits fongiques UR3 et CR2, obtenus à l'acétate d'éthyle, se sont distingués par des CMI et CMB faibles, en particulier contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. En comparaison avec les données rapportées par dos Santos *et al.* (2015), les extraits marins montrent une efficacité supérieure, traduisant un potentiel réel dans la lutte contre les bactéries pathogènes, y compris celles présentant une résistance accrue aux antibiotiques conventionnels.

# Conclusion Générale

La forte demande de nouvelles substances bioactives, notamment face à l'augmentation des résistances microbiennes et à la prévalence de maladies chroniques comme le cancer, a motivé la recherche de composés naturels aux propriétés thérapeutiques prometteuses. Dans ce contexte, les champignons endophytes apparaissent comme des sources innovantes de métabolites secondaires bioactifs. Ce travail a porté sur l'isolement, l'identification et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de champignons endophytes associés à différentes espèces d'algues marines collectées sur les côtes de Mostaganem.

L'isolement a permis d'obtenir plusieurs isolats fongiques à partir des macroalgues étudiées. La fréquence de colonisation a varié selon les espèces d'algues, avec une dominance marquée chez *Ulva lactuca* et *Jania rubens*, alors que d'autres espèces comme *Gracilaria sp.* et *Codium fragile* n'ont présenté aucune colonisation fongique.

L'identification morphologique des isolats a révélé une dominance des genres *Penicillium* et *Aspergillus*, deux genres connus pour leur capacité à produire des métabolites secondaires à forte activité biologique. L'observation macroscopique et microscopique a permis de différencier les isolats selon la morphologie des colonies, la structure des spores et la nature du mycélium.

Après les étapes d'isolement, et d'identification, les activités antimicrobiennes des isolats de champignons endophytes de chaque algue ont été dépistées par le test d'antagonisme et la technique des cylindres d'agar, respectivement. Parmi les 10 isolats testés, huit isolats étaient actifs au moins contre un microorganisme pathogène. Parmi ces derniers, quatre isolats étaient les plus actifs à savoir AL6.1, UR1, UR3 et CR2.

La fermentation liquide en milieu PDB a permis l'obtention d'un extrait brut pour chaque isolat sélectionné. Le rendement d'extraction a varié selon les souches, ce qui reflète la différence dans la production de métabolites secondaires.

Les extraits fongiques obtenus ont été testés contre plusieurs souches bactériennes et une levure pathogène. Les extraits des isolats CR2 et UR3 ont présenté les plus larges zones d'inhibition, et ils ont montré des zones d'inhibition contre toutes les souches pathogènes testées indiquant une activité antimicrobienne notable. Sur la base de ces résultats, nous suggérons que les champignons endophytes marins étudiés, en particulier les isolats CR2 et UR3, identifiés comme des espèces du genre *Penicillium sp.*, constituent des candidats prometteurs pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens.

Leurs métabolites présentent un réel intérêt pour les industries pharmaceutiques et biotechnologiques, notamment dans un contexte de lutte contre les infections multirésistantes.

Ces résultats mettent en lumière l'intérêt croissant pour les écosystèmes marins en tant que réservoirs de microorganismes endophytes aux capacités métaboliques originales, et ouvrent la voie à une valorisation biotechnologique de ces isolats dans le domaine pharmaceutique et biomédical.

Les perspectives de ce présent travail sont multiples et les principales peuvent être résumées comme suit :

- Identification moléculaire des isolats fongiques endophytes sélectionnés.
- Caractérisation chimique approfondie des métabolites secondaires isolés afin d'identifier les molécules actives.
- Études *in vivo* pour évaluer la toxicité, l'innocuité et l'efficacité des extraits fongiques.
- Exploration d'autres espèces d'algues comme sources potentielles de champignons endophytes à fort intérêt pharmaceutique.
- Optimisation des conditions de fermentation pour améliorer le rendement et la production des métabolites d'intérêt.
- Criblage élargi contre d'autres types de pathogènes (fongiques, viraux, etc.).

# Référence bibliographique

A

- **Adams R.Z., 2002.** Indoor Environment Connections Featured Public Library Closes Down for Mold Investigation [www.ieconnections.com/archive/jan\\_01/jan-01.html](http://www.ieconnections.com/archive/jan_01/jan-01.html).
- **Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., et Blackwell, M. (1996).** *Introductory Mycology* (4th ed.). New York: John Wiley et Sons.
- **Allal, K., et Hamma, L. (2019).** *Isolement, caractérisation et évaluation de l'activité antimicrobienne des champignons endophytes de *Caesalpinia echinata* Lam.* [Mémoire de fin d'études]. Soutenu en juillet 2019.
- **Aly, A. H., Debbab, A., et Proksch, P. (2011).** Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), 1829–1845. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3270-y>

B

- **Babich, O., Sukhikh, S., Larina, V., Kalashnikova, O., Kashirskikh, E., Prosekov, A., ... et Dolganyuk, V. (2022).** Algae: Study of edible and biologically active fractions, their properties and applications. *Plants*, 11(6), 780.
- **Ban, K.-M. (2016).** *Statement on antimicrobial resistance at the UN General Assembly*. [Discours officiel]. Organisation des Nations Unies
- **Barik B. P., Tayung K., Jagadev P. N. and Dutta S. K.** Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *European Journal of Biological Sciences* 2010; 2: 8-16.
- **BARNETT. H.L AND HUNTER.B. B, (1972).** *Illustrated genera of Imperfect fungi*. 3thEd, Burgess publishing company, Minnesota.pp 62- 197.
- **Bary HA (1884).** *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze Mycetozen und Bacterien*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig
- **Berche P., Gaillard JL et Simonet M. (1991).** *Les bactéries des infections humaines*. Ed. Flammarion, Médecine et Sciences. P. 660.
- **Blackwell, M. (2011).** The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438.<https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>
- **Boiron P., 1996.** *Organisation et biologie des champignons*. Nathan. Paris. Johanning E., Gareis M., Nielsen K., Dietrich R., Martlbauer E., 2002: Airborne Mycotoxin

Sampling and Screening Analysis.  
<http://www.ibt.dtu.dk/mycology/staff/kfn/papers/Airborne-mycotoxin2002.pdf>

- **Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., et Moulin, G. (1990).** *In vitro* digestibility of fungal mycelium. *Journal of Animal Science*, \*68\*(9), 2742-2750. <https://doi.org/10.2527/1990.6892742x>
- **Brakhage, A. A. (2013).** Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 21–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>

### C

- **Cabioc'h, J., Floc'h, J. Y., Le Toquin, A., Boudouresque, C. F., Meinesz, A., et Verlaque, M. (2006).** Guide des algues des mers d'Europe. Manche et Atlantique. *Méditerranée*.
- **Cabral D, Cafaro MJ, Saidman B, Lugo M, Reddy PV, White JF Jr (1999).** Evidence supporting the occurrence of a new species of endophyte in some South American grasses. *Mycologia* 91:315–325
- **Carmen, V. & Sciortino, Jr. (2017).** Atlas of clinically important fungi. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- **Chabasse D, Bouchra J-P, De Gentile L, BrunS, Cimon B, Penn P. 2002.** Les Moisissures d'Intérêt Médical. Cahier de formation N° 25, Bioforma : Paris ; 160.
- **Chang Hong. L., Wong Xin. Z., Hong.L., Ren Xiang.T. (2001).** Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology* 88 : 277–282.

### D

- **de Felício, R., Pavão, G. B., de Oliveira, A. L. L., Erbert, C., Conti, R., Pupo, M. T., Furtado, N. A. J. C., Ferreira, E. G., Costa-Lotufo, L. V., Young, M. C. M., Yokoya, N. S., et Deboni, H. M. (2015).** Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marine red alga *Bostrychia tenella* (Ceramiales). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, \*25\*(6), 641–650. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.003>
- **De Zoysa, M. H. N., Rathnayake, H., Hewawasam, R. P., et Wijayarathne, W. M. D. G. B. (2019).** Determination of *in vitro* antimicrobial activity of five Sri Lankan medicinal plants against selected human pathogenic bacteria. *International Journal of Microbiology*, 2019:7431439. <https://doi.org/10.1155/2019/7431439>

- **Deacon, J. W. (2006).** *Fungal Biology* (4th ed.). Blackwell Publishing. ISBN: 9781405130660.
- **Debbab, A., Aly, A. H., et Proksch, P. (2011).** Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Diversity*, 49(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0114-0>
- **Dekkers, J., Van Doornen, L., Kemper, H. (1996):** The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Medicine*. (Auckland, NZ). 21:213-238.
- **Demain AL, Sanchez S (2009).** Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The J Antibiot* 62:5–16
- **Deutsch, Y., Gur, L., Berman Frank, I., et Ezra, D. (2021).** Endophytes from algae, a potential source for new biologically active metabolites for disease management in aquaculture. *Frontiers in Marine Science*, 8, 636636. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.636636>
- **dos Santos, I. P., da Silva, L. C. N., da Silva, M. V., de Araújo, J. M., Cavalcanti, M. S., et Lima, V. L. M. (2015).** Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). *Frontiers in Microbiology*, 6, 350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00350>

E

- **El-Bondkly, E. A. M., El-Bondkly, A. A. M., et El-Bondkly, A. A. M. (2021).** Marine endophytic fungal metabolites: A whole new world of pharmaceutical therapy exploration. *Heliyon*, 7(3).

F

- **Faller, H. (2011).** Les Applications Et La Toxicite Des Algues Marines. PhD, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, Limoges.
- **Floc'h J.-Y. et Leclerc V. 2010.** Le secret des algues. Collection Carnets et Sciences. Editeur Quae
- **Freeman EM (1904).** The seed fungus of *Lolium temulentum* L. *Phil Trans R Soc Lond (Biol)* 196:1–27.

G

- **Gagic M., Faville M.J., Zhang W., Forester N.T., Rolston M.P., Johnson R.D., Ganesh S., Koolaard J.P., Easton H.S., Hudson D., Johnson L.J., Moon C.D. et Voisey C.R. (2018).** Seed transmission of *Epichloë* endophytes in *Lolium perenne* heavily influenced by host genetics. *Front. Plant Sci.*9: 1580.

- **Gerbouz.M., Khoudour.H. (2020).** Etude de l'activité antifongique des champignons endophytes isolés à partir de Citrus limon vis à vis *Penicillium digitatum*. Master en Science de la nature et de la vie. Filière Science agronomique. Option protection de végétaux. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A. Algérie.19p
- **Guiry, M. D., Guiry, G. M., Morrison, L., Rindi, F., Miranda, S. V., Mathieson, A. C., ... & Garbary, D. J. (2014).** Algae Base: an on-line resource for algae. *Cryptogamie, Algologie*, 35(2), 105-115.
- **Grijseels S, Nielsen JC, Nielsen J, Larsen TO, Frisvad JC, Nielsen KF, Frandsen RJN, Workman M. 2017.** Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. *Fungal Biol Biotechnol*. 4:1–12.

## H

- **Ha, A.W; Na, S.J.; Kim, W.K.** Antioxidant Effects of Fucoxanthin Rich Powder in Rats Fed with High Fat Diet. *Nutr. Res. Pract.* 2013, 7, 475. [CrossRef]
- **HADDOUCHE et BAININE. (2017).** Contribution à l'étude du régime alimentaire de l'oursin *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) de la région de Mostaganem. Mémoire de Master . Université de Mostaganem.
- **Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. 2015.** The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 79:293–320.
- **Hazalin N. A., Ramasamy K., Lim S. M., Wahab I. A., Cole A. L. and Abdul Majeed A. B.** Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2009; 9: 46.
- **Heitman, J., Howlett, B. J., Crous, P. W., Stukenbrock, E. H., James, T. Y., et Gow, N. A. R. (Éds.). (2018).** *The Fungal Kingdom*. Washington, DC: ASM Press.
- **Hodgson S., de Cates C., Hodgson J., Morley N.J., Sutton B.C. et Gange A.C. (2014).** Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecol. Evol.*4: 1199 1208.

## I

- **INVRST IN ALGERIA. (2013).** Centre culturelle, approche urbaines présentation de la wilaya de Mostaganem.

**J**

- **Jennings, D. H., et Lysek, G. (1999).** *Fungal biology: Understanding the fungal lifestyle* (2nd ed.). BIOS Scientific Publishers.
- **Johanning E., Gareis M., Nielsen K., Dietrich R., Martlbauer E., 2002:** Airborne Mycotoxin Sampling and Screening Analysis. <http://www.ibt.dtu.dk/mycology/staff/kfn/papers/Airborne-mycotoxin2002.pdf>
- **Jones, E.B.G., Alias, S.A., Pang, K.L. et al. (2013).** Marine Fungi and Fungal-like Organisms. De Gruyter. DOI: [10.1007/978-3-642-31344-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31344-7_1)
- **Jung H A, Seong Eun Jin, Bo Ra Ahn, Chan Mi Lee, Jae Sue Choi, (2013).** Antiinflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology* 59 ,1993206.

**K**

- **Kamat, S., Kumari, M., Taritla, S., et Jayabaskaran, C. (2020).** *Endophytic fungi of marine alga from Konkan Coast, India—A rich source of bioactive material.* *Frontiers in Marine Science*, 7, 31. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00031>
- **Kameswaran, V., Ramya, M., et Kumar, G. V. (2009).** Fungal nutrition and ecology: A review. *Journal of Phytology*, 1(5), 303–309.
- **Karaoui.S. (2017).** Etude de l'activité antibactérienne de champignons endophytes foliaires de *Peganum harmala* de la région de Laghouat (Algérie). Master en Science de la nature et de la vie. Filière Biologie .Option Diversité et Adaptation de la Flore Méditerranéenne. Université Mouloud Mammeri .Tizi-Ouzou .Algérie.63p
- **Keller NP, Turner G, Bennett JW (2005)** Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3:937–947
- **Kim, S. K. (Ed.). (2011).** *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology.* John Wiley & Sons.
- **Kjer, J., Debbab, A., Aly, A.H., et Proksch, P. (2010).** Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature Protocols*, 5, 479–490. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.231>

- **Kousar R, Naeem M, Jamaludin MI et al (2022).** Exploring the anti-cancer activities of novel bioactive compounds derived from endophytic fungi: Mechanisms of action, current challenges and future perspectives. *Am J Cancer Res* 12:2897
- **Kumari, M., Taritla, S., Sharma, A., et Jayabaskaran, C. (2018).** Antiproliferative and antioxidative bioactive compounds in extracts of marine-derived endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus*. *Frontiers in microbiology*, 9, 1777.
- **Kusari S, Spitteller M (2012).** Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In : Roessner U (ed) *Metabolomics*. Rijeka, Croatia, InTech, pp 241–266

#### L

- **Lee, S.; Lee, Y.S.; Jung, S.H.; Kang, S.S.; Shin, K.H.** Anti-Oxidant Activities of Fucosterol from the Marine Algae *Pelvetia siliquosa*. *Arch. Pharm. Res* 2003, 26, 719–722. [CrossRef] [PubMed]
- **Lordan, S et al., 2011.; Ross, R.P.; Stanton, C.** Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Mar. Drugs* 2011, 9, 1056–1100. [CrossRef]
- **Lowe, R. G. T., et Howlett, B. J. (2012).** Indifferent, affectionate, or deceitful: Lifestyles and secretomes of fungi. *PLoS Pathogens*, \*8\*(11), e1002515.

#### M

- **Maheshwari, D. K. (Éd.). (2017).** *Endophytes: Biology and Biotechnology* (Vol. 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-66541-2>
- **Mandeel. Q., Al-Laith. A., Mohsen. L. (1998).** Survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain. V. Antimicrobial activity of some local and International *Fusarium* species. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 37, No. 3, pp. 181–187.
- **Martin, F., et Selosse, M. A. (2011).** The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytologist*, 180(2), 296–310.
- **Mathan, S., Subramanian, V., Nagamony, S., et Ganapathy, K. (2013).** Isolation of endophytic fungi from marine algae and its bioactivity. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, \*4\*(1), 45–49.
- **Mishra M, Prasad R, Varma A. 2015.** Endophytic fungi: Biodiversity and functions. *Int J Pharm Bio Sci.* 6:18–36.

- **Mohanta J., Tayung K. and Mohapatra U.** Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology* 2008; 5(2).
- **Moore, D., Robson, G. D., et Trinci, A. P. J. (2011).** *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge University Press.

#### N

- **Nicoletti, R., et Andolfi, A. (2020).** Fungal Endophytes from Marine Algae: Biodiversity, Bioactivity, and Biotechnological Applications. *Marine Drugs*, 18(1), 9. DOI:
- **Noor, S., Begum, M. N., Rony, S. R., Uddin, M. Z., Sohrab, M. H., et Mazid, M. A. (2024).** Bioactivity and chemical screening of endophytic fungi associated with the seaweed *Ulva* sp. of the Bay of Bengal, Bangladesh. *Botanica Marina*, 67(2), 115–129.

#### O

- **Oliveira Silva M. R., Sena Xisto K. et Buarque Gusumao N.** Secondary metabolites produced by endophytic fungus *Paecilomyces variotii* Bainier with antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. In: Mendez-Vilas A.(eds). *Current Research Topics in Applied Microbiology: Proceedings of the II international Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (Biomicroworld2007)*, 2009; pp. 519-520.
- **Ouzid. Y. (2018).** Activités biologique et diversité en mycoendophytes des feuilles de *Peganum harmala* L. de la région de Laghouat (Algérie). Thèse de doctorat LMD 3ème cycle en Science biologique. Option biochimie, microbiologie et science alimentaires. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou. Algérie .163p.
- **Owen NL, Hundley N (2004)** Endophytes- The chemical synthesizers inside plants. *Sci Prog* 87 (2):79–99.

#### P

- **Pallela, R.** Antioxidants from Marine Organisms and Skin Care. In *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*; Laher, I., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; pp. 3771–3783. ISBN 978-3-642-30017-2.

- **Petrini O, Fisher PJ (1988).** “A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*”. Transactions of the British Mycological Society 1988, 91:233-238.
- **Petrini O., Sieber T.N., Toti L. et Viret O. (1992).** Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins.*, 1: 185–196.
- **Pickersgill, D. A., Wehking, J., Paulsen, H., Thines, E., Pöschl, U., Fröhlich-Nowoisky, J., et Després, V. R. (2017).** Lifestyle dependent occurrence of airborne fungi. *Biogeosciences Discussions*. <https://doi.org/10.5194/bg-2017-452>
- **Pitt, J. I., et Hocking, A. D. (2009).** *Fungi and food spoilage* (3rd ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- **Plett, J. M., Montanini, B., Kohler, A., Ottonello, S., et Martin, F. (2011).** Tapping Genomics for Unraveling the Ectomycorrhizal Symbiosis. In J. R. Xu et B. H. Bluhm (Eds.), *Fungal Genomics: Methods and Protocols* (Vol. 722, pp. 249–281). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-040-9\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-040-9_19)

## R

- **Raghukumar, C. (2017).** *Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems: Marine Fungi*. Springer. DOI : [10.1007/978-3-319-54304-8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54304-8)
- **Rateb, M.E., et Ebel, R. (2011).** Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Natural Product Reports*, 28, 290–344. <https://doi.org/10.1039/c0np00060h>
- **Ratnam J, Syed JI, Singh SK. 2014.** Comparative study on production of Penicillin by *Penicillium Notatum* and *Penicillium Chrysogenum* et its Antimicrobial Property. *IJBTT*. 4:28–30.
- **Ravelomanantsoa. S-H. (2004).** Les endophytes d’*Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) : un modèle de relation plante-microorganismes. Mémoire pour l’obtention du diplôme d’études approfondies. Faculté des sciences. Option physiologie végétale. Université d’Antananarivo. Madagascar.87p.
- **Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F et al (2008).** Stress tolerance in plants via habitat adapted symbiosis. *ISME J* 2(4):404–416.

## S

- **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 de doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1]. Université Ferhat Abbas Sétif 1.

- **Sadrati, N., Zerroug, A., Demirel, R., Bakli, S., et Harzallah, D. (2020).** *Antimicrobial activity of secondary metabolites produced by Aspergillus neobridgeri isolated from Pistacia lentiscus against multi-drug-resistant bacteria.* Bangladesh Journal of Pharmacology, 15, 82–95.
- **Saha A. et Rahman M.S. (2008).** Antimicrobial activity of crude extract from Calycopteris floribunsa. Bang. J. Microbiol., 25: 137-139.
- **Samuel P, Prince L, Prabakaran A (2011).** Antibacterial Activity of marine derived fungi collected from South East Coast of Tamilnadu. India. J Microbiol Biotechnol Res 1(4):86–94
- **Selosse M, Le Tacon F.** The land flora: a phototroph-fungus partnership? Trends Ecol Evol. 1998 ; 13(1) : 15–20
- **Senequier-Crozet, A., et Canard, B. (2016).** *Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique* [Thèse de doctorat, Université Grenoble Alpes, Faculté de Pharmacie]. Université Grenoble Alpes.
- **Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., ... et Stajich, J. E. (2017).** A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046.
- **Stajich, J. E., Berbee, M. L., Blackwell, M., Hibbett, D. S., James, T. Y., Spatafora, J. W., et Taylor, J. W. (2009).** The Fungi. *Current Biology*, 19(18), R840–R845.
- **Stone K, Bacon EW, White F (2000).** An Overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon EW, White F (eds) Microbial endophytes. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, pp 3–29
- **Strobel, G. (2003).** Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5(6), 535–544
- **Strobel, G., et Daisy, B. (2003).** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491–502.

- **Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW.** Phylogenetic classification of Cordyceps and the Clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol.* 2007; 57: 5–59
- **Suryanarayanan T.S. (2013)** Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecol.*, 6: 561–568.

**T**

- **Tan, X., Zhou, Y. Q., Zhou, X. L., Xia, X. H., Wei, Y., He, L. L., et al. (2018).** Diversity and bioactive potential of culturable fungal endophytes of *Dyosma versipellis*; a rare medicinal plant endemic to China. *Sci. Rep.* 8:5929. Doi: 10.1038/s41598-018-31009-0
- **Terhonen E, Blumenstein K, Kovalchuk A, Asiegbu FO. 2019.** Forest tree microbiomes and associated fungal endophytes: Functional roles and impact on forest health. *Forests.* 10:1–32.
- **Tsoupras, A; Kouvelis, V.N.; Pappas, K.M.; Demopoulos, C.A.; Typas, M.A.** Anti Inflammatory and Anti-Thrombotic Properties of Lipid Bioactives from the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2022, 158,106606. [CrossRef] [PubMed]

**V**

- **Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... & Samson, R. A. (2014).** Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, 78, 343-371.

**W**

- **Weaver BA (2014)** How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* 25:2677–2681.
- **Wu, H., Yan, Z., Deng, Y., Wu, Z., Xu, X., Li, X., ... et Luo, H. (2020).** Endophytic fungi from the root tubers of medicinal plant *Stephania dielsiana* and their antimicrobial activity. *Acta Ecologica Sinica*, 40(5), 383-387.

**X**

- **Xiaoling C., Xiaoli L., Shining Z., Junping G., Shuiping W., Xiaoming L., Zhigang S. and Yongcheng L.** Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *Journal of Ecology and The Natural Environment* 2010; 2: 017-024.

**Y**

- **Yamaç M. and Bilgili F.** Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. *Pharmaceutical Biology* 2006; 44: 660-667.

**Z**

- **Zainee, N. F. A., Ibrahim, N., Hidayah, N., et Rozaimi, M.** (2021). Variation in antibacterial properties of endophytic fungi isolated from Phaeophytes and Rhodophytes of Johor, Malaysia. *Journal of Environmental Biology*, 42(3), 840-848.
- **Zaragoza, O. (2017).** *Titre de l'article. Mycology.* Elsevier Inc.
- **Zuccaro, A., Schoch, C.L., Spatafora, J.W. et al. (2008).** Detection and identification of fungal endophytes in marine algae. *Mycological Research*, 112(2), 207–215.

# Annexes

**Annexe n°1 : Composition des différents milieux de cultures et solutions utilisées****Eau physiologique**

NaCl.....09g

Eau distillée.....1000 ml

**Potato Dextrose Agar (PDA)**

Pomme de terre.....200g

Glucose.....20g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000 ml

PH.....5.1 ± 0.2

**Sabouraud Dextrose Agar (SDA)**

Dextrose.....40g

Peptone.....10g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000 ml

PH.....5.6 ± 0.2

**Miller Hinton (MH)**

Extrait de viande.....03g

Hydrolysate acide de caséine.....17,5 g

Amidon.....1,5g

Agar-agar.....16g

Eau distillée.....1000 ml

PH.....7,3

**Gélose nutritive (GN)**

Peptone.....10 g

Extrait de levure.....5 g

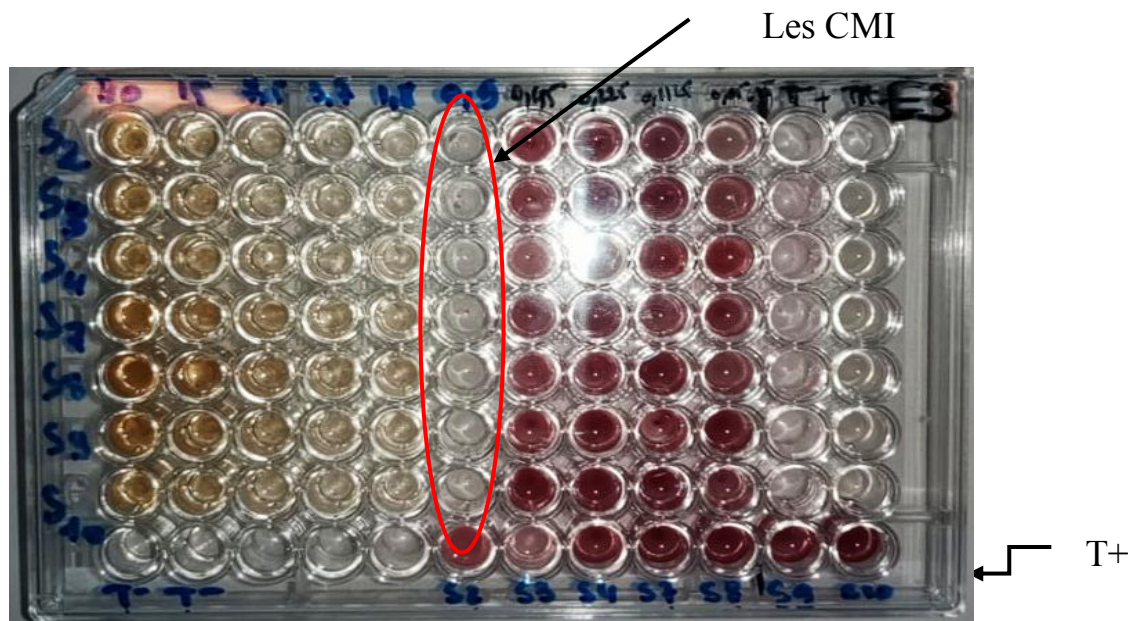
NaCl.....5 g

Agar.....20g

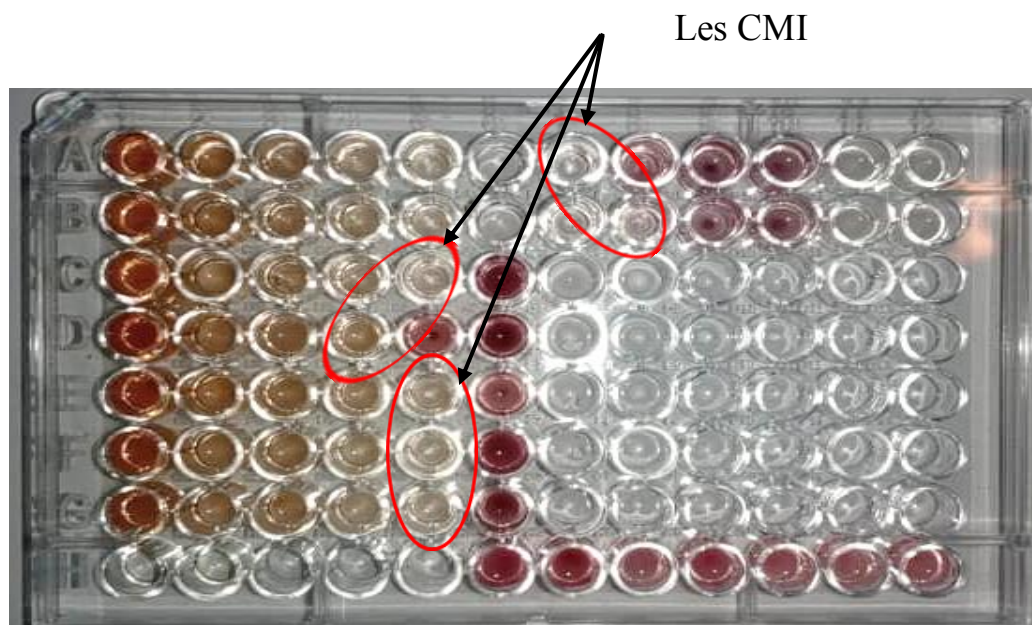
Eau distillée.....1000ml

PH.....7,2

**Annexe n°2 : Microplaques du test de la CMI**



**Figure 01.** Détermination de la CMI de l'extrait 3 (CR2) vis-à-vis les sept souches microbiennes testées



**Figure 02.** Détermination de la CMI de l'extrait 2 (UR3) vis-à-vis les sept souches microbiennes testées

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس-مستغانم-  
كلية علوم الطبيعة والحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية  
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالبة: بن عولة نسرین يسرى رقم التسجيل الجامعي: 202037030128  
الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم: 414801893 والصادرة بتاريخ: 16/04/2025  
عن دائرة مستغانم

المسجل بكلية علوم الطبيعة والحياة / قسم بيولوجيا  
شعبة ميكروبيولوجيا. / التخصص ميكروبيولوجيا التطبيقية

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان:

**Evaluation de l'activité antimicrobienne des champignons endophytes  
isolés des algues marines du littoral de Mostaganem**

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية  
المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ: 30/06/2025

إمضاء المعني



\* ملحق القرار الوزاري رقم 933 المؤرخ في 28 جويلية 2016 الذي يحدد القواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.