

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SALAH BOUBNIDER Constantine 3



N° d'ordre :
Série :

Faculté : génie des procédés
Département : génie pharmaceutique
Mémoire de Master

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

**Isolement, identification des champignons
endophytes et extraction de l'huile essentielle de la
plante médicinale *Lavandula officinalis* et leur
activité antimicrobienne**

Encadré par :

Dr. Nacef Houda Sara

Présenté par :

Chaibi Safa

Remla Khawla

BoussedjraKhawla

2020/2021

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SALAH BOUBNIDER Constantine 3

N° d'ordre :
Série :



Faculté : génie des procédés
Département : génie pharmaceutique
Mémoire de Master

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

**Isolement, identification des champignons
endophytes et extraction de l'huile essentielle de la
plante médicinale *Lavandula officinalis* et leur
activité antimicrobienne**

Encadré par :

Dr. Nacef Houda Sara

Présenté par :

Chaibi Safa

Remla Khawla

BoussedjraKhawla

2020/2021

Remerciements



*On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la
volonté d'entamer et de terminer ce mémoire*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu
avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mme. Nacef**,
on le remercie pour la qualité de son encadrement
exceptionnel, pour ça patience rigueur et sa disponibilité
durant notre préparation de ce mémoire.*

*J'adresse mes parents, pour leur soutien constant et leurs
encouragements.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les
professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs
compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos
études.*

*J'adresse mes sincères remerciements à nos familles et nos amis qui
par leurs prières et leurs encouragements on à puis
surmonter tous les obstacles*

*Enfin, on remercie tous ceux qui de près on de loin, a contribué à
réalisation de ce travail*



Dédicace

Je dédie ce mémoire

A tous ceux que j'aime.

*A mes chers parents : ma mère et mon père pour leur
patience, leur amour, leur soutien et leur
encouragement.*

A mes frères Saïf, Raouf.

A ma sœur Assma.

A ma grandmère.

A tous la famille.

*A mes amies et mes camarades ceux qui ont partagé
avec moi tous les moments d'émotion lors de la
réalisation de ce travail.*

*Sans oublier tous les professeur que ce soit du
primaire, du moyen, du secondaire ou de l'université.*

*** REMLA KHAULA ***





Dédicace

A la mémoire de ma chère mère

*Un dédicace spéciale ma défunte mère, et Sidou
irremplaçable de par ses affections chaleureuses qui n'a eu
de cesse de veiller sur nous tous avec toute ses douceurs et
ses bontés continuelles et indéfectibles jusqu'à ses derniers
soupirs mais qui sont partie trop prématurément ALLAH
YARHAMHOMÉ*

A MA FAMILLE CHAIBI et KORFI

*A mon père Kaddour, et zmima SALEHA, rien au monde ne
vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et
mon bien être mes frères et mes sœurs*

A mes neveux et nièces sans exceptions

*A toute mes amies et toutes les personnes qui m'ont
prodiguée des encouragements et se sont donne la peine de
me soutenir*

CHAIBI SAFA



Table des matières

-	Remerciements	
-	Dédicace	
-	Liste des figures	
-	Liste des tableaux	
-	Liste des abréviations	
-	Introduction générale	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique		
I.1.	Plants médicinales.....	04
I.2.	Généralités sur la lavande.....	04
I.3.	Classification et la systématique botanique	05
I.4.	Botanique de la plante étudiée	05
I.5.	Huile essentielle de <i>lavande officinale</i>	06
I.6.	Rôles des huiles essentielles.....	06
I.7.	Composition chimique de huile essentielles de <i>lavandula officinalis</i>	06
I.8.	Définition des endophytes	08
I.9.	Rôle des endophytes.....	09
I.10.	Champignons endophytes.....	09
I.11.	Relation entre les champignons et leur plante hôte.....	10
I.12.	Spécificité de l'hôte	10
I.13.	Spécificité de tissu.....	11
I.14.	Diversité et classification des champignons endophytes.....	12
I.15.	Champignons endophytes comme source des produits naturels bioactifs.....	15

I.15.1.Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes	15
I.15.2.Champignons endophytes comme source de substances antifongiques	16
I.16.Méthodes d'extraction de l'huile essentielle.....	17
I.16.1.Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	17
I.16.2.Extraction par hydro distillation.....	19
I.16.3.Expression à froid.....	19
I.16.4.Extraction par solvants organique	19
I.16.5 Extraction par fluide à l'état supercritique	19
I.15. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles.....	20
I.15.1. Facteurs intrinsèques.....	20
I.15.2. Facteurs extrinsèques.....	20

Chapitre II: Matériel et méthodes

II.1.Matériel	22
II.1.1.Matériel végétal	22
II.1.2.Souches microbiennes.....	22
II.1.3.Produits chimiques	22
II.1.4.Antibiotique.....	23
II.1.4.Appareillage	23
II.2.Méthodes.....	23
II.2.1.Échantillonnage.....	23
II.2.2.Isolement et purification des champignons endophytes.....	23
II.2.3.Identification des champignons isolés.....	27
II.2.4.Activité antibactérienne des champignons endophytes.....	27
II.2.5.Activité antifongique des champignons endophytes.....	27

II.2.6. Extraction de l'huile essentielle	28
II.2.7. Calcul de rendement.....	29
II.2.8. Activité antibactérienne de l'huile essentielle.....	30
II.2.9. Traitement statistique.....	30

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Isolement et purification des champignons endophytes.....	32
III.2. Identification des champignons isolés.....	33
III.3. Calcul de rendement.....	36
III.4. Activité antibactérienne	36
III.4.1. Activité antibactérienne des champignons endophytes	36
III.4.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle.....	42
III.4.3. Comparaison de l'activité antibactérienne entre les champignons endophytes et l'huile essentielle.....	44
III.5. Activité antifongique.....	46
III.5.1. Activité antifongique des champignons endophytes.....	46
III.5.2. Activité antifongique de l'huile essentielle.....	48
III.5.3. Comparaison de l'activité antifongique entre les champignons endophytes et l'huile essentielle.....	48
- Conclusion	51
- Références bibliographiques	53
- Annexe	
- Résumé	
- الملخص	

Liste des figures

Figure I.1 : Planche de <i>lavandula angustifolia</i>	06
Figure I.2 : Représentation schématique de l'association des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes.	14
Figure I.3 : Structure de certains métabolites secondaires ayant une activité antibactérienne	16
Figure I.4 : Structure de certains métabolites secondaires ayant une activité antifongique	17
Figure II.1 : Photographie de la plante étudiée <i>lavandula officinalis</i>	17
Figure II.2 : Isolement et purification des champignons endophytes.....	24
Figure II.3 : Echantillon de plante la <i>lavandula officinalis</i> de cinq place.....	24
Figure II.4 : Séchage sur papier filtre.....	26
Figure II.5 : Découpage et mise en place dans les boîtes de PDA.....	27
Figure II.6 : Mesure de la croissance radiale des mycéliums de champignon pathogène par la méthode de double culture	28
Figure II.7 : Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type Clevenger utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.....	29
Figure III.1 : Taux de colonisation des endophytes de <i>lavandula officinalis</i>	32
Figure III.2 : Effet des champignons endophytes actifs contre <i>Bacillus sp</i>	32
Figure III.3 : Effet des champignons endophytes actifs contre <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Figure III.4 : Zone d'inhibition obtenue par quelques champignons endophytes contre <i>Bacillus sp</i>	39
Figure III.5 : Zone d'inhibition obtenues par quelques champignons endophytes contre <i>Pseudomonas fluorescens</i>	40
Figure III.6 : Zone d'inhibition obtenues par quelques champignons endophytes contre <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Figure III.7 : Effet de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> contre des bactéries pathogènes	42
Figure III.8 : L'Activité antibactérienne de l'HE(A) : <i>Bacillus sp</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (E) : <i>Pseudomonas fluorescens</i>	43

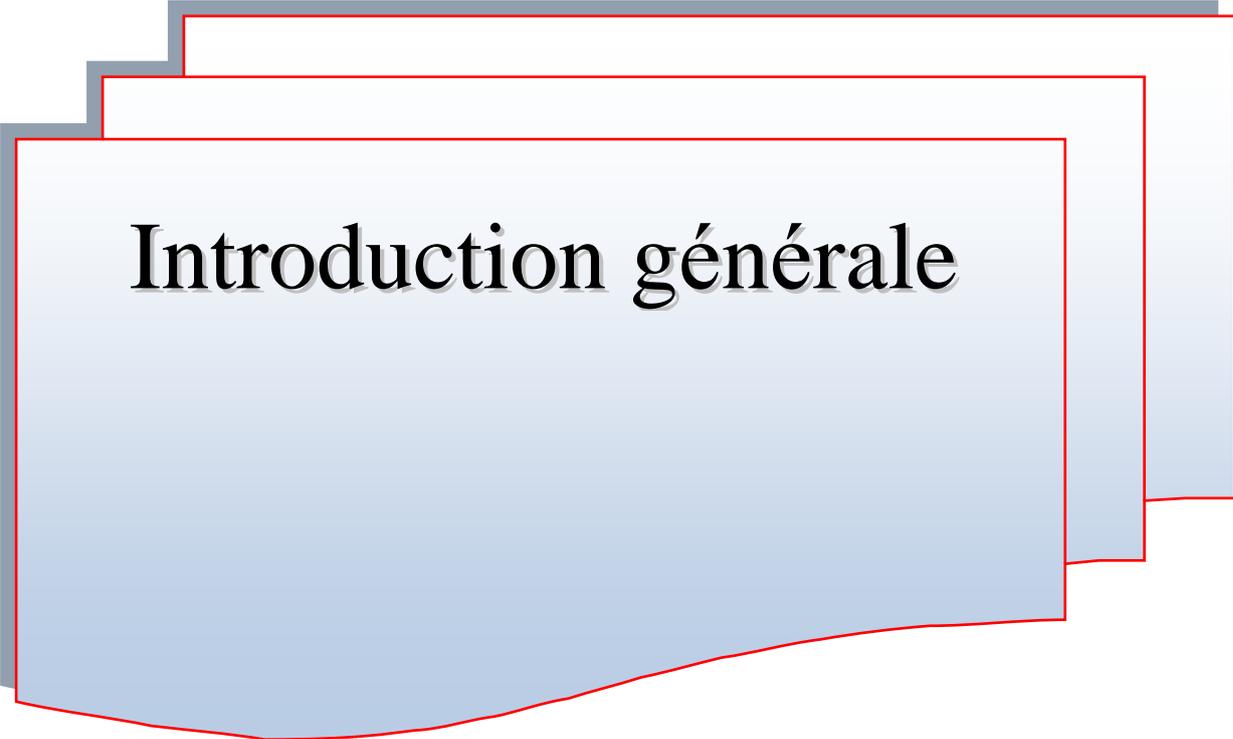
Figure III.9 : Comparaison de l'effet antibactérien contre <i>Bacillus sp.</i> entre les champignons Endophytes et l'huile essentielle.....	45
Figure III.10 : Comparaison de l'effet antibactérien contre <i>S. aureus</i> entre les champignons endophytes et l'huile essentielle.....	45
Figure III.11 : Comparaison de l'effet antibactérien contre <i>P. fluorescens</i> entre les champignons endophytes et l'huile essentielle.....	45
Figure III.12 : Activité antifongique des champignons endophytes contre <i>F. oxysporum</i>	47
Figure III.13 : Zone d'inhibition obtenues par les champignons endophytes contre champignon pathogènes <i>Fusarium oxysporum</i>	47
Figure III.14 : Zone d'inhibition obtenues par l'huile essentielle contre <i>F. oxysporum</i>	48
Figure III.15 : Comparaison de l'effet antifongique contre <i>F. oxysporum</i> entre les champignons endophytes et l'huile essentielle	49

Liste des tableaux

Tableau I.1 : composition chimique de l'huile essentielles de <i>lavandula officinalis</i> obtenues par trois méthodes différentes.....	07
Tableau I.2 : Classification des champignons endophytes	13
Tableau III.1 : photographie d'aspect macroscopique et microscopique des isolats fongiques.....	34
Tableau III.2 : Zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les champignons endophytes.....	37
Tableau III.3 : Zones d'inhibition de la croissance bactérienne par l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i>	42
Tableau III.4 : Pourcentage d'inhibition de <i>Fusarium oxysporum</i> par les champignons endophytes.....	46

Liste des abréviations

AH	Adapté à l'habitat
GN	Gélose Nutritive
HE	Huile essentielle
NAH	Non à l'habitat
NaOCl	Hypochlorite de sodium
NI	Non identifié
PDA	Potato Dextrose Agar
R%	Rendement
SD	Standard déviation



Introduction générale

L'augmentation des personnes dans le monde ayant des problèmes de santé causés par des bactéries résistantes aux médicaments, des protozoaires parasites et des champignons, est une source d'alerte. Le développement de plusieurs microbes résistants aux médicaments a soulevé la nécessité de recherche de nouveaux agents antimicrobiens pour le traitement des maladies humaines. Une recherche intensive d'agents nouveaux et plus efficaces pour traiter ces problèmes de maladie est actuellement en cours, et les endophytes sont considérés comme une nouvelle source de composés médicinaux potentiellement utiles. Les micro-organismes ont la capacité d'utiliser divers substrats en raison de la diversité de leur évolution biologique et biochimique. Les substrats solides qu'ils utilisent comprennent, entre autres, les plantes vivantes. Les bactéries et les champignons sont connus pour coopérer avec de nombreuses plantes pour former des associations mutuellement bénéfiques. Les actinomycètes et les champignons, de tous les micro-organismes étudiés, se sont révélés être les producteurs les plus prolifiques de métabolites secondaires (**Sharma et al., 2016**). Parmi les différents groupes de champignons les plus importants sont les champignons endophytes. Comme ces derniers représentent des sources biologiques nouvelles inexplorées et utiles dans de nombreux secteurs, dont les plus importants sont les secteurs pharmaceutique, industriel et agricole (**Zheng et al., 2016**).

Il existe d'énormes possibilités pour la récupération de nouvelles espèces, genres et biotypes fongiques de cette niche écologique. Selon certaines estimations, environ 1,5 million d'espèces fongiques existent dans le monde. Alors que seulement 100 000 ont été découvertes et qu'il peut y avoir au moins un million d'espèces de champignons endophytes seuls. Ces dernières années, des connaissances considérables ont été accumulées sur la biologie des microorganismes endophytes. Les endophytes représentent une part importante mais peu explorée de la diversité fongique (**Sharma et al., 2016**).

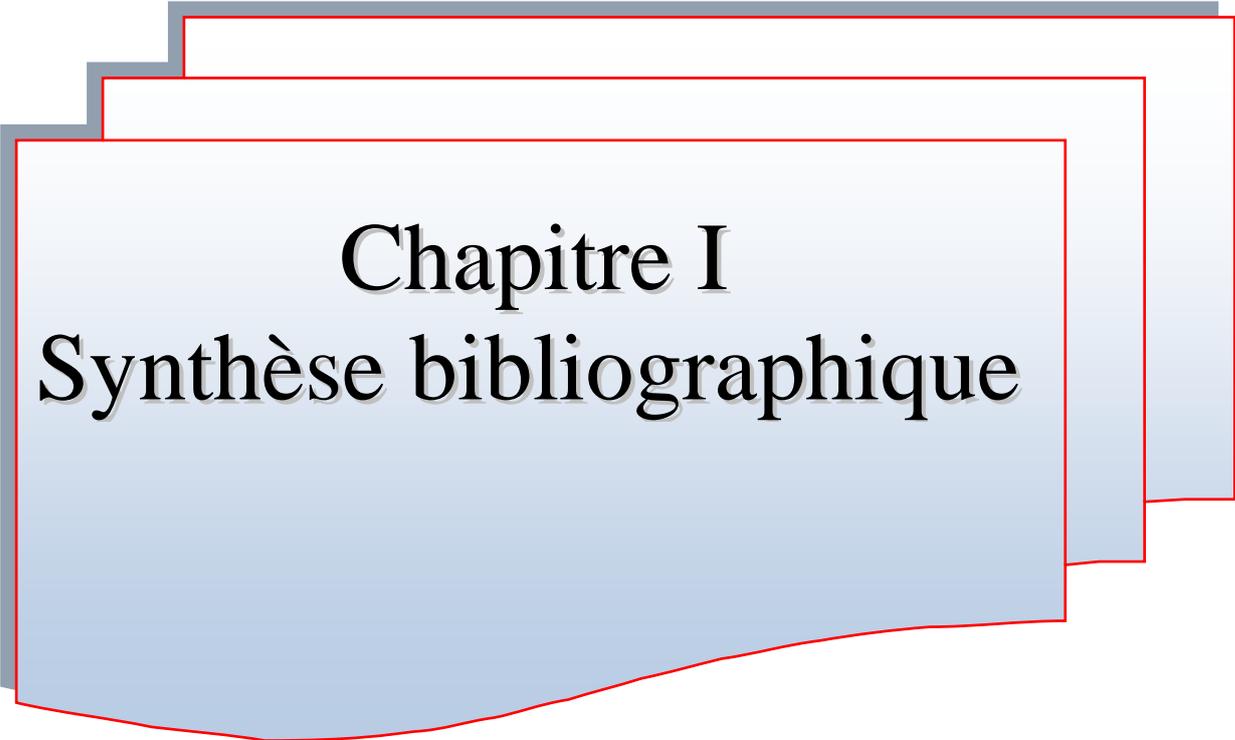
L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est liée au développement des civilisations. Ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et des préparations culinaires. L'évaluation de ces ressources végétales naturelles ne se limite pas aux seuls champignons d'intérieur, car leur importance réside également dans l'extraction de ses huiles essentielles. Ces derniers sont des produits à forte valeur ajoutée et sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire (**Bouzouita et al., 2008**).

Introduction générale

L'activité des huiles volatiles réside dans les centaines de molécules chimiques qui la constituent comme les terpénoïdes. Ces derniers donnent à la plante son odeur, d'autres sont responsables du parfum (**Angioni et al., 2006**). Le domaine d'application des huiles essentielles est diversifié malgré l'arrivée sur le marché des composés de synthèse ; C'est ainsi qu'elles trouvent de nombreuses applications dans l'industrie chimique et dans le domaine de l'agroalimentaire (condiments, épices, aromatisants,...) et l'aromathérapie (parfumerie, cosmétique et savonnerie) (**Tardugno et al., 2018**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre présent travail dans l'objectif consiste en l'étude d'activité antimicrobienne des champignons endophytes isolés de *lavandulaofficinalis*, une plante médicinale récoltée à partir de l'université de Constantine 3 ainsi que l'extraction de l'huile essentielle de cette plante et l'étude de son activité antimicrobienne. Les objectifs à réaliser dans cette étude sont les suivants :

- Isolement ; purification et identification des champignons endophytes.
- Extraction de l'huile essentielle de la plante.
- Détermination de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et les champignons endophytes.



Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre I - Synthèse bibliographique

I.1.Plantes médicinales

Au fil des ans, l'Homme a appris à reconnaître les plantes, à distinguer celles comestibles, de celles indésirables, voire, toxiques. Parmi ces dernières, il a utilisé certaines à des fins guerrières, criminelles, magiques, ou pour faciliter la pêche et la chasse ; quant au premier groupe, il l'a exploité à des fins nutritionnelles, aromatiques, ornementales, tinctoriales et médicinales donnant ainsi lieu au développement de nombreuses filières, notamment agroalimentaire, cosmétique et médicinale (**Benabdelkader, 2012**).

L'organisation mondiale de la santé définit une plante médicinale comme « toute plante qui, dans un ou plusieurs de ses organes, contient des substances qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs de la semi-synthèse parapharmaceutique (**kaul et al., 2012**).

Les plantes médicinales sont utilisées en médecine traditionnelle depuis de nombreuses années (**Venieraki et al., 2017**). La population africaine utilise la médecine traditionnelle à 80%, et l'Algérie et par sa situation géographique, est considérée comme l'un des pays arabes les plus importants et les plus riches en plantes médicinales avec 3164 espèces (**Benarba et al., 2016**).

L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. A cet effet, on s'est intéressé à l'une des espèces de la famille de *Lamiacées* : la lavande, celle-ci est utilisée comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien, antifongique et antioxydant (**Benyagoub, 2014**).

I.2. Généralités sur la Lavande

La famille des *Lamiacées*, également appelée *Labiés*, comprend les plantes *herbacées*. Cette famille compte 6500 espèces et 200 genres très divers. C'est une famille très harmonieuse, par exemple menthe, lavande ou basilic. Beaucoup de ces espèces sont des plantes médicinales, La *lavande* est l'une des plus importantes de ces plantes, ses arbres se caractérisent par une couleur verte permanente et un parfum aromatique (**Angioniet al., 2006**).

Il peut atteindre une longueur d'un mètre avec des fleurs bleues - violettes, Largement distribuée dans les îles canari, Islande et à travers tout le tell méditerranéen, l'Afrique du Nord, Sud-ouest de l'Asie, Afrique tropicale avec une disjonction vers l'Inde (**Mohammedi et Atik., 2011**).

Elle publie sa première étude en 1780 (**lis-balchin, 2002**); Il a une longue histoire d'utilisation médicinale et son huile est considérée comme un traitement pour de nombreux problèmes de

Chapitre I - Synthèse bibliographique

peau, le nettoyage des plaies, et de nombreuses autres maladies, et comme des agents antispasmodiques, et antimicrobiens (**Mohammedi et Atik., 2011**).

Les lavandes se répartissent en quatre catégories principales :

- *Lavandula latifolia*: une lavande méditerranéenne ressemblant à de l'herbe.
- *Lavande angustifolia*: une plante plus trapue avec une fleur plus pleine, communément appelée lavande anglaise (anciennement connue comme *L. vera* ou *L. officinalise*).
- *Lavandula stoechas* : qui a des bractées en forme de papillon au-dessus des fleurs et est parfois connue sous le nom de lavande française.
- *Lavande x intermedia* : qui est un croisement stérile entre *L. latifolia* et *L. angustifolia*.

Les différentes lavandes ont des propriétés ethnobotaniques et principaux constituants chimiques, cependant, il y a quelques différences dans les rapports usages thérapeutiques pour différentes espèces, par exemple la plupart pense que les lavandes ont des actions carminatives, mais *L. stoechas* est traditionnellement utilisée pour les maux de tête, *L. latifolia* comme un abortif et *L. angustifolia* comme diurétique (**Belmont., 2013**).

I.3. Classification et la systématique botanique

- Règne : *Plantae*
- Embranchement : *Spermatophytes*
- Sous-Embranchement : *Angiosperms*
- Division : *Magnoliophyta*
- Classe : *Eudicotylédones*
- Ordre : *Lamiales*
- Famille : *Lamiaceae*
- Genre : *Lavandula*
- Espèce : *lavandula officinalis*

I.4. Botanique de la plante étudiée (*Lavandula officinalis*)

Lavandula officinalis ou Lavande vraie, est une plante à feuilles étroites. Son nom latin est *Lavandula angustifolia* ou *L. officinalis*. Elle connue en arabe sous le nom de «*huzâma* » (**Elharas et al., 2013**). *Lavandula officinalis* est un arbuste dense pouvant atteindre une hauteur de 50 cm à 1 mètre. Les feuilles, linéaires et gris-vert quand elles sont jeunes et plus vertes avec l'âge, varient en longueur entre 3 et 5 cm et sont à la fois amères et aromatiques. Le tronc est en bois. La tige florale est généralement non ramifiée et les fleurs sont bleues, regroupées en bractées ovales à l'aisselle, le sommet des branches luxuriantes forme des

épines un peu lâches qui sont très aromatiques, les racines peuvent pousser jusqu'à une profondeur de 4 m (Lis-Balchin, 2002).



Figure I.1: Planche de *lavandula angustifolia* (Benabdelleader, 2012).

I.5. Huile essentielle de *lavandula officinalie*

La vraie huile de Lavande est presque incolore et a une odeur douce, florale, herbacée, rafraîchissante. Il a une note de tête fruitée-douce qui est très transitoire, et l'huile entière a une faible ténacité (Lis-balchin, 2002).

Les huiles essentielles de lavande sont largement utilisées dans l'industrie de l'aromathérapie et la recherche a montré qu'ils possèdent une gamme de propriétés biologiques qui peuvent les rendre utiles dans un environnement médical. De nombreux chercheurs ont montré l'activité antibactérienne des huiles de lavande Parmi eux, Lis-Balchin (1998) et Svoboda et Deans (1995), Goren (2002). Autre Des chercheurs ont étudié l'activité antifongique des huiles essentielles de lavande. Par exemple, inouye, L'huile de *Lavandula angustifolia* s'est avérée efficace contre une gamme de champignons Les plus importants sont *Trichophytonrubrum* et *Aspergillus fumigatus*. Des huiles essentielles de lavande ont également été utilisées Il a été démontré qu'il inhibe la croissance d'*Aspergillus niger*, d'*Aspergillus ochraceus* et de *Fusarium culmorum*, avec Le taux d'inhibition varie de 29 à 93 % (Moon et al.,2004).

I.6. Rôles des huiles essentielles

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu.

Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs (**Deroin, 1988**). De plus, en règle générale, les huiles essentielles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes. Les substances émises sont dans ce dernier cas appelées « phytoalexines ». Ce type de toxine n'est produit qu'en cas d'infection et n'entre donc pas dans la composition d'une huile essentielle provenant d'une plante saine .

La sauge *Salvia leucophylla* libère quant à elle des substances dans l'atmosphère telles du cinéole, du camphre et d'autres composés voisins afin d'inhiber la germination et le développement d'espèces prairiales en concurrence. Ces composés agissent par absorption dans un sol sec .

L'intérêt pour les produits naturels dans l'alimentation et dans l'industrie pharmaceutique est grandissant. **Baratta et al., (1998)**, ont réalisé une expérience visant à mettre en évidence les propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes de plusieurs huiles essentielles (**Laib , 2011**).

I.7. Composition chimique de l'huile essentielles de *lavandula officinalis*

Les méthodes d'extraction ont un impact significatif sur le rendement, composition chimique et activités biologique des huiles essentielle (antioxydants et antimicrobiens) . le (**Tableau I.1**) montre la composition chimique de l'huile essentielle de *lavandula officinalis* obtenues par trois méthodes différentes(**Danh et al .,2012**).

Tableau I.1 : composition chimique de huile essentielles de *lavandula officinalis* obtenues par trois méthodes différentes (**Danh et al .,2012**).

Compound	Hydro distillation	Hexane extraction	SCE
Camphene	0.19±0.00	–	–
1-Octen-3-ol	0.28±0.03	0.21±0.00	0.30±0.00
Myrcene	0.56±0.12	–	–
1,4-Cineole	0.06±0.03	–	–
Limonene	0.24±0.01	0.08±0.00	0.10±0.00
1,8-Cineole	1.51±0.10	0.55±0.44	1.18±0.01

Chapitre I - Synthèse bibliographique

(Z)- β -Ocimene	0.44 \pm 0.04	0.07 \pm 0.00	0.23 \pm 0.00
(E)- β -Ocimene	0.09 \pm 0.00	–	–
α -Terpinene	0.32 \pm 0.02	0.19 \pm 0.08	0.20 \pm 0.04
cis-Linalool oxide	0.24 \pm 0.04	0.16 \pm 0.03	0.16 \pm 0.00
Terpinolene	0.21 \pm 0.03	–	–
Linalool	52.59 \pm 0.70	33.35 \pm 8.26	42.82 \pm 0.19
Octen-1-ol-acetate	0.12 \pm 0.04	–	–
Camphor	8.79 \pm 0.20	6.81 \pm 0.16	8.05 \pm 0.04
Borneol	7.50 \pm 0.12	7.50 \pm 0.24	6.68 \pm 0.36
Lavandulol	–	–	0.52 \pm 0.00
Terpinen-4-ol	2.45 \pm 0.02	2.12 \pm 0.07	2.16 \pm 0.01
Cryptone	0.11 \pm 0.00	1.16 \pm 0.05	–
p-Cymen-8-ol	–	–	0.10 \pm 0.03
α -Terpineol	3.03 \pm 0.17	0.80 \pm 0.02	0.73 \pm 0.02
Hexenyl butanoate	–	–	0.09 \pm 0.00
Hexyl isobutanoate	0.06 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02	0.17 \pm 0.00
Isobornyl formate	0.05 \pm 0.00	0.18 \pm 0.00	–
Cumin aldehyde	0.16 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00	–
Hexyl-2-methyl butyrate	0.06 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	–
Hexyl isovalerate	0.10 \pm 0.00	25.73 \pm 1.76	–
Linalyl acetate	9.27 \pm 0.21	–	23.40 \pm 0.23
Bornyl acetate	1.11 \pm 0.30	1.58 \pm 0.15	0.17 \pm 0.01
Lavandulyl acetate	1.32 \pm 0.10	0.23 \pm 0.06	1.35 \pm 0.01
Lavandulyl isovalerate	0.10 \pm 0.00	0.26 \pm 0.12	0.17 \pm 0.00
Total identified (%)	98.07	92.77	98.19

I.8. Définition des endophytes

Le terme « endophyte » est dérivé du grec, *endon* : à l'intérieur et *phyte* : plante. Il a été introduit pour la première fois par **De Babys** (1866) où il le définissait comme étant tous les micro-organismes, qui se développent et colonisent à l'intérieur des tissus internes vivants de la plante hôte sans lui causer un effet négatif (**Patil et al., 2016**). Carroll (1986) restreint l'utilisation de ce terme aux organismes causant des infections asymptomatiques au niveau des tissus végétaux en excluant les champignons pathogènes.

La définition la plus utilisée maintenant est celle de Pertini (1991) où il a élargi la définition de Carroll (1986), et a inclus les organismes endophytes ayant une phase épiphyte ainsi que les agents pathogènes latents pouvant vivre à l'intérieur de leur hôte pendant au moins un certain temps de leur cycle de vie sans causer de symptômes à ce dernier. Ces organismes endophytes englobent aussi bien les bactéries, les archées, les champignons que les protistes; cependant, les champignons sont les plus répandus (**Patil et al., 2016; Yan et al., 2018**).

I.9. Rôle des endophytes

Il a été démontré que les endophytes jouent un rôle clé dans l'adaptation des plantes hôtes aux environnements pollués et qu'ils peuvent améliorer la phytoremédiation en mobilisant dégradant ou immobilisant les contaminants dans le sol, en favorisant la croissance des plantes, en diminuant la phytotoxicité et en améliorant également la tolérance aux métaux des plantes comme par d'autres moyens (**Eid et al., 2019**). Il a été rapporté que les champignons endophytes améliorent la croissance des plantes en améliorant l'absorption des nutriments et la solubilité des phosphates, en plus du potassium, de l'azote et du fer, les plantes d'intérieur réparent également biologiquement l'azote et le mettent à la disposition des plantes hôtes. Les phytohormones sont des petites molécules de signalisation essentielles à la croissance, au développement et à la défense des plantes, parmi elles : l'acide indole-3-acétique (IAA), les cytokines et les gibbérellines sont impliqués dans une multitude de processus de développement des plantes tels que la croissance cellulaire, la dominance apicale, les tropismes, initiation des racines adventives et latérales, différenciation cellulaire et vasculaire, développement des étamines et résistance au stress biotique et abiotique, ainsi, les endophytes sont les habitants naturels des plantes qui peuvent être utilisées comme bio-engrais et agents de lutte biologique pour une agriculture durable (**Li et al., 2012**).

I.10. Champignons endophytes

Les champignons endophytes ont été décrits comme des champignons qui colonisent symptomatiquement les tissus végétaux sains, même bien qu'ils puissent, après incubation ou une période de latence, provoquer des maladies, C'est utilisé pour divers traitements médicaux (**Rokotoniriana, 2007**).

Les champignons endophytes sont étudiés depuis 1898, mais seul un nombre limité de champignons endophytes a été rapporté dans les années 1898-1980. Les champignons endophytes ont attiré de plus en plus l'attention et sont considérés comme des agents de lutte biologique prometteurs grâce à de leur colonisation intracellulaire de plantes saines, des champignons endophytes ont été identifiés présents dans près de 300 000 espèces végétales, ces champignons habitent dans presque tous les organes (racine, tige, feuille, fleur, fruit et graine) de la plante hôte; une partie de eux produisent des métabolites bioactifs mais seulement quelques-uns de ces champignons ont été étudiés (**Yu et al., 2018**).

I.11. Relation entre les champignons endophytes et leur plante hôte

Diverses relations peuvent exister entre les champignons endophytes et leurs hôtes, allant de mutualiste ou symbiotique avec des agents antagonistes ou pathogènes. En raison de ce qui est censé être leur contribution aux plantes hôtes, les champignons endophytes peuvent produire une pléthore des métabolites secondaires qui ont une utilisation potentielle dans l'agriculture, la médecine et l'industrie, tels que les nouveaux antibiotiques, immunosuppresseurs, antioxydants et agents anticancéreux. Selon (**Strobel, 2002**), les hypothèses raisonnables devraient régir la stratégie de sélection des plantes pour la découverte de champignons endophytes bioactifs; on comprend des plantes qui présentent des activités pharmacologiques. Des études récentes ont démontré que les champignons endophytes vivant dans les plantes médicinales exercent un large éventail d'activités biologiques (**Vieira et al., 2012**).

La relation mutualiste entre les champignons endophytes et les plantes hôtes sont quelque peu complexes. Les plantes peuvent fournir aux endophytes des nutriments, une protection contre la dessiccation, une structure spatiale, et la transmission via la dissémination des graines à la prochaine génération d'hôtes (**Guo et al., 2008**). La plante peut également fournir des composés chimiques importants qui sont essentiels pour la croissance et l'autodéfense des endophytes (**Strobel, 2002**). Au d'autre part, les endophytes apportent des avantages significatifs à leurs plantes hôtes en produisant une pléthore de substances bioactives

Chapitre I - Synthèse bibliographique

nécessaires pour s'adapter aux conditions abiotiques et biotiques (Guo *et al.*, 2008). La résistance au stress abiotique est renforcée par tolérance croissante à la sécheresse ou au stress hydrique, température élevée, pH faible, salinité et présence de métaux lourds (Jalgaonwala *et al.*, 2011). Les plantes subissent un stress biotique dû à des agents pathogènes bactériens et fongiques, et à des attaques d'insectes, nématodes et mammifères herbivores. Les métabolites secondaires bioactifs produits par les endophytes vivant dans ces plantes sont connus pour induire une résistance aux facteurs de stress biotiques (Ratnaweera *et de Silva.*, 2017).

I.12. Spécificité de l'hôte

La relation des champignons endophytes avec la plante hôte peut être unique ou multiple, ce qui peut être décrit en quatre termes : spécificité, fréquence, sélectivité ou préférence de l'hôte, unicité de l'hôte (Cohen, 2004).

Premièrement, La relation dans laquelle le champignon est limité à une plante hôte ou à un groupe d'espèces apparentées qui ne se trouvent pas dans d'autres plantes apparentées, situées dans la même patrie.

Deuxièmement, Conscience de la fréquence ou de la prédominance des champignons internes à un hôte particulier ou à un groupe de plantes hôtes, et pouvant être trouvés dans d'autres plantes hôtes dans le même pays (Zhou *et Hyde.*, 2001).

Troisièmement, la sélectivité de l'hôte, qui est une espèce fongique interne, formant une relation avec deux types de plantes apparentées, ce qui indique une préférence pour l'une des espèces (Cohen, 2004)

Enfin, l'unicité de l'hôte, qui est la dominance ou l'occurrence individuelle de champignon sur une plante hôte particulière, est également utilisée pour indiquer des différences dans la composition des communautés fongiques. (Zhou *et Hyde*, 2001; Bettucci *et al.*, 2004)

En ce qui concerne la spécificité montrée par les endophytes pour leurs plantes hôtes, des spécialistes comme des généralistes sont présents dans ce groupe. Par exemple, les endophytes *Neotyphodium* ont une gamme d'hôtes étroite, se limitant à une ou deux espèces végétales. D'autres champignons tels que *Alternaria*, *Penicillium* et *Piriformospora* ont de larges gammes d'hôtes, englobant des espèces de différents genres ou familles de plantes (Zabalgozcoa, 2008).

I.13. Spécificité des tissus

De nombreux endophytes infectent localement les parties de la plante, étant limités à une petite zone tissulaire (Zabalgozcoa,2008).

Les champignons endophytes ont été trouvés dans différents tissus de la même espèce végétale, ou même dans différents tissus d'une plante, et cela révèle le tissu spécifique de certains champignons endophytes (Callabo *et al.*, 2011).Lorsque certains endophytes se trouvent dans certaines parties de la plante telles que les racines, les feuilles ou les rameaux, tandis que d'autres peuvent infecter plusieurs de ces parties, comme les espèces systémiques *Neotyphodium* et *Epichoe*, qui infectent systématiquement l'espace intercellulaire des feuilles, des tiges reproductrices et des graines de leurs hôtes. Ces cellules systémiques internes peuvent être isolées de plusieurs parties de la même plante(Zabalgozcoa, 2008).

Parfois, des composés chimiques peuvent altérer certains tissus de la colonisation de divers endophytes, cependant, certains de ces endophytes portent certaines toxines produites par l'hôte, ce qui affecte l'abondance, la diversité et la composition des espèces de champignons (Vanetten *et al.*, 2001 ; Osbourn *et al.*, 2003). Il y a aussi l'âge de l'hôte, avec le passage du temps, le vieux tissu accumule de nombreuses cellules entrantes contrairement au jeune tissu(Zabalgozcoa, 2008).

I.14.Diversité et classification des champignons endophytes

Les champignons sont des décomposeurs de base majeurs dans certains écosystèmes et des partenaires essentiels pour de nombreux organismes. En 1991, on estimait qu'il y avait 1.5 million d'espèces de champignons (Blackwell., 2011), dont au moins un million d'espèces de plantes d'intérieur, connectées lorsque les plantes ont commencé à coloniser la terre il y a plus de 400millions d'années(Mane *et al.*,2018 ; Yan *et al.*, 2018).

Les champignons endophytes ont un grand effet sur la forme physique, l'écologie et l'évolution de la plante. Divers groupes de micro-organismes sont capables de produire un certain nombre d'agents bioactifs. Dans le passé, les champignons étaient classés en deux groupes : les clavicipitacés et non clavicipitacés selon leur taxonomie, évolution, fonction écologique et spécificité de l'hôte. Illustré que, il y quatre groupes spéciaux en fonction de six propriétés qui sont le (s)tissu (s) colonisé (s), le modèle de colonisation des plantes, la gamme d'hôtes, les niveaux de biodiversité végétale, les fonctions écologiques et le mécanisme de transmission entre les générations d'hôtes (Tableau I.2, Figure I.3)

Chapitre I - Synthèse bibliographique

La classe (1) est les endophytes clavicipitacés tandis que; les endophytes non clavicipitacés sont divisés en trois groupes spéciaux: classe (2), classe (3) et classe (4).

Tableau I.2: Classification des champignons endophytes (**Rodriguez, 2009**).

	Clavicipitacées	Non clavicipitacées		
Critères	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Gamme d' hôtes	Etroit	Vaste	Vaste	Vaste
Tissus colonisés	Tiges, racines et rhizomes	Tiges, racines et Rhizomes	Tiges	Racines
Colonisation des plantes	Extensive	Extensive	Limitée	Extensive
Biodiversité des plantes	Faible	Faible	Haute	Inconnue
Transmission	Vertical et horizontal	Vertical et Horizontal	Verticale et Horizontal	Horizontal
Bénéfice physique	NHA	NHA et HA	NHA	NHA

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

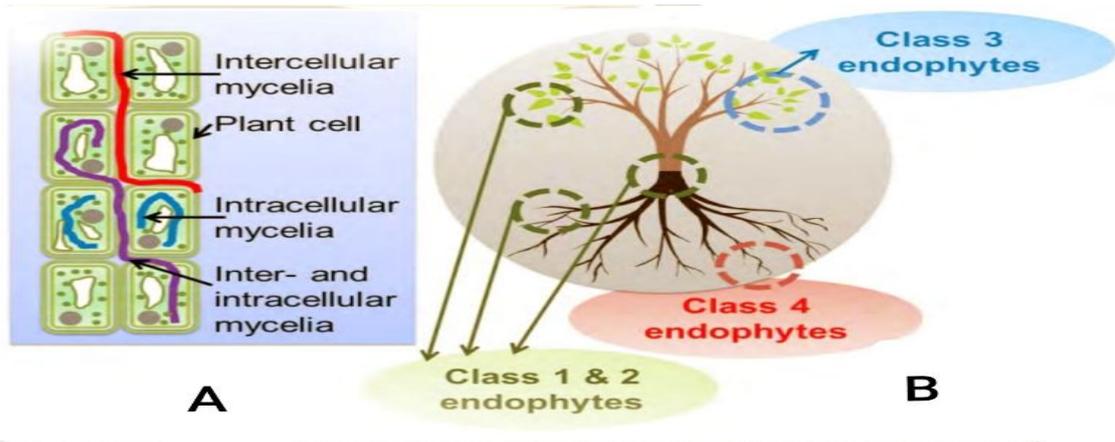


Figure I.2: Représentation schématique de l'association des champignons endophytes avec leurs plantes hôtes. (A) différentes localisation des champignons endophytes dans les tissus végétaux. (B) localisation de différentes classes d'endophytes (**Kusari et Spiteller, 2012**).

➤ Endophytes de classe (1) (endophytes clavicipitacés)

Comprend quelques champignons appartenant à (ascomycoètes et hypocréales) tels que (*Epichloë spp*, *Claviceps spp*, *Cordyceps spp*, et *Balansia spp*). Les plantes colonisées hébergent toujours un isolat / génotype fongique de contrôle. Il existe trois types d'endophyte sclavicipitacés étendus des espèces pathogènes et symptomatiques (type I) aux combinaisons mixtes et endophytes asymptomatiques (types II et III) respectivement. Les endophytes de classe (1) sont principalement transmis verticalement et horizontalement sur la progéniture via des infections de semences. Les endophytes de classe (1) confèrent une tolérance à la sécheresse, augmentent de la biomasse végétale et produisent des produits chimiques toxiques pour les herbivores et les animaux. Cependant, l'importance de ces champignons est due au génotype de l'hôte, aux conditions environnementales et aux espèces hôtes (**Selim, 2017**).

➤ Endophytes de classe (2) (endophytes non clavicipitacés)

qui peuvent se développer dans les tissus souterrains et aériens, peuvent largement coloniser les tissus. Les endophytes de classe 2 contenant différents espèces sont tous des organes du Dikarya (Basidiomycète ou Ascomycète). En fait, ce groupe d'endophytes est totalement limité dans une seule plante hôte. Ils peuvent transférer verticalement et horizontalement par graines, téguments ou rhizomes. Un aspect superbe des endophytes de classe 2 est leur capacité à donner une possibilité de stress spécifique à l'habitat aux plantes hôtes qui, sont identifiées comme adaptées à l'habitat si les avantages sont le résultat de pressions sélectives

spécifiques à l'habitat comme la température, la salinité et le pH ou comme non adaptées à l'habitat si l'utile est joint entre les endophytes indépendamment d'habitat. (Selim, 2017).

➤ Endophytes de classe (3) (endophytes non clavicipitacées)

Sont particulièrement remarquables pour leur haute véracité dans les plantes hôtes individuelles, les tissus et les populations. Les endophytes de classe (3) contenant les champignons endophytes hyper diversifiés liés aux feuilles des arbres tropicaux, ainsi que le compagnon très différent des tissus au-dessus du sol des plantes non vasculaires, des conifères, des plantes vasculaires ligneuses sans pépins et des angiospermes herbacées dans les biomes étendus de l'Arctique et société boréale / antarctique aux forêts. En particulier, les feuilles peuvent accueillir jusqu'à un isolat par 2 mm² de tissu foliaire et ont beaucoup d'espèces. De plus, dans les tissus herbacés et photosynthétiques, les endophytes de classe (3) sont présents dans les fruits et les fleurs, ainsi que dans l'écorce interne et le bois asymptotique. Les champignons ayant une durée de vie identique enregistrés aux endophytes de classe (3) également trouvés à l'intérieur des lichens asymptotiques et ce cas sont appelés champignons « endolichéniques ». Il forme des infections très localisées. La variété d'endophytes de classe (3) à l'intérieur d'un tissu ou d'une plante hôte peut être élevé (comme> 20 espèces répertoriées à partir d'une seule feuille tropicale. (Selim, 2017), tandis que l'isolement et l'étude des champignons ectomycorhiziens avaient repéré un champignon pigmenté brun à noirâtre lié aux racines des plantes terrestres.

➤ Endophytes de classe (4) (endophytes non clavicipitacées)

Qui sont initialement des champignons d'ascomycète stériles ou conidiens et qui forment une structure mélanisée comme des hyphes intra et intercellulaires et des micros sclérotés dans les racines. Ces champignons associés aux racines et stériles sont appelés «*Mycelium Radicus Atrovirens*». Les endophytes à l'intérieur des plantes individuelles n'ont pas été suffisamment évalués. Aussi, ce n'est pas confirmé si cela augmente l'aptitude aux hôtes, la compétence de la rhizosphère et mode de transmission. Cette classe d'endophytes est présente dans les plantes hôtes telles que non mycorhiziennes de l'Arctique, zones de température, alpines, écosystèmes tropicales, antarctiques et subalpins (Selim, 2017).

I.15. Champignons endophytes comme source des produits naturels bioactifs

Les plantes sont capables de produire des constituants bioactifs qui aident à prévenir ou à guérir les maladies. De nombreux champignons endophytes ont été reconnus comme sources de nouveaux métabolites d'importance pharmaceutique. Ils ont également le potentiel de synthétiser divers métabolites bioactifs qui peuvent directement ou indirectement être utilisés comme agents thérapeutiques contre de nombreuses maladies (Vasundhara *et al.*, 2019).

De nombreux scientifiques ont manifesté un vif intérêt pour l'étude des champignons endophytes en tant que producteurs potentiels de composés nouveaux et biologiquement actifs. Au cours des deux dernières décennies, de nombreux composés bioactifs précieux avec des activités antimicrobiennes, cytotoxiques, anticancéreuses, antioxydantes, antipaludiques, antivirales, antituberculeuses... etc. ont été découverts avec succès à partir des champignons endophytes (Vasundhara *et al.*, 2019).

I.15.I. Champignons endophytes comme source de substance antibactérienne

Les champignons endophytes sont considérés comme une source importante des produits bio-thérapeutiques (Deshmukh *et al.*, 2015), par exemple la pestalotiopén A produit par *Pestalotiopsis sp.*, un endophyte isolé à partir de la mangrove chinoise *Rhizophyramucronata* après avoir eu une activité antibactérienne modérée contre la bactérienne *Enterococcus faecalis*.

Chaetoglobosin B produit par l'endophyte *Chaetomium globosum* de feuilles de *viguierarobustaa* montré une faible activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Figure I.4) (Deshmukh *et al.*, 2015).

De nombreux champignons endophytes appartenant aux ascomycètes sont également connus par leur production des molécules antibactériennes, par exemple l'acide collétotrique produit par *Colletotrichum gloeosporioides* associé à la plante *Artemisiamongolica*. Ce composé a une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Sarcinalutea*.

La javanaise (Figure I.4), aussi un agent antibactérien, produit par *Chloridium sp.*, associé à *Azadirachtaindica*, pourrait stopper la croissance des bactéries *Pseudomonas fluorescens* et *P. aeruginosa* (Vasundhara *et al.*, 2019).

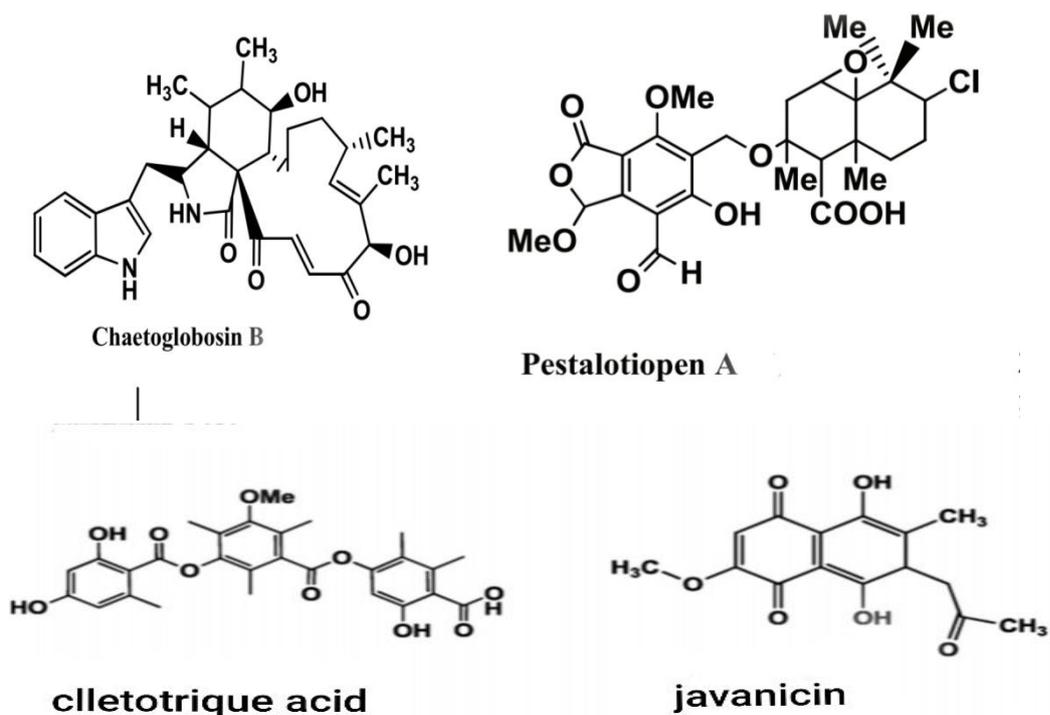


Figure I.3 : Structures de certains métabolites secondaires ayant une activité antibactérienne (Deshmukh *et al.*, 2015 ; vasundhara *et al.*, 2019).

I.15.2. Champignons endophytes comme source de substances antifongiques

Les plantes représentent une vaste source de micro-organismes inexplorés et non caractérisés, capables de produire des métabolites secondaires dérivés des endoblastes comprenant des classes de composés possédant des activités antifongiques, par exemple la Mellein (**Figure I.4**), produit par *Pezizulas*. Associé aux brindilles de *forsythia viridissima*. L'activité antifongique, de ce composé a été testée contre *Botrytis.cinerea*, *Pythiummultimun*, *Fusarium oxysporium*. *Cucumerinum*, *colletotrichum orbiculare*, *Verticillum dahliae*, *Pyricularia oryzae*, *pestalotia diospyri*, *Sclerotiorumet fulvia fulva*. LaMellein a présenté une activité antifongique contre 9 champignons phytopathogènes, en particulier, *B.cinerea* et *Fulvia fulva* (Deshmukh, 2018).

Trichothecinol A (**Figure I.4**) a été obtenu à partir de *Trichothecium sp.* Un champignon endophyte isolé de *phyllanthus amarus*. Le composé a montré une activité contre *Cryptococcus Albidus* (Deshmukh, 2018).

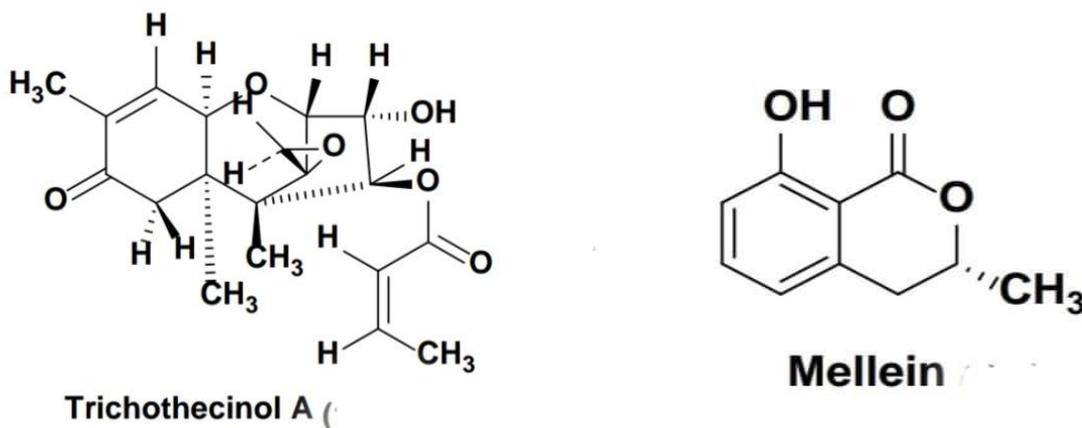


Figure I.4 : Structure de certains métabolites secondaires ayant une activité antifongique (Deshmukh, 2018).

I.16. Méthodes d'extraction de l'huile essentielle

L'extraction des huiles essentielles (HE) est nécessairement une opération complexe et délicate. Elle a pour but, en effet, de capter et recueillir les produits les plus volatils, subtils et les plus fragiles qu'élabore le végétal, et cela sans en altérer la qualité. Plusieurs techniques d'extraction des huiles essentielles. Cependant, les méthodes d'extraction sont adaptées aux propriétés les plus importantes des huiles et des bases en particulier, leur volatilité dans l'air et la vapeur d'eau (Boukhatem *et al.*, 2019).

I.16.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE, dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées dans l'essencier, avant d'être séparées en une phase aqueuse et une phase organique. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire la qualité de l'huile. De plus, le parfum de l'HE obtenue est plus délicat, la distillation régulière et plus rapide, fait que les notes de tête sont riches en esters et des substances volatiles dues à des particules légères. Le contact direct des composants provoque des réactions chimiques qui entraînent des modifications de la composition finale de l'extrait. Les conditions opératoires, et en particulier la durée de distillation, ont un impact significatif sur l'efficacité de la composition de l'HE (Boukhatem *et al.*, 2019).

I.16.2. Extraction par hydro distillation

C'est la méthode la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste en une immersion directe de la matière végétale dans l'eau. L'ensemble est porté à ébullition, la vapeur d'eau entraîne les éléments odorants passent ensuite dans un système de refroidissement. L'huile est séparée de l'eau par la différence de densité (**Boukhatem *et al.*,2019**).

I.16.3.Extraction à froid

La technique est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes en déchirant ces dernières par un traitement mécanique. Elle consiste à rompre ou dilacérer les parois des sacs oléifères contenus dans le mésocarpe situé juste sous l'écorce du fruit (**Boukhatem *et al.*,2019**).

I.16.4. Extraction par solvants organiques

L'extraction par solvants organiques volatils reste la méthode la plus utilisée. Les solvates les plus largement utilisées à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane et l'éthanol. Le dichlorométhane et l'acétone sont rarement utilisés. Selon la technologie et le solvant utilisé, on obtient :

- Alcoolat : extrait à l'éthanol dilué.
- Hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau.
- Teintures ou solution non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées avec l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- Extrait de résine ou d'éthanol concentré.

Les raisons de restreindre l'utilisation des solvants organiques volatils pour l'extraction sont son coût, ses problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que les réglementations liées à la protection de l'environnement (**Boukhatem *et al.*,2019**).

I.16.5. Extraction par fluide à l'état supercritique

Le dioxyde de carbone est généralement utilisé pour l'extraction de gaz liquéfié ou de fluide supercritique. D'autres travaux montrent l'utilisation d'eau supercritique. Dans ce système, le solvant est utilisé dans la boucle en insérant un échangeur de chaleur, un compresseur et un détendeur pour amener le solvant à l'état souhaité à chaque étape du processus. Séparation des extraits en phase gazeuse par simple détente. L'avantage de cette méthode est que le solvant peut être éliminé et récupéré par simple compression et relaxation. de plus, dans le cas du

dioxyde de carbone, la température d'extraction est basse et il n'est pas corrosif pour les composants les plus vulnérables. A ces différents avantages s'ajoutent des avantages tels que la sécurité, l'inertie et l'inflammabilité du dioxyde de carbone. L'obstacle au développement de cette technologie est le coût élevé des équipements associés aux applications de pression de plusieurs centaines de bars (**Boukhatem et al., 2019**).

I.17. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont très grande variabilité, tant au niveau de la composition que des performances plantes primitives. Cette variabilité peut s'expliquer par divers facteurs, on peut les diviser en deux catégories :

- ❖ Facteurs intrinsèques, liés aux espèces, types de clones, organes apparentés, interaction avec le milieu (type de sol ou climat...) et maturité des plantes pertinentes, même pendant la période de récolte pendant la journée.

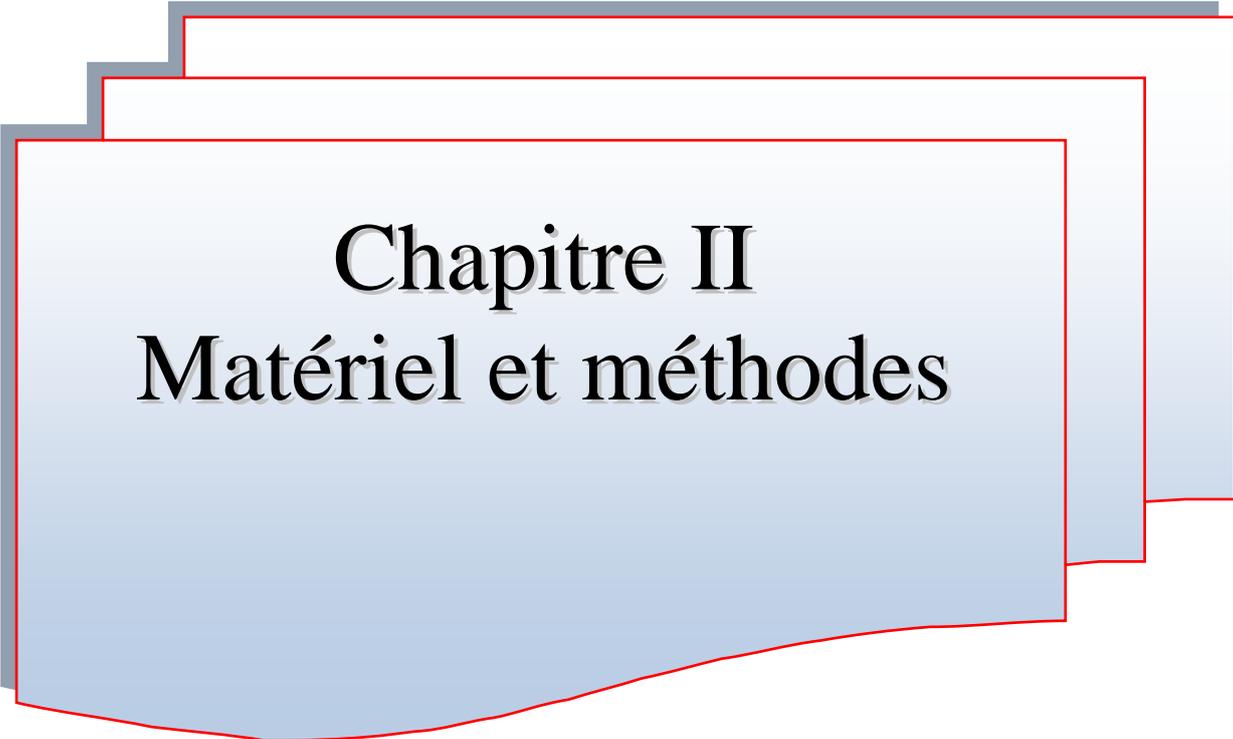
- ❖ Facteurs externes, liés à la méthode d'extraction (**Laib, 2011**).

I.17.1. Facteurs intrinsèques

Étant donné que les cellules qui produisent les huiles essentielles peuvent être situées dans différents organes, différentes huiles peuvent être obtenues à partir des parties sélectionnées de la même plante. Des études ont montré qu'en raison de différents organes (feuilles et fleurs) et de différentes sous-espèces, il existe des différences dans la composition des huiles essentielles. Le stade végétatif à la récolte est le déterminant du rendement et de la composition en huile essentielle de la plante de lavande obtenu par clonage (**Laib, 2011**).

I.1.2. Facteurs extrinsèques

La méthode d'extraction a un grand effet sur la composition des huiles essentielles, le stockage des matières premières avant distillation affecte également la composition et le rendement des huiles essentielles. Notez la perte substantielle d'huiles essentielles lors d'un stockage congelé à long terme, mais presque aucun changement de composition. De plus, la durée de conservation des huiles essentielles après extraction a tendance à modifier la composition de ces huiles. Les huiles essentielles peuvent se conserver 12 à 18 mois après leur obtention, car leurs propriétés ont tendance à décliner avec le temps. D'autres travaux montrent l'influence de l'origine géographique des matières premières (**Laib, 2011**).



Chapitre II

Matériel et méthodes

Chapitre II - Matériel et méthodes

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Des échantillons de la plante médicinale « *lavandula officinalis* » (feuilles, tiges et racines) ont été collectés en Avril 2021 de cinq places différentes de l'université Saleh Boubenider à Constantine, Algérie.



Figure II.1 : Photographie de la plante étudiée *Lavandula officinalis*.

II.1.2. souches microbiennes

Nous avons utilisé trois souches bactériennes : une bactérie à Gram négatif *Pseudomonas fluorescens*, deux bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Bacillus sp.* et le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*. Les souches microbiennes provenant de laboratoire de microbiologie de l'université Ferhat Abbas de Sétif.

II.1.3 .Produits chimiques

Plusieurs produits chimiques sont utilisés dans notre étude:

- Ethanol (C₂H₅OH) 96%
- NaOCl hypochlorite de sodium 2%
- Glucose (C₆H₁₂O₆)
- Agar
- Gélose nutritive
- Eau de javel (hypochlorite de Na 2%)

Chapitre II - Matériel et méthodes

- Les milieux de cultures utilisés sont : GN, PDA (**voir l'annexe**)

II.1.4 .Antibiotique

Nous avons utilisé un antibiotique :Gentamicine comme témoin positif pour les bactéries, et Clotrimazole comme témoin positif pour les champignons.

II.1.5.Appareillage

Étuve, plaque chauffante avec agitation, autoclave, bec bunsen, microscope.

II.2.Méthode

II.2.1. Echantillonnage

Des échantillons de la plante de lavande ont été collectés au hasard à partir des feuilles, destiges et de racines de 5 places différentes dans la même zone (**Figure II.3**), les échantillons doivent être exempts de symptômes pathologiques. Les échantillons ont été stockés séparément dans des sacs stériles et ramenés au laboratoire.pour être utilisé dans un délai ne dépassant pas 24 heures (**Zerroug et al., 2018**).

II.2.2. Isolement et purification des champignons endophytes

Les échantillons de la plante ont été lavés sous l'eau du robinet pour éliminer les résidus qui y sont collés, puis exécution du processus désinfection des échantillons dans le but d'éliminer les organismes qui vivent à la surface, puis de les couper en petits morceaux et de les immerger dans (96% éthanol) pendant une minute et (l'hypochlorite de sodium 2%) pendant 3 minutes, puis un (éthanol à 96%) pendant 30 secondes et enfin lavage avec l'eau distillée stérile deux fois, après cette étape, les échantillons sont coupés avec un outil pointu et stérile en petits morceaux (0,5 cm × 0.5 cm), et les laisser sécher sur du papier filtre stérile(**Figure II.4**). Cinq morceaux de chaque échantillon sont cultivés dans une boîte de Pétri contenant le milieu dans la boîte d'abluation PDA (**FigureII.5**) (**Pimentel et al., 2006 ; Ouzid,2019**).

Les boites sont incubéesà 28 ° C pendant 5 jours, et après l'incubation chaque champignon poussé sera repiqué plusieurs fois jusqu'à l'obtention des cultures pures. Le pourcentage de colonisation est calculé selon (**Sandlui et al.,2014**) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de colonisation}(\%) = \frac{\text{nombre de segments colonisés}}{\text{nombre total des segments}} \times 100 \dots (1)$$

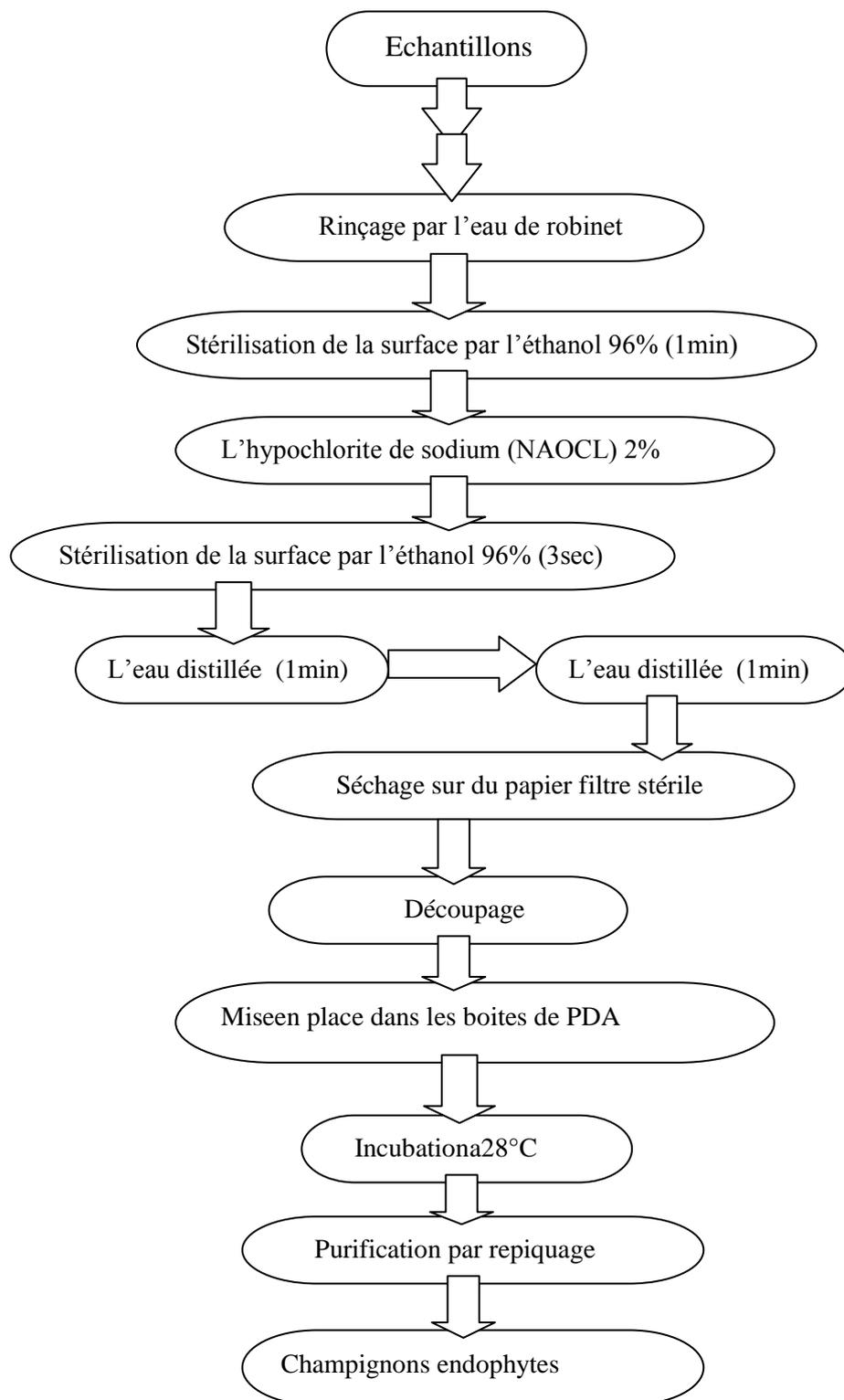


Figure II.2 : Isolement et purification des champignons endophytes (Pimentel *et al* 2006 ; Ouzid, 2019).



Figure II.3 : Echantillons de la plante *Lavandula officinalis*

P1, P2, P3, P4, P5 : places de récolte



Figure II.4 : Séchage sur du papier filtre.



Figure II.5 : Découpage et mise en place dans les boîtes de PDA.

Chapitre II - Matériel et méthodes

2.2.3. Identification des champignons endophytes

Les genres fongiques isolés ont été identifiés sur la base des caractéristiques morphologiques macroscopiques et des caractéristiques microscopiques utilisant les clés d'identification (**Dufresne, 2018**) les caractéristiques suivantes ont été observées :

- La morphologie du mycélium, sa couleur. Ainsi que la production des fructifications, sclérotés.
- La forme et la couleur des spores.

2.2.4. Activité antibactérienne des champignons endophytes

Les isolats fongiques ont été testés contre les bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.* et *Pseudomonas fluorescens*, qui ont été ensemencées dans des boîtes contenues du GN et incubées à 37 °C pendant 24 heures, après l'incubation, des colonies sont grattées utilisant l'anse de platine en suite mélangées avec l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne doit être bien homogène, la turbidité a été ajustée à 0,5 McFarland ce qui correspond à l'absorbance impliquée entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde de 620 nm. À l'aide d'un écouvillon stérile, on a fait un ensemencement de chaque bactérie dans des boîtes contiennent de PDA (**Devarju et Satish, 2011**).

L'activité antibactérienne a été réalisée suivant la technique de culture par diffusion ; Cette technique consiste à prélever des cylindres d'agar où les champignons ont préalablement cultures sur PDA et incubé à 28 °C pendant 7 jours, à partir de ces cultures, des disques de 6 mm ont été découpés et placés sur la surface des boîtes déjà ensemencée par les bactéries à tester. Après l'incubation à 28°C pendant 5 jours, des zones d'inhibition autour des disques fongiques ont été mesurées (**Devarju et Satish, 2011**).

2.2.5. Activité antifongique des champignons endophytes

L'activité antifongique des champignons endophytes a été testée contre le champignon phytopathogène (*Fusarium oxysporum*). Deux disques de 6 mm de diamètre de chaque champignon endophyte, et l'autre de champignon pathogène, ont été découpés, et inoculés avec un espacement d'environ 50mm entre les deux disques. Une boîte à témoin contenant le champignon pathogène seul a été préparée.

Toutes les boîtes ont ensuite été incubées à 28°C pendant 7 jours. Le rayon de la colonie du champignon pathogène dans les boîtes contrôle et en double culture a été mesuré.

Chapitre II - Matériel et méthodes

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule de **Ting et al., (2009)** ; **Orole et adejumo, (2009)**.

$$\text{pourcentage d'inhibition} = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100 \dots (2)$$

R1 : le rayon de la colonie du champignon pathogène dans la boîte à témoin.

R2 : le rayon de la colonie du champignon pathogène en double culture.

- Le pourcentage d'inhibition a été classé en quatre catégories :

- Pourcentage d'inhibition < 30% \Longrightarrow faible activité.
- 30% < pourcentage d'inhibition < 50% \Longrightarrow activité modérée.
- 50% < pourcentage d'inhibition < 70% \Longrightarrow activité élevée.
- Pourcentage d'inhibition > 70% \Longrightarrow activité très importante.

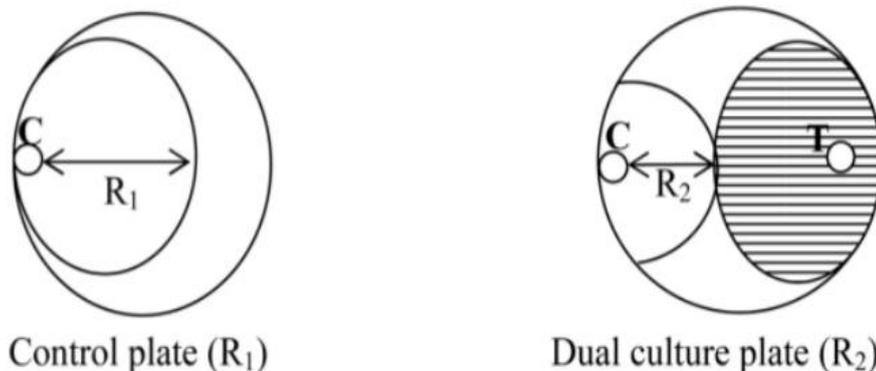


Figure II.6 : Mesure de la croissance radiale des mycéliums de champignons pathogènes par méthode de plaque de culture double. (**Nacef et al., 2020**).

C : champignon pathogène, **T :** champignon testé

II.2.6. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction a été réalisée par hydro distillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger, et il se compose d'un ballon et d'un réchauffeur qui permet une répartition homogène de la chaleur dans un ballon en verre pyrex ou l'on met la plante séchée et l'eau distillée.

Une colonne de condensation de la vapeur (liquide de refroidissement) provient du chauffage du ballon, qui est composé d'un Erlenmeyer en verre pyrex aussi qui reçoit des extraits de la distillation. Avant l'opération, l'appareil a été nettoyé par rinçage à l'eau distillée et

Chapitre II - Matériel et méthodes

l'éthanol pour éliminer la poussière et toute contamination éventuelle de l'huile essentielle lors de l'extraction (**Figure II.7**).

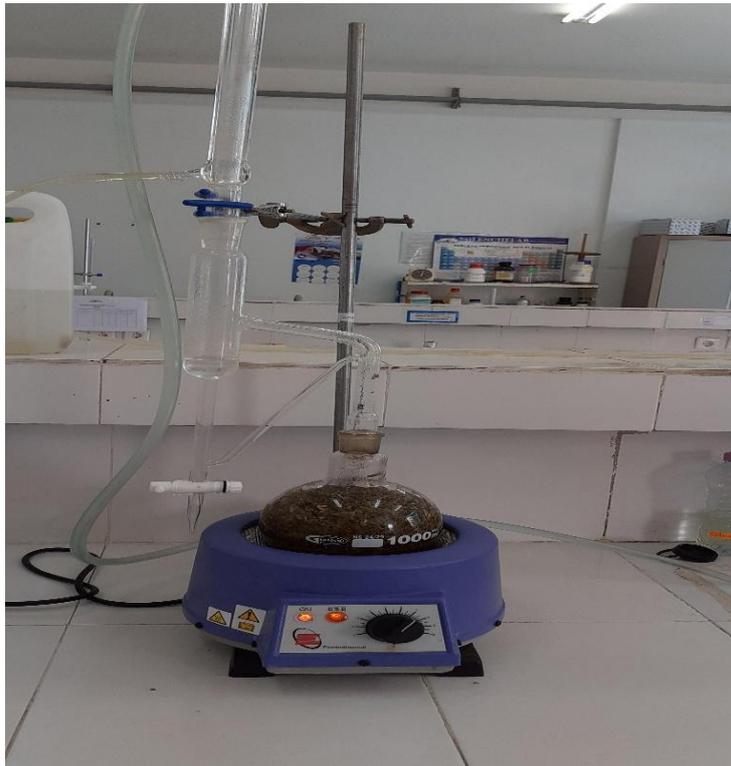


Figure II.7: Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type Clevenger.

➤ Procédé d'extraction

100g de matière végétale sèche sont placés dans un ballon de 1 litre, et mélangés avec 600 ml d'eau distillée. Faites bouillir pendant une heure et demie, température fixée à 70 degrés. Les huiles essentielles sont de la vapeur d'eau qui monte dans le condensat et après condensation et allumage, l'eau huileuse excessive est séparée de l'eau. Après avoir extrait l'huile végétale puis mesurer le volume d'huile essentielle que nous avons obtenu, elle est conservée dans du verre scellé, emballé dans une feuille d'aluminium et conservé au réfrigérateur à 4 °C afin de la préserver de la lumière et de la chaleur, jusqu'à ce qu'elle soit utilisée pour des tests biologiques (**El ajjouriet al., 2008 ; El amri, 2014**).

II.2.7. Calcul de rendement

Le rendement ($R\%$) exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante (**Selvakumaret al., 2012**).

$$R\% = \frac{Mhs}{Mvg} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

R% : Rendement de l'extraction d'huile essentielle en pourcentage (%)

Mhs : masse de l'huile essentielle en gramme (g)

Mvg : masse d'essai de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g)

2.2.8. Activité antibactérienne de l'huile essentielle :

L'aromatogramme consiste à déposer des disques de papier Whatman de 6mm de diamètre, préalablement stérilisés, à la surface de la gélose ensemencée par la suspension bactérienne après avoir été chargé de 10 µl de l'huile essentielle à concentration 0.15mg/ml. D'autres disques vides sont utilisés comme témoins négatifs en plus du disque de l'antibiotique Gentamycine comme témoin positif. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré

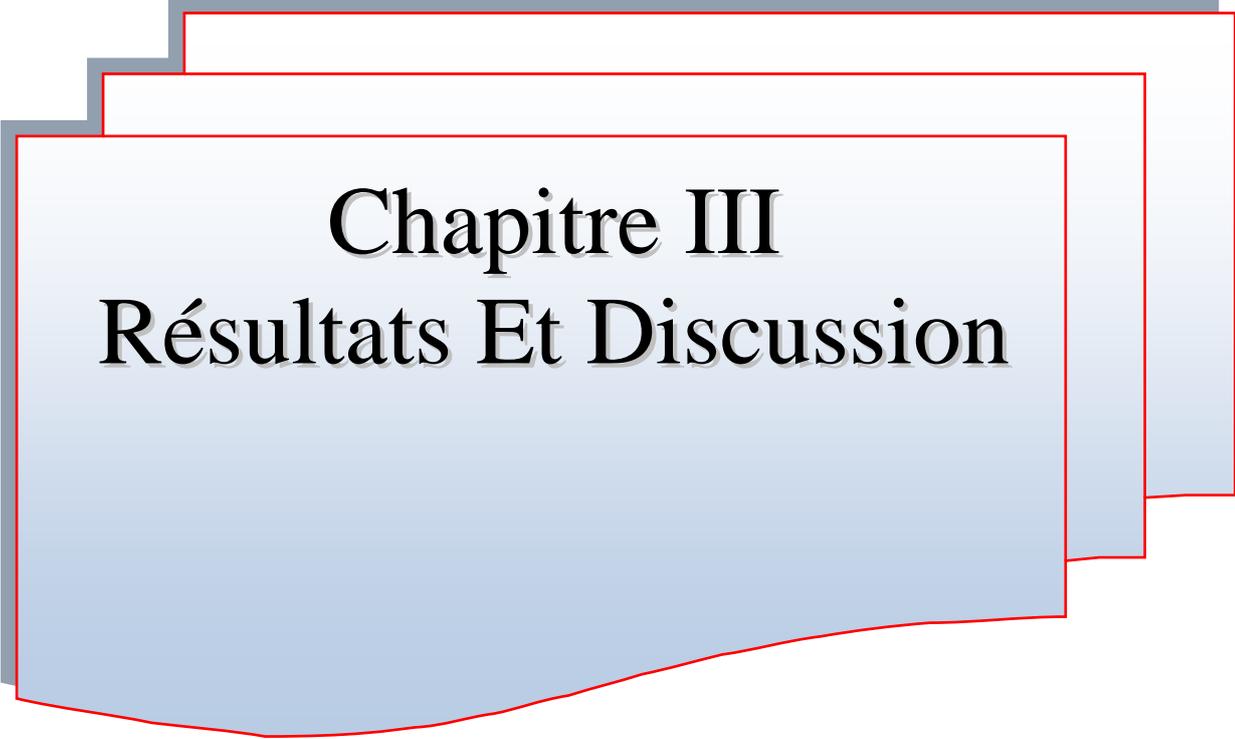
En ce qui concerne l'activité antifongique de l'HE, une suspension de spores a été préparée à partir de culture pure et jeune de champignon pathogène *Fusarium oxysporum*, dans l'eau physiologique stérile. Cette suspension serve à ensemencer la gélose PDA. L'incubation se fait à une température de 28°C pendant 3-5 jours.

La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible

Une boîte à témoin positif a été préparée utilisant des disques imprégnés par l'antibiotique Clotrimazole (Duraffourd et al., 1990 ; Kalemba et Kunicka, 2003).

II.2.10. Traitement statistique

Les moyennes plus ou moins l'écart type des trois essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2007.



Chapitre III

Résultats Et Discussion

Chapitre III - Résultats Et Discussion

III.1. Isolement et purification des champignons endophytes

Aucune croissance de champignons ou de bactéries n'a été enregistrée sur les milieux de culture utilisés pour le contrôle de l'efficacité de la stérilisation de surface. Ceci nous conduit à déduire que les étapes utilisées dans le processus de stérilisation étaient suffisantes 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 plantes étudiées.

Toutes les parties de la plante utilisée ont été colonisées par des champignons endophytes, des levures et des actinomycètes avec des proportions variables. Le pourcentage de colonisation est 40.55%, distribué comme suit : 2 isolats des actinomycètes, 4 isolats des levures et 15 isolats des moisissures avec des taux : 9.5%, 19% et 71 % respectivement (**Figure III.1**).

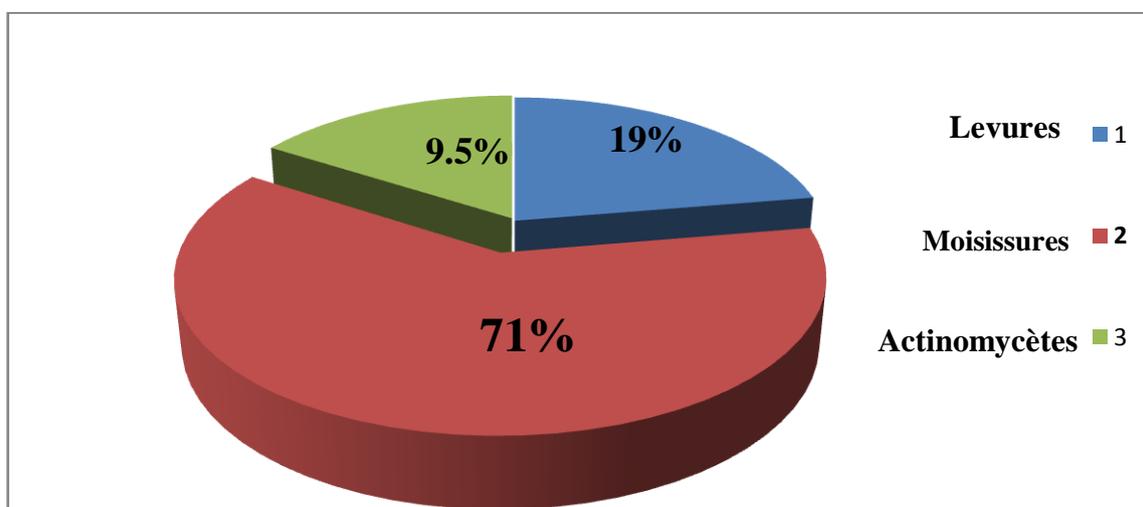


Figure III.1 : Taux de colonisation des endophytes de *lavandula officinalis*

Les résultats obtenus ont montré que la colonisation de la plante par les champignons était plus élevée dans les racines (99%), suivie par les tiges (12.5%), tandis que les feuilles étaient les plus faibles à 5.02%.

Cette différence de diversité est due à l'état physiologique de la plante hôte en étant affectée par la saison (en raison de facteurs tels que l'eau, la période d'éclairage, la température, etc.), l'emplacement et l'âge (Yu *et al.*, 2018). Cette variation a été également constatée par Li *et al.*, (2020) qui ont récupéré 1046 isolats de champignons endophytes à partir de dix espèces de plantes halophytes et ont trouvé que les taux de colonisation des champignons endophytes variaient entre $7.5 \pm 3.33\%$ et $83.75 \pm 8.95\%$ dans les tiges et entre $33.75 \pm 11.19\%$ et $97.5 \pm$

1.67% dans les racines. **Du et al.,(2020)** ont isolé 420 isolats fongiques endophytes à partir de *Securinega suffruticosa*, 170 provenaient des racines, 143 des tiges et 107 des feuilles. Dans leur étude sur *Mukiamaderasapatana*, **Kannan (2017)** ont trouvé que les segments racinaires étaient plus densément colonisés par les champignons endophytes, comme en témoigne la colonisation totale des feuilles, tiges et racines qui s'est avérée être de 86, 64 et 92% respectivement. Cela prouve que les champignons affectent la plante hôte et les tissus.

3.2. Identification des champignons endophytes

L'identification des champignons repose sur des critères macroscopique et microscopique. Quinze isolats fongiques ont obtenu appartiennent à Cinq genres différents (**Tableau III.1**).

Penicillium sp

Un genre qui comporte plus de 200 espèces certaines utilisées dans l'industrie fromagère (**Gond et al, 2012**). Ce genre présente des colonies de couleur vert avec un texture poudreuse, vitesse de croissance modérée. Sous microscopique il montre des conidiophores non cloisonnés, lisse et ramifié, d'une forme de pinceau tri-verticillé. Les conidiospores sont arrondis et de taille moyenne.

Mycélium stérile

Mycélium stérile blan-crème, les colonies sont cotonneuses, et vitesse de croissance modérée. Il n'a formé aucune forme de spores sexuée ou asexuées donc son identification est difficile.

Aspergillus niger

Ce genre montre une couleur noire avec une texture poudreuse et vitesse de croissance rapide. Sous microscope le Conidiophore apparaît lisse, long, incolore et se termine par une vésicule arrondie, les phialides sont directement disposées sur la vésicule et leur implantation est tout autour de cette vésicule, les conidies sont globuleuses.

Aspergillus terreus

Cette espèce apparaît avec une texture poudreuse, couleur marron-rose. Sa vitesse de croissance est modérée. Le Conidiophore lisse, incolore, les phialides sont disposées sur la mérule à la surface supérieure de la vésicule, les conidies sont globuleuses avec une taille homogène, les cellules conidiogènes sont bisériées.

Alternaria altarnatasp

Colonies laineuses, la couleur vert d'huile et bords gris, avec stries radiales et la vitesse de croissance rapide. Conidiophore est cloisonné, noir, lisse, à croissance modérée. Les Conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières, cloisonnées longitudinalement et transversalement.

Chapitre III - Résultats Et Discussion

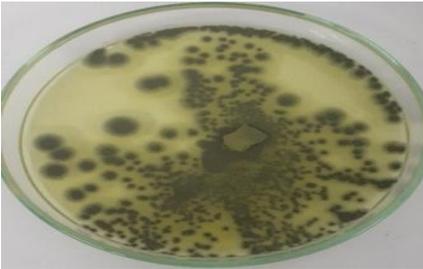
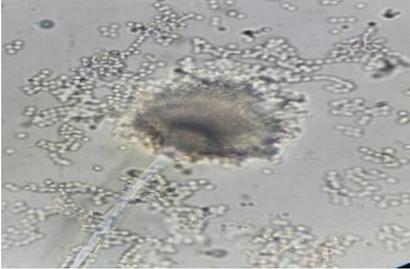
Fusarium

Le genre *Fusarium* a plus de 1000 espèces (Zhang *et al.*, 2012). Il montre des Colonnes blanches, avec une texture duveteuse, et stries radiales. Sa vitesse de croissance rapide.

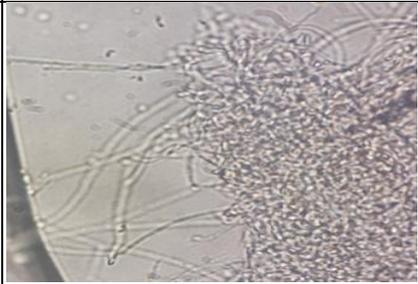
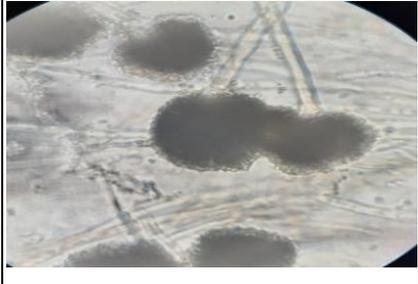
Le conidiphoreest court et ramifié, les phialides sont courtes et solitaires, d'une forme ovale, hyphe septe.

Tableau.III.1 : photographie d'aspect macroscopique et microscopique des isolats fongiques

a- aspect macroscopique b- aspect microscopique

-a-	-b-	
		<i>Penicillium sp.</i>
		<i>Fusarium sp.</i>
		<i>Aspergillus terreus spl.</i>
		<i>Aspergillus niger</i>

Chapitre III - Résultats Et Discussion

		<p><i>Alternaria alternata.</i></p>
		<p><i>Mycélium stérile.</i></p>
		<p><i>Aspergillus terreus</i> <i>sp 2.</i></p>
		<p>N.I</p>
		<p>N.I</p>

III.3. Calcul de rendement

Nous rappelons que l'huile essentielle a été extraite de *lavande* par un hydro distillateur de type Clevenger. Nous avons obtenu une huile de couleur jaune pâle avec une odeur âcre. Nous avons récupéré une quantité huileuse importante, le rendement obtenu est voisin de 1.5%. d'extraction a montré que la quasi-totalité de volume de l'huile essentielle obtenu est extraite au bout de 90 premières minute. Le même résultat a été confirmé par **(Boughendjioua, 2011)** que la *lavande* provenant de la région d'Azzaba willaya de Skikda (Algérie).

(Bouguerra et Zeghou., 2009) ont trouvé que *lavandula officinalis* collecté du même lieu ont présenté un rendement de 3.41 %.

De même, les résultats obtenus par **(Laib et Bardat ,2011)** indique que les fleurs sèches de Lavande présentent de teneurs en huile essentielle 1.36 %.

Ces variations de teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment le degré maturité de *Lavandula officinalis*, l'interaction avec l'environnement (type de climat, sol) , le moment de la récolte et la méthode d'extraction **(Boughendjioua., 2011)**.

III.4. Activité antibactérienne

III.4.1. Activité antibactérienne des champignons endophytes

L'activité antibactérienne des isolats des champignons endophytes sur la croissance des 3 souches bactérienne deux espèces gram positif (*S. aureus* et *Bacillus sp*) et une espèce à Gram négatif (*P. fluorescens*).

Le diamètre des zones claires autour des disques fongiques a été mesuré après 5 jours d'incubation. Parmi les 9 champignons, 66.7% des champignons ont montré un pouvoir inhibiteur pour certaines des bactéries pathogènes testés avec une zone d'inhibition comprise entre [24.5-39.5 mm] pour *Bacillus sp.* et [15.5 - 16.5mm] pour *S.aureus*, mais aucune activité pour *P.fluorescens* a été observée **(Tableau III.2)**.

Chapitre III - Résultats Et Discussion

Tableau.III.2 : Zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les champignons endophytes

Bactéries champignons	Zones d'inhibition (mm) ±SD		
	<i>Bacillus sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Penicilliumsp</i>	27.5±1.50	16.5±0.5	00
<i>Fusarium sp</i>	25±0.00	00	00
<i>Aspergillus terreus sp1</i>	00	15.5±0.5	00
<i>Aspergillus niger</i>	28.5±0.50	00	00
<i>Alternariaaltarnata</i>	24.5±0.50	00	00
<i>Mycélium stérile</i>	39.5±0.50	15.5±2.5	00
<i>Aspergillus terreussp 2</i>	00	00	00
<i>NI</i>	00	00	00
<i>NI</i>	00	00	00

-Pour *Bacillus sp* ; 55.55% des champignons ont montré une activité antibactérienne où la plus élevée était par *Mycélium stérile* 39.5mm, *Aspergillus niger* 28.5 mm Suivie par *Fusarium sp.* (25mm), *Penicillium sp.*, et *A.alternata*, avec le diamètre 24.5mm. Cependant *Aspergillus terreus* et les deux isolats non identifiés ne montrent aucune activité (**Figure.III.2 ; Figure.III.4**).

Chapitre III - Résultats Et Discussion

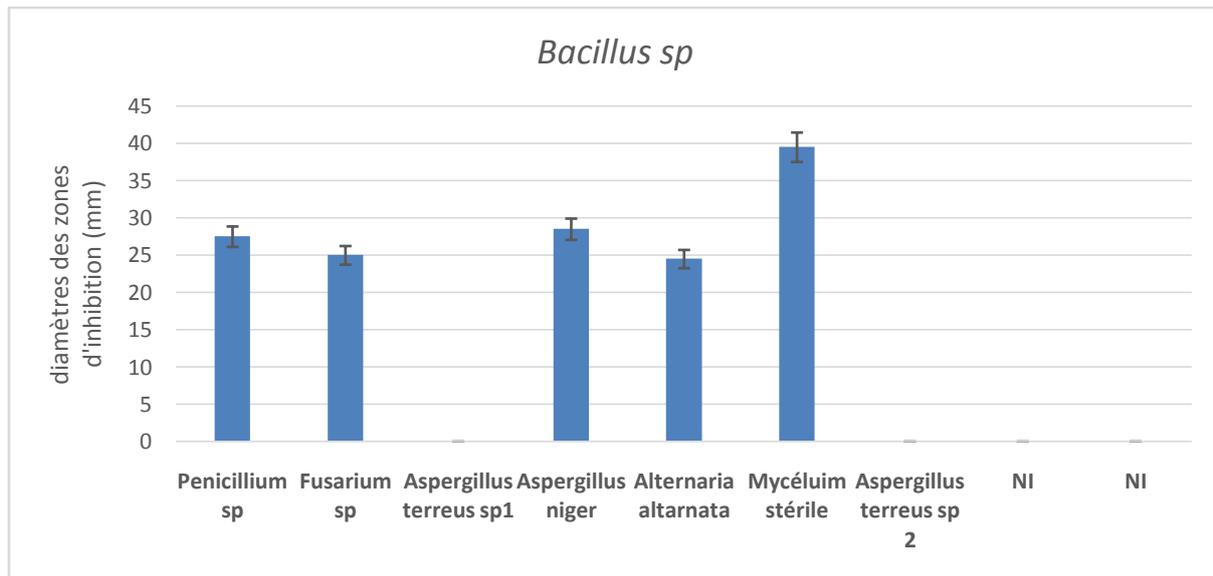


Figure III .2 : Effet des champignons endophytes actifs contre *Bacillus sp.*

NI : Non identifié

-Pour *S. aureus* ; 33.33% des champignons testés pour leur activité antibactérienne, où les plus actifs sont : *Penicillium* (16.5mm), *Mycélium stérile* (15.5 mm) et *Aspergillus terreus* (15.5mm)(**Figure III.3 ; Figure III.6**).

-Pour *P.fluorescens* ; aucune activité à été observée pour tous les champignons isolés (**Figure III.5**).

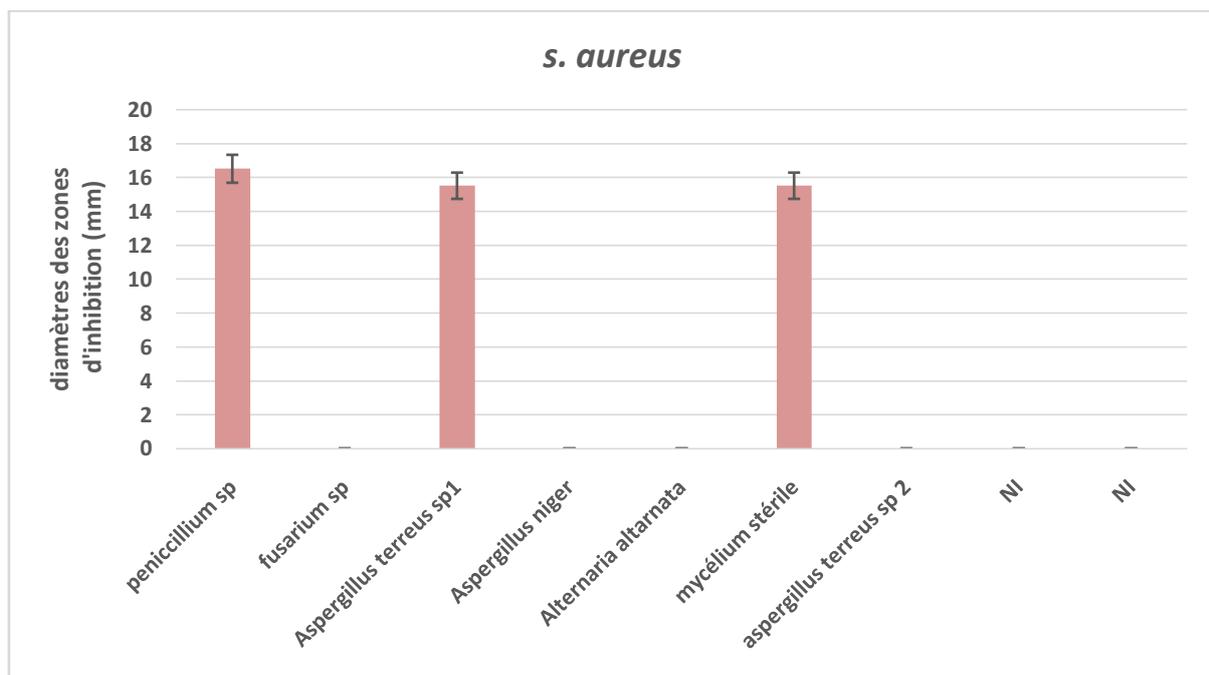


Figure III.3 : Effet des champignons endophytes actifs contre *Staphylococcus aureus*

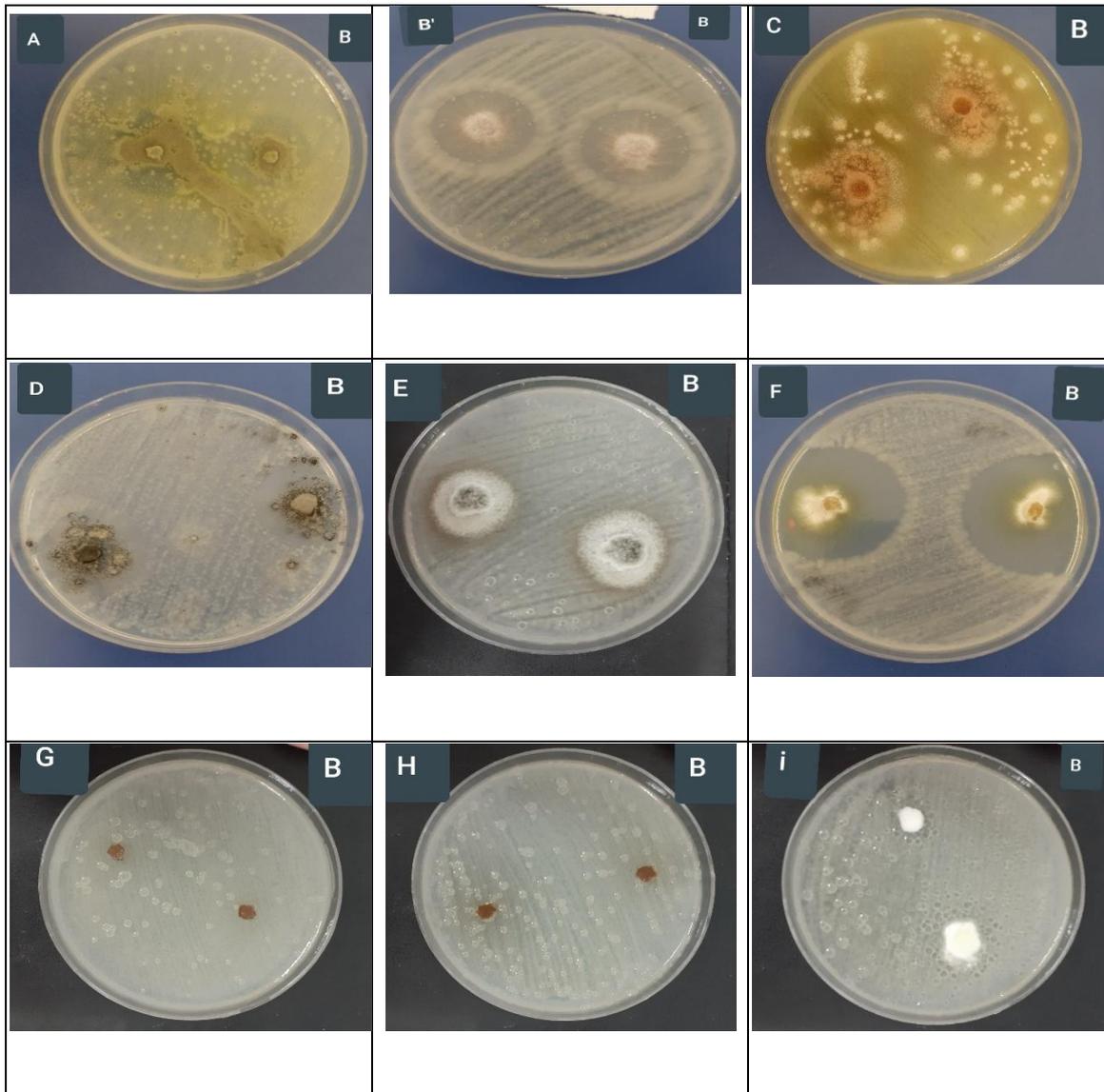


Figure III.4 : Zones d'inhibition obtenues par quelques champignons endophytes contre *Bacillus sp.*

B : *Bacillus sp.* **A :** *Penicillium*, **B' :** *Fusarium*, **C :** *Aspergillus terreus sp1*, **D :** *Aspergillus niger*, **E :** *Alternaria altarnata*, **F :** *Mycélium stérile*, **G :** *Aspergillus terreus sp2*
H : NI, **I :** NI

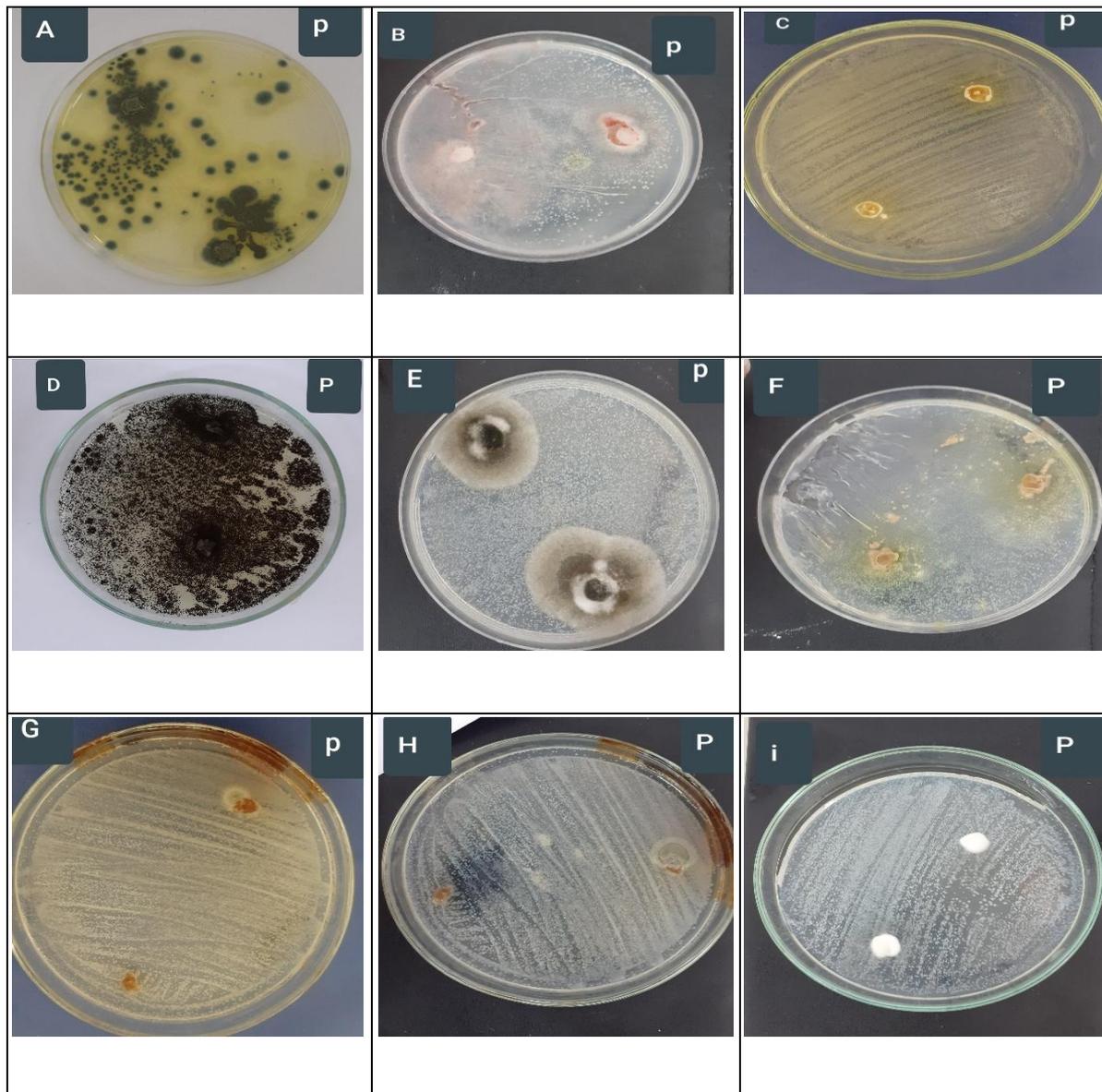


Figure III.5 : Zones d'inhibition obtenues par quelques champignons endophytes contre *Pseudomonas fluorescens*.

P : *Pseudomonas fluorescens*, **A :** *Penicillium*, **B :** *Fusarium*, **C :** *Aspergillus terreus sp1*,
D : *Aspergillus niger*, **E :** *Alternaria alternata*, **F :** Mycélium stérile **G :** *Aspergillus terreus*
 sp.2 **H :** NI **I :** NI

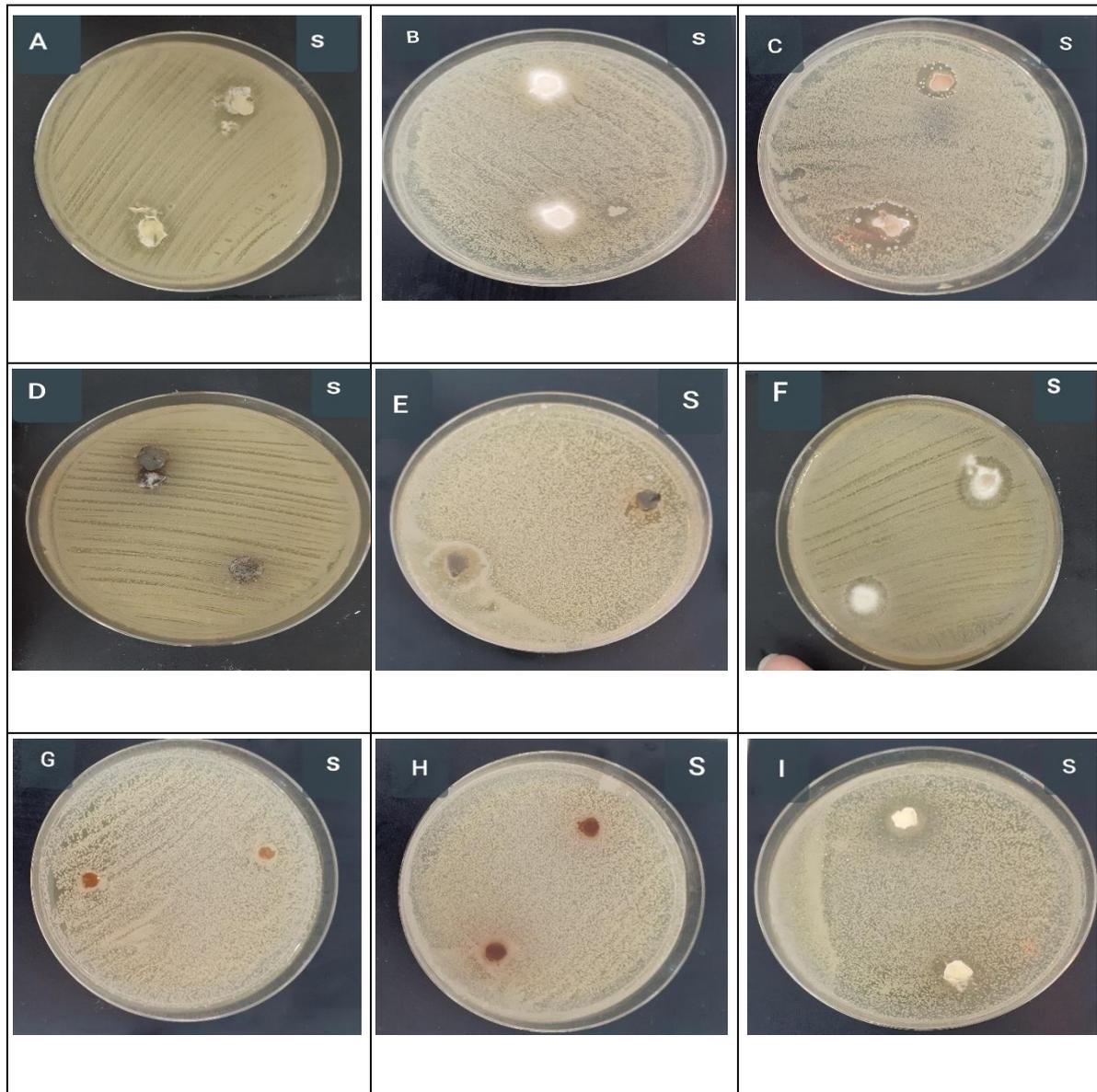


Figure III.6 : Zones d'inhibition obtenues par quelques champignons endophytes contre *S. aureus*.

S: *Staphylococcus aureus* **A :** *Penicillium*, **B :** *Fusarium*, **C :** *Aspergillus terreus sp1*,
D : *Aspergillus niger*, **E :** *Alternaria alternata*, **F :** *Mycélium stérile* **G :** *Aspergillus terreus sp2*. **H :** NI **I :** NI

Selon les résultats obtenus, certains champignons isolés ont une activité antibactérienne contre au moins une bactérie pathogène, les bactéries à Gram-positif étaient plus sensibles aux champignons endophytes que les bactéries à Gram-négatif, **Sadrati et al.,(2013)** ont prouvé que les champignons endophytes montrent une activité stabilisatrice sur au moins une des bactéries à Gram-positif, où les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, étaient actifs contre toutes les bactéries à Gram positif testées (*Bacillus* sp., *S.aueus* et *Enterococcus faecalis*). Les bactéries à Gram-négatif (*Citrobacter freundii*, *P.aeruginosa* , *Pseudomonas sp*) n'étaient pas

Chapitre III - Résultats Et Discussion

sensibles à la plupart des champignons endophytes. **Maria et al., (2005)** ont également confirmé qu'en plus de *Penicillium* et *Aspergillus*, le *Fusarium* a également une forte activité antimicrobienne.

L'activité inhibitrice des champignons endophytes isolés confirme la possibilité que ces isolats produisent des composés ayant une activité biologique inhibant la croissance des organismes pathogènes, ces différents métabolites secondaires pouvant être utilisés dans le domaine de la science des Médicaments et également comme source potentielle de médicaments précieux (**Sharma et al., 2016**).

III.4.2. Activité antibactérienne de l'HE

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle vis-à-vis les trois bactéries pathogènes testées est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'HE de Lavande. Chaque zone est claire, montre la destruction des bactéries pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne de l'HE utilisée.

Les résultats montrent que toutes les souches bactériennes apparaissent presque sensibles à des degrés divers pour notre HE, où *S.aureus* et *Bacillus sp.* étaient plus sensibles que *P.fluorescens*(**Tableau III.3 ; Figure III .7 ; Figure III .8**)

Tableau III.3 : Zones d'inhibition de la croissance bactérienne pathogènes par l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*

Bactéries	Diamètres (mm)
<i>Bacillus sp</i>	23±0.42
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11,5±0.14
<i>Staphylococcus aureus</i>	23,25±0.55

Chapitre III - Résultats Et Discussion

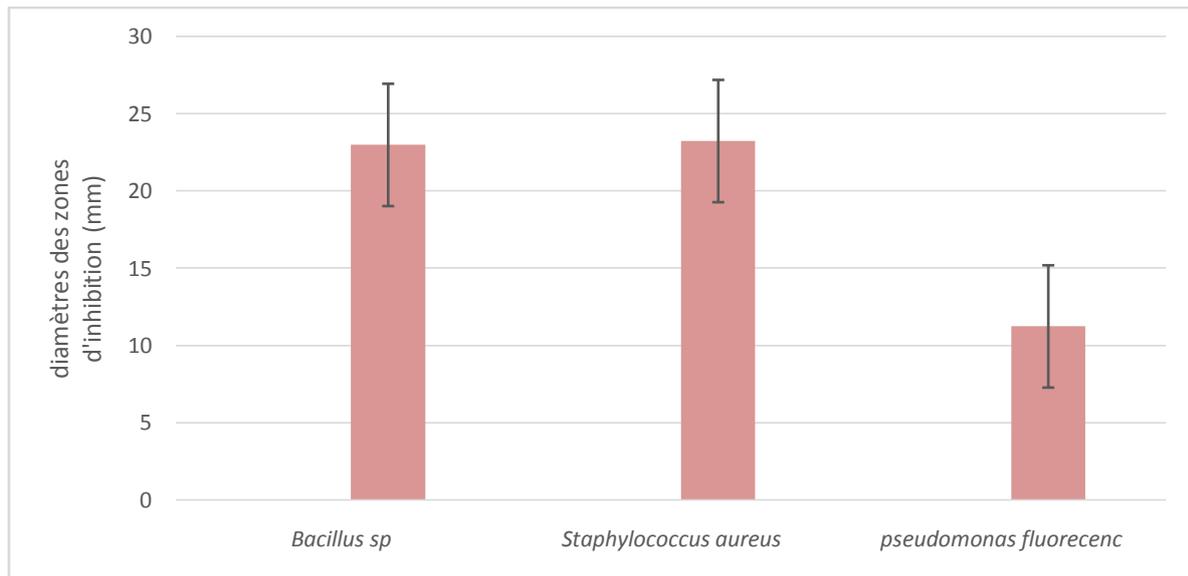


Figure III.7 : Effet de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* contre des bactéries

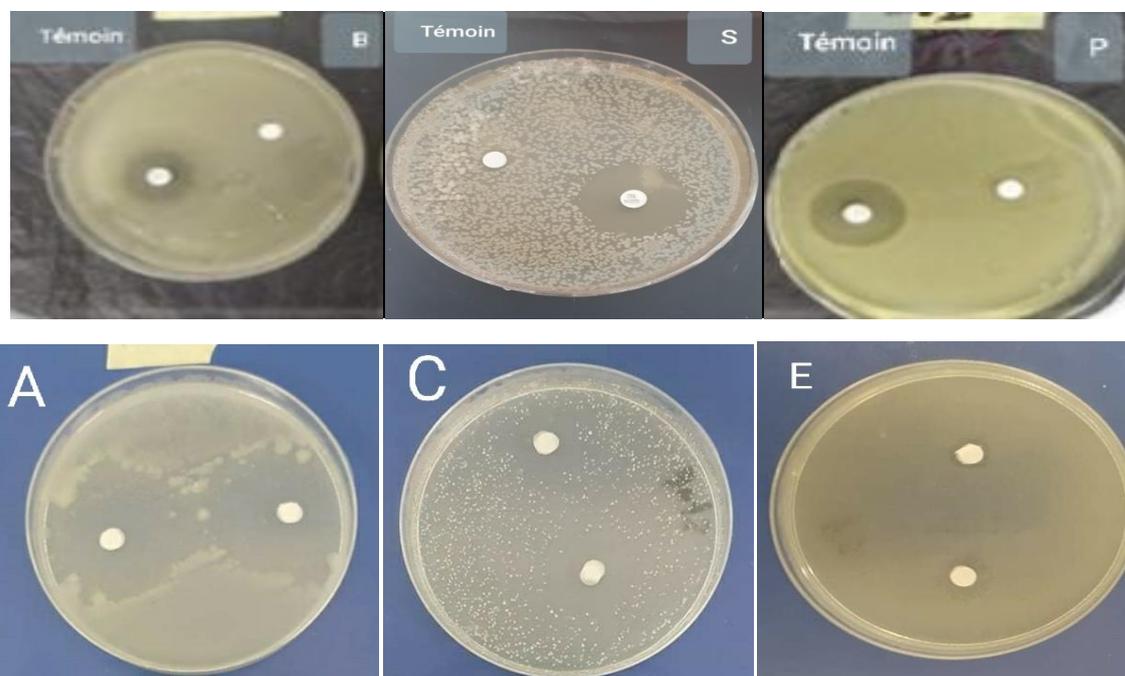


Figure III.8 : L'Activité antibactérienne de l'HE (A, B) : *Bacillus sp*, (C, S) : *S.aueus*, (E, P) : *P.fluorescens*.

Les résultats obtenus sont identiques avec l'étude de **Dragoljun et al., (2012)** qui ont confirmé l'utilisation de l'huile de lavande comme un agent antibactérien car elle contient des composés oxydants terpènes oxygénés qui ont une activité antimicrobienne, et il a été également prouvé dans la même étude que l'effet des huiles sur les bactéries Gram-positifs diffère de son effet sur les bactéries à Gram négatif.

Chapitre III - Résultats Et Discussion

Les huiles essentielles sont trouvées pour affecter les propriétés structurales et fonctionnelles de membranes artificielles. Les composants des huiles essentielles ont été montrés pour perméabiliser les membranes, les faisant gonfler, les bactéries à Gram négatif sont généralement plus résistantes aux antiseptiques et désinfectants que les bactéries à Gram-positif. La membrane externe des bactéries à Gram négatif agit comme une barrière qui limite l'entrée de nombreux types d'agents antibactériens sans rapport chimique **Dragoljun et al.,(2012)** .Et où **Bachiri et al.,(2017)** dite quant au mode d'action des HEs sur les cellules bactériennes, il semble plus probable que l'activité antimicrobienne résulte de l'association conjointe de plusieurs mécanismes sur différentes cibles cellulaires. Ainsi, les composés phénoliques auraient pour cible la membrane plasmique et la paroi. D'autres agents compromettent plutôt l'intégrité structurale de la membrane plasmique en induisant une perte du matériel cytoplasmique au moment où la cible pour d'autres est probablement l'ADN bactérien suite à diffusion à travers les membranes bactériennes. Outre les propriétés de l'HE, la sensibilité d'un microorganisme dépend du microorganisme lui-même ; les bactéries à Gram (+) sont plus sensibles aux HEs que les bactéries à Gram (-), ceci revient en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces dernières qui contient une double membrane, contrairement à la structure simple de la paroi des bactéries Gram (+). Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des HEs confirment ce phénomène.

Benyagoub et al., (2014)confirme également dans leur étude qu'il a menée sur l'huile de lavande pour l'étude de l'activité antibactérienne de certains extraits sur six souches de bactéries responsables d'intoxications alimentaires; *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens*, qu'il apparaît que le pouvoir antibactérien contre les bactéries à Gram positifs est plus important que les bactéries à Gram négatifs, et dans ce contexte, il est remarquable que l'huile extraite présente une activité importante contre *S. typhimurium*. Ces résultats sont confirmés par **Bosnić et al., (2006)**où ils ont signalé un effet faible à moyen vis-à-vis les souches bactériennes *E. coli* et *S. aureus*, présentant un diamètre de 11,5 et 9mm, correspondant à un pourcentage d'inhibition de 12,77 et 10% respectivement. Les bactéries à Gram négatifs apparaissent plus résistantes comparées à celle de Gram positifs, cela est dû principalement à la différence de structure de leur paroi externe, qui est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéine par rapport de celles à Gram positifs qui rendent ces bactéries plus hydrophiles.

Chapitre III - Résultats Et Discussion

III.4.3. Comparaison entre les champignons endophytes et l'huile essentielle

On a constaté que l'activité antimicrobienne des champignons endophytes et de l'huile essentielle diffère d'une bactérie à l'autre, selon les résultats obtenus, on a montré que les champignons endophytes avaient une activité antibactérienne plus importante sur la bactérie pathogène *Bacillus sp.* par rapport à l'huile essentielle, alors que chez *Staphylococcus aureus*, l'huile essentielle présente une activité antibactérienne importante par rapport aux champignons endophytes. Tandis que la bactérie *Pseudomonas fluorescens* était plus sensible à l'huile essentielle, alors que nous n'avons enregistré aucune activité pour les champignons endophytes (Figure III.9 ; Figure III.10 ; Figure III.11).

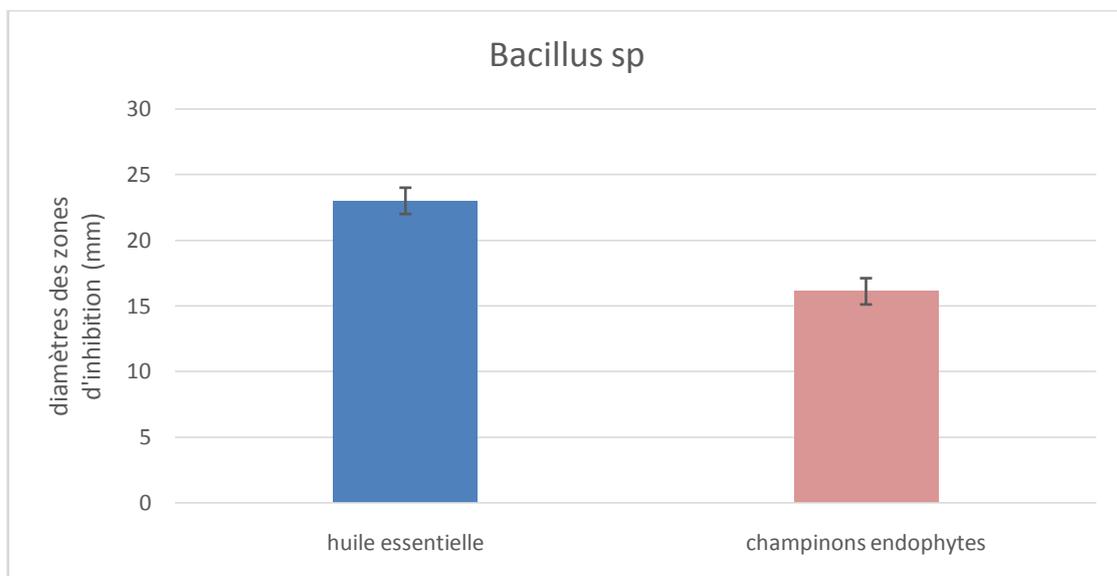


Figure III.9 : Comparaison de l'effet antibactérien contre *Bacillus sp.* Entre les champignons endophytes et l'huile essentielle.

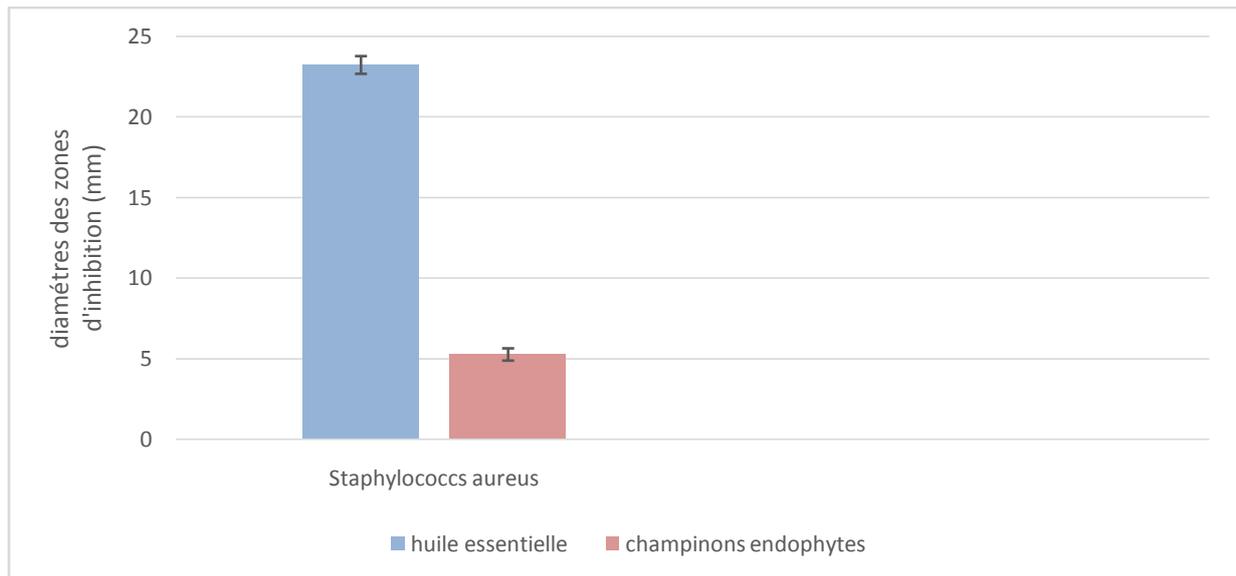


Figure III.10 : Comparaison de l'effet antibactérien contre *S. aureus* entre les champignons endophytes et l'huile essentielle.

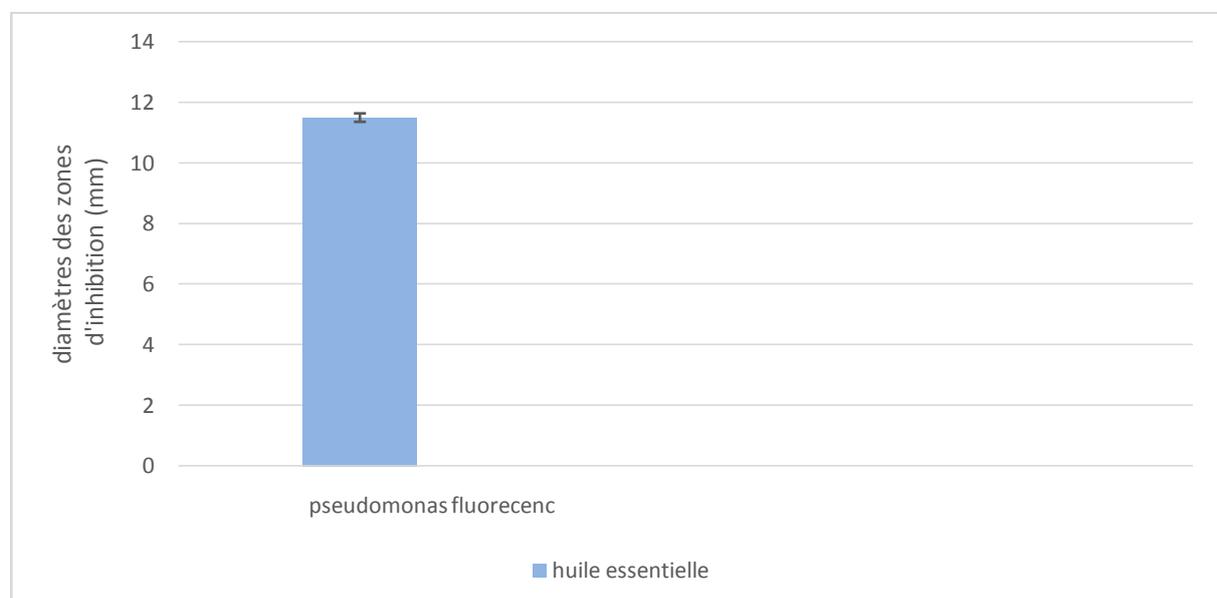


Figure III.11 : Comparaison de l'effet antibactérien contre *P. fluorescens* entre les champignons endophytes et l'huile essentielle.

III.5. Activités antifongique

III.5.1. Activités antifongique des champignons endophytes

Pour évaluer le potentiel antagoniste des champignons endophytes isolés, la méthode de la double culture a été utilisée contre le champignon pathogène *F.oxysporum*. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés après 7 jours d'incubation et sont présentés dans le (**Tableau III.4**).

Chapitre III - Résultats Et Discussion

Parmi les 9 isolats fongiques, seulement *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* ont une activité antifongique, où le pourcentage d'inhibition était 41% et 61 % respectivement (**Figure III.12 ; Figure III.13**).

Tableau III.4 : Pourcentage d'inhibition de champignon pathogène *F.oxysporum* par les champignons endophytes.

Champignons endophytes	Pourcentage d'inhibition (%)
<i>Penicillium sp.</i>	41
<i>Aspergillus niger</i>	61

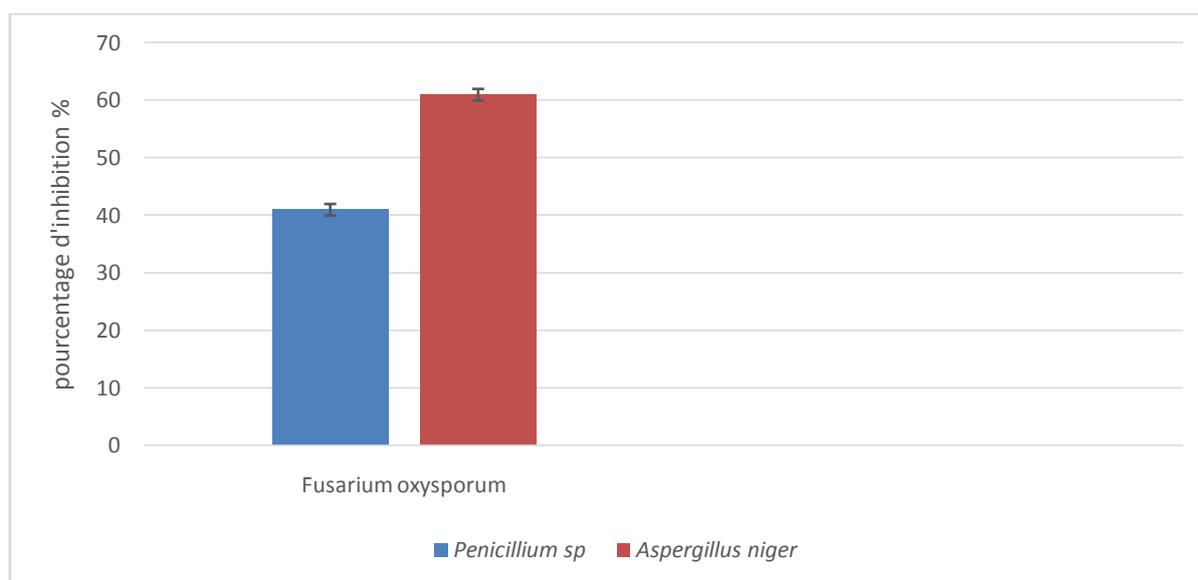


Figure III.12 : Activité antifongique des champignons endophytes isolée contre *F. oxysporum*.

Selon les résultats obtenus, deux isolats fongiques ont une activité antifongique. Mêmes résultats ont obtenus par plusieurs études précédentes utilisant la méthode de double culture, où il a été constaté que les champignons internes isolés de la plante médicinale *Taraxacum coreanum* Nakia ont une activité antifongique contre *F.oxysporum* (Paul, 2006).

La différence dans l'activité antimicrobienne des champignons endophytes peut être due par la différence dans l'état physiologique de la plante hôte, qui varie selon les saisons en raison de facteurs tels que l'eau, la période d'éclairage, la température ...etc. Ces différences peuvent être responsables de la différence dans les activités biologiques des communautés fongiques (Vieira *et al.*, 2011). Cette différence peut aussi s'expliquer par la spécificité des

Chapitre III - Résultats Et Discussion

champignons endophytes vis-à-vis des champignons phytopathogènes, c'est à dire les métabolites secondaires produites par l'endophytes sont spécifiques au niveau de l'espèce (Arnold *et al.*, 2000).

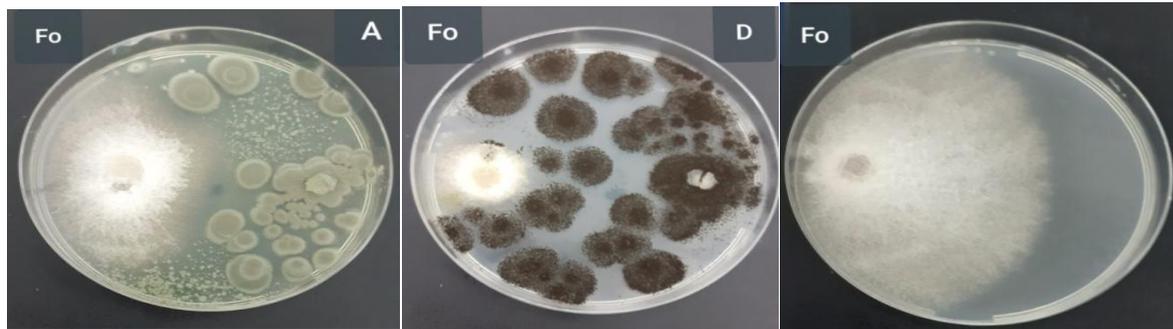


Figure III.13 : zone d'inhibition obtenues par les champignons endophytes actifs contre *F. oxysporum*. Fo : *Fusarium oxysporum*, A : *Penicillium*, D : *Aspergillus niger*.

III.5.2. Activité antifongique de l'huile

Les résultats du test de l'activité antifongique de l'HE étaient relativement faibles, car le diamètre de la zone d'inhibition était de 12.5 mm (Figure III.14).

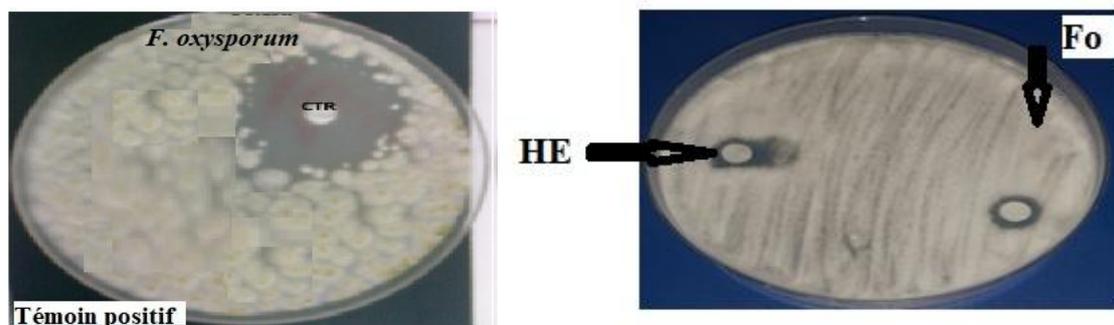


Figure III.14 : zone d'inhibition obtenue par l'huile essentielle contre *F. oxysporum*
FO : *F. oxysporum*, HE : disque contenant l'HE, CTR : Clotrimazole.

Plusieurs études ont été menées sur l'efficacité de l'huile de lavande contre les champignons pathogènes, en particulier sur les *Aspergillus* et *Fusarium* (Cavanagh et Wilkinson, 2002). Où ils ont trouvé que l'huile de lavande a la même activité antibactérienne, mais une activité antifongique différente et cela suggère que les différents composants de l'huile peuvent être responsables à une activité spécifique par rapport les endophytes.

Laib (2012) explique aussi la faiblesse de l'activité fongique de l'huile de lavande par sa composition chimique, ainsi que la proportion de biomolécules joue un rôle déterminant. La

Chapitre III - Résultats Et Discussion

différence de la sensibilité des genres à l'huile essentielle peut être due à certains facteurs, à savoir la dose appliquée et l'espèce ciblée (Cavangh et Wilkinson, 2002).

Ainsi, les résultats obtenus dans notre travail peuvent être interprétés par la qualité des molécules bioactives contenant dans la plante étudiée qui n'ait pas efficace contre *Fusarium oxysporum*, cependant, elle peut être efficace contre d'autres champignons pathogènes.

III.5.3. Comparaison de l'activité antifongique entre les champignons endophytes et l'huile essentielle

A travers les résultats obtenus dans ce travail a fin d'étudier l'effet de chaque des champignons endophytes et de l'huile essentielle sur le champignon pathogène *Fusarium oxysporum*, il a été trouvé que l'activité antifongique des champignons endophytes isolés est plus forte que celle de l'huile essentielle de la même plante (Figure III.15).

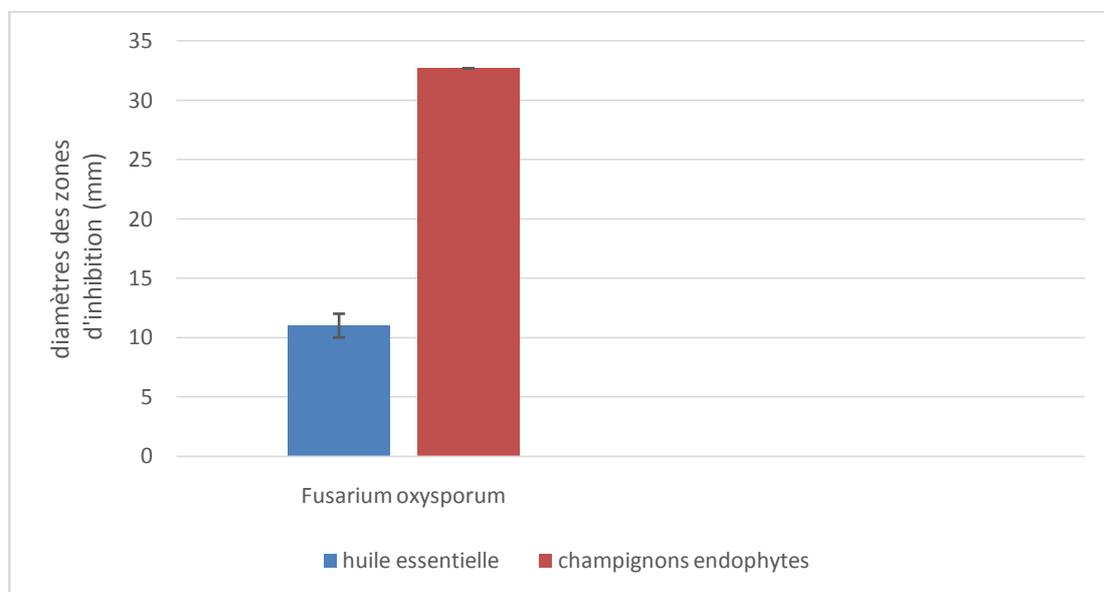
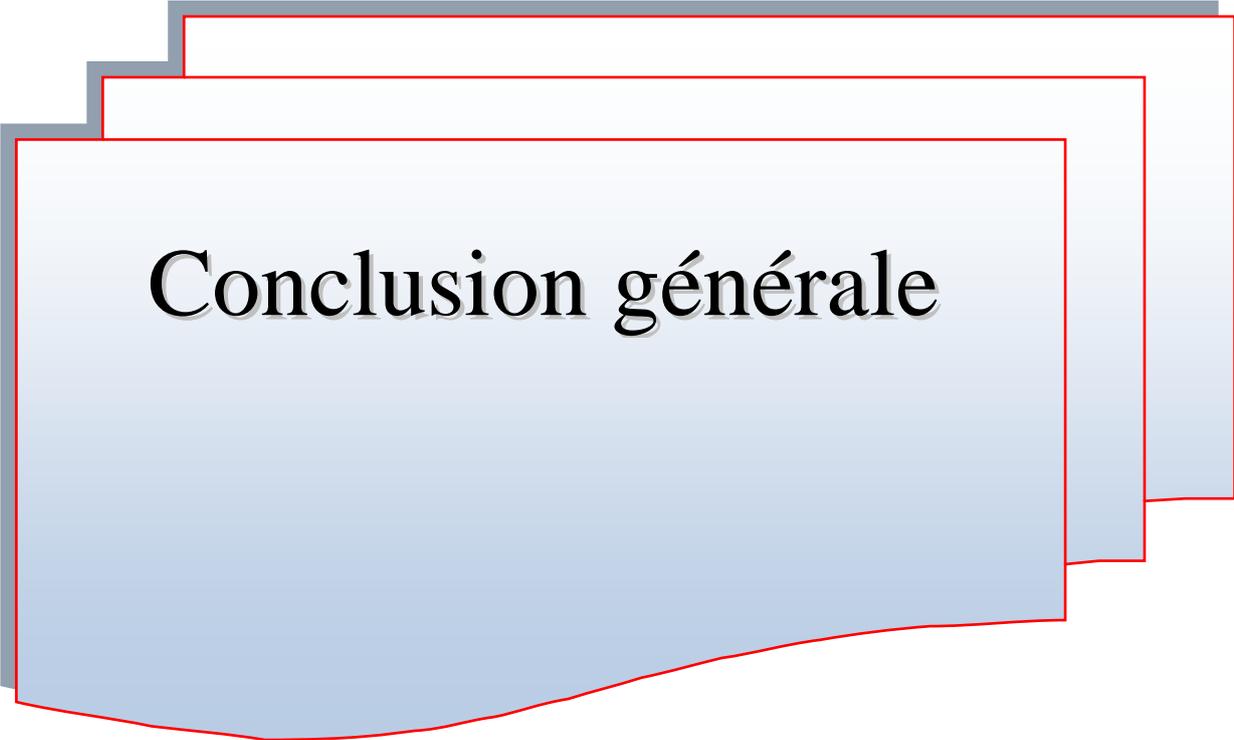


Figure III.15 : Comparaison de l'effet antifongique contre *F. oxysporum* entre les champignons endophytes et l'huile essentielle.



Conclusion générale

Conclusion générale

Il existe une forte demande de nouveaux matériaux pour diverses applications humaines, en particulier pour le traitement des infections causées par des bactéries et des champignons multi-résistants, ce qui a conduit à une recherche continue de nouvelles molécules biologiquement actives, les produits naturels produits par des micro-organismes sont des ressources potentielles pour répondre à cette forte demande.

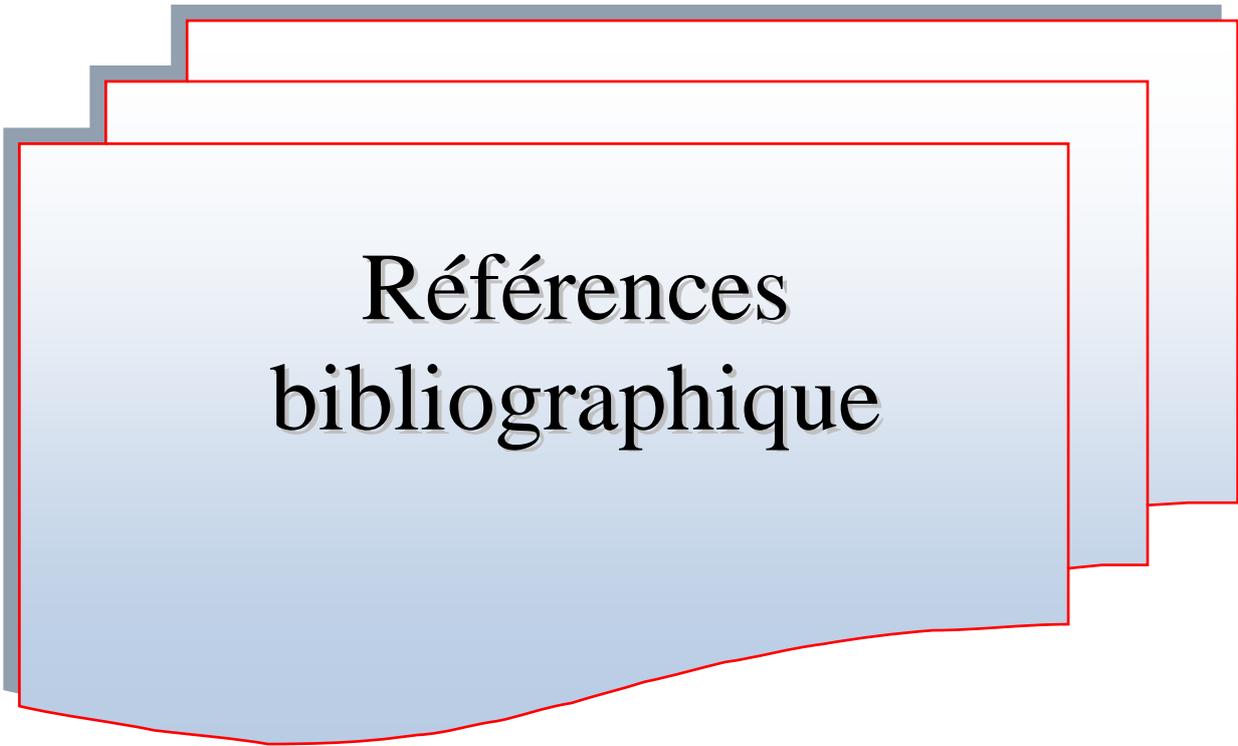
Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude de l'activité antimicrobienne des champignons endophytes ainsi que de l'huile essentielle de la plante médicinale *Lavandula officinalis*.

Les résultats obtenus indiquent que les champignons endophytes ont un pouvoir antagoniste contre les bactéries pathogènes ainsi que le champignon phytopathogène testé. Cette efficacité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte contre les maladies humaines, ainsi que dans la lutte biologique contre les microorganismes phytopathogènes surtout les champignons.

L'huile essentielle a présenté une activité antimicrobienne mais moins efficace par comparaison aux champignons endophytes. Donc on peut conclure que l'importance de la plante médicinale *Lavandula officinalis* est due à une relation complémentaire entre la composition chimique de la plante et sa flore microbienne.

Pour une étude beaucoup plus approfondie, on pourra envisager d'autres investigations telles que :

- L'application de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* directement dans la lutte biologique durant le stockage.
- Une identification moléculaire des espèces fongiques isolées.
- Etude quantitative et qualitative de l'huile essentielle et l'extrait des champignons endophytes isolés actifs.
- Détermination des fractions les plus actives et éventuellement de caractériser les molécules responsables de ces activités.



Références bibliographiques

Références bibliographique

- Bachiri, L., Bammou, M., Echchegadda, G., Ibijbijen, J., El Rhaffari, L., Haloui, Z., & Nassiri, L.** Composition Chimique Et Activité Antimicrobienne Des Huiles Essentielles De Deux Espèces De Lavande: *Lavandula Dentata* Spp. *Dentata* Et *Lavandula Pedunculata* Spp. *Pedunculata*. *European Scientific Journal*. Vol (13), (2017)
- Benabdelkader, T.** biodiversité bioactivités et biosynthèse des composés terpéniques volatils des *lavande stoechassensu lato*, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. (2012).
- Benarba, B.** Medicinal plants used by traditional healers from South-West Algeria: An ethnobotanical study. 2016. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* ,5(4), (2016): 320–330.
- Benyagoub, E., Nabbou, N., Sirat, M., & Dahlis, Z.** Propriétés antibactériennes et constituants photochimiques des extraits de la *lavande* de la région de Tlemcen et leur effet sur quelques espèces bactériennes responsables d'infection alimentaire. *Revue des bio Ressources*. Vol (4). (2014): 18-28.
- Bettucci, L., Simeto, S., Alonso, R., & Lupo, S.** Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. *Sydowia-Horn* . 56.(2004): 8-23.
- Blackwell, M.** The fungi : 1,2,3.... 5.1 million species ?. *American journal of Botany* .98,(2011): 426-438 .
- Boukhatem, M. N., Ferhat, A., Kameli A.** Méthodes d'extraction et distillation des huiles essentielles : revue de littérature. *Revue Agrobiologia*, 9(2), (2019) : 1653-1659.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., & Chaabouni, M. M.** Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, (2008) : 119-125.
- Cohen, S. D.** Endophytic-host selectivity of *Disculca umbrellinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelia compatibility. *European Journal of Plant Pathology*. 110(7). (2004): 713-721.
- Danh L . Han L . Triet N . Zhao J . Mammucari R . Foster N.** Comparison of Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) Essential Oils Extracted by Supercritical CO₂, Hexane and Hydrodistillation. (2012) . *Food Bioprocess Technol* . DOI 10.1007/s11947-012-1026-z
- Deshmukh, S. K., Gupta, M. K., Prakash, V., Saxena, S.** Endophytic fungi: A Source of potential Antifungal Compounds. *Journal of fungi* ,4(3), (2018): 1-42.

Références bibliographique

- Deshmukh, S. K., Verekar, S. A., & Bhave, S. V.** Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials». *Frontiers in microbiology* ,5,(2015): 1-34.
- Devaraju, R., Satish, S.** Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian Journal of Experimental Sciences*.2.(1). (2011) : 75-79.
- Dragoljub, L., Miladinović, et Budimir, S., Ilić et Tatjana, M., Mihajilov-Krstev et Nikola D. Nikolić et Ljiljana C. Miladinović & Olga G. Cvetković .** Investigation of the chemical composition–antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Anal Bioanal Chem*.403,(2012):1007–1018.
- Du, W., Yao, Z., Li, J., Sun, C., Xia, J., Wang, B., Shi, D., Ren, L.** Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Securinega suffruticosa* in the Yellow River Delta. (2020) *PLoS One*. 15: e0229589. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229589>.
- Dufresne, Ph.** identification des champignons d'un portance médicale. Laboratoire de Santé Publique du Québec.(2018). 7-52.
- Eid, A. M., Salim, S. S., Hassan, S. E. D., Ismail, M. A., & Fouda, A.** Role of endophytes in plant health and abiotic stress management. In *Microbiome Springer nature singapore Plant Health and Disease*. (2019):119-144.
- El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., Amari, F., Aberchane, M.** Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre». *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 12(4). (2008) : 345-351.
- El Amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., Alaoui, T.I** Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de silène vulgaris sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*. 82. (2014):7481– 7492.
- Elharas, K., Daagare, A., Mesifioui, A., & Ouhsine, M.** Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus Nobilis* et *Lavandula Angustifolia*. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 9(2), (2013): 134-141.
- Gond, S. K., Mishra, A., Sharma, V. K., Verma, S. K., Kumar, J., Kharwar, R. N., Kumar, A.** Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycosience*, 53(2), (2011). 113-121.

Références bibliographique

- Gören, A. C., Topçu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Aydoğmuş, Z., & Pezzuto, J. M.** The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10). (2002) : 797-800.
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X., & Tang, K.** Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), (2008) : 136-142.
- Haddouchi F, Benmansour A.** Huile essentielle, utilisation et activités biologique, application à deux plans aromatiques. *Les technologies de laboratoires*. (2008) : 20-27 .
- Houali, K., Ouzid, Y., Saadoun, N. S .,** Antimitotic and antiproliferative activities of crude fungal extracts of endophytic foliar fungi of *peganum harmala* l . from dayateaiat (laghouat, algeria). *Journal of Fundametal and Applied Sciences*. 11.(2).(2019) : 587-604.
- Kalemba, D., Kunicka, A.** Antibacterian and antifungal. Properties of essential oils . *Current Medicinal chemistry*. 10.(2003):813-829.
- Kalemba, D.A.A.K., & Kunicka, A.** «antibactériel and antifungal . properties of essential ouils. *Current Medicinal chemistry*. 10(10) .(2003) :813-829.
- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., & Dhar, M. K.** Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry reviews*, 11(4), (2012) : 487-505.
- Khan, A. L., Hamayun, M., Ahmad, N., Hussain, J., Kang, S. M., Kim, Y. H., ..& Lee, I.** salinity stress resistance offered by endophytic fungal interaction between *Penicillium minioluteum* LHL09 and *Glycine max. L.* *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(9), (2011):893-902.
- Kusari. S., Spitteller, M.** Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary Metabolites: progress, challenges and opportunities. *Metabolomics*. (2012) : 364.
- Lain I.** étude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Thèse de Magister, Université Mentouri, Constantine, (2011).
- Li, JL., Sun, X., Zheng, Y., Lü, PP., Wang, YL., Guo, LD.** Diversity and community of culturable endophytic fungi from stems and roots of desert halophytes in northwest China. *mycoKeys*. 62, (2020):75–95
- Lis-Balchin, M.** *Lavendula genus lavendula* . Medicinal and aromatic plants—industrial profiles. Taylor & Francis.
- Mane, R. S., Paarakh, P. M., & Vendamurthy, A. B.** Brief Review on Fungal Endophytes. *international Journal of Secondary Metabolite*, 5(4), (2018):288-303.
- MOHAMMEDI, Z., ATIK, F.** Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. *Revue « Nature & Technologie »*. n° 06/Janvier. (2012) : 34 -39

Références bibliographique

- Moon, T., Cavanagh, H., Wilkinson, J.** Activity of Australian grown *Lavandula spp.* essential oils against *Aspergillus nidulans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Leptosphaeria maculans* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Essential Oil Research*. 19.(2004):171-175.
- Orole, O. O., & Adejumo, T. O.** Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research* .3(12). (2009) :969-973
- Osborn, A. E., Qi, X., Townsend, B., & Qin, B.** Dissecting plant secondary metabolism-constitutive chemical defences in cereals. *New Phytologist* .159(1). (2003):101-108.
- Patil, R. H., Patil, M. P., & Maheshwari, V. L.** Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi: a review of biotechnological production and their potential applications. *Studies in natural products chemistry*, 49, (2016) :189-205.
- Pimentel, I. C., Glienke-Blanco, C., Gabardo, J., Stuart, R. M., & Azevedo, J. L.** Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian archives of biology and technology*, 49(5), (2006): 705-711.
- Rakotoniriana, E. F., Munaut, F., Decock, C., Randriamampionona, D., Andriamboloniaina, M., Rakotomalala, T., ... & Corbisier, A. M.** Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93(1), (2007): 27-36.
- Ratnaweera, P. B., & de Silva, E. D.** Endophytic fungi: A remarkable source of biologically active secondary metabolites. In *Endophytes: Crop Productivity and Protection* 16. (2017) : 191-212.
- Rodriguez, R. J., White Jr, F., Arnold, A. E., Redman, R. S.** fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist journal compilation*.182(2). (2009): 314-330.
- Sandhi, S. S., Kuman, S., Ravindr, R., Ahrwal, P.** « isolation and identification of endophytic fungi from *Ricinus Communis* Linn. And their antibacterial activity » *Journal of Research in Pharmacy and Chemistry Research*. 4.(3). (2014) : 611-618.
- Selin, K. A., Nagia, M. M., & Ghwas, D. E. E.** endophytic fungi are multifunctional biosynthesizers: ecological role and chemical diversity. *Endophytic fungi: diversity, characterization and biocontrol* . (2017) : 41-91.
- Selvakumar, P., Edhaya Naveena, B., et Prakash, D .S.** Studies on the antifungal activity of the essential oil of *coleusamboinicus* and *eucalyptus globules*. *Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine*.(2012):715-719.

Références bibliographique

Sharma, D., Pramanik, A., & Agrawal, PK. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don. *3 Biotech*. 6 (2). (2016), 1-14.

Strobel, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical reviews in biotechnology*. 2002. Rev. *Biotechnol.* 22(4), (2002): 315–333. doi:10.1080/07388550290789531. PMID:12487423.

Svobada K et S. G. Deans, Biological activities of essential oils from selected aromatic plants. *Acta Horticulturae*, 390, 203-209.

Tardugno, R., Serio, A., Pellati, F., D'Amato, S., Chaves López, C., Bellardi, M. G., ...& Benvenuti, S. *Lavandula x intermedia* and *Lavandula angustifolia* essential oils: phytochemical composition and antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Natural product research*, 33(22), (2018): 3330-3335.

Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S., Vijayakumar, R. An introductory chapter: secondary metabolites. In: *Secondary metabolites - sources and applications*. (2018). Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.79766>.

Ting, A. S. Y., Mah, S. W., & Tee, C. S. Prevalence of Endophytes Antagonistic Towards *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Cubense race 4 in Various Plants. *Am-Eurasian J Sustain Agric*. 3(3), (2009): 399-406.

Vanetten, H., Temporini, E., Wasmann, C. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens. *Physiological and Molecular Plant pathology*. 59(2). (2001): 83-93.

Vasundhara, M., Reddy, M. S., & Kumar, A. Secondary Metabolites from Endophytic fungi and Their Biological Activities. *New and Future Developments in Microbial biotechnology and Bioengineering*, (2019): 237-258.

Vieira, M., Hughes, A., Gil, V., Vaz, A., Alves, T., Zani, C., Rosa, C., Rosa, L. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology*. 58(1), (2012): 54–66.

Yu, J., Ying, W., Zhen, H., Mi, L., Zhu, K., Gao, B. Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with *Camellia oleifera*. *Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/tmyb20*. Vol 46. (2018): 85-91

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

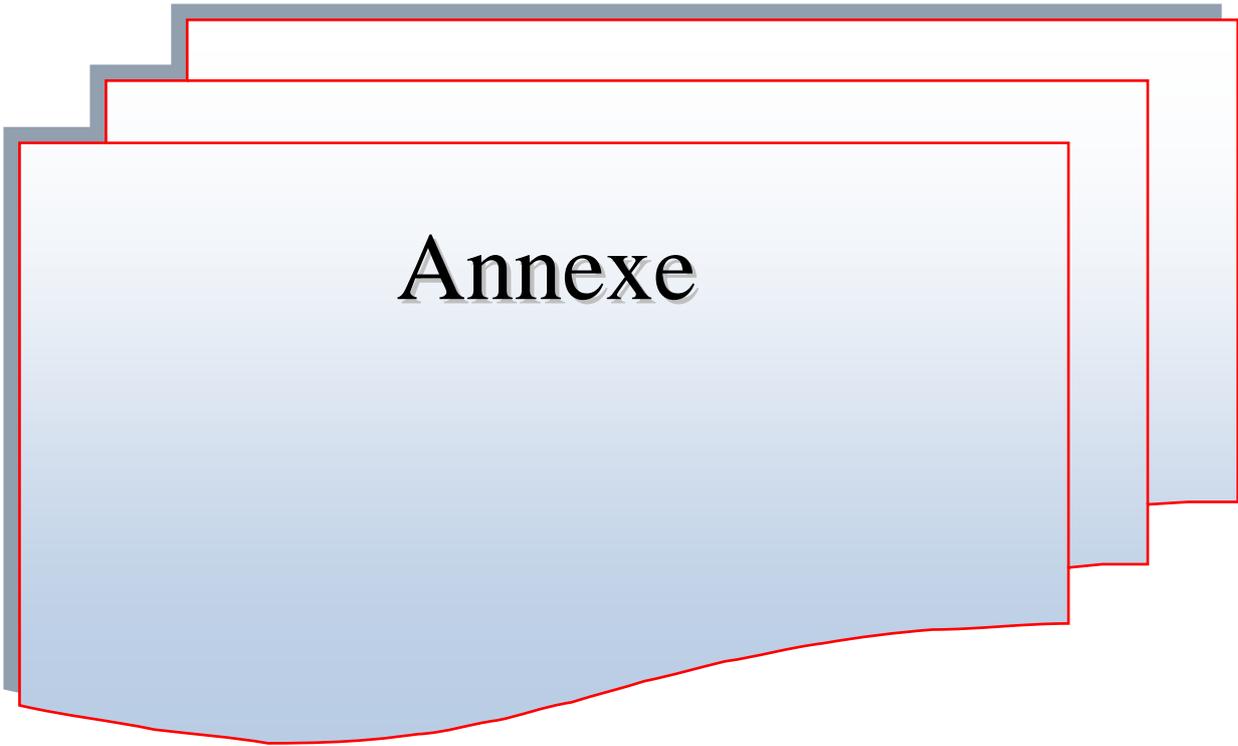
Références bibliographique

Zerroug, A., Sadrati, N., Demirel, R., Bakli, S., & Harzallah, D. Antibacterial activity of endophytic fungus, *Penicillium griseofulvum* MPR1 isolated from medicinal plant, *Mentha pulegium* L. *African Journal of Microbiology Research*, 12(48), (2018): 1056-1066.

Zhang, H., Bai, X., & Wu, B. Evaluation of antimicrobial activities of extracts of endophytic fungi from *Artemisia annua*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 7(2), (2012): 120-123.

Zheng, Y., Qiao, X., Miao, C., Liu, K., Chen, Y., Xu, L., Zhao, L. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Annals of Microbiology*. 66(2), (2016): 529–542.

Zhou, D., & Hyde, K. D. Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research*. 105(12). (2001): 1449-1457.



Annexe

Annexe 1 : préparation des milieux de cultures

Patato Dextrose Agar (PDA)

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

Gélose Nutritive (GN)

Gélose Nutritive.....	39 g
Eau distillé.....	1000 ml

Annexe 2: Activité antifongiques négative

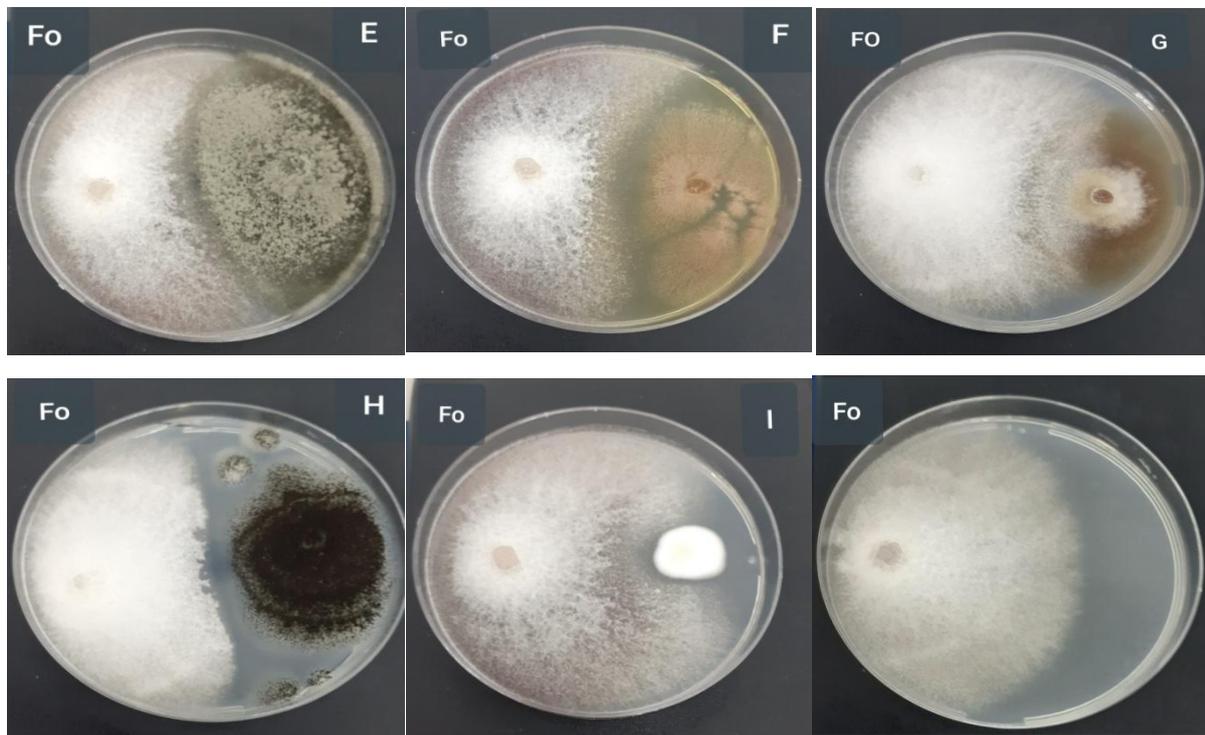


Figure.1 : les zones d'inhibitions obtenues par les champignons endophytes non actifs

Fo : *Fusarium oxysporum*, **B** : *Fusarium*, **C** : *Aspergillus terreus* sp1, **E** : *Alternaria alternata*,

F : *Mycélium stérile* **G** : *Aspergillus terreus* sp2 **H** : NI **I** : NI

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو عزل و تشخيص الفطريات الداخلية وكذلك استخلاص الزيت الأساسية من النبات الطبي *Lavandula officinalis* (الخزامى)، ثم تقدير نشاطيهما المضادة للبكتيريا و الفطريات والمقارنة بينهما. تم الحصول على العينات من ولاية قسنطينة (الجزائر)، وأجري اختبار النشاطية المضادة للميكروبات على ثلاثة أنواع من البكتيريا الممرضة، اثنان موجبة الغرام *Staphylococcus aureus* و *Bacillus sp.* وواحدة سالبة الغرام *Pseudomonas fluorescens* و الفطر الممرض *Fusarium oxysporum*. قدرت نسبة الاستيطان للفطريات الداخلية بـ 40.55%، و من خلال تشخيصها وجد أنها تنتمي إلى خمسة أجناس: *Alternaria, Fusarium, Penicillium, Aspergillus* بالإضافة إلى ميسيليوم عقيم. استخلاص الزيت الأساسية للنبتة الطبية تم بواسطة التقطير المائي حيث قدر المردود بـ 1.5% من خلال استعمال طريقة الانتشار على الوسط الصلب، تبين أن بعض الفطريات الداخلية لديها نشاط مضاد على الأقل على كائن مجهري ممرض واحد حيث تراوحت مناطق التثبيط بين 0-39.5 مم بمساحة تثبيط أكبر 39.5 مم (28.5-39.5) تحصل عليها *Aspergillus niger* و الميسيليوم العقيم على الترتيب ضد *Bacillus sp.* أما الزيت الأساسية كانت لها نشاط ضد كل البكتيريا الممرض. أما بالنسبة لإختبار النشاطية المضادة للفطريات باستعمال طريقة الزرع المزدوجة، فقد تبين أن الفطري ن الداخليين *Aspergillus niger* و *Penicillium* لهما تأثير تثبيطي على الفطر الممرض المختبر حيث قدرت نسبة التثبيط بـ 41%، 61.53%، أما الزيت الأساسية فكانت أقل تأثيراً 12 مم. هذه النتائج تسمح لنا أن نقول أن الفطريات الداخلية لديها أفضل نشاط مضاد للفطريات مقارنة مع الزيت الأساسية والتي لها أفضل نشاط مضاد للبكتيريا. وعليه يمكن اعتبار هذه النباتة الطبية وكذلك فطرياتها الداخلية مصدرا قيما للمركبات الحيوية النشطة.

الكلمات المفتاحية

Lavandula officinalis، فطريات داخلية، زيوت أساسية، نشاط مضاد للبكتيريا، نشاط مضاد للفطريات.

Résumé

L'objectif de cette étude est l'isolement et l'identifier les champignons endophytes et l'extraction de l'huile essentielle de la plante médicinale *Lavandula officinilis*, collectée de la région de Constantine (Algérie). Puis d'évaluer et comparer l'activité antibactérienne et antifongique de ces champignons et l'huile essentielle contre trois bactéries pathogènes : deux à Gram positif ; *Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, et une à Gram négatif ; *Pseudomonas fluorescense*, ainsi que le champignon pathogène *Fusarium oxysporum*. Le pourcentage de colonisation était 40.55%. La purification et l'étude microscopique des souches isolées ont donné la possibilité d'identifier 5 genres de moisissures à savoir *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* ainsi que un Mycélium stérile.

L'extraction de l'huile essentielle de la plante a été réalisée par hydro distillation ,où le rendement a été estimé à 1.5%

En utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide, il a été constaté que certains champignons endophytes ont une activité antimicrobienne sur au moins un microorganisme pathogène, où les zones d'inhibition variaient entre 0-39.5 mm, cette dernière a été obtenu par l'isolat Mycélium stérile avec 39.5mm, et *Aspergillus niger* avec 28.5mm, contre *Bacillus sp.*, Toutefois, l'huile essentielle avaient une activité contre toutes les bactéries pathogènes testées. Quant au test d'activité antifongique par la méthode de la double culture, il a été constaté que les deux champignons endophytes *Aspergillus niger* et *Penicilliumsp.* ont un effet inhibiteur sur le champignon pathogène testé, où le pourcentage d'inhibition a été estimé à 61.55% , 41% alors que l'huile essentielle était moins efficace 12mm. Ces résultats nous permettent de dire que les champignons endophytes ont la meilleure activité antifongique par rapport à l'huile essentielle qui a la meilleure activité antibactérienne. Par conséquent, la plante médicinale et les champignons endophytes pourraient être une source prometteuse de composés bioactifs.

Mots clés

Lavandula officinalis, champignons endophytes, l'huile essentielle, activité antibactérienne, activité antifongique