

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Activités biologiques des métabolites secondaires d'origine
fongique.**

Présenté par : BOUZID Bouthaina

Le : 22/06/2022

GHERBI Imane

BOUCEKKINE Samah

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mme LEGHLIMI Hind (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examineur 1 : Melle. ABDELAZIZ Ouided (MCB-Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Examineur 2 : Mme LABBANI Fatima-Zohra Kenza (MCA-Ecole Normale Supérieure Assia
Djebar de Constantine)

**Année universitaire
2021 - 2022**

Remerciements

Après avoir rendu grâce à Dieu le tout puissant qui nous a mis sur le bon chemin et nous a aidés à accomplir ce modeste travail.

Nous remercions notre encadrante de mémoire Mme **LEGHLIMI Hind**, qui fut la première à nous faire découvrir le sujet et qui a guidé notre mémoire, nous adressons tous nos reconnaissances à elle pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.

Nous tenons à exprimer notre grande considération et nos remerciements aux membres de jury : Melle **ABDELAZIZ Ouided** et Mme **LABBANI Fatima-Zohra Kenza** d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Un grand merci à nos collègues et à toutes personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Tout d'abord, je remercie Dieu le tout puissant, de nous avoir
donné la possibilité de pouvoir réaliser ce travail.

Je dédie ce modeste travail aux êtres qui sont les plus chers

Au monde « Mes parents »

« **Ma mère Ghalia** »

Symbole d'amour, et de tendresse, Patience fidélité qui a
Toujours Veiller sur ma réussite.

« **Mon père Mohamed** »

Qui a consacré sa vie pour moi, il m'a toujours guidé et
Encourager dans mes études.

A Mon Frère **chawki** et mes sœurs **Amal, khawla, Inass** et ma
petite sœur **Abir** et la femme de mon frère **Hadjer** qui n'ont
jamais cessé de m'encourager

« **A toute ma famille** »

A tous mes collègues de promotion et à tous mes amis et
spécialement mes amies les plus proche de mon cœur

Soumia, Hiba, Rawnak et kamilia

A toutes ces personnes je dédie ce modeste travail.

Bouthaina

Dédicaces

C'est avec un grand plaisir et une immense fierté et joie que

je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère **Hassina**

Quoi que je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là c'est grâce à toi, qu'Allah te donne une longue vie et te protège pour moi. Merci pour ton soutien et ton amour.

A mon très cher père **Brahim**

Signe de fierté et d'honneur. Que ce travail témoigne de mon respect, ma profonde Gratitude pour toutes ces années de sacrifice pour moi et de mon grand amour pour toi. Merci pour ta confiance.

A ma chère sœur **Hanane** pour son soutien moral

A mon cher frère **Fouad** pour son soutien financier

A la femme de mon frère **Imane**

Dédie spéciale à ma belle nièce **Rawnak**

Et à mon amie la plus proche de mon cœur **Hidaya**

Et à ma cousine **Maria**

Samah

Didicase :

Pour l'amour d'Allah, mon Créateur et mon Maître, Mon grand maître et messenger, Mohammed (qu'Allah le bénisse et lui accorde),
qui a enseigné nous le but de la vie.

Mes chère parents et, qui ne cessent de donner d'eux-mêmes
d'innombrables façons.

<<Ma mère **HAFIDA**>>

Symbole de l'amour, de la tendresse, de la patience et de la fidélité .

<<MON Père **ABD ELMOUMEN** >>

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

Mes frères bien-aimés **Ramzi** ,**Iotfi** et mes Sœurs **charifa** ,**Nada** et
leurs enfants **Hacheme Abd elrahmane** et **lyne**.

A Mon mari **Saif eldinne** je ne saurais exprimer un profonde
reconnaissance pour le soutien continu dont tu as toujours fait
preuvu. Je prie Dieu le tout puissant de préserver notre attachement
mutuel ,et d'exaucer tous nos rêve.

A la femme de mon frère **Nouara**

Mes amis qui m'encouragent et me soutiennent .

Je dédie ce projet à toutes les personnes de ma vie qui touche mon
cœur.

Imane

TABLE DES MATIERES

Résumé

Abstract

ملخص

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Chapitre I. Les métabolites secondaires

1. Introduction	3
2. Les métabolites secondaires.....	3
2.1. Définition.....	3
2.2. Origine	4
2.2.1. Origine végétale	4
2.2.2. Origine microbienne.....	4
3. Classification des métabolites secondaires.....	5
3.1. Les composés phénoliques.....	5
3.1.1. Les acides phénoliques simples (C6-C1 ou C6-C3).....	6
3.1.2. Les flavonoïdes	7
3.1.3. Les tannins.....	9
3.1.3.1. Tannins hydrolysables.....	10
3.1.3.1.1. Gallotannins.....	10
3.1.3.1.2. Tannins ellagiques.....	10
3.1.3.1.3. Tannins complexes.....	10
3.1.3.2. Tannins condensées (non hydrolysables).....	10
3.1.4. Les anthocyanes.....	10
3.1.5. Les lignane.....	11
3.2. Les terpénoïdes.....	11
3.2.1. Classification.....	11
3.2.2. Action pharmacologique.....	12
3.3. Les hétérosides	12
3.4. Les saponosides	13
3.5. Les alcaloïdes.....	14
3.5.1. Définition.....	14
3.5.2. Classification.....	15
3.5.2.1. Alcaloïdes vrais.....	15
3.5.2.2. Pseudo- alcaloïdes.....	15
3.5.2.3. Proto- alcaloïdes.....	15
4. Les métabolites secondaires fongiques.....	16

Chapitre II. Les activités des métabolites secondaires fongiques

1. Activités des métabolites secondaires fongiques.....	18
1.1. Activité antibactériennes.....	18
1.2. Activité antivirales.....	20
1.3. Activité antioxydante.....	21
1.4. Activité antifongiques et antilevuriennes.....	22
1.5. Activités anticancéreux.....	24
1.6. Succès des métabolites secondaires dans la lutte contre les phytopathogènes.....	25
1.6.1. Métabolites secondaires de <i>Trichoderma</i>	25
1.6.2. Métabolites secondaires de <i>Fusarium</i>	27
1.6.3. Métabolites secondaires des endophytes.....	27
1.6.4. Métabolites secondaires des levures.....	28

Chapitre III. Méthodes de production des métabolites secondaires

1. Microorganismes utilisés.....	30
2. Conduite de la culture et de la production.....	30
3. Extraction et purification.....	30
4. Discussion générale.....	32

Conclusion et perspectives	43
---	----

Références bibliographiques	45
--	----

Annexes	53
----------------------	----

Résumé

Les champignons microscopiques sont actuellement considérés comme une riche source des nouveaux métabolites secondaires biologiquement actif pour faire face la résistance des microorganismes pathogènes. Notre recherche a pour objectif d'étudier la production des métabolites secondaires par certaines espèces fongiques et démontrer leur activité biologique. La production de ces métabolites par fermentation de souches fongiques *P.guepinii* et *Phomopsis* sp (souche 1) est réalisée pendant sept jours sur milieu liquide d'extrait de malt (ME), et 10 jours pour les souches *Guignardia* sp et *Phomopsis* sp (souche 2) cultivées sur le milieu liquide czapek yeast (CY). Les flacons de culture sur milieu ME ont été incubés à 110 rpm sur un agitateur rotatif à la température ambiante avec une photopériode de 12 heures sous des lampes fluorescentes. Pour le deuxième milieu CY, les cultures ont été incubées à 25 °C pendant deux semaines dans l'obscurité. L'extraction est effectuée par l'acétate d'éthyle (EtOAc), suivie d'une purification par chromatographie sur couche mince (TLC) et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La purification de tous les métabolites d'*Eurotium* a été réalisée par prep-TLC, et les métabolites d'*A.calidoustus* ont été purifiés par des colonnes d'extraction en phase solide. Les résultats montrent que *Guignardia* a produit au moins cinq métabolites, par contre, les souches 1 et 2 de *Phomopsis* ont donné trois métabolites. Les résultats ont également montré que *Eurotium amstelodami*, *E. Herbariorum* et *E. rubrum* produisent 11 métabolites secondaires et *Aspergillus calidoustus*, *A.insuetus* produisent 6 métabolites. A la lumière de ces résultats, les moisissures utilisées semblent intéressantes pour la production d'une variété de métabolites secondaires à activités biologiques multiples. De ce fait, elles constituent des agents à potentiel biologique efficace, qui peuvent par conséquent contourner le problème de la résistance microbienne aux agents thérapeutiques.

Mots clés : Métabolites secondaires, champignons microscopiques, activité biologique, agents thérapeutiques, HPLC, TLC.

Abstract

Microscopic fungi are currently considered as a rich source of new biologically active secondary metabolites to cope with the resistance of pathogenic microorganisms. The objective of our research is to study the production of secondary metabolites by some fungal species and demonstrate their biological activity. The production of these metabolites by fermentation of fungal strains *P. guepinii* and *Phomopsis sp* (strain 1) for seven days on liquid malt extract medium (ME), and 10 days for *Guignardia sp et Phomopsis sp* (strain 2) strains grown on liquid czapek yeast medium (CY). Culture flasks on ME medium were incubated at 110 rpm on a rotary shaker at room temperature with a 12h photoperiod under fluorescent lights. For the second CY medium, the cultures were incubated at 25°C for two weeks in the dark. The extraction is performed with ethyl acetate (EtOAc), followed with purification by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). Purification of all *Eurotium* metabolites was performed by prep-TLC, and *A. calidoustus* metabolites were purified by solid phase extraction columns. Results show that *Guignardia* produced at least five metabolites; on the other hand, *Phomopsis* strains 1 and 2 gave three metabolites. The results also showed that *Eurotium amstelodami*, *E. Herbariorum* and *E. rubrum* produced 11 secondary metabolites and *Aspergillus calidoustus*, *A.insuetus* produced six metabolites. In the light of these results, the moulds used seem to be interesting for the production of a variety of secondary metabolites with multiple biological activities. Therefore, they constitute agents with effective biological potential, which can consequently circumvent the problem of microbial resistance to therapeutic agents.

Key words: Secondary metabolites, microscopic fungi, biological activity, therapeutic agents, HPLC, TLC.

ملخص

تعتبر الفطريات المجهرية حاليًا مصدرًا غنيًا للمركبات الايضية الثانوية الجديدة النشطة بيولوجيًا للتعامل مع مقاومة الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض. يهدف بحثنا إلى دراسة إنتاج المركبات الايضية الثانوية من قبل بعض الأنواع الفطرية وإثبات نشاطها البيولوجي. إنتاج هذه المركبات عن طريق تخمير السلالات الفطرية *P.guepinii* و *Phomopsis sp* (السلالة 1) لمدة سبعة أيام على وسط سائل من مستخلص الشعير (ME) ، و 10 أيام لسلالات *sp* و *Guignardia Phomopsis sp* (السلالة 2) المستزرعة على خميرة *czapek* (CY) وسط سائل. تم تحضير قوارير وسط ME عند 110 دورة في الدقيقة على محرض دوار في درجة حرارة الغرفة مع فترة ضوئية مدتها 12 ساعة تحت مصابيح الفلورسنت. بالنسبة للوسط الثاني CY ، تم التحضين عند 25 درجة مئوية لمدة أسبوعين في الظلام ثم استخلاص المركبات الايضية الثانوية بواسطة أسيتات الإيثيل (EtOAc) ، تليها التنقية كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) والكروماتوجرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). تم إجراء تنقية لجميع مركبات *Eurotium* بواسطة مستقلبات TLC المسبقة و *A.calidoustus* تمت تنقيتها بواسطة أعمدة استخراج المرحلة الصلبة. اظهرت النتائج أن *Guignardia* أنتجت ما لا يقل عن خمسة مركبات أيضية ، من ناحية أخرى ، أنتجت *Phomopsis* (سلالة 1 و2) ثلاثة مركبات. كما اظهرت النتائج أن *Eurotium amstelodami* و *E. Herbariorum* و *E. rubrum* أنتجت 11 مركبا ايضيا ثانويًا وأن *Aspergillus calidioustus* و *A.insuetus* أنتجت 6 نواتج أيضية. في ضوء هذه النتائج ، تبدو الفطريات المستخدمة مثيرة للاهتمام لإنتاج مجموعة متنوعة من المركبات الثانوية ذات الأنشطة البيولوجية المتعددة. ولذلك فهي تشكل عوامل ذات إمكانيات بيولوجية فعالة يمكنها بالتالي التغلب على مشكلة المقاومة الميكروبية للعوامل العلاجية.

الكلمات المفتاحية: المركبات الايضية الثانوية، الفطريات المجهرية، النشاط البيولوجي، العوامل العلاجية، HPLC،

TLC.

Liste des abréviations

P : *Pestalotiopsis*

E : *Eurotium*

A : *Aspergillus*

ME : milieu extrait de malt

CY : Czapek Yeast

COV : Composées organiques volatils

Liste des figures

Figure 01 : Acides hydroxy benzoïques (C6-C1).....	6
Figure 02 : Acides hydroxycinnamiques (C6 -C3).....	6
Figure 03 : Structure des coumarines.....	7
Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes.....	7
Figure 05 : Structure des tanins.....	9
Figure 06 : Structure de base des anthocyanidine.....	11
Figure 07 : Molécule isoprène.....	11
Figure 08 : La salicyline (exemple des hétérosides).....	13
Figure 09 : Squelettes des génines stéroïdiques des saponosides.....	14
Figure 10 : Structure des quelques alcaloïdes.....	15
Figure 11 : Structure d'une substance antibactérienne produite par les champignons endophytes.....	19
Figure 12 : Mécanismes d'action des antibactériens.....	20
Figure 13 : Structure des acides cytoniques A et B.....	21
Figure 14 : Structure de l'alternariol si (R = H) et de l'alternariol- (9) -méthyléther si (R= CH3).....	21
Figure 15 : Structure de l'aurasperone. A, agent antioxydant produit par les champignons endophytes.....	22
Figure 16 : Structure de l'isopestacin (A), et de la Pestacin (B).....	22
Figure 17 : Quelques substances antifongiques produites pas les champignons endophytes.....	24
Figure 18 : Structure du 2-phényléthyle 1H-indol-3-yl-acétate.....	24
Figure 19 : Structure de quelques substances anticancéreuses produites par les champignons endophytes.....	25

Figure 20 : Chromatogramme HPLC de l'extrait brut obtenu à partir de l'isolat de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> [phase mobile : H ₂ O : MeOH ; débit : 0,66 ml/min, 230 nm ; détection UV à 230 nm (A) et spectres UV des pics (B)].....	33
Figure 21 : Métabolites secondaires détectés chez les espèces <i>Eurotium</i> (* détectés dans le mycélium, métabolites mineurs).....	37
Figure 22 : Métabolites secondaires détectés dans les extraits de filtrats bruts d' <i>A. insuetus</i> et <i>A. Calidoustus</i>	38

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les différentes classes des composés phénoliques.....	6
Tableau 02 : Les principales classes des flavonoïdes.....	8
Tableau 03 : Classification des terpèn.....	12
Tableau 04 : Les hétérosides.....	13
Tableau 05 : Les différentes espèces productrices des métabolites secondaires	16
Tableau 06 : Les antibiotiques produits par certains champignons.....	19
Tableau 07 : Résultats de l'analyse HPLC montrant le temps de rétention et λ_{\max} des principaux pics détectés dans les extraits de bouillon de culture de <i>Guignardia sp</i> , <i>Pestalotiopsis guepinii</i> et <i>Phomopsis sp</i>	33
Tableau 08 : Activité biologique démontrée par les extraits bruts de <i>Guignardia sp</i> , <i>Pestalotiopsis guepinii</i> et <i>Phomopsis sp</i> (souches 1 et 2) , contre 14 organismes d'essai, dont des actinomycètes, des bactéries, des levures et des champignons filamenteux.....	34

Introduction Générale

La découverte des premiers sulfamides antibactériens en 1935 et de la pénicilline après la Seconde Guerre mondiale ont suscité de grands espoirs pour l'éradication permanente des maladies infectieuses, révolutionnant la médecine moderne et réduisant considérablement la souffrance humaine. Malheureusement, des bactéries résistantes aux médicaments sont apparues peu après leur introduction en médecine humaine. La résistance bactérienne aux antibiotiques n'est pas un phénomène récent, mais l'émergence de nouvelles maladies infectieuses, combinées à la vitesse et à l'intensité croissante des voyages et des échanges internationaux, constituent une menace sécuritaire pour la santé internationale (Mansour et Mazzi, 2017). Une procédure similaire a été suivie par la suite avec d'autres antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, tétracycline et érythromycine, dans l'ordre chronologique). En effet, bien que l'utilisation croissante des antibiotiques ait réduit la mortalité due aux maladies infectieuses, notamment bactériennes, elle n'a pas modifié leur incidence. Ce mésusage fréquent a également entraîné l'évolution de la résistance bactérienne, conduisant à une augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques. Face à cette croissance, il y a un besoin de plus en plus urgent de nouveaux traitements antimicrobiens efficaces (Berger, 2014).

Cependant, l'alternative à long terme face à la résistance microbienne est l'innovation et la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes, que ce soit par l'extraction de nouveaux sous-produits à partir de mutants des souches répertoriées, la production semi-synthétique de nouvelles molécules antibactériennes à partir de molécules de structures connues, synthétiser de nouveaux sous-produits ou obtenir de nouvelles substances (Kitouni, 2007). Bien que des études aient montré le grand potentiel des micro-organismes, en particulier des champignons microscopiques, qu'ils ont reçu une attention considérable et sont maintenant considérés comme une riche source de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs (Zhang et al., 2006). Ces molécules bioactives sont des acteurs importants de la communauté microbienne. Par ailleurs, les champignons microscopiques sont impliqués dans une variété de processus biologiques environnementaux (Abu Seidah, 2003). Plus tard, il y avait une explosion de nouvelles découvertes de molécules bioactives issues de champignons tels la griséofulvine, un agent antifongique isolé de *penicillium griseofulvum* et utilisé contre les

champignons de peau, des cheveux et des ongles, la cyclosporine qui est un agent immunosuppresseur isolé de *Tolyocladium niveum*...Néanmoins, certains espèces d'endophytes produisent ces métabolites, plus précisément *Aspergillus terreus*, producteur spécialisé de ces molécules bioactives d'une énorme importance économique, écologique, médicale et pharmaceutique. Il est capable de produire des molécules aux propriétés antibactériennes, comme l'aflatoxine. En raison de leur utilité et de leur activité biologique, les chercheurs étudient encore de nouvelles molécules thérapeutiques (Pedro et *al.*, 2017).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail dont l'objectif consiste à l'étude de l'activité biologique des métabolites secondaires d'origine fongique. Plusieurs points sont pris en compte pour enrichir cette étude en l'occurrence :

1. La première partie théorique s'intéresse aux métabolites secondaires leur origine, leur classification, ainsi que les activités biologique qui peuvent offrir.
2. La deuxième partie mettant au point les méthodes utilisées pour la production des métabolites secondaires par des souches fongiques, cultivées sur des milieux différents et sous des conditions précises, et de poursuivre par les étapes de l'extraction et de la purification de l'extrait brut.
3. Une discussion générale, basée sur quelques résultats des travaux antérieurs, permettant d'évaluer notre thématique de recherche.
4. Ce travail sera clôturé par une conclusion générale. Des perspectives seront proposées pour donner suite à cette étude, dans le but d'améliorer la production, ainsi que les méthodes de purification de ces métabolites secondaires.

Chapitre 1 : Métabolites secondaires

1. Introduction

L'étude systématique des métabolites secondaires fongique a commencé en 1922 sous la direction d'Harold Raistrick qui a fini par caractériser plus de 200 métabolites de moisissures. Cependant il a fallu attendre la découverte et le développement de la pénicilline que l'attention générale était axée sur les métabolites fongique. Entreprises pharmaceutiques à l'initiative programmes de criblage extensifs, et en 1950 trésor de produits microbiens ayant des applications pharmaceutiques a été découvert. Une étude récente de la littérature sur les métabolites fongiques a examiné 1500 composés déjà isolés. Entre 1993 et 2001, cette étude a montré que plus de la moitié de ces molécules avaient une activité antibactérienne, antifongique ou antitumorale. Etant donné l'accent mis sur l'activité physiologique, une méthode de classification courante des métabolites secondaires consiste à définir leur impact sur les intérêts humains, par exemple les toxines végétales, les hormones de croissance et les produits pharmaceutique (Keller et *al.*, 2005).

Les études sur les métabolites secondaires des plantes ont augmenté au cours des 50 dernières années. Ces molécules sont connus par jouer un rôle dans l'adaptation des plantes à leur environnement, mais représente également une source importante de produits pharmaceutique actifs. Les technologies de culture de cellules végétales ont été introduites à la fin des années 1960 comme un outil possible pour étudier et extraire des métabolites secondaires de plantes (Bourgaud et *al.*, 2001).

2. Les métabolites secondaires

2.1. Définition

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

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

Certaines conditions environnementales peuvent influencer sur la production des métabolites secondaires, comme la composition du milieu de culture, l'activité de l'eau, la valeur de pH, la température, la teneur en oxygène et la présence d'organisme concurrents (Ladjel et Benkhaled, 2017).

2.2. Origine

2.2.1. Origine végétale

Les métabolites secondaires des végétaux sont omniprésents chez les végétaux, et jouent plusieurs rôles écologiques et physiologiques dans la défense contre les herbivores, les microorganismes pathogènes et les végétaux en compétition, ils agissent aussi comme médiateurs lors des interactions avec les pollinisateurs, les mycorhizes et d'autres végétaux et offre une protection contre les facteurs de stress non biologiques, tels que les rayons ultraviolets, le gel et la sécheresse (Zhang et al., 2021).

Les métabolites secondaires végétaux ont été utilisés principalement à des fins médicinales et antipoison ainsi qu'à des fins alimentaires. La morphine était le premier seul produit naturel isolé du pavot à opium (*Papaver somniferum*), en 1806 et a ouvert une nouvelle ère dans la recherche sur les métabolites secondaires (Twaij et Nazmul, 2022).

2.2.2. Origine microbienne

Les métabolites secondaires microbiens sont des produits à faible poids moléculaire dérivés du métabolisme secondaire, habituellement produits au cours de la phase tardive (idiophase) (Ruiz et al., 2010).

Les métabolites secondaires microbiens, tels que les antibiotiques, les pigments, les hormones de croissance, les agents antitumoraux, ne sont pas indispensables pour la croissance et le développement des microorganismes, mais ils ont démontré un grand potentiel pour la santé des personnes et des animaux. Parmi les microorganismes produisant les composés ci-dessus, les bactéries, dont les actinobactéries et les champignons produisent une gamme diversifiée de petites molécules bioactives avec un potentiel significatif d'être employé dans la médecine (Singh et al., 2019).

Les animaux ne produisent pas des métabolites secondaires. Mais les herbivores ont un comportement physiologique et nutritif régies en partie par l'existence de moyens de protection chimique, ou des métabolites secondaires chez les végétaux.

Beaucoup d'espèces végétales produisent des métabolites secondaires qui peuvent inhiber la croissance des microbes, des champignons et autres végétaux, et ont généralement des conséquences physiologiques et comportementales négatives après l'ingestion par les animaux. Les métabolites secondaires ingérés par les animaux peuvent provoquer une perte de poids et une défaillance des organes, altérer par conséquent, les taux métaboliques, réduire la digestibilité des nutriments, compromettre le dépense d'énergie et même entraîner la mort, en fonction du type et de la quantité de métabolites secondaire consommée (Forbey et *al.*, 2009).

3. Classification

Les métabolites secondaires sont classés en fonction de leur structure chimique en quatre groupes majeurs :

- Les composés phénoliques ou aromatiques.
- Les terpénoïdes.
- Les hétérosides.
- Les alcaloïdes.

3.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont un groupe très diversifié de substances organiques cycliques dérivées du phénol C_6H_5OH , un monohydroxybenzène (**Tableau 01**). Ils sont largement présents dans le règne végétal ; on les trouve dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arôme ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et de la transformation des phénols. Dans la nature, ces composés sont généralement liés sous forme d'esters ou, plus généralement d'hétérosides (Walton et Broun, 1999). Ils sont caractérisés comme l'indique leur nom par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes (Benslama,2016).

Ils existent aussi sous forme de polymères naturels (les tanins). Les phénols les plus grands et les plus répandus sont les flavonoïdes (Walton et Broun, 1999). La plupart de ces composés phénoliques dérivent d'acides aminés aromatiques : la tyrosine et la phénylalanine (Benslama,2016). Plusieurs classes de composés polyphénoliques sont définies selon le squelette de base (**Tableau 01**) :

Tableau 01 : Les différentes classes des composés phénoliques (Daayf et Lattanzid, 2008).

Squelette carbonée	Classes de composés phénoliques
C ₆	Phénols simples et benzoquinones
C ₆ -C ₁	Acides phénoliques
C ₆ -C ₂	Acétophénonnes et les acides phenylacétiques
C ₆ -C ₃	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes, Chromons
C ₆ -C ₄	Naphthoquinones
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthonnes
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes et anthraquinones
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes et isoflavonoïdes
(C ₆ -C ₁) ₂	Tannins hydrolysables
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes et néolignanes
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoïdes
(C ₆ -C ₃) n	Lignines
(C ₆) n	Catéchols
(C ₆ -C ₃ -C ₆) n	Tannins condensés

3.1.1. Les acides phénoliques simples

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes majeurs qui sont les acides hydroxybenzoïques (**Figure 01**) et les acides hydroxycinnamiques (**Figure 02**) (Lamarti et al., 1994).

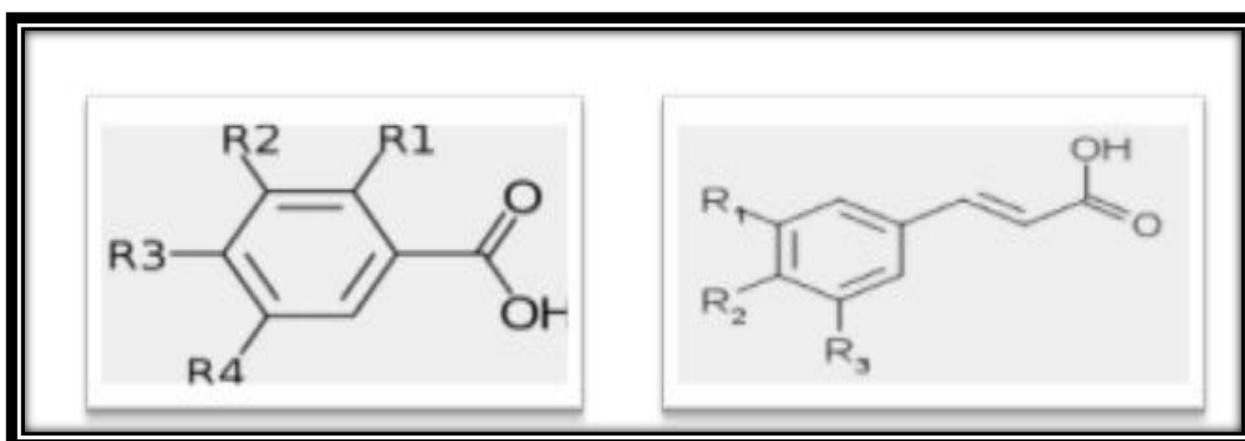


Figure 01 : Acides hydroxy benzoïques (C₆-C₁) (Lamarti et al., 2008)

Figure 02 : Acides hydroxycinnamiques (C₆-C₃) (Lamarti et al., 2008)

Les acides phénoliques sont des composés qui ont des propriétés antioxydants. Ils peuvent contribuer à prévenir l'apparition de plusieurs maladies (cancers, maladies cardiovasculaires et maladies liées au vieillissement) en neutralisant les radicaux libres de l'organisme (Benslama,2016).

✚ Les coumarines

Les coumarines proviennent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (**Figure 03**) (Crozier et *al.*, 2006).

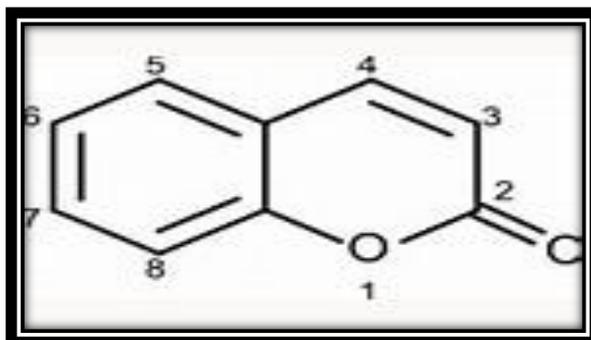


Figure 03 : Structure des coumarines (Crozier et *al.*, 2006).

3.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été découverts en 1936 par Albert Szent-Györgyi, qui a reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1937. Les flavonoïdes sont connus sous le nom de vitamine P en raison de leur efficacité à normaliser les vaisseaux sanguins (Benslama,2016).

Il s'agit de substances phénoliques qui représentent un groupe important des métabolites secondaires.

Leur structure est constituée de deux cycles aromatiques (A et B) reliées par une chaîne carbonée, habituellement organisé sous la forme hétérocyclique oxygéné (C) (**Figure 04**) (Karabin et *al.*, 2015).

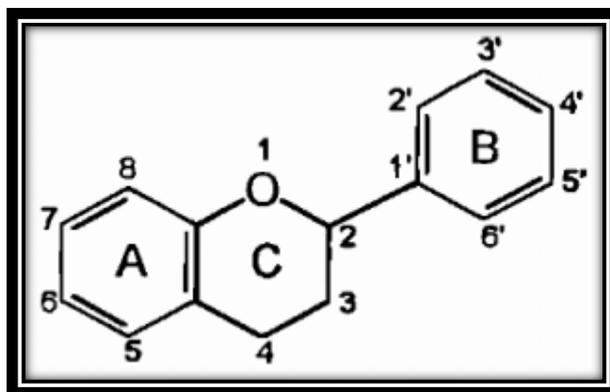


Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes (Karabin et *al.*, 2015).

➤ **Classification des flavonoïdes**

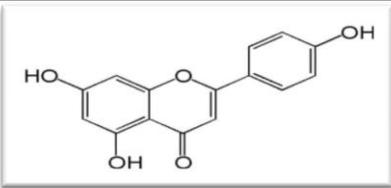
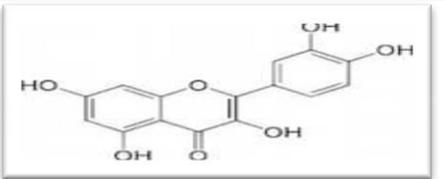
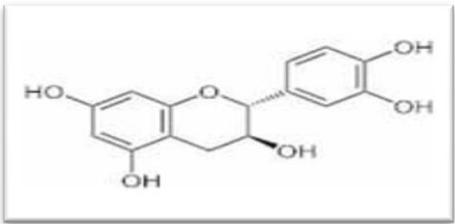
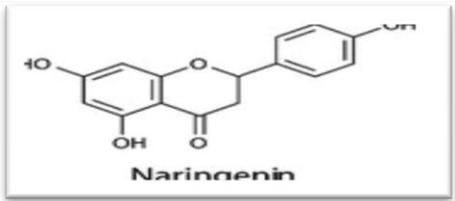
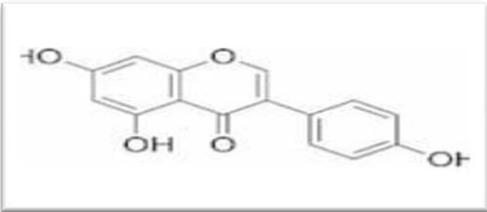
Les flavonoïdes sont responsables du changement de couleur des fleurs et des fruits et constituent une excellente source d'antioxydants dans notre alimentation (Benslam,2016).

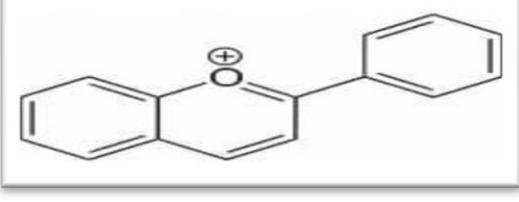
Plus de 5000 variétés de flavonoïdes ont été identifiés et peuvent être classifiés en fonction de leur structure, sur la base du degré de substitution et l'oxydation (Yao et *al.*, 2004) .

Les flavonoïdes tirent leur nom du mot flavedo, qui fait référence à la couche externe d'une peau d'orange.

Les flavonoïdes prédominants sont généralement répartis en six sous-classes : les flavones, les flavonols, flavan-3-ols, les flavanones, les isoflavones et anthocyanidines (**Tableau 02**) (Karabin et *al.*, 2015).

Tableau 02 : Les principales classes des flavonoïdes (Karabin et *al.*, 2015).

Classe	Structure	Exemple
Les flavones		Apigénine
Les flavonols		Quercétine
Flavan-3-ols		Catéchine
Les flavanones	 Naringénine	Naringénine
Isoflavonones		Génistéine

Anthocyanidines		Cyandine
-----------------	--	----------

3.1. 3. Les tanins

Ils sont définis comme étant des composés poly-phénoliques, hydrosolubles dont la masse moléculaire se situe entre 500 et 3000 KD (polymères) et qui ont la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de la rendre imputrescible (l'empêche de pourrir), propriété liée à leur capacité à se combiner à des macromolécules (protéines), à précipiter les alcaloïdes et la gélatine (Harrar, 2012).

Selon la structure (**Figure 05**), il existe deux groupes différents de tanins ; les tanins hydrolysables et les tanins condensés, appelés aussi : proanthocyanidin (Boudjouref, 2011).

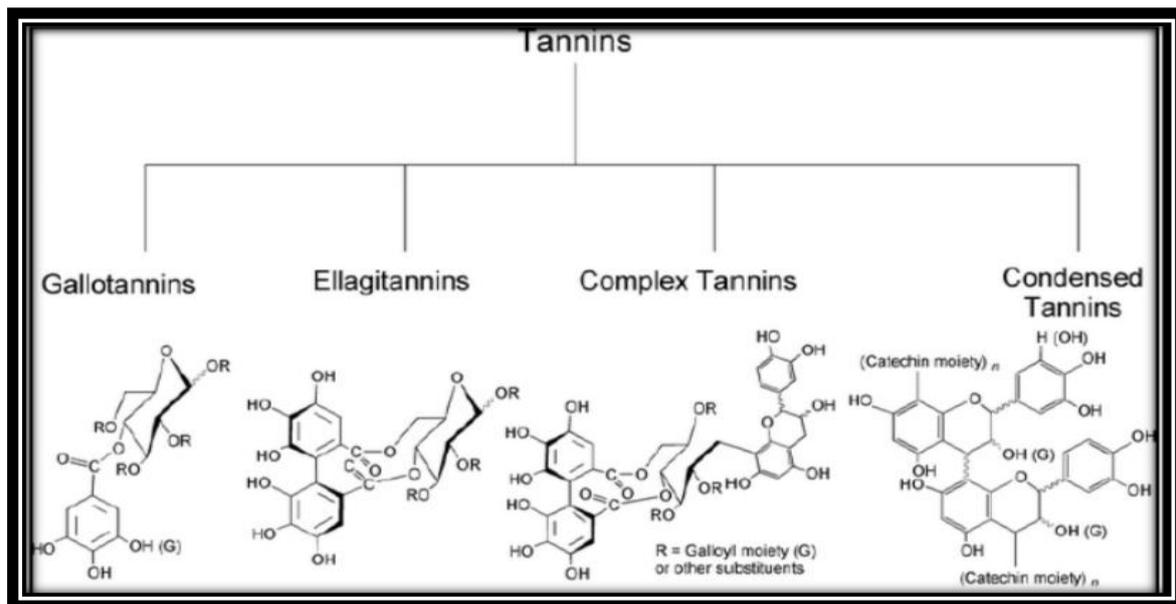


Figure 5 : Structure des tanins (Bramki et Nekia, 2016).

➤ **Classification des tannins**

3.1.3.1. Tannins hydrolysables

3.1.3.1.1. Gallotannins

Les gallotannins ou tannins galliques se forment autour de sucres (glucose ou dérivés du D-glucose), dont plusieurs liaisons d'ester avec l'acide gallique (ou ses dérivés). Il peut former plusieurs chaînes latérales d'acide gallique, liées selon le mode meta ou para (Benslama,2016).

3.1.3.1.2. Tannins ellagiques

Les tanins ellagiques ou ellagitanins se forment autour de sucres (dérivés du glucose ou du D-glucose) qui contiennent plusieurs liaisons ester avec l'acide ellagique. Avec plus de 500 composés, les ellagitanins constituent le plus grand groupe de tanins (Benslama,2016)

3.1.3.1.3. Tanins complexes

Les tanins complexes sont constitués d'unités de gallosides qui contiennent des liaisons avec des flavonoïdes (Benslama ,2016).

3.1.3.2. Tannins condensées (non hydrolysables)

Les tanins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavonoïdes. Ils sont constitués d'unités flavan-3-ol liées entre elles par des liaisons carbone-carbone de type 4→8 ou 4→6. Ils sont non hydrolysables mais traités à chaud par un acide, ils se dégradent en pigments colorés formés d'anthocyanidols (Benslama,2016).

3.1.4. Les anthocyanes

Les anthocyanes proviennent de l'hydrolyse des anthocyanidines (**Figure 06**) (flavonoïdes proches des flavones), qui donnent aux fleurs et aux fruits leur couleur bleue, rouge ou pourpre. Ces puissants antioxydants purifient l'organisme des radicaux libres. Ils assurent une bonne circulation, surtout dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux (Messioughl, 2010).

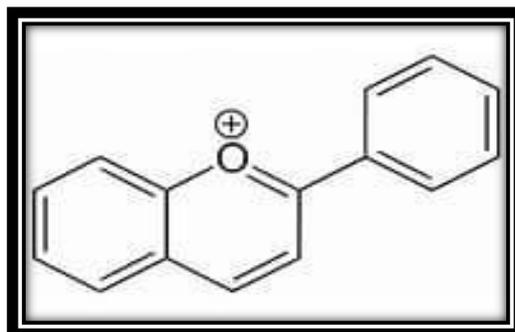


Figure 06 : Structure de base des anthocyanidines (Bramki et Nekia, 2016).

3.1.5. Les lignanes

Les lignanes sont des molécules qui résultent, le plus souvent de la mise en place d'une liaison entre deux carbones de la chaîne latérale de deux acides hydroxycinnamiques. Ils participent aux mécanismes de défense de la plante (Yang et *al.*, 2006).

3.2. Les terpénoïdes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels à structure cyclique ou à chaîne ouverte : leur formule moléculaire d'origine est $(C_5H_x)_n$ où x : varie selon le degré d'établissement de la molécule, et n peut prendre des valeurs de 1 à 8 sauf pour ceux au-dessus de 100 Polyterpène (caoutchouc), la molécule de base est l'isoprène, formule moléculaire C_5H_8 (**Figure 07**) (Bezzaz, 2014).

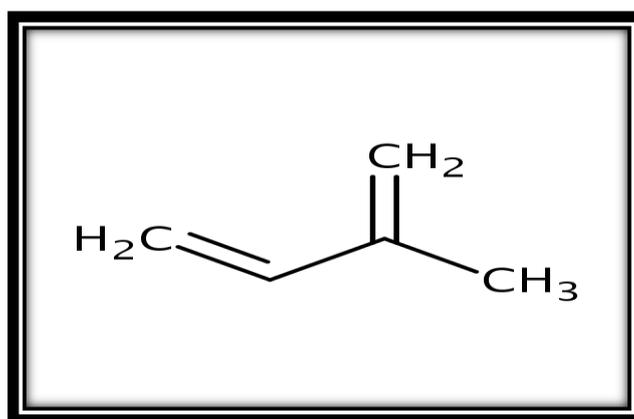


Figure 07 : Molécule isoprène (Bramki et Nekia, 2016).

3.2.1. Classification

Ils proviennent d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique et ils sont formés par couplage de plusieurs unités isopréniques (**Tableau 03**) (Bezzaz, 2014).

Tableau 03 : Classification des terpèn (Bezzaz, 2014).

Monoterpène	$C_{10}H_{16}$
Sesquiterpène	$C_{15}H_{24}$
Diterpène	$C_{20}H_{32}$
Triterpène	$C_{30}H_{48}$
Tétraterpène	$C_{40}H_{64}$
Polyterpène	$(C_5H_8)_n$

3.2.2. Action pharmacologique

Les terpenoïdes ont un intérêt qui détermine leur usage en médecine par leurs propriétés différentes contre les poux de tête adultes, effets ovicides. Une façon de contrôler l'infestation de poux de tête est de réduire le développement de leurs ensemble répulsif aux œufs, et aussi pour les propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires, antivirales et antioxydantes (Jose et *al.*, 2016).

3.3. Les hétérosides

Les hétérosides ou glycosides sont des molécules constituées d'une combinaison d'oses et de substances non glucidiques appelées aglycones ou génines (**Figure 08**). Ces métabolites secondaires sont les plus anciennement connus. Ils constituent des substances de réserve situés dans les vacuoles cellulaires. Les hétérosides se différencient entre eux par leurs génines qui appartiennent à tous les groupes de métabolite secondaire (flavonoïde, saponosides et tanins) et par le mode de liaison entre le génine et l'ose ainsi que par la nature de la partie glucidique. Ils sont classés en fonction de la nature de la liaison en C-, N-, O-, S-hétérosides (Aref, 2015).

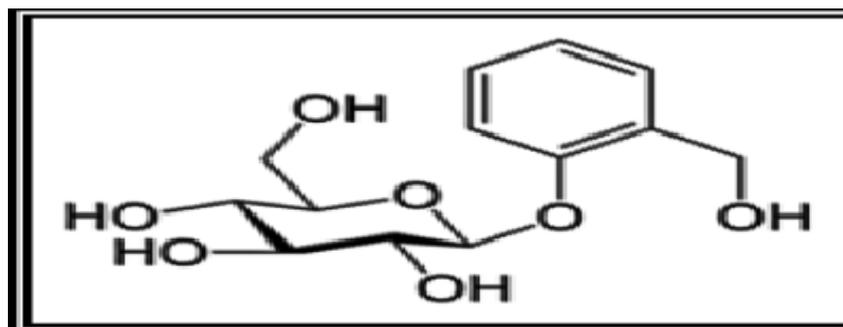


Figure 08 : La salicyline (exemple des hétérosides) (Bramki et Nekia, 2016).

On peut classer l'hétérogénéité de plusieurs manières (la nature de la fraction glucidique ou aglycone ou l'effet sur l'organisme ou la nature de la liaison entre deux éléments (**Tableau 04**) (Benslama,2016).

Tableau 04 : Les hétérosides (Benslama,2016).

O-hétérosides				N-hétérosides		S-hétérosides
Salicyline ou salicine	Esculine	Naringine	Diosmine	Sinigraside sinigrine	ou	Les nucléosides

3.4. Les saponosides

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques (**Figure 09**), ils sont souvent trouvés chez les végétaux supérieurs, en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais ils sont synthétisés aussi, par certains animaux marins tels que les concombres de mer ou les étoiles de mer.

Les saponosides sont surtout des composés très polaires et sont souvent retrouvés comme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent également un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques, y compris les propriétés immunes modulatrices, immunoadjuvante, cytotoxique, anti tumorale et hypocholestérolémiant (Kissoum et khalfaoui, 2015).

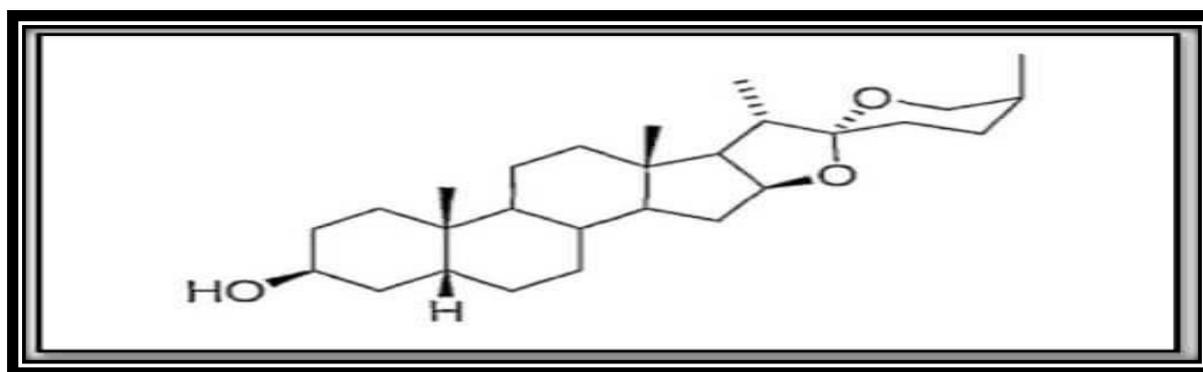


Figure 09 : Squelettes des génines stéroïdiques des saponosides (Bramki et Nekia, 2016).

3.5. Les alcaloïdes

3.5.1. Définition

Un alcaloïde est un composé organique naturel (généralement d'origine végétale) à cycle hétérocyclique, avec l'azote comme hétéroatome, à structure moléculaire plus ou moins complexe, qui présente des propriétés physiologiques remarquables même à faible dose (**Figure 10**) (Donatien, 2009).

Le rôle principal des alcalis est de protéger les plantes des mammifères et des insectes. Leur fonctionnement dépend de l'espèce végétale : certaines plantes contiennent des alcaloïdes qui peuvent provoquer des syndromes neurologiques, et ces espèces ont causé des intoxications et la mort de nombreux animaux d'élevage. Pour les plantes digitales, la digitaline peut provoquer une augmentation des conditions climatiques et même un arrêt cardiaque, selon la dose (Benslama,2016).

De nombreux alcaloïdes sont utilisés en pharmacie :

- La morphine est un analgésique majeur.
- La codéine est utilisée comme analgésique et antitussif.
- La quinine aide à lutter contre le paludisme.
- L'atropine dilate les pupilles, ce qui est bénéfique pour les examens ophtalmologiques.
- la vimblastine est utilisée dans la chimiothérapie anticancéreuse, d'autres alcaloïdes ont des usages plus courants, comme la nicotine utilisée pour fabriquer des pesticides et des cigarettes.
- La cocaïne est un stimulant (Benslama,2016).

3.5.2. Classification

Les alcaloïdes sont généralement classés en (Kebili, 2016) :

3.5.2.1. Alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes vrais contiennent ordinairement un azote hétérocyclique dans leurs structures qui dérivent des acides aminés.

3.5.2.2. Pseudo- alcaloïdes

Les pseudo alcaloïdes ont généralement toutes les caractéristiques des vrais alcaloïdes, mais ils ne sont pas des dérivés d'acides aminés. Dans la plupart des cas connus, ce sont des isoprénoïdes, on dit alors des alcaloïdes terpénoïdes : monoterpènes, sesquiterpènes ou diterpènes. Dans ce groupe, on connaît également les substances produites par le métabolisme de l'acétate, qui est le principe de toxicité de la pruche.

3.5.2.3. Proto- alcaloïdes

Les protoalcaloïdes sont de simples amines dont les atomes d'azote ne sont pas inclus dans le système hétérocyclique, mais formés à la place des groupements aminés latéraux. Ils sont bio synthétisés à partir d'acides aminés.

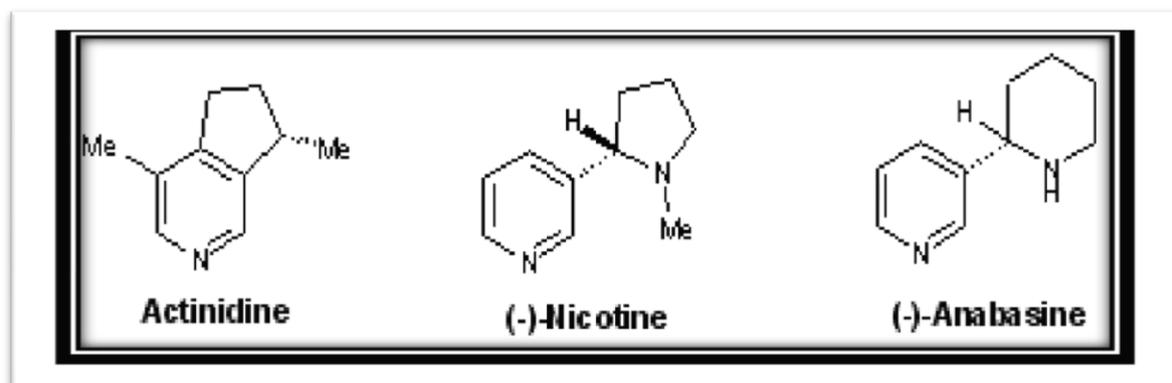


Figure10 : Structure des quelques alcaloïdes (Bramki et Nekia, 2016).

4. Les métabolites secondaires fongiques

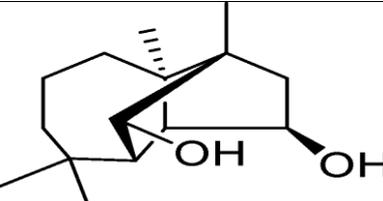
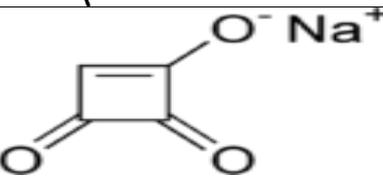
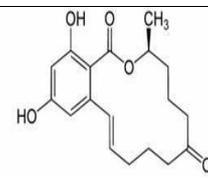
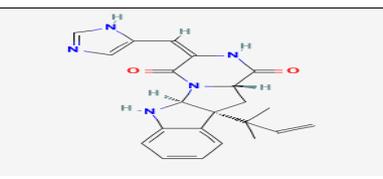
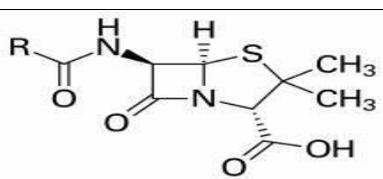
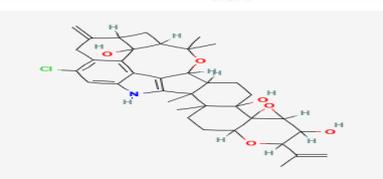
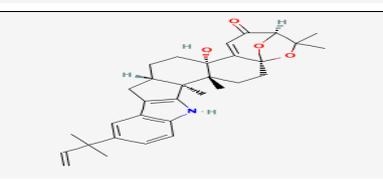
Les champignons microscopiques sont aussi connus par la production des métabolites secondaires.

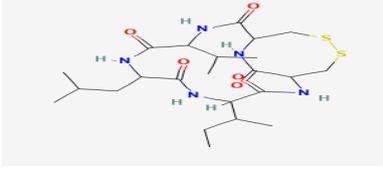
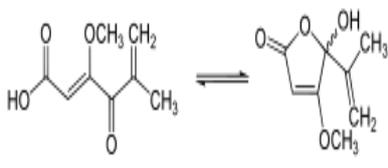
Les principaux genres producteurs de métabolites secondaires sont (kumar et *al.*, 2018) :

- *Penicillium*
- *Aspergillus*
- *Fusarium*
- *Trichoderma*

Le tableau suivant résume les différentes espèces connus pour la production des métabolites secondaires (**Tableau 05**).

Tableau 05 : les différentes espèces productrices des métabolites secondaires.

Espèce	Nom chimique	Structure	Référence
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	β- sitostérol		(Li et al., 2019)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Ethylène	$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{H} \\ & \backslash & / \\ & \text{C} = \text{C} \\ & / & \backslash \\ \text{H} & & \text{H} \end{array}$	(Vizcaino et al., 2005)
<i>Fusarium culmorum</i>	Culmorine		(pitt, 2000)
<i>Fusarium acuminatum</i>	Moniliformine		(Pitt, 2000)
<i>Fusarium graminearum</i>	Zéaralénone		(Pitt, 2000)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Requefortine C		(Pitt, 2000)
<i>Penicillium nalgiovense</i>	Pénicilline		(Pitt, 2000)
<i>Penicillium crustosum</i>	Penitrene		(Filtensborg et al., 1983)
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatreme		(Tepaske et al., 1990)

<i>Aspergillus niger</i>	Malformine		(Anderegg et <i>al.</i> , 1976)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Acide penicellique		(Elvidge et <i>al.</i> , 1977)

Chapitre 2 :
Activités biologiques des
métabolites secondaires

1. Activités des métabolites secondaires fongiques

Les métabolites secondaires fongiques occupent une variété de molécules qui jouent un rôle important en raison de leur activité biologique. Ces molécules complexes peuvent être des composés biologiquement actifs, y compris : antibactérien, antitumoral, agents antifongiques, agents antiviraux, inhibiteurs d'enzymes (Zain et *al.*, 2014). Ces activités donnent l'intérêt et ouvrent des applications intéressantes pour ces molécules, également en agriculture pour lutter contre les maladies des plantes (Mathivanan et *al.*, 2008).

Les métabolites secondaires affectent surtout les agents phytopathogènes comme les champignons, les bactéries et même les virus à cause de leur activité antagonistes (Devi et *al.*, 2020). Ils servent aux espèces fongiques eux-mêmes de plusieurs fonctions, par exemple ils jouent un rôle d'armes de compétition utilisés contre d'autres champignons, bactéries, amibes et plantes; mais aussi comme des agents de transport de métaux, agents de symbiose entre les microorganismes et les plantes, les nématodes, les insectes et les animaux supérieurs; comme des hormones sexuelles; et médiateur pour la communication et plusieurs autres fonctions (Zain et *al.*, 2014).

1.1. Activité antibactérienne

L'histoire des antibiotiques a débuté avec la découverte de la pénicilline par Fleming dans les années 40, ils ont constitué une découverte thérapeutique importante pour la santé humaine. Leur utilisation a permis de diminuer le taux de mortalité et de morbidité mondiale depuis longtemps (Lounas, 2020).

La fréquence accrue des souches pathogènes multirésistantes limite l'efficacité des traitements antimicrobiens traditionnels, impliquant le besoin de nouveaux agents thérapeutiques pour les maladies infectieuses (Strobel et Daisy, 2003 ; Larsen et *al.*, 2005). Les antibiotiques sont définis comme des molécules organiques naturelles produites par des micro-organismes et sont des produits biologiquement actifs (Guo et *al.*, 2006), des substances chimiques et/ou organiques qui ont un effet toxique sur d'autres micro-organismes (principalement des bactéries). Cet effet peut être seulement inhibiteur de croissance puis bactériostatique, mais il peut aussi être létal, auquel cas il est bactéricide. Souvent, un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, selon sa concentration (Lounas,2020). Les guanacastépènes sont des molécules présentes chez les champignons endophytes à activité antimicrobienne, en particulier le guanacastépène A (**Figure 11**), qui a une activité antibiotique contre *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, les antibiotiques périconicine A et B contre *Staphylococcus aureus*, et il existe de l'altersetine purifiée à partir

de l'endophyte *Alternaria sp.* Il montre une activité puissante contre les bactéries GRAM positives pathogènes (Hellwig et al., 2002 ; Gimenez et al., 2007)

Une nouvelle cytochalasine, la phomopsichalasinine, a été isolée de l'endophyte *Phomopsis sp.* Dans sa structure, le macrocycle des autres cytochalasines est remplacé par un système tricyclique, et ce métabolite présente une activité contre *Bacillus subtilis*, *Salmonella Gallinarum* et *Staphylococcus aureus* lorsqu'il est testé à une concentration de 4 µg/disque (Strobel et al., 2004).

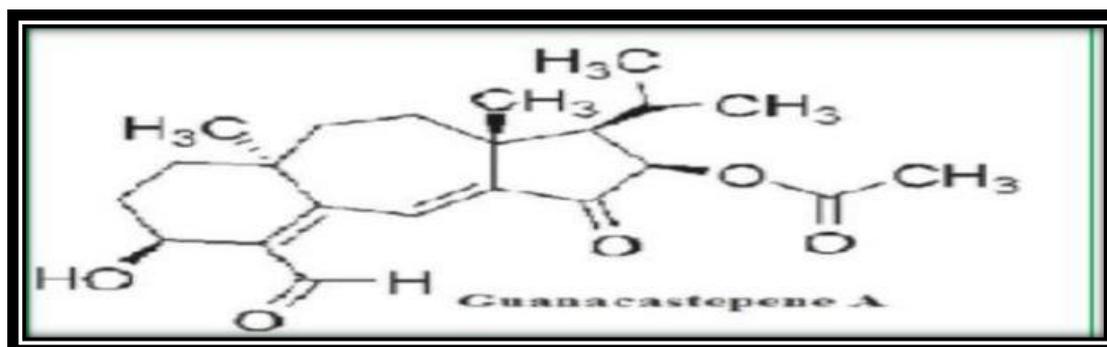


Figure 11 : Structure de guanacstepène A, produit par des champignons endophytes (Gimenez et al., 2007).

Sur un total d'environ 10 700 antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde biologique. Environ 1 600 espèces proviennent de champignons. La répartition des organismes producteurs dans les différentes classes ou ordres fongiques dépend non seulement de la capacité de synthèse, mais aussi de la nature fréquentielle des différentes espèces et de leur capacité à se développer facilement en culture. Les espèces *Aspergillus*, *Penicillium* et *Candida* constituent les réservoirs les plus importants (**Tableau 06**) (Botton et al., 1990).

Tableau 06 : Les antibiotiques produits par certains champignons (Larpant et larpant–Gourguand, 1996).

Champignons microscopiques	Antibiotiques
<i>Aspergillus flavus</i>	Acide aspergillique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilline
<i>Cephalosporium acremoniumn</i>	Céphalosporine
<i>Cephalosporium caerulens</i>	Cérulinine
<i>Helminthsportum siccans</i>	Siccanine
<i>Paecilomyces variotti</i>	Variotine

<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pénicilline
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griséofulvine

Les antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques spécifiques, telles que : la synthèse de la paroi cellulaire, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines, etc. Pour jouer un rôle, ils doivent se lier à des cibles spécifiques dans la cellule (**Figure 12**) (Lounas,2020).

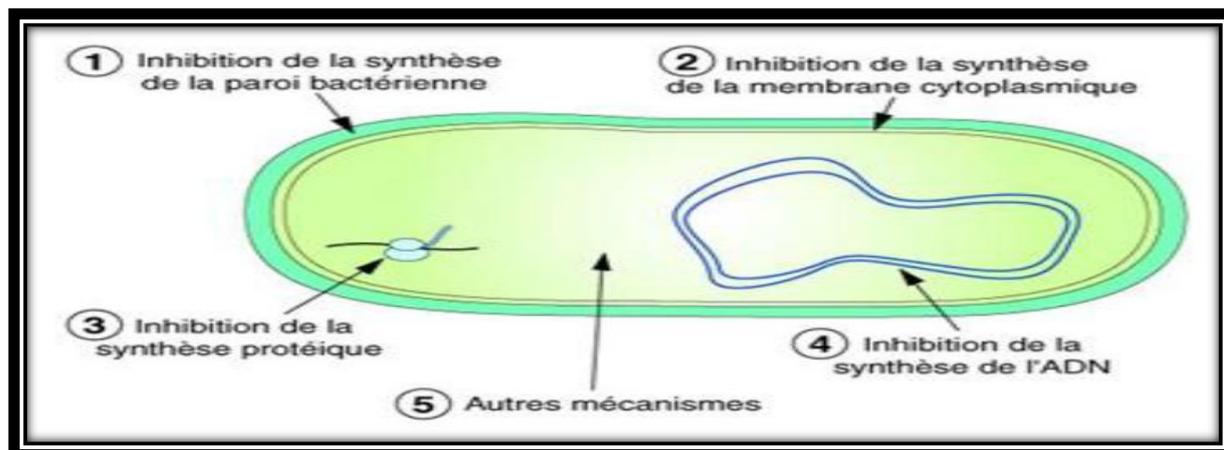


Figure 12 : Mécanismes d'action des antibactériens (Lounas,2020).

1.2. Activité antivirale

Il existe un besoin mondial de nouveaux composés antiviraux pour lutter contre la résistance aux médicaments. Les champignons endophytes sont considérés comme une source importante de nouveaux métabolites antiviraux naturels à utiliser en médecine et en agriculture (Selim et *al.*, 2018).

De nombreux agents antiviraux ont été rapportés chez les champignons endophytes. Deux nouveaux composés, les acides cytoniques A et B (**Figure 13**), ont été isolés de l'endophyte *Cytonaema sp.* Ces composés comprennent des inhibiteurs de la protéase du cytomégalovirus humain (hCMV) (Singh et Dubey, 2015).

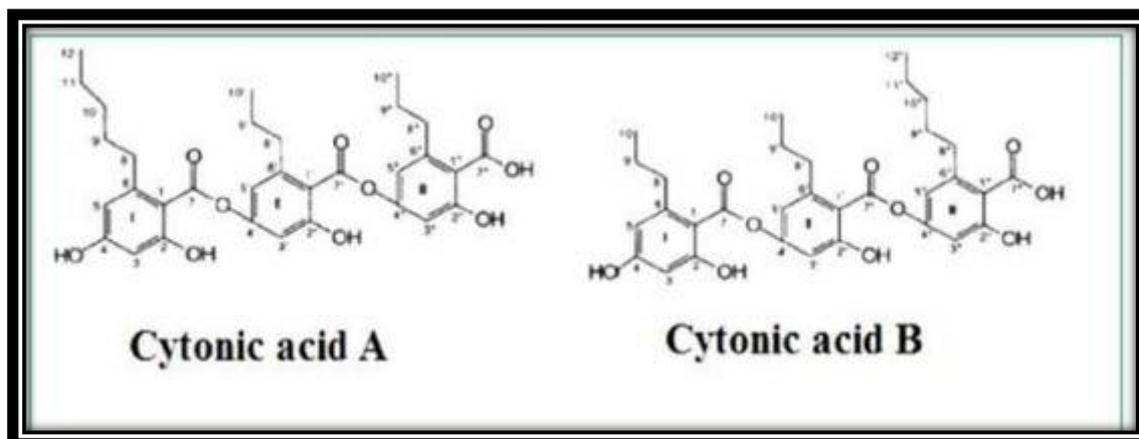


Figure 13 : Structure des acides cytoniques A et B (Singh et Dubey, 2015).

Aussi, deux composés antiviraux, Alternariol et Alternariol-(9)-methylether, ont été isolés de la culture du champignon endophyte *Pleospora tarda* (**Figure 14**), apparenté à la plante médicinale Ephedra. Ils inhibent le virus de l'herpès simplex et le virus de la stomatite vésiculeuse. D'autre part, des substances antivirales actives isolées de *Galium sinaicum* sont également connues pour provoquer la reproduction du virus de l'immunodéficience simienne (Selim et *al.*, 2018).

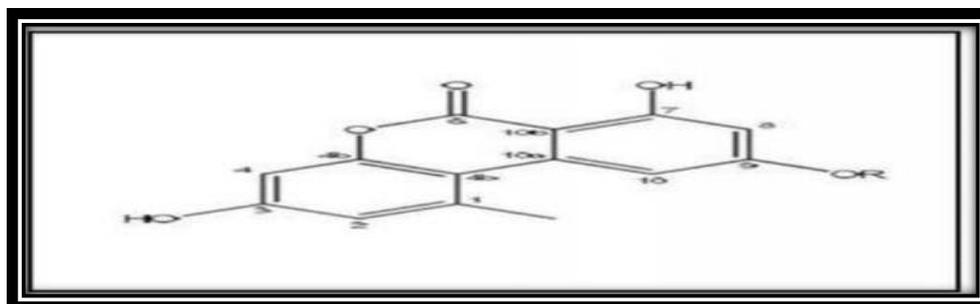


Figure 14 : Structure de l'alternariol si (R = H) et de l'alternariol- (9) -méthyléther si (R= CH3) (Selim et *al.*, 2018).

1.3. Activité antioxydante

Les composés antioxydants sont des substances qui protègent l'organisme des dommages causés par les molécules instables (radicaux libres) (Kaul et *al.*, 2012). Les antioxydants naturels se trouvent couramment dans les endophytes et les champignons (Pimentel et *al.*, 2011). Les composés antioxydants actifs sont hautement réactifs aux dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'oxygène dérivé des radicaux libres, et provoquent divers effets pathologiques tels que les dommages à l'ADN, la carcinogenèse et la dégénérescence cellulaire. Par conséquent, considérés comme des thérapies prometteuses pour

la prévention et le traitement des maladies liées aux (ROS) telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires, l'hypertension (Pimentel et *al.*, 2011), ils sont également utilisés comme additifs dans les industries alimentaires pharmaceutiques et cosmétiques (Talbil et *al.*, 2015).

Deux cérébrosides isolés de l'endophyte *Fusarium* présentent une activité inhibitrice de la xanthine oxydase (Shu et *al.*, 2004). *Aspergillus niger*, un endophyte de l'herbe des Bermudes, produit également de l'aurasperone A, qui inhibe aussi, la xanthine oxydase (**Figure 15**) (Song et *al.*, 2004).

Deux composés ont été identifiés, à savoir la pestacine (1 ; 3 dihydroisobenzofurane) et isopestacine (**Figure 16**) de cultures de *Pestalotiopsis microspora*, un endophyte isolé de la queue noire, ces deux molécules ont des activités antibactériennes et anti oxydantes. L'isopestacine est suspectée en raison de sa similitude structurelle avec les flavonoïdes (Touseef, 2006).

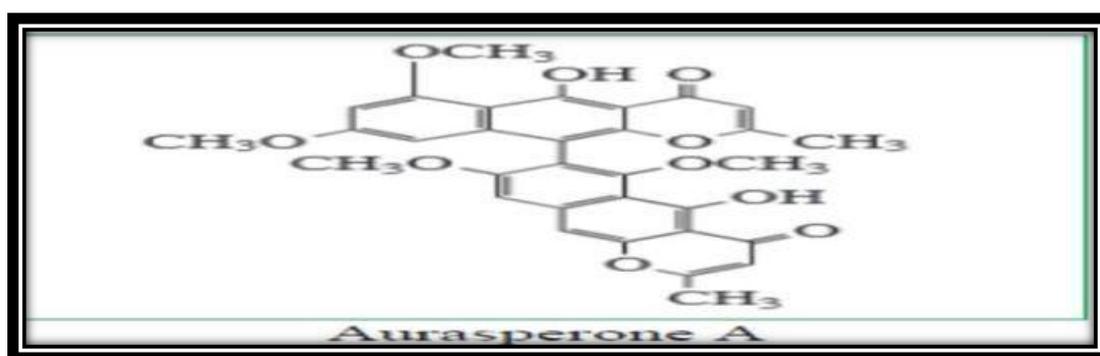


Figure 15 : Structure de l'aurasperone A, agent antioxydant produit par les champignons endophytes (Gimenez et *al.*, 2007).

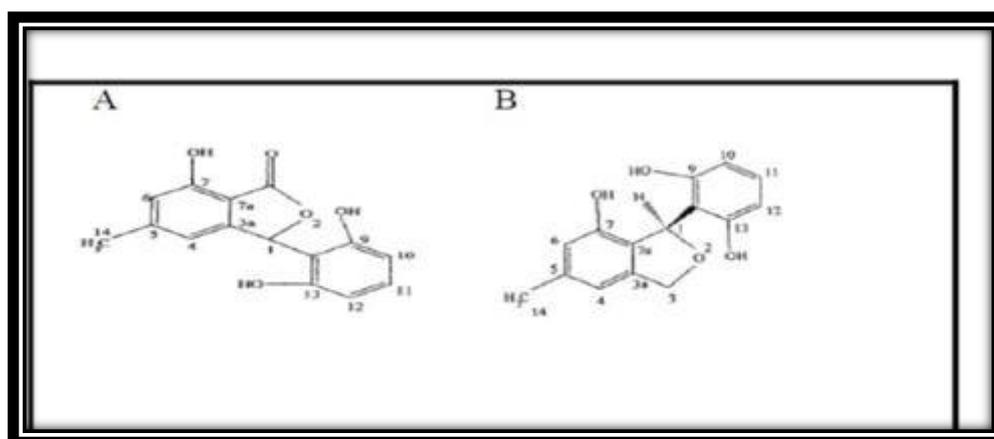


Figure 16 : Structure de l'isopestacin (A), et de la Pestacin (B) (Touseef, 2006).

1.4. Activités antifongiques et antilevuriennes

Les infections fongiques sont devenues un problème croissant en raison de l'augmentation du nombre de personnes vivant avec le VIH et de greffés dont le système immunitaire est affaibli, et de nouvelles substances antifongiques doivent être trouvées pour résoudre ces problèmes (Lounas, 2020).

Le champignon endophyte *Cryptosporiopsis cf quercina*, isolé d'une plante médicinale originaire d'Eurasie, *Tripterygium wilfordii*, constitue une source de la cryptococcine A (**Figure 17**), qui est un composé associé aux peptides antifongiques apparentés aux échinocandines et aux pneumocoques et a montré une activité contre *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea* (Strobel et al., 2004).

Aussi, la cryptocandine et ses dérivés sont à l'étude pour une utilisation contre une variété de maladies fongiques de la peau et des ongles (Strobel et al., 2004; Bennaïm et al., 2020). Il existe également un agent antifongique, l'acide ambui (**Figure 17**), qui est un agent antifongique purifié à partir de l'endophyte *Pestalotiopsis microspora*, que l'on trouve couramment dans les forêts tropicales (Liu et al., 2001; Strobel et al., 2004).

Plusieurs autres composés antifongiques ont été purifiés à partir d'un autre groupe de *microspores sp* isolé de *Torreya*, notamment le pestalosite (**Figure 17**), un B- glucoside aromatique et deux purines, la pestalopyrone et l'hydroxypestalopyrone. D'autres métabolites secondaires, tels que les pestalitiopsines A et B, ont été générés à partir d'un autre cluster secondaire isolé du cab à feuilles courtes. Une autre espèce de *Pestalotiopsis jesteri*, produit des hydroxyflavonoïdes et des flavonoïdes (**Figure 17**), ce dernier étant l'un des 33 produits rares purifiés.

D'autre part, un nouvel agent antifongique, CR377, a été isolé du bouillon de culture du champignon endophyte *Fusarium sp*, qui a été isolé de *Selaginella pallescens*, et a montré une résistance à *Candida albicans* dans le test de diffusion sur gélose (Brady et Clardy, 2000). Un nouveau composé, le 1H-indol-3-ylacétate de 2-phényléthyle (**Figure 18**), a été produit. Ce composé de nystatine a montré une bonne activité contre *Cladosporium* et *Coccidioides* (Deshmukh et al., 2018).

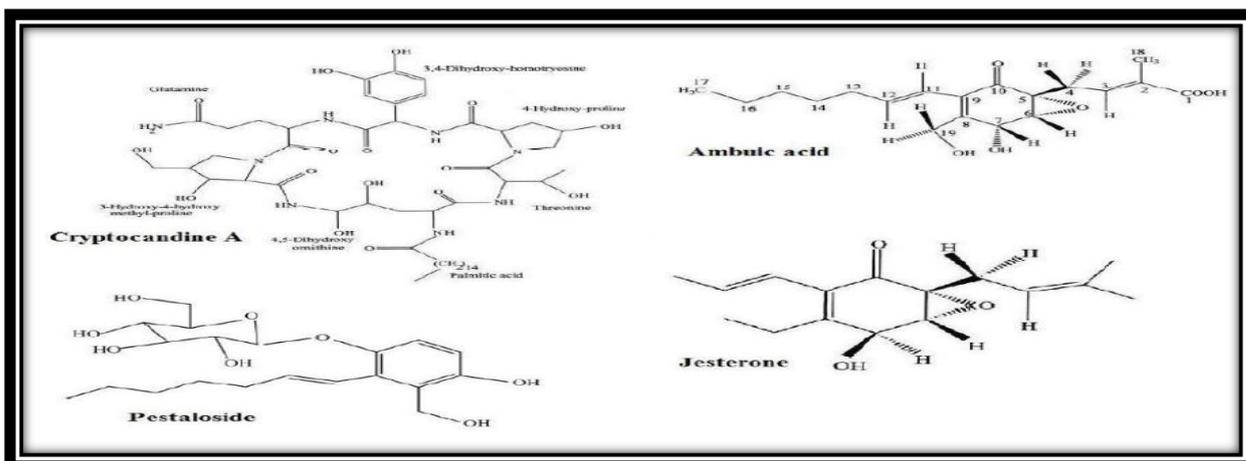


Figure 17 : Quelques substances antifongiques produites pas les champignons endophytes (Zerroug, 2011).

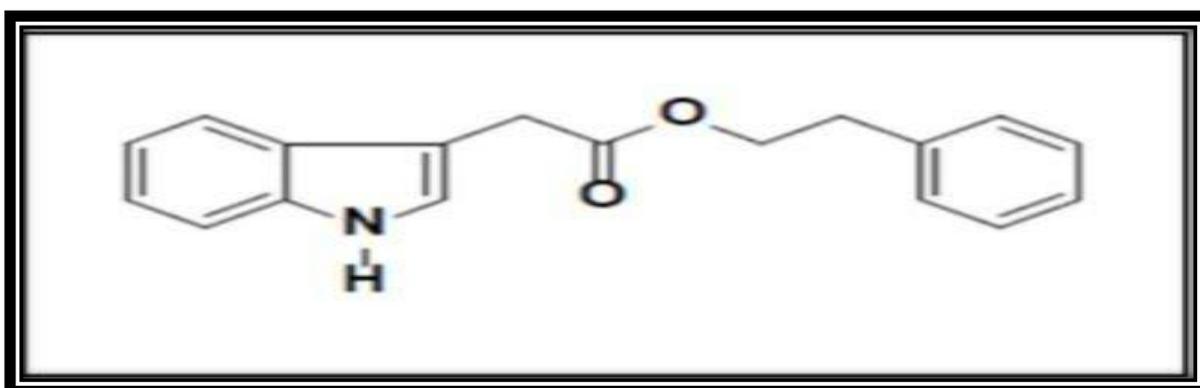


Figure 18 : Structure du 2-phényléthyle 1H-indol-3-yl-acétate (Deshmukh et al., 2018).

1.5. Activités anticancéreuses

Le cancer, maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale et incontrôlée conduisant à la formation incontrôlée de tissus, et constitue la première cause de décès dans le monde (Pimentel et al., 2011). Plus de 100 composés anticancéreux sont considérés comme des métabolites secondaires (Lounas,2020). Parmi ceux, il a été démontré que certaines molécules inhibent la prolifération de cellules cancéreuses. Ces composés bioactifs semblent être de nouvelles options pour la découverte de nouveaux médicaments anticancéreux, tels que le paclitaxel (paclitaxel), un puissant composé anticancéreux (**Figure 19**) qui interfère avec la prolifération des cellules cancéreuses, il est produit par un certain nombre de champignons endophytes, comme *Cladosporium*, *Microsporium* et *Periconia* sp. (Chandra, 2012).

L'Actinomycine D et différents produits comme : anthracyclines, laromycines ou mitomycines, agissent en immobilisant l'ADN. Par exemple, l'actinomycine D, se lie au complexe d'initiation de la transcription et empêche l'allongement par l'ARN polymérase (Kaul *et al.*, 2012).

Il y a aussi, la vincristine et la vinblastine, deux alcaloïdes naturels qui sont utilisés comme médicaments primaires pour la leucémie (Chandra, 2012).

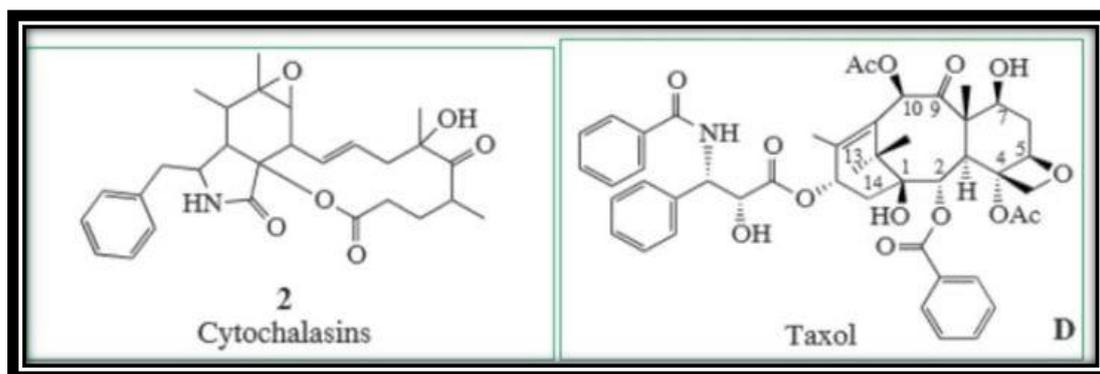


Figure 19 : Structure de quelques substances anticancéreuses produites par les champignons endophytes (Gimenez *et al.*, 2007).

1.6. Succès des métabolites secondaires dans la lutte contre les phytopathogènes

1.6.1. Métabolites secondaires de *Trichoderma*

Le succès des espèces fongiques en tant qu'agents de lutte biologique contre divers agents pathogènes des plantes a été associé à la production d'un excès de composés bioactifs et de métabolites, y compris des métabolites secondaires (Boukharia *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018). Cependant, les fonctions de nombreux métabolites secondaires n'ont pas été déterminées. Il est déterminé et chargé qu'une seule espèce de *Trichoderma* est susceptible de produire des métabolites secondaires très diversifiés et spécifiques. L'importance écologique de la plupart des métabolites secondaires est également mal comprise et des recherches supplémentaires dans ce domaine sont encore nécessaires pour mieux en savoir plus sur l'écologie de *Trichoderma* (Keswani *et al.*, 2014).

Dans des études précédentes, il a été rapporté que les espèces de *Trichoderma* sécrètent divers composés volatils et non volatils tels que les alkylpyrones, les peptidols, les polyesters, les stéroïdes, les isonitriles, les sesquiterpènes, les dicétopipérazines (Meena *et al.*, 2017 ; Boukharia *et al.*, 2020). Ces substances ont un effet très large car elles inhibent la croissance des bactéries et des champignons phytopathogènes. De plus, leur activité antibactérienne est

principalement déterminée par leur composition chimique (Meena et *al.*, 2017 ; Boukhariaet *al.*, 2020).

Les complexes puriques tels que les koniginines A et B ont une activité antifongique contre les *Gaeumannomyces graminis* (Ghisalberti et Rowland, 1993). De plus, les viridifungines ont montré une activité microbicide contre *Aspergillus* et *Cryptococcus sp* (Harris et *al.*, 1998). Aussi l'application d'harzianopyridone a montré une puissante activité antifongique contre *Rhizoctoni solani*, *Botrytis cinerea* (Dickinson et *al.*, 1989), *Pythium ultimum* et *Gaeumannomyces graminis* (Vinale et *al.*, 2006). Les métabolites secondaires spécifiques de *Trichoderma* T22-azaphilone, harzianolide et buténolide T39 ont des effets inhibiteurs sur *Rhizoctoni solani*, *Pythium ultimum* et *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, *in vitro* (Boukhariaet *al.*, 2020; Vinale et *al.*, 2006).

Sur la base de critères spécifiques tels que les facteurs de la masse spectrale et les indices de rétention, les analyses faites par Stoppacher et *al.*, (2010) ont identifié 25 différentes substances volatiles produites par *T. atroviride*, qui peuvent exercer une activité antagoniste à distance vis-à-vis plusieurs phytopathogènes. Les études antérieures ont également révélé que les métabolites antimicrobiens tels que les pyrones (Keszler et *al.*, 2000) et les peptides sont produits par *T. atroviride* (Oh et *al.*, 2000).

Les travaux de Moutassem et *al.*, (2020) ont montré que les métabolites secondaires extra de cinq espèces de *Trichoderma* présentaient une réduction significative de la croissance mycélienne d'environ 6 à 75 %. Cependant, cet effet était dose-dépendant, l'efficacité augmentant de manière significative avec l'augmentation de la dose. Tandis que, les métabolites secondaires de *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viride* ont présenté les effets les plus puissants sur l'inhibition de la croissance mycélienne. Les différences observées dans l'activité bactéricide parmi les cinq espèces de *Trichoderma* peuvent être attribuées aux différents types de composés libérés.

Ce travail a montré que les niveaux de polyphénols et de flavonoïdes étaient significativement augmentés dans toutes les plantes traitées avec les espèces de *Trichoderma*, avec des fréquences comprises entre 51,15 et 69,54 mg g⁻¹, et entre 37,44 et 72,4 mg g⁻¹ respectivement. Cela pourrait également expliquer l'effet positif des espèces de *Trichoderma* dans la réduction de la gravité de la maladie causée par la fusariose du pois chiche chez les semis traités avec l'extrait fongique (Moutassem et *al.*, 2020).

1.6.2. Métabolites secondaires de *Fusarium*

En général, *Fusarium* est un pathogène végétal commun qui cause des maladies liées aux racines et aux tiges telles que la brûlure vasculaire et la pourriture des racines. De plus, ils sont également considérés comme des champignons nuisibles en raison de leur capacité à produire des mycotoxines, des métabolites secondaires qui nuisent aux plantes et la santé humaine.

Cependant, plusieurs espèces de *Fusarium*, à savoir *Fusarium chlamydia*, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium longipes*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* non pathogène ont été signalées comme agents de lutte biologique pour contrôler divers champignons phytopathogènes (Mathivanan et al., 2008). Ces agents de lutte biologique produisent certaines substances toxiques qui inhibent la croissance de micro-organismes pathogènes (Boukharia et al., 2020).

Parmi ceux, il y a l'acide nonanoïque de *Fusarium oxysporum*, qui inhibe la germination des spores de *Cunninghamella elegans*.

1.6.3. Métabolites secondaires des endophytes

Les champignons endophytes vivent de manière asymptomatique dans les tissus végétaux, ne provoquent pas d'infection pathogène et ont la capacité de synthétiser des composés biologiquement actifs identiques ou similaires à ceux de leur hôte (Lou et al., 2016). Les plantes médicinales sont une source importante de souches fongiques endophytes avec de nouveaux métabolites bioactifs (Venkateswarulu et al., 2018). Ces composés présentent une gamme d'activités biologiques et trouvent des applications dans les industries agricoles, médicales et alimentaires (Vasundhara et al., 2019).

Ils produisent un large spectre de métabolites secondaires qui minimisent l'infestation par divers insectes et ravageurs. Beaucoup de ces métabolites secondaires ont des propriétés antifongiques et antibactériennes qui inhibent fortement la croissance d'autres micro-organismes, y compris les agents pathogènes des plantes (Gautam et al., 2013).

La production de métabolites secondaires et l'inhibition des pathogènes par les endophytes déclenchent l'adaptation, la compétitivité et la bonne croissance des plantes hôtes. Ces métabolites sont répartis en différents groupes fonctionnels : alcaloïdes, benzopyrones, chinones, flavonoïdes, acides phénoliques, quinine, stéroïdes, saponines, tanins, terpènes,

tétralones, xanthènes (Gautam et Avasthi, 2019). Les métabolites secondaires des endophytes fongiques et leurs effets anti-pathogènes ont été étudiés par de nombreux chercheurs tels que les cétones pour explorer le rôle de ces composés dans le contrôle biologique des maladies des cultures.

Lim et *al.*, (2010) ont isolé différents composés antibactériens tels que le dichromandrostérol A(1), le dichromandrostérol B(2), le dichromandrostérol C(3), la déacétyl phosphaxanthone B(4) et la fusaricine A(5). Ces composés ont montré une activité antibactérienne contre *Xanthomonas oryzae*. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) étaient respectivement de 8,16 et 128 ug/ml. Le dicérandrol A a également montré une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium miliophila* et *Erwinia acidolyticus* avec des valeurs respectives de CMI de 0,25, 0,125 1 et 2 ug/ml. La phomoxanthone A(6), isolée de l'espèce *Phomopsis sp*, a montré une activité antibactérienne contre *Bacillus megaterium* (10 mg/ml) avec une zone d'inhibition de 3 à 4 cm (Elsässer et *al.*, 2005).

1.6.4. Métabolites secondaires des levures

Les levures produisent plusieurs métabolites antimicrobiens qui les aident à réduire l'induction de plusieurs agents pathogènes des plantes (Pérez-Montaño et *al.*, 2014). Des preuves expérimentales récentes ont révélé un rôle critique pour les composés volatils de la levure dans les interactions levure-pathogène, y compris les pathogènes post-récolte et les producteurs de mycotoxines. Les activités de lutte biologique de différentes levures alimentaires telles que *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcjerrima*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Aureobasidium pullulans* contre *Botrytis cinerea* in vitro et sur les baies de raisin de table ont été largement attribuées à la production de COV (Parafati et *al.*, 2015).

De même, l'activité inhibitrice de *Sporidiobolus pararoseus* sur la germination des spores et la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* est principalement attribuée au 2-éthyl-1-hexanol (Boukharria et *al.*, 2020). Tandis que *Chelativorans intermedius* produit du 1,3,5,7-cyclooctatétrène, 3-méthyl-1- lors de l'interaction avec cet agent pathogène, le butanol, la 2-nonanone et l'alcool phénéthylique sont les principaux composants (Huang et *al.*, 2011). COV émis par *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri* et *Hanseniaspora uvarum* inhibe la croissance d'*Asprgillus flavus* et la production d'ochratoxine A pendant le traitement du café (Masoud et *al.*, 2005). Bien que le 2-phényléthanol identifié comme un composant clé de *Pichia anomala*

qui empêche la germination des spores *d'Aspergillus flavus*, la croissance mycélienne et la production de toxines (Hua et *al.*, 2014).

D'autres mécanismes de contrôle biologique utilisés par *Saccharomyces cerevisiae* comprennent la sécrétion d'hydrolases et de composés organiques volatils par la levure. Leur activité antifongique contre l'agrumes *Colletotrichum acutatum* ont été décrite et étudiée (López et *al.*, 2015). Des composés volatils en général et des composés spécifiques (par exemple : alcools et esters), qui ont également été identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* et sont associés à la lutte biologique contre la tache noire des agrumes (Fialho et *al.*, 2010 ; Oro et *al.*, 2017).

Chapitre 3 : Méthodes de production des métabolites secondaires.

1. Microorganismes utilisés

Souches fongiques	Origines des souches	Références
<i>Guignardia, Pestalotiopsis guepinii</i> et <i>Phomopsis sp.</i>	Feuilles et brindilles.	(Rodrigues et al., 2000)
<i>Eurotium amstelodami</i> , <i>E. herbariorum</i> , <i>E. rubrum</i> , <i>Aspergillus calidoustus</i> , <i>A. insuetus</i>	L'air.	(Slack et al., 2009)

2. Conduite de la culture et de la production

Rodrigues et al., (2000), ont utilisé un milieu liquide le bouillon d'extrait de malt (ME). Le milieu est réparti dans des flacons d'erlenmeyer à raison de 100ml de bouillon par erlen. Les erlen ont été inoculés avec trois fragments prélevés sur le bord de colonies de *P. guepinii* et *Phomopsis sp.* (souche 1) puis incubés pendant sept jours. D'autres flacons contenant 50 ml du milieu ME ont été inoculés avec *Guignardia sp* et *Phomopsis sp* (souche 2) puis incubés pendant 10 jours.

Tous les flacons de fermentation ont été incubés à 110 rpm sur un agitateur rotatif à la température ambiante avec une photopériode de 12 heures, sous des lampes fluorescentes.

Selon Slack et al., (2009), des isolats à spore unique ont été préparés et cultivés sur des géloses contenant 2 % d'extrait de malt. La gélose a été macérée dans l'eau stérile. La suspension obtenue a été utilisée pour inoculer trois bouteilles de Roux [5 % (v/v)] contenant 200 ml du milieu Czapek-Dox stérile supplémenté soit par l'extrait levure, soit par le milieu ME à raison 2%. Les cultures ont été incubées à 25 °C pendant deux semaines dans l'obscurité.

3. Extraction et purification

Selon l'étude de Rodrigues et al., (2000), après la durée de la fermentation, le bouillon de culture a été séparé des mycéliums par filtration. Les filtrats de culture ont été extraits trois fois avec l'acétate d'éthyle (EtOAc), puis filtrés à travers un tampon de Na₂SO₄ anhydre, évaporés jusqu'à siccité complète et dissous à nouveau dans du méthanol (MeOH). Après

évaporation du solvant, la masse obtenue était 183 mg, 190 mg, 168 mg et 235 mg pour *Guignardia*, *P. guepinii* et *Phomopsis* (souches 1 et 2), respectivement.

Une partie de l'extrait brut a été utilisée pour les tests biologiques et le reste a été analysé par chromatographie sur couche mince (TLC) et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour détecter les métabolites secondaires fongiques et pour déterminer le rapport des composants présents dans les extraits bruts en vue d'une purification plus poussée.

La TLC analytique a été réalisée sur des plaques de gel de silice avec du CHCl_3 -MeOH- NH_4OH , comme système de développement. Les taches ont été visualisées par exposition à la lumière UV. Le réactif de SCHLITTLER a été utilisé pour la détection des alcaloïdes.

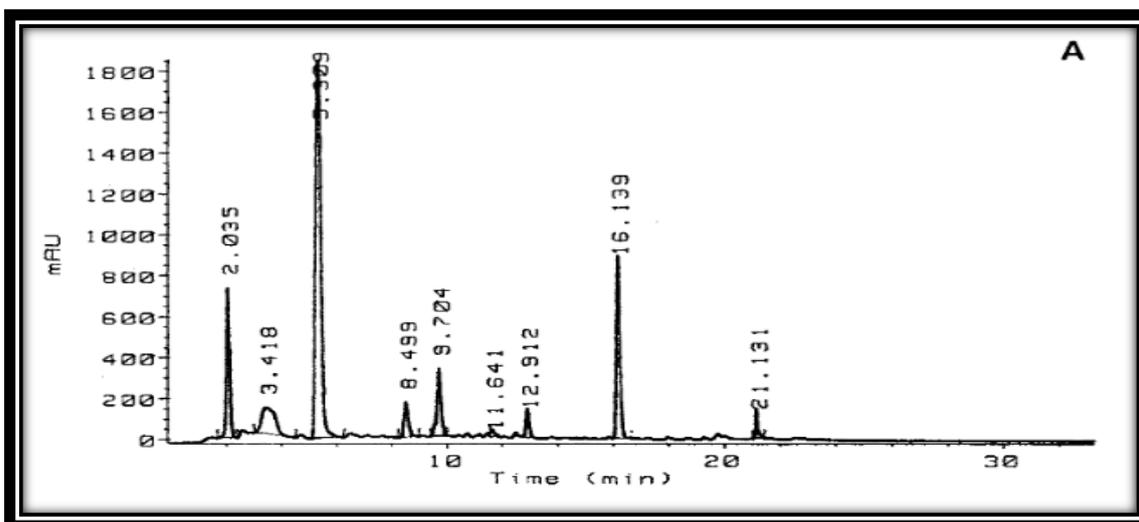
Les extraits bruts ont été soumis à des analyses HPLC sur un instrument HEWLETT PACKARD 1090M. La séparation a été effectuée sur une colonne préemballée en phase inverse C-8 ou C-18 MACHEREY-NAGEL ET 250/3 (Nucleosil 100-5). Pour l'élution, un système à gradient de deux solvants a été utilisé (solvant A : H_2O ; solvant B : MeOH). Le gradient était à un débit de 0,66 ml/min, passant de 0 % à 100 % de solvant B en 30 min, suivi d'une partie isocratique de 5 min. L'effluent de la colonne a été contrôlé à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes UV photo-diode-array detector (DAD-UV) à 230 nm.

D'après l'étude de Slack et *al.*, (2009), la purification de tous les métabolites d'*Eurotium* a été réalisée par prep-TLC (Partisil PK5F, 150 Å, 1000 µm) par l'utilisation d'un système solvant MeOH- CHCl_3 à 10 % . Les métabolites isolés ont été purifiés par un système waters Delta Prep 3000 prep-HPLC avec un détecteur d'absorbance accordable 484 de Waters, connecté à un système Synergi Max-RP C12 de Phenomenex (250×21,2 mm, 10 µm, 80 Å), avec le même changement de gradient que dans le processus de criblage, mais en augmentant le débit de solvant à 25 ml min⁻¹. Les métabolites d'*Aspergillus calidoustus* ont été purifiés de manière grossière par l'utilisation des colonnes d'extraction en phase solide (Strata-x-33 µm polymeric RP, Phenomenex) avec des composés éluant entre 0-50 % CH_3CN - H_2O . Une purification supplémentaire a été réalisée par prep-HPLC mais avec un gradient CH_3CN - H_2O (10-90 % CH_3CN) sur une période de 40 minutes avec un débit de 25 ml min⁻¹. Toutes les suspensions de métabolites obtenues ont été séchées sous vide et conservées dans des flacons en verre ambré. La pureté des métabolites a été testée par une combinaison de HPLC-DAD, de résonance magnétique nucléaire (RMN), de spectrométrie de masse (SM) et de diverses données spectrales en comparaison avec les valeurs de la littérature. Les métabolites purifiés résultants ont été utilisés comme standards.

4. Discussion générale

Selon l'étude de Rodrigues et *al.*, (2000), les bouillons de culture ont été séparés par filtration suivie d'une extraction à l'acétate d'éthyle. Les composés ont d'abord été détectés sur les plaques TLC par absorption UV sous lampe UV. Après pulvérisation des plaques avec le réactif de SCHLITTLER, aucun alcaloïde n'a été détecté dans les extraits bruts de *Guignardia*, *P. guepinii* et *Phomopsis sp.* La production de métabolites a été démontrée au moyen d'une HPLC couplée à un détecteur à barrettes de diodes. La présence de plusieurs métabolites a été détectée dans les extraits bruts de *Guignardia*, *Pestalotiopsis guepinii* et *Phomopsis sp.*, dans les conditions décrites précédemment, il a été possible d'obtenir une séparation satisfaisante comme le montre la **Figure 20**, où l'on a pu distinguer six pics bien définis produits par l'isolat de *P. guepinii*.

Les temps de rétention et la longueur d'onde (λ_{\max} , nm) de tous les isolats étudiés sont indiqués dans le **tableau 7**, où un total de 17 pics reproductibles avec différents spectres UV ont été détectés.



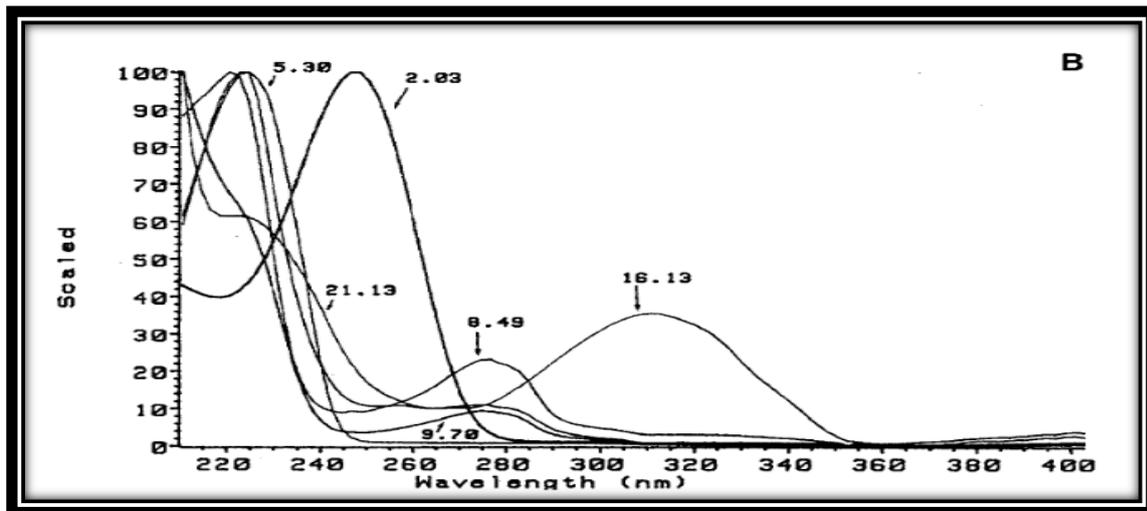


Figure 20 : Chromatogramme HPLC de l'extrait brut obtenu à partir de l'isolat de *Pestalotiopsis guepinii* [phase mobile : H₂O : MeOH ; débit : 0,66 ml/min, 230 nm ; détection UV à 230 nm (A) et spectres UV des pics (B)] (Rodrigues et *al.*, 2000).

Tableau 7 : Résultats de l'analyse HPLC montrant le temps de rétention et λ_{max} des principaux pics détectés dans les extraits de bouillon de culture de *Guignardia sp.*, *Pestalotiopsis guepinii* et *Phomopsis sp.* (Rodrigues et *al.*, 2000)

Taxon	Plant tissue	Locality	Retention time	Wavelength ¹
<i>Guignardia sp.</i>	leaf	RJ	5.4	225
			8.3	225, 275
			9.6	225sh, 305, 320sh
			10.6	225sh, 305, 320sh
			17.0	265
<i>P. guepinii</i>	twig	RJ	2.0	250
			5.3	225
			8.4	220, 275
			9.7	225sh, 275
			16	225, 310
21	225sh, 280sh			
<i>Phomopsis sp.</i> (strain 1)	twig	RJ	5.3	225
			8.4	225, 280
			9.7	225sh, 275
<i>Phomopsis sp.</i> (strain 2)	leaf	PA	5.1	225
			7.9	275
			9.4	225sh, 280

¹ λ_{max} , nm

L'extrait brut de *Guignardia* a produit au moins cinq métabolites, à des temps de rétention de 5.4, 8.3, 9.6, 10.6 et 17.0 minutes. Les extraits des souches 1 et 2 de *Phomopsis* présentaient trois pics avec un temps de rétention de 5.3, 8.4 et 9.7 et 5.1, 7.9 et 9.4, respectivement. Les extraits bruts fongiques testés pour les activités antibiotiques dans l'essai de plaque de microtitration ont montré des activités inhibitrices contre *Actinomyces sp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium elatum*, *Geotrichum sp*, *Mycotypha sp*. et *Penicillium canadensis* (**Tableau 8**). Tous les extraits fongiques ont été capables d'inhiber la croissance des actinomycètes.

Les extraits culturels de *Guignardia* étaient très puissants contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum sp*, et *Penicillium canadensis*, tandis que les extraits de *P. guepinii* étaient actifs contre *S. cerevisiae*, tandis que des souches de *Phomopsis sp* ont montré un effet antifongique prononcé envers *C. elatum*, *Mycotypha sp* et *S. cerevisiae*.

Tableau 8 : Activité biologique démontrée par les extraits bruts de *Guignardia sp* , *Pestalotiopsis guepinii* et *Phomopsis sp* (souches 1 et 2) , contre 14 organismes d'essai, dont des actinomycètes, des bactéries, des levures et des champignons filamenteux (Rodrigues et al., 2000).

Taxon	Actinomy- cetes ²	Bacteria ³			Fungi											
		ACT	COM	ESC	STA	Yeast ⁴					Filamentous ⁵					
						CAN	SAC	ASP	CLA	GEO	MYC	NEU	PAE	PCA	PCL	
<i>Guignardia sp.</i>	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>P. guepinii</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phomopsis sp.</i> (strain 1)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Phomopsis sp.</i> (strain 2)	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Score: 0 – no inhibition; 1 – inhibition
² ACT: *Actino sp.*
³ Gram-negative and Gram-positive – COM: *Comamonas sp.*, ESC: *Escherichia coli*, STA: *Staphylococcus aureus*
⁴ Yeasts: CAN: *Candida albicans*, SAC: *Saccharomyces cerevisiae*
⁵ Filamentous fungi: ASP: *Aspergillus niger*, CLA: *Cladosporium elatum*, GEO: *Geotrichum sp.*, MYC: *Mycotypha sp.*, NEU: *Neurospora crassa*, PAE: *Paecilomyces sp.*, PCA: *Penicillium canadensis*, PCL: *Penicillium claviformae*

Les profils des métabolites secondaires fongiques obtenus au cours de cette étude ont présenté une séparation satisfaisante avec l'utilisation de la HPLC couplée à une détection par réseau de photodiodes UV.

De plus, leurs résultats ont fourni des informations préliminaires pour désigner *Guignardia* et *P. guepinii* comme organismes créateurs selon la classification de DREYFUSS et CHAPELA (1994), car ils présentent un grand nombre de pics HPLC et d'activités biologiques.

Guignardia sp a démontré une activité antibactérienne non sélective contre les bactéries GRAM positives (*S. aureus*) et les bactéries GRAM négatives (*E. coli*).

Aucun rapport n'a été décrit sur des métabolites secondaires produits par des espèces de *Guignardia* ayant une telle activité antibiotique, d'autre part, plusieurs phytotoxines ont été décrites comme étant produites *in vitro* par *Phyllosticta sp*, qui est son genre anamorphe.

Phomopsis a été signalé comme étant l'un des genres endophytes les plus fréquemment isolés, trouvé dans une large gamme de plantes hôtes dans le monde entier. Jusqu'à présent, plusieurs composés aux activités biologiques diverses ont été détectés chez ce champignon.

La diversité chimique et biologique des souches endophytes de *Phomopsis* n'a été étudiée que récemment. Les métabolites bioactifs produits *in vitro* par les souches endophytes des espèces de *Phomopsis* ont montré des activités inhibitrices contre les champignons *Ustilago violacea*, *Mycotypha microspora*, *Eurotium repens*, *Fusarium oxysporum* et *Candida tropicalis*, ainsi que contre les bactéries *E. coli* et *Bacillus megaterium*.

D'autres recherches sont en cours pour déterminer les fractions des extraits responsables des activités biologiques démontrées par les souches fongiques étudiées. En parallèle des travaux sont en cours pour élucider la structure chimique des métabolites, car ils peuvent représenter de nouveaux agents thérapeutiques.

Compte tenu de ces résultats, cette étude a pu démontrer la valeur potentielle de la production des métabolites secondaires par les champignons des régions tropicales, confirmant ainsi les résultats de MÖLLER et *al.*, (1996), qui ont trouvé que les isolats tropicaux, y compris les endophytes, étaient d'une grande créativité métabolique.

Par ailleurs, l'étude de Slack et *al.*, (2009) affirme que les cultures de plusieurs souches d'*Euortium amstelodami* sur milieu CY ont donné plus de biomasse ($\times 16$) que sur le milieu

ME à 2 %. *E. herbariorum* et *E. rubrum* n'ont pas poussé sur le milieu ME. De ce fait, le milieu CY a été utilisé par la suite. L'analyse des extraits de filtrat d'*E. herbariorum* a révélé la production des principaux métabolites majeurs détectés dans les espèces d'*Eurotium* cités ci-dessus, ainsi qu'un autre métabolite majeur. L'analyse des extraits mycéliens des trois espèces était qualitativement similaire.

Les principaux métabolites des extraits de filtrat d'*E. amstelodami* et d'*E. rubrum* ont été identifiés comme étant la néoéchinuline A (**figure 21A**) et la néoéchinuline B (**figure 21B**). L'épiheveadrine (**Figure 21C**) a été identifié comme un métabolite majeur chez *E. amstelodami*, mais comme un métabolite mineur chez *E. rubrum*. Les extraits de filtrat d'*E. herbariorum* contenaient ceux trouvés chez *E. amstelodami*. Les extraits de mycélium des trois espèces contenaient de la flavoglaucine (**figure 21E**), auroglaucine (**figure 21F**) et isotétrahydroauroglaucine (**figure 21G**). Echinuline (**figure 21H**), preechinuline (**figure 21I**) et neoechinuline E (**figure 21J**) ont été détectés comme métabolites mineurs dans l'extrait de culture naturels d'*E. amstelodami* et d'*E. rubrum*, tandis que la questine (**figure 21 K**) ont été détectés chez *E. Herbariorum*. Les identifications étaient fondées sur des masses moléculaires connues et des comparaisons avec des données publiées. Les structures des métabolites sont présentées dans la **figure 21**. En général, tous les principaux métabolites ont été produits par les souches testées, à l'exception de la cladosporine, produite uniquement par *E. herbariorum*. De plus grandes quantités de flavoglaucine, auroglaucine, et isotétrahydroauroglaucine ont été décelée dans des extraits de mycélium, qu'en filtrats de culture, les néoéchinulines A et B et épiheveadrine ont été trouvés en plus grandes quantités. Contrairement aux autres souches, l'épiheveadrine était un composé mineur chez la souche d'*E. rubrum* testée.

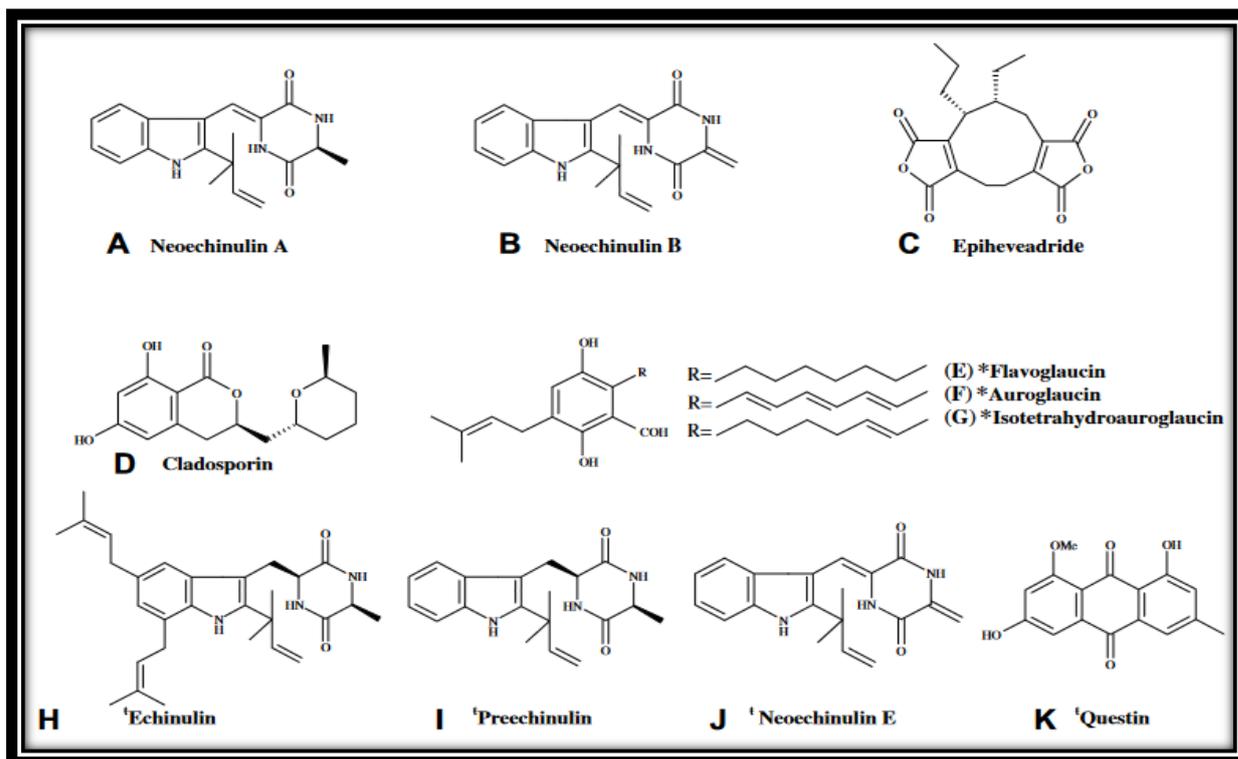


Figure 21 : Métabolites secondaires détectés chez les espèces *Eurotium* (* détectés dans le mycélium, métabolites mineurs) (Slack et al., 2009).

Toutes les souches d'*Aspergillus insuetus* et *A. calidoustus* ont bien poussé dans le milieu CY, mais mal à zéro dans les milieux ME. Il n'y avait pas des différences significatives dans la masse mycélienne parmi les souches sur le milieu CY. Les principaux métabolites ont été identifiés presque exclusivement à partir de l'extrait de filtrat comme TMC-120 A (**figure 22A**), TMC-120 C (**figure 22C**), dérivé TMC-120 nouveau 1 (**figure 22D**), dérivé TMC-120 2 (**figure 22E**) et une drimane sesquiterpène (**figure 22F**). Ces nouveau TMC-120 connus et alcaloïdes d'isoquinoléine ont été détectés principalement dans les souches d'*Aspergillus calidoustus*, alors que dans une seule souche d'*A. insuetus*. L'identification de TMC-120 B (**figure 22B**) par l'analyse LC-MS était basée sur les UV publiés et la masse moléculaire données. Les structures des métabolites sont présentées dans la **figure 22**.

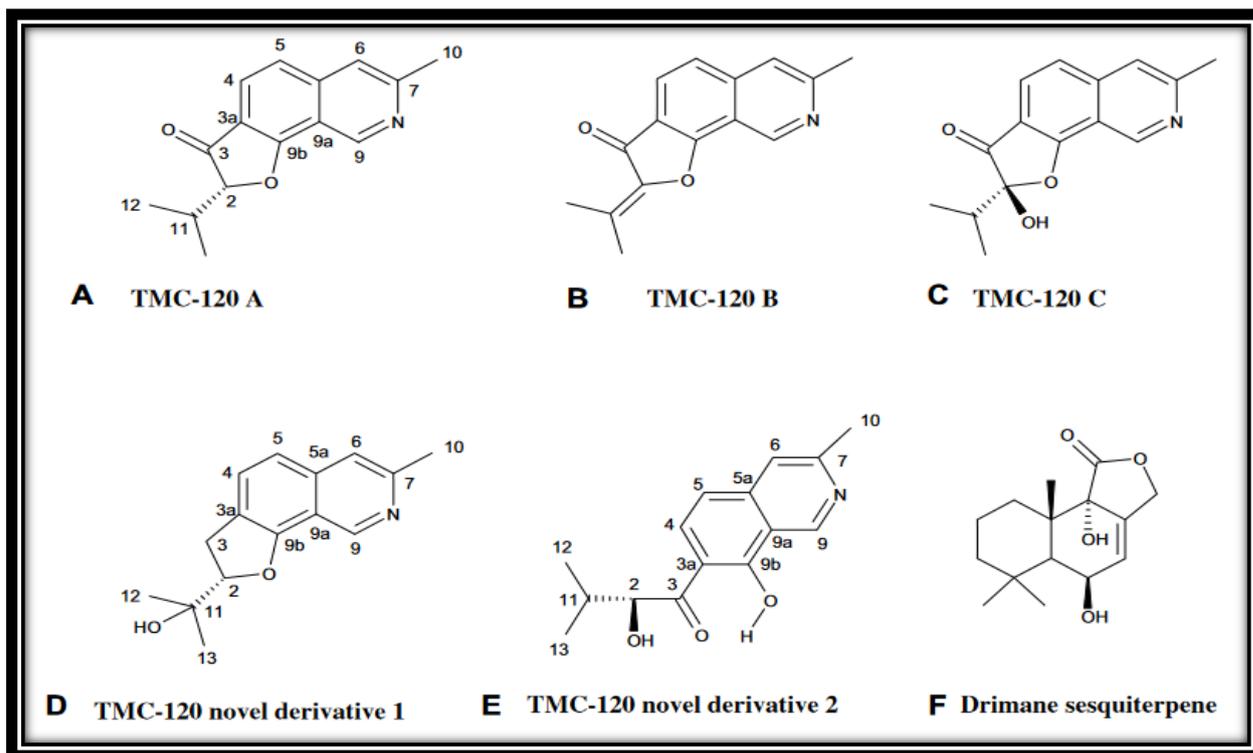


Figure 22 : Métabolites secondaires détectés dans les extraits de filtrats bruts d'*A. insuetus* et *A. Calidoustus* (Slack et al., 2009).

Les trois espèces d'*Eurotium* ont produit un profil de métabolite commun, toutes les souches ont donné de grandes quantités de flavoglaucine, d'auroglaucine et d'isotétrahydorauroglaucine (**Fig. 21E-G**) ainsi que de néoéchinulines A et B (**Fig 21A-B**), l'échinuline, la prééchinuline, la néchinuline E (**Fig 21H-J**), l'épiheveadrine (**Fig 21C**) et questin (**Fig 21K**). *E. herbariorum* a produit de la cladosporine (**Fig 21D**) et un rendement très réduit d'épiheveadrine chez les souches d'*E. rubrum* testées. Les alcaloïdes de la dicétopipérazine et l'éphévadrine n'ont pas été détectés dans le mycélium, mais ont été trouvés dans le filtrat de culture. Cependant, la flavoglaucine, l'auroglaucine et l'isotétrahydorauroglaucine ont été trouvés uniquement dans les extraits mycéliens.

En effet, le genre *Eurotium* était initialement connu pour produire des pigments d'hydroquinone et une variété d'anthraquinones, comme le physcion et la questine. Ces derniers ont été détectés principalement dans le mycélium d'un certain nombre d'espèces d'*Eurotium*.

La questine a été isolée chez de nombreuses espèces d'*Aspergillus*, ainsi que des espèces de *Chrysosporium*, et *Microascus tardifaciens*.

L'échinuline a été découverte pour la première fois chez *E. echinulatum* et a été rapporté par la suite chez diverses souches d'*E. amstelodami*, *E. repens*. La néoéchinuline A a été apparue pour la première fois dans la littérature, comme un co-métabolite de la néochinuline B et d'autres néochinulines (C-E) chez *E. amstelodami* et aussi pour la néochinuline chez *E. amstelodami*.

Comme rapporté dans cette étude, la flavoglaucine et l'auroglaucine sont présentes chez diverses espèces d'*Eurotium*, mais l'isotétrahydroauroglaucine n'est présente que chez certaines souches. Les chémotypes des espèces d'*Eurotium* étudiées dans ce travail étaient cohérents avec des isolats provenant d'aliments, de sols salés et d'autres habitats. La cladosporine également connue sous le nom d'asperentin, a été initialement découverte chez *C. cladosporioides*. Aussi *E. repens* a été signalé comme un producteur de cladosporine. En revanche, Slack et al., (2009) ont constaté que la cladosporine était produite uniquement par *E. herbariorum*. L'épiheveadrine est le premier nonadrine découvert chez *Eurotium*, comme produit naturel. Il a été initialement signalé comme un produit synthétique et un diastéréoisomère de l'héveadrine, un métabolite fongique de *Helminthosporium heveae*. Il a présenté une forte activité antifongique contre *A. fumigatus*, *Penicillium marneffei*, *Trichophyton rubrum*, et *T. mentagrophytes*.

Il a été démontré que la néochinuline présente une activité cytoprotectrice. Une activité contre la mort des cellules PC12 induite par le peroxy-nitrite et la mort cellulaire induite par le SIN-1. Il a également démontré une activité antioxydante que le tocophérol, et une activité de piégeage des radicaux contre le diphénylpicryl hydrazyl (DPPH).

La flavoglaucine a été signalée comme étant faiblement cytotoxique pour les cellules. Il a démontré une activité antioxydante et a été signalé comme synergique avec le tocophérol. Les deux flavoglaucines et l'isotétrahydroauroglaucine ont montré une activité de piégeage des radicaux contre le DPPH.

La cladosporine a une activité insecticide, ainsi qu'une activité antibactérienne et antifongique. Elle inhibe également l'absorption d'uracile et de leucine dans les cellules de *Bacillus brevis*, et la croissance des coléoptiles de blé étioilé. Questin a une activité antibiotique et inhibe l'importation de nucléosides par une lignée cellulaire tumorale et dans les lymphocytes de souris.

A. insuetus, *A. calidoustus* et *A. pseudodeflectus*, ont produit des métabolites secondaires similaires. Tous ont produit des drimanes, les deux *A. calidoustus* et *A. insuetus* produisent des ophiobolines G et H, tandis que seul *A. calidoustus* a produit des austines, par rapport aux métabolites de type pergilline et à de nombreux métabolites inconnus biosynthétisés par *A. insuetus* et *A. pseudodeflectus*, respectivement.

Les TMC-120 ont été signalés pour la première fois comme des métabolites secondaires d'*A. ustus* isolés de la rhizosphère d'une herbe. Le TMC-120 B et les dérivés esters de la drimane ont été isolés de *A. pseudodeflectus*, et *A. ustus var. pseudodeflectus*, respectivement. Ceci conforte l'idée actuelle d'une relation biochimique entre ces espèces. Il existe peu de données de toxicité pour les composés TMC-120, mais ils ont été impliqués comme inhibiteurs modérés de la fonction éosinophile et comme agents anti-inflammatoires possibles.

Le TMC-120 B n'a pas inhibé la croissance des cellules cancéreuses, ni les polymérases testées.

Par ailleurs, la production des métabolites secondaires diffère significativement d'une souche fongique à l'autre ; qui est expliquée par un métabolisme secondaire spécifique qui varie entre les espèces voire entre les souches appartenant à la même espèce, et aussi quand elles avaient les mêmes conditions de culture et d'extraction.

Ce type de production se poursuit jusqu'à présent, vu l'intérêt accordé à ces molécules, qui est expliqué par le besoin en continu pour produire et extraire de nouvelles substances actives, afin de faire face l'émergence des différentes pathologies ainsi que la résistance des microorganismes pathogènes.

En effet, Stierle, A et Stierle, B (2015), ont montrés, plusieurs métabolites produits par des espèces fongiques, ayant des activités biologiques multiples, entre autres :

- La Brefeldine est un composé dont les activités antifongiques, antivirales et anticancéreuses ont été démontrées, et qui agit également comme un inhibiteur de transport de protéines. elle a été isolée de plusieurs espèces fongiques, notamment *Curvularia*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Phyllosticta*, *Penicillium* et *Cercospora*.
- La griséofulvine a été isolée de *Penicillium griseofulvum*, elle est actuellement utilisée comme agent antifongique administré par voie orale chez l'homme et l'animal contre les affections de la peau et des ongles induites par les champignons dermatophytes.

- Les polykétides séquoiatones A et B ont été isolés de l'endophyte *Aspergillus parasiticus* associé à l'écorce de *Sequoia sempervirens*. Les composés ont montré une inhibition modérée et sélective des cellules tumorales humaines, avec une plus grande efficacité contre les lignées cellulaires du cancer du sein.
- Les xylarénones A et B et l'acide xylarénique ont été isolés du champignon endophyte *Xylaria sp.* Ces composés ont été testés in vitro dans des essais antitumoraux et antimicrobiens, et ont montré des activités antitumorales modérées contre les cellules HeLa (lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus).
- L'enfumafungine est un nouveau glycoside triterpénoïde antifongique produit par *Hormonema sp.*, un champignon endophyte de *Juniperus communis*. Il a présenté une activité antifongique très puissante (in vitro) contre *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* et *Saccharomyces cerevisiae*.
- L'acide torrénique est une quinone dimérique inhabituelle, isolée à partir de *Pestalotiopsis microspora*, un endophyte de *Torreya taxifolia*. En général l'acide torrénique s'est avéré être 5 à 10 fois plus puissant que les autres composés contre les lignées cellulaires qui sont sensibles aux agonistes de la protéine kinase C, et il a été suggéré qu'il provoque la mort cellulaire par apoptose.

Par ailleurs, selon l'étude de Khan et al., (2020), les métabolites secondaires des microorganismes peuvent jouer un rôle antifongique contre les champignons phytopathogènes pour l'agriculture. Parmi les différents microorganismes, les espèces du genre *Trichoderma* sont les agents de biocontrôle les plus puissants utilisés aujourd'hui, car elles produisent une gamme variée de métabolites secondaires antimicrobiens. Les espèces de *Trichoderma* sécrètent une pléthore de métabolites dans leur voisinage tout en ayant des besoins nutritionnels minimes. Ces métabolites peuvent être utilisés à des fins agricoles, industrielles et médicales et sont donc importants pour les humains. Plusieurs *Trichoderma spp.* présentent des activités antifongiques contre les champignons phytopathogènes, dans lesquels différents groupes de métabolites secondaires, tels que les terpènes, les pyrones, la gliotoxine, la gliovirine et les peptaïbols, peuvent être impliqués :

- Les peptaïbols sont importants sur le plan écologique et commercial pour leurs propriétés antimicrobiennes et anticancéreuses, ainsi que pour leur capacité à induire une résistance systémique chez les plantes contre l'invasion microbienne. Ils sont de nature amphipathique et s'auto-assemblent pour former des canaux ioniques voltage-dépendants dans les membranes. Cette capacité est en grande partie responsable des

propriétés antibiotiques de ces composés. Ils sont produits, en grande partie par les membres du genre *Trichoderma*, et le premier peptaïbol découvert, l'alaméthicine F30, a été signalé par *Trichoderma viride*.

- La pyrone est un agent aromatique responsable de l'arôme de la noix de coco et a été signalée comme ayant des activités antifongiques et favorisant la croissance des plantes. Elle appartient au groupe chimiquement diversifié des métabolites de faible poids moléculaire ayant une pression de vapeur élevée à température ambiante et une faible solubilité dans l'eau. La pyrone a été découverte pour la première fois dans un bouillon de culture de *Trichoderma viride*. Cette molécule était également produite par *T. koningii* et *T. harzianum*.
- Un composé buténolide antifongique, l'harzianolide a été isolé de trois souches de *Trichoderma harzianum*. Le déhydro-dérivé de l'harzianolide a été obtenu à partir de *T. harzianum*. Un autre butanolide, le T39 butenolide disponible dans le commerce, a été produit par une souche de *T. harzianum*. Tous ces composés ont montré une activité antifongique contre *Gaeumannomyces graminis*. L'harzianolide a particulièrement inhibé la croissance de *Gaeumannomyces graminis* à 200 mg/ml, tandis que le T39 butenolide a inhibé la croissance de *Gaeumannomyces graminis* à 100 mg/ml. De plus, l'harzianolide et le T39 buténolide ont causé une inhibition de la croissance de *Pythium ultimum* et de *Rhizoctonia solani*.

Ces métabolites secondaires présentent une diversité de composés naturels, qui peuvent être dotés de propriétés pharmacologiques et antimicrobiennes marquées, vu que le problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques se pose de plus en plus. Alors, ces substances méritent d'être étudiées de façon approfondie afin de caractériser les activités biologiques des molécules nouvellement obtenues.

Conclusion

Conclusion

Ces dernières années, le succès des espèces fongiques en tant qu'agents thérapeutiques, est associé à la production d'un nombre excessif de métabolites secondaires, qui connaissent un intérêt croissant dans le domaine médical et dans l'industrie pharmaceutique. Les métabolites secondaires sont des composés non indispensables à la survie d'un organisme, mais synthétisés afin de lui conférer un avantage sélectif pour favoriser son développement. Ces produits naturels présentent donc des propriétés actives dont l'Homme peut tirer les bénéfices ou au contraire contre lesquelles il doit se protéger.

C'est dans ce cadre, que notre étude s'est intéressée à la production par fermentation des métabolites secondaires, à partir de certaines souches fongiques, ainsi de démontrer leur activité biologique.

- La culture des souches *Guignardia*, *Pestalotiopsis guepinii* et *Phomopsis sp* a été effectuée sur milieu ME à la température ambiante. L'extraction des métabolites secondaires résultant a été assurée par le solvant organique acétate d'éthyle. Quant à la purification de ces substances, une chromatographie sur couche mince (TLC) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont été réalisées.
- Les résultats obtenus ont montré que ces moisissures ont produit aux moins 11 métabolites secondaires, possédant des activités inhibitrices intéressantes, entre autres, antibactériennes contre *Actinomyces sp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et aussi antifongiques vis à vis *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium elatum*, *Geotrichum sp*, *Mycotypha sp*. et *Penicillium canadensis*. Ils se sont aussi avérés capables d'inhiber la croissance des actinomycètes.
- D'autre part, les souches *Eurotium amstelodami*, *E. herbariorum*, *E. rubrum*, *Aspergillus calidoustus* et *A. insuetus*, ont été cultivées sur milieu CY à 25 °C. L'extraction a été assurée par l'acétate d'éthyle, suivie d'une purification par chromatographie sur couche mince (prep-TLC) et par des colonnes d'extraction en phase solide.
- L'analyse des résultats a révélé la présence de 11 métabolites secondaires dans les extraits des souches *Eurotium amstelodami*, *E. rubrum* et *E. herbariorum*. Par contre, 6 métabolites secondaires ont été caractérisés dans les extraits d'*Aspergillus insuetus* et d'*A. calidoustus*. Ces métabolites ont montré d'importantes activités biologiques à savoir, la néochinuline à activité cytoprotectrice, la flavoglaucine, qui a montré une

- activité antioxydante, la cladosporine avec une activité insecticide, ainsi que des activités antibactériennes et antifongiques et la questin qui avait aussi une activité antibiotique.

Au vu des études actuelles, la majeure partie des métabolites secondaires fongiques restait à découvrir. Etant donné le grand nombre des différents organismes producteurs (champignons, bactéries, plantes...), ces substances naturelles représentent donc, une source très importante pour la découverte de molécules bioactives.

Références bibliographiques

Abu-Seidah A.A. (2003). Secondary metabolites as comarkers in the taxonomy of *Aspergilli*. *Acta.Microbiologica.Polonica*. 52 : 15-23.

Anderegg, R.J., Bieman, K., Buchi, G., Cushman, M. (1976). Malformin C, a new metabolite of *Aspergillus niger*. *J Am Chem Soc* 98, 3365-3370 .

Aref M. (2015). Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf). Mémoire de master : Biochimie appliquée. Université echahid hamma lakhdar d'el-oued. p: 13.

Bennaïm,O., Daïfallah,F.(2020). Champignons endophytes : un puissant agent de lutte biologique et un réservoir de métabolites secondaires bioactifs.Memoire de master : Microbiologie appliquée. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.46p.

Benslama A. (2016). Substances d'origine végétale. Polycopié de cours. Département des sciences de la nature et de la vie . Université Mohamed khider-biskra.

Benyerbah,A., Aliguechi,A. (2021). Extraction des métabolites secondaires bioactifs de la moisissure *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé. Mémoire de master : Mycologie et Biotechnologie Fongique. Université des Frères Mentouri Constantine.72p.

Berger savin M.C.E. (2014) la phagotherapie: historique et potentielle utilisation contre les infections a bactéries multirésistantes, Thèse de doctorat, faculté de medecine deCréteil.

Bezzaz, N. (2014). Détermination structurale des métabolites secondaires, et extraction des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia*. Mémoire de magistère : chimie organique.M' sila :Université de M SILA.Algérie.p :14.

Botton, B., Bretton, A., Fever M., Gautier, S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond, P.,Sanglier, JJ., Vayssier, Y and Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importanceindustrielle , (edn) Masson, Paris.

Boukhari,A., Lagraa, N .(2020). L'emploi des métabolites secondaires fongiques dans la lutte contre les maladies des plantes.Mémoire de master : protection des végétaux. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.p26.

Brady, S. F, Clardy J. (2000). A new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products* 63: 1447-1448.

Boudjouref, M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister En Biochimie. Université Ferhat Abbes, Sétif. Algérie. p : 9-28.

Bourgaud,F., Melesi,S., Gravot,A., Gontier,E. (2001). Production of plant secondary metabolites : a historical perspective .*Laboratoire agronomie et environnement*,161,839-851.

Chandra, Sh. (2012). Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Biotechnol* 95, 47–59.

Crozier A., Jaganath Ib., Clifford Mn. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, editors. *Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and Role in the human diet*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p: 1–24.

Daayf F., Lattanzid V. (2008). *Recent Advances in Poly phenol Research* 1; Ed: Wiley-Blackwell.31:1- 24.

Deshmukh, S. K., Gupta M.K ., Prakash V ., Saxena S. (2018). .Endophytic fungi : A SourceOf Potential Antifungal Compounds. *Journal of fungi*, 4, 1-42.

Devi, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K.L., Kour, D., Yadav, N., Yadav, A.N., Saxena, A.K. (2020). Chapter 9 - Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health, in: Rastegari, A.A., Yadav, A.N., Yadav, N. (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 147–161.

Dickinson, J.M., Hanson, J.R., Hitchcock, P.B, Claydon, N. (1989). Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1:1885–1887.

DONATIEN.K. (2009) Enquete ethnobotanique de six plantes médicinales Malliennes – Extraction Identification d’alcaloïdes –Caractérisation, Quantification de polyphénols : Etude de leur Activité Antioxydant. Thèse de doctorat : Chimie organique. Université Paul Verlaine de METZ–UPV-M. France. p: 24-65.

Elsässer, B., Krohn, K., Flörke, U., Root, N., Aust, H.-J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S., Kurtán, T.(2005). X- ray Structure Determination, Absolute Configuration and Biological Activity of Phomoxanthone A. *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 4563–4570. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200500265>.

Elvidge, J. A.,Jaiswal, D.K., Jones, J.R. and Thomas, R. (1977). Tritium nuclear magnetic resonance spectroscopy. Part 7. New information from the tritium distribution in biosynthetically labelled penicillic acid. *J Chem Soc Perkin Trans* 1, 9, 1080-1083.

Fialho, M.B., Toffano, L., Pedroso, M.P., Augusto, F., Pascholati, S.F.(2010). Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 925–932.

Filténborg, O.,Frisvad, J.C. and Svendsen, J.A. (1983). Simple screening method for moulds producing intercellular mycotoxins in pure cultures. *Appl Environ Microbiol* 45,581-585.

Forbey,S.J et al .(2009).Exploitation of secondary metabolite by animals : a response to homeostatic challenges.Integrative and comparative biology , 49(3), 314-328.

Gimenez C., Cabrera R., Reina2. M and González-Coloma. A.(2007). Bentham Science Publishers Ltd. Fungal Endophytes and their Role in Plant Protection.current organic 28006.

Gautam, A., Avasthi, S.,(2019). Fungal Endophytes: potential biocontrol agents in agriculture. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817004-5.00014-2>.

Gautam, A., Kant, M., Thakur, Y.(2013). Isolation of endophytic fungi from Cannabis sativa and study their antifungal potential. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 46. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.749696>.

Ghisalberti, E., Rowland, C.Y. (1993). Antifungal Metabolites from Trichoderma harzianum. Journal of Natural Products, 56(10): 1799-1804.

Guo B., Wang S., Sun X., Tan . K.(2006). Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review1. A Biochem Microbiol., 44: p136–142.

Harrar,A. (2012).Activités antioxydante et antimicrobienne d’extraits de Rhamnus alaternus Le Diplôme de Magister Biochimie et physiologie expérimentale. Université Ferhat Abbes-Sétif. 8-31.

Harris, D.R.(1998). The spread of Neolithic agriculture from the Levant to western central Asia.In: Damania A. B., Valkoun J., Willocox G and Qualset C. O. (eds). The origine of Agriculture and Crop Domestication. ICARDA, Aleppo, Syria, pp.54-64.

Hellwig.V., Grothe.T., Mayer.B.A., Endermann. R., Geschke.F. U., Henkel. T., AND Stadler. M.A.(2002). a new antibiotic from cultures of endophytic Alternaria spp. Taxonomy, fermentation,isolation, structure elucidation and biological activities. J. Antibiot. 55(10): pp 881-892.

Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D.H., Huang, H.C. (2011). Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of Candida intermedia. Phytopathology 101, 859–869.

JOSE, S., DALBOLEN,A et al.(2016). Terpènes: Natural Products for ControllingInsects of Importance to Human Heath A Structure-Activity Relationship Study. Hindawi Publishing Corporation,17(2)3-5.

Rodrigues,K.F., Hesse,M., Werner,C.(2000). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from Spondias mombin. Journal of Basic Microbiology. 40(4) 261 –267.

Karabin, M., Tereza Hudcova., Lukas Jelinek et Pavel Dostalek. (2015). Biotransformationsand biological activities of hop flavonoids. Department of Biotechnology, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of

Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic.

Kaul S., Gupta S., Ahmed M., &Dhar M.K. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews.*, 11:487-505.

KEBILI,Z .(2016). Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de Ephedraalata de la région d'Ouargla. Mémoire de magister : Biologie. Ouargla: Université Kasdi Merbah. Algérie.p :21.

Keller,N.,Turner,G.(2005).Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics.Nature reviews microbiology, 3,937-947.

Keszler, A., forgacs, E., Kotai, I., Vizcaino, J.A., Garcia-Acha, I. (2000). Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectroscopy. *J Chromatograph Sci*, 38 :421-424.

Khan,R et al .(2020).Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp against phytopathogenic fungi. *Plant Microbe Interactions.*8(6) 817.

Kitouni M. (2007). Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat .Microbiologie appliquée. Université Mentouri de Constantine, Algérie. 176.

Kissoum A., Khalfaoui K. (2015).Evaluation phytochimique et étude des activités biologiques d'une plante médicinale Algérienne (*Foeniculum vulgare*). Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Maste.34-35p.

Kumar, A., Asthana, M., Gupta, A., Nigam, D., Mahajan, S. (2018). Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Penicillium*, in: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. p 47–68.

Ladjel,Y., Benkhaled,H.(2016/2017). Activité antifongique des métabolites secondaires de quelques espèces de *Trichoderma sp .*, isolées de rhizosphère de pois chiche (*Cicer areitinum* L) dirigées contre *Fusarium oxysporum F.sp.ciceris* agent de la fusariose vasculaire.Mémoire :phytopathologie .Bordj bouarreridj. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy.p49.

Lamarti A., Badoc A., Deffieux G et Carde J. (1994). Biogénèse Des Monoterpènes La Chaîne Isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 133 : 79 –99.

Larpant J. P., Larpant-Gourguand M. (1996). Mémento Technique de microbiologie, 2ème édition.Technique et Documentation. Lavoisier.

- Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielsen, K. F., Hansen, M. E AND Frisvad, J. C.** (2005). Phenotypictaxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports*. 22: pp 672-695.
- Lim, C., Kim, Jiyoung, Choi, J., Ponnusamy, K., Jeon, Y., Kim, S.-U., Kim, Jeong, Lee, C.**(2010). Identification, Fermentation, and Bioactivity Against *Xanthomonas oryzae* of Antimicrobial Metabolites Isolated from *Phomopsis longicolla* S1B4. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 494–500. <https://doi.org/10.4014/jmb.0909.09026>.
- Lopes, M.R., Klein, M.N., Ferraz, L.P., da Silva, A.C., Kupper, K.C.**(2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. *Microbiol. Res.* 175, 93–99.
- Lou, J., Yu, R., Wang, X., Mao, Z., Fu, L., Liu, Y., Zhou, L.** (2016). Alternariol 9-methyl ether from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01 and its bioactivities. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 47, 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.004>.
- Lounas, I., Lounas,F.**(2020). Evaluation du potentiel antimicrobien d'*Aspergillus terreus*.Mémoire de master : Microbiologie. UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA-I.55p.
- Li, M.-F., Li, G.-H., & Zhang, K.-Q.** (2019). Non-Volatile Metabolites from *Trichoderma* spp. *Metabolites*, National Library of medicine (3), 58.
- Li, Y.T., Hwang, S.G., Huang, Y.M., Huang, C.H.** (2018). Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. *Crop Protection*, 110: 275–282.
- Liu C. H., Zou W. X., Lu H. et Tan R. X.**(2001). Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*, 88: 277-282.
- Mansour,M.,Mazzi,Y.**(2017). Recherche de l'activité antibactérienne des souches du genre *Aspergillus*.Memiore de master . Université des Frères Mentouri Constantine.p44.
- Mathivanan, N., Prabavathy, V.R., Vijayanandraj, V.R.** (2008). The effect of fungalsecondary metabolites on bacterial and fungal pathogens, in: *Secondary Metabolites in SoilEcology*. Springer, p. 129–140.
- Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M.**(2005). Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast* 22, 1133–1142.
- Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M.K., Upadhyay, R.S.**(2017). Antagonistic assessment of *Trichoderma* spp. by producing volatile and non-volatile compounds against different fungal pathogens, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, DOI: 10.1080/03235408.2017.1357360.

- Messioughl. M.** (2010). Analyse des substances actives "les flavonoïdes" et action antibactérienne d'une fabacée à intérêt médicinal "Medicagosativa.L." cultivée sur des sols du Nord-Est algérien. Mémoire de magistère : Physiologie des Plantes Médicinales. Annaba :Université Badji Mokhtar. Algérie. p: 25.
- Moutassem Dahou, Lakhdar Belabid et Yuva Bellik.** (2020). Efficiency of secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Fusarium* wilt in chickpea. *J. Crop Prot.* 2020, 9 (2): 217-231.
- Oh, S-U., Lee, S.J., Kim, J.H ., Yoo, I.D.**(2000). Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B and C from *Trichoderma atroviride*. *Tetrahedron Letters*, 41: 61–64.
- Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., Comitini, F.** (2017). Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus* , *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *Int. J. Food Microbiol.* 265. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2017.10.027>.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G.**(2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* 47, 85–92.
- Pedro, M aqueveque, Carlos, L Cespedes, Isao Kubo, David, S., Seigler and Olov Sterner.** (2017). New bioactive molecule Product bay fungus (1) : 5-18.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R.A., Del Cerro, P., Espuny, M.R., JiménezGuerrero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Cubo, T.**(2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiol. Res.* 169, 325–336.
- Pimentel M. R., Molina G., Dionisio A. P., Marostica. Junior. M. R AND Pastore. G. M.**(2011). The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int.*
- Pitt J.I.**(2000), Toxigenic fungi and mycotoxins *Br.Med.Bull.*,56(1),184-192.
- Ruiz.B et al .**(2009).Production of microbial secondary metabolites : Regulation by the carbon source .*Critical Reviews in Microbiology*,36(2),146-167.
- Selim K., Elkhateeb W., Tawila A., El-Beih A., Tahany A., El-Diwany A., Eman F.A.**(2018).Antiviral and Antioxidant Potential of Fungal Endophytes of Egyptian Medicinal Plants.*Fermentation*.4, 1-11.

Shu R. G., Wang F. W., Yang Y. M., Liu Y. X. and Tan R. X. (2004). Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium* sp. IFB-121, an endophytic fungus in *Quercus variabilis*. *Lipids*; 39: 667-673.

Slack, G et al . (2009). Secondary metabolites from Eurotium species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *mycological research*. 13 : 480 – 490.

Singh, R., Dubey AK. (2015). Endophytic actinomycetes as emerging source for therapeutic compounds. *Indo Global Journal of pharmaceutical sciences*, 5, 106-116.

Singh, B et al. (2019) .Editorial: Microbiol secondary metabolites: recent developments and technological challenges .*Fontiers in microbiology* 10(914).

Song Y. C., Li H., Ye Y. H., Shan C. Y., Yang Y. M. and Tan R. X. (2004). Endophytic naphthopyronem metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters*; 241: 67-72.

Stierl, A., Stierl, B. (2015). Bioactive Secondary Metabolites Produced by the Fungal Endophytes of Conifers. *Natural Product Communications*. 10(10) 1671 – 1682.

Strobel G. et Daisy B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 491-502.

Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67: 257-268.

Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi J et Hilali, A. (2015). Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L). *Mater. Environ. Sci* , 6, 1111-1117.

Touseef A. (2006). Endophytic Fungi harbored in nothapodytes Foetida Plants. University Aligarh (India). 1-135.

TePaske, M.R.; Gloer, J.B.; Wicklow, D.T. and Dowd, P.F. (1990). Aflavazole : An antiinsectin carbazole metabolite from the sclerotia of *Aspergillus flavus*. *J Org Chem*, 55, 5299-5301.

Twaij, B., Hasan, N . (2022). Bioactive secondary metabolites from plant sources : typessynthesis , and thier therapeutic uses. *international journal of plant biology* , 13, 4-14.

Vasundhara, M., Reddy, M., Kumar, A. (2019). Secondary Metabolites From Endophytic Fungi and Their Biological Activities. pp. 237–258. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00018-9>.

Venkateswarulu, N., Shameer, S., Bramhachari, P.V., Basha, S.K.T., Nagaraju, C., Vijaya, T. (2018). Isolation and characterization of plumbagin (5- hydroxyl- 2-methylnaptalene-1,4- dione) producing endophytic fungi *Cladosporium delicatulum* from endemic medicinal plants: Isolation and characterization of plumbagin producing endophytic fungi from endemic medicinal plants. *Biotechnol. Rep. Amst. Neth.* 20, e00282–e00282. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00282>.

Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E., Lorito, M., Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 143–8. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01939.x>.

Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S., Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 705–711. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02599.x>.

Vizcaino, J.A.; Sanz, L.; Cardoza, R.E.; Monte, E. & Gutierrez, S. (2005) Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. *FEMS Microb. Lett.* 244 : 139–148.

Walton N., Brown D. (1999). *Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products*; Ed: world scientific. 43:1-14.

YANG B; LINKO A et al. (2006). Secoisolariciresinol and matairesinol of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different subspecies and harvesting times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54 (21):8065-8070.

Yao L., Jiang Y., Shi J., Tomas B., Datta N., et al. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods Hum Nutr.* 59: 113-122.

Zain, M.E., Awaad, A.S., Al-Othman, M.R., Alafeefy, A.M., El-Meligy, R.M. (2014). Biological activity of fungal secondary metabolites. *Int. J. Chem. Appl. Biol. Sci.* 1, 14.

Zerroug A. (2011). Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk), 89.

Zhang, Y et al. (2021). Phylogenetic patterns suggest frequent multiple origins of secondary metabolites across the seed plant "tree life". *National science review.* v : 8.

Zhang, H., Song Y. C., Tan R. X. *Biology and chemistry of endophytes.* (2006). *Natural Product Reports* ; 23: 753-754.

Annexes

Annexes

La composition de milieu ME

-Extrait de malt : 20g/l

-Peptone :1g/l

-Glucose : 20g/l

La composition de milieu CY

Saccharose: 30 g/l

K_2HPO_4 : 1 g/l

extrait de levure : 5 g/l

$MgSO_4$: 0,5 g/l

$NaNO_3$: 3 g/l

$FeSO_4$: 0,01 g/l

KCl: 0,5 g/l

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BOUZID Bouthaina
GHERBI Imane
BOUCEKKINE Samah

Activités biologiques des métabolites secondaires d'origine fongique

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Résumé

Les champignons microscopiques sont actuellement considérés comme une riche source des nouveaux métabolites secondaires biologiquement actif pour faire face la résistance des microorganismes pathogènes. Notre recherche a pour objectif d'étudier la production des métabolites secondaires par certaines espèces fongiques et démontrer leur activité biologique. La production de ces métabolites par fermentation de souches fongiques *P.guepinii* et *Phomopsis* sp (souche 1) pendant sept jours sur milieu liquide d'extrait de malt (ME), et 10 jours pour les souches *Guignardia* sp et *Phomopsis* sp (souche 2) cultivées sur le milieu liquide czapek yeast (CY). Les flacons de culture sur milieu ME ont été incubés à 110 rpm sur un agitateur rotatif à la température ambiante avec une photopériode de 12 heures sous des lampes fluorescentes. Pour le deuxième milieu CY, les cultures ont été incubées à 25 °C pendant deux semaines dans l'obscurité. L'extraction est effectuée par l'acétate d'éthyle (EtOAc), suivie d'une purification par chromatographie sur couche mince (TLC) et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). la purification de tous les métabolites d'*Eurotium* a été réalisée par prep-TLC, et les métabolites d'*A.calidoustus* ont été purifiés par des colonnes d'extraction en phase solide. Les résultats montrent que *Guignardia* a produit au moins cinq métabolites, par contre, les souches 1 et 2 de *Phomopsis* ont données trois métabolites. Les résultats ont également montré que *Eurotium amstelodami*, *E. Herbariorum* et *E. rubrum* produisent 11 métabolites secondaires et *Aspergillus calidoustus*, *A.insuetus* produisent 6 métabolites. A la lumière de ces résultats, les moisissures utilisées semblent intéressantes pour la production d'une variété de métabolites secondaires à activités biologiques multiples. De ce fait, elles constituent des agents à potentiel biologique efficace, qui peuvent par conséquent contourner le problème de la résistance microbienne aux agents thérapeutiques.

Mots-clefs : Métabolites secondaires, champignons microscopiques, activité biologique, agents thérapeutiques, HPLC, TLC.

Encadreur : Mme LEGHLIMI Hind (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Melle. ABDELAZIZ Ouided (MCB-Université Frères Mentouri, Constantine1).

Examineur 2 : Mme LABBANI Fatima-Zohra Kenza (MCA-Ecole Normale Supérieure Assia Djebar de Constantine).