



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département: Microbiologie

قسم: الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

Production de molécules à activité anti-cancéreuse par le champignon endophyte *Taxomyces andreanea*

Préparé par : *BELHAMRA Esma*

BENBOUZID Nour El Houda

Le : 18/07/2021

Jury d'évaluation :

Président du jury	Melle. ABDELAZIZ O.	M. C. - UFM Constantine 1.
Promotrice :	Melle. BELMESSIKH A.	M. A. - UFM Constantine 1.
Examinatrice :	Mme. MERGOUD L.	M. A. - UFM Constantine 1.

*Année universitaire
2020- 2021*

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force, le courage, la volonté ainsi que la patience pour dépasser toutes les difficultés.

*Nos premiers remerciements vont à notre encadreur **Melle. BELMSIKH Aicha M. A.** - UFM Constantine 1 pour avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir suivi tous au long de la réalisation de ce mémoire et pour ses précieux conseils.*

*Nous exprimons toute notre reconnaissance à **Melle. ABDELAZIZ Ouidad M. C.** - UFM Constantine 1 pour avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous remercions vivement **Mme. MERGOUD Lilia M. A.** - UFM Constantine 1 d'avoir accepté de juger ce mémoire de master.*

*Nous voudrions également rendre un hommage particulier à **Melle. BOUCHLOUKHE Warda M. C.** - UFM Constantine 1 pour son caractère, ces qualités humaines et professionnelles.*

*Nos remerciements s'adressent également à **Mr. BOULHROUF Khaled M. C.** - UFM Constantine 1.*

Nous tiendrons à remercier tous ceux qui ; D'une façon ou d'une autre, nous ont aidé pendant notre travail de mémoire... Certains par leur conseil et leur connaissance scientifique... d'autres par leur soutien et leur présence dans les moments les plus pénibles.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à des êtres qui me sont très chers, et sans lesquelles je n'aurais jamais atteint le stade où je suis actuellement

A mes chères parents Houria et Abd Elghani

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect mon amour et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle

A ma sœur MAROI et mes grands frères NACER, HAMZA et SOFIANE, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, que je porte pour vous

A ma nièce RAWAN et mes neveux AMIR, YOUSSEF et NAZIM

A mon binôme NOURELHOUDA

BELHAMRA ESMA

Dédicace

Je dédie Ce modeste travail :

A l'âme de mes grands-parents.

Aux personnes qui comptent le plus pour moi, qui ont été présentes et j'espère y resteront tout au long de mon parcours.

*A mes très chers parents **NASSIMA** et **YASSINE** la source de mon bonheur, en témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma formation et qui m'ont toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour, sans vous je ne serai jamais arrivée jusque-là. Je ne vous remercierais jamais assez pour tous ce que vous avez faits encore pour moi.*

*A ma sœur et ma meilleure amie **ABIR**, pour leur soutien et encouragement.*

*A mes chers frères **IBRAHIM EL KHALIL** et **SOUHAIB**.*

*A mes meilleurs cousines **SAFA** et **MARWA**.*

*A ma copine **WAFÀ***

*A mon biome **ESMA BELHAMRA**.*

A mes proches et toute ma famille.

BENBOUZID NOUR ELHOUDA

TABLE DES MATIERES

المُلخَص

Résumé

Abstract

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION	1
--------------------	---

CHAPITRE 01: Généralités

1	Généralités sur les mycètes	3
1.1	Les mycètes.....	3
1.2	Phylogénie	3
1.2.1	Microsporidia	4
1.2.2	Chytridiomycota.....	4
1.2.3	Glomeromycota.....	5
1.2.4	Zygomycota.....	5
1.2.5	Dikarya.....	5
1.2.5.1	Ascomycota.....	5
1.2.5.2	Basidiomycota.....	6
1.3	Modes de vie	6
1.3.1	Le saprophytisme	6
1.3.2	Le parasitisme	6
1.3.3	Le symbiotisme	7
1.3.4	L'endophytismes	7
2	Généralités sur le cancer	8
2.1	Définitions	8
2.2	Les traitements du cancer.....	9
2.2.1	La chirurgie	9
2.2.2	La radiothérapie.....	10
2.2.3	L'hormonothérapie.....	10
2.2.4	L'immunothérapie.....	10

2.2.5	La chimiothérapie.....	10
2.2.6	La mycothérapie.....	10
2.3	Les organismes d'intérêt thérapeutique.....	11
2.3.1	Les bactéries.....	11
2.3.2	Les champignons macroscopiques.....	13
2.3.3	Les champignons microscopiques.....	14

CHAPITRE 02: Les champignons endophytes

1	Définitions.....	16
2	Historique.....	16
3	La diversité.....	17
4	La classification.....	17
4.1	Classe 01.....	18
4.2	Classe 02.....	19
4.3	Classe 03.....	19
4.4	Classe 04.....	19
5	Mode de reproduction et de transmission.....	20
5.1	Croissance végétative des hyphes.....	20
5.2	Croissance par biais des spores.....	21
5.3	Mode de reproduction.....	22
6	Interaction plante – endophyte.....	22
6.1	Etape de formation de l'interaction.....	22
6.2	La nature de l'interaction plante/champignons endophytes.....	23
7	L'importance des endophytes.....	24
8	Les métabolites secondaires.....	25
8.1	Les alcaloïdes.....	25
8.2	Les terpènes.....	26
8.3	Les polycétides.....	27
8.4	Le peptide non ribosomique.....	28
9	Les activités biologiques des métabolites secondaires des endophytes.....	28
9.1	Activité antibactérienne.....	28
9.2	Activité antioxydante.....	29
9.3	Activité antivirale.....	30

9.4	Activité antifongique	31
9.5	Activité anticancéreuse	31

CHAPITRE 03 : Production du Taxol par *Taxomyces andreanae*

1	Définitions du Taxol.....	35
2	La structure chimique de Taxol.....	35
3	Mécanisme d'action	36
4	Production du Taxol par <i>Taxomyces andreanae</i>	38
4.1	Historique.....	38
4.2	Définitions de l'espèce <i>Taxomyces andreanae</i>	39
4.3	Méthodes d'isolement.....	40
4.4	Méthodes d'identification	42
4.4.1	Observation des caractères cultureux macroscopiquement.....	42
4.4.2	Observation des caractères morphologiques microscopiquement	42
4.5	Culture de <i>Taxomyces andreanae</i> et production de Taxol	44
4.5.1	Identification du Taxol	44
4.5.2	Confirmation de l'origine de Taxol.....	46
4.5.3	Quantités de Taxol produites.....	46
5	La production à grande échelle	46
5.1	Limites	47
5.2	Améliorations.....	48
6	L'activité biologique du Taxol <i>in vitro</i>	50
7	L'efficacité du Taxol (paclitaxel) <i>in vivo</i>	51
7.1	Méthode d'analyse	52
7.2	Résultats.....	52
7.3	Conclusion des résultats.....	53
	CONCLUSION	54
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	56
	ANNEXES	

الملخص

الهدف من هذا المسعى هو دراسة إنتاج الجزيئات الفطرية ذات الخاصية المضادة للسرطان باعتباره السبب الرئيسي للوفاة و نظرا لطرق علاجه التي لا تخلو من الآثار الجانبية، و هذا ما جعلنا نبحث عن جزيئات ذات خصائص مضادة للسرطان من مصادر طبيعية، مثل التاكسول الذي ينتجه الفطر الداخلي *Taxomyces andreanae* المرتبط بالنبات العائل *Taxus brevifoli*. من خلال هذا العمل واستناداً إلى الدراسات السابقة التي أجراها علماء باحثون ، تعاملنا نظرياً مع عملية إنتاج التاكسول بالتقنيات البيولوجية ؛ التحليل الطيفي ، الاختبار مناعي و HPLC، والتي أكدت التشابه بين تاكسول النبات وتاكسول الفطر ، وكذلك اختبار النشاط البيولوجي في المختبر الذي أظهر فعالية التاكسول الفطري ضد جميع الخلايا السرطانية ، و نظرا لقلة مردودية إنتاجه فهذا يتطلب تحسين الإنتاج. على ضوء هذه النتائج نؤكد امكانية إنتاج جزيئات ذات أصل فطري والتي لها نشاط مضاد للسرطان.

الكلمات المفتاحية: السرطان، الفطريات داخل النباتات ، عامل مضاد للسرطان، تاكسول، نواتج

الأبيض الثانوية.

Résumé

L'objectif de cette démarche est d'étudier la production des molécules d'origine fongique d'intérêt anticancéreux vu que le cancer est la principale cause de mortalité ainsi que leurs thérapeutiques ne sont pas dénuées d'effets secondaires, ce qui a orienté la recherche vers des molécules aux propriétés anticancéreuses issues de source naturelle, tel que le Taxol produit par le champignon endophyte : *Taxomyces andreanae* associé à la plante hôte *Taxus brevifolia*. A travers ce travail et en se basant sur les études précédentes des chercheurs scientifiques, nous avons traité théoriquement la production et l'identification du Taxol par techniques biologiques ; spectroscopiques, immunologiques et l'HPLC, qui ont confirmé la similitude entre le Taxol de la plante et celui du champignon. En outre, le test de l'activité biologique *in vitro* a montré l'efficacité de Taxol fongique contre toutes les cellules tumorales, malgré son faible rendement qui nécessite une amélioration de production. A la lumière de ces résultats nous affirmons la possibilité de la production des molécules d'origine fongique à activité anticancéreuse.

Mots clés : Cancer, champignons endophytes, agent anticancéreux, Taxol, métabolites secondaires.

Abstract

The objective of this approach is to study the production of molecules of fungal origin of anticancer activity since cancer is the main cause of death and their treatments are not devoid of side effects, which has directed research towards molecules with anticancer properties from natural sources, such as Taxol produced by the endophytic fungus *Taxomyces andreanae* associated with the host plant *Taxus brevifolia*. Through this work and based on previous studies by scientific researchers, we have theoretically dealt with the production and identification of Taxol by biological techniques; spectroscopies, immunological and HPLC, which have confirmed the similarity between the Taxol of the plant and the Taxol of the fungus, as well as the test of the biological activity in vitro which showed the effectiveness of fungal Taxol against all tumor cells, despite its low yield which requires an improvement in production. In the light of these results, we confirm the possibility of the production of molecules of fungal origin with anticancer activity.

Key words: Cancer, endophytic fungi, anticancer agent, Taxol, secondary metabolites.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 01	Les différences entre les cellules malignes et les cellules bénignes [21].	09
Tableau 02	Présentation de quelques espèces de macro-champignons médicinaux et de leurs propriétés anti tumorale.	13
Tableau 03	Critères symbiotiques qui caractérisent les classes des champignons Endophytes [52].	17
Tableau 04	Répartition des terpénoïdes d'intérêt thérapeutique selon leur structure [89].	27
Tableau 05	Exemples de polycétides d'intérêt thérapeutique [3].	27
Tableau 06	Quelques molécules d'origine endophytes à activité anticancéreuse.	32
Tableau 07	Rendement de production du paclitaxel par des souches fongiques [141] .	47
Tableau 08	Les stratégies utilisées pour améliorer le rendement.	49
Tableau 09	L'activité anticancéreuse de paclitaxel fongique contre divers lignées cellulaires cancéreuses [152].	51

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 01	Classification phylogénétique du règne <i>Fungi</i> [6].	04
Figure 02	Un schéma qui représente le symbiotisme et l'endophytisme des champignons endophytes.	07
Figure 03	Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisées [3].	20
Figure 04	Représentation schématique du cycle de vie des champignons endophytes du genre <i>Neotyphodium</i> [64].	21
Figure 05	Mode de transmission des champignons endophytes [67].	22
Figure06	Développement symbiotique d'endophytes fongiques [70].	23
Figure 07	Voie de biosynthèse simplifiée des alcaloïdes indoliques [3].	26
Figure 08	Représentation schématique d'une NRPS [92].	28
Figure 09	Structure des substances antibactériennes produites par les champignons endophytes [95].	29
Figure 10	Structure de certaines molécules antioxydants produites par les champignons endophyte [100].	30
Figure 11	Structure de l'acide cétonique A et B [102].	30
Figure12	Structure de la cryptocandin A [105].	31
Figure 13	Structure chimique du paclitaxel [123].	35
Figure 14	Polymérisation d'un microtubule [126].	36
Figure 15	Stabilisation de la formation des microtubules au profit de la forme tubuline par le paclitaxel [124].	36
Figure 16	Devenir d'une cellule en présence d'une molécule antiméiotique comme le paclitaxel [125].	38
Figure 17	Photographie de la plante <i>Taxus brevifolia</i> [132].	40

Figure 18	Technique d'isolement des champignons endophytes [133].	41
Figure 19	Culture dans une boîte pétrie du champignon <i>Taxomyces andreanae</i> [133].	42
Figure 20	Photo de l'espèce <i>Taxomyces andreanae</i> sous microscopie électronique [133].	43
Figure 21	Spectre de masse du Taxol de champignon (A) et du taxol d'if (B). [128].	45

Liste des abréviations

ACEE	Antigène carcino-embryonnaire
ADN	AcideDésoxyribonucléique
ARN	Acideribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
ATSO	<i>Antitumor Polysaccharide Oral</i>
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
ED	<i>Effective dose</i>
EMS	Méthane Sulfonâtes D'éthyle
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony-Stimulating Factor</i>
GTP	Guanosine Triphosphate
HA	<i>Habitat-adapted</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPP	Isopentyl PyroPhosphate
KB	<i>Ubiquitous KERATIN-forming tumor cell line HeLa.</i>
NHA	<i>Non-habitat-adapted</i>
Ng	Nanogramme
NRPS	Non ribosomal peptide synthases
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PS	Parasporines
PSK	<i>Polysaccharide Krestin</i>
PSP	<i>Polysaccharide Peptide</i>
Rf	Rapport Frontal
RPSP	<i>Refined Polysaccharide Peptide</i>
SBR	<i>Sequencing Batch Reactor</i>
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor, TNFα</i>
TNP	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TS	Thymidylate Synthase
UV	Ultraviolet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

Le cancer considéré comme la maladie du siècle, elle constitue la deuxième cause de mortalité dans le monde. En Algérie, environ 50.000 nouveaux cas de cancer et pas de moins de 20.000 décès ont été enregistrés en 2019. Il s'agit d'une transformation de cellule normale en cellule tumorale, qui met en jeu les facteurs environnementaux, le mode de vie de l'individu et son comportement qu'il soit alimentaire ou qu'il soit dans la manière de vivre. Cette maladie est difficile à traiter puisqu'il faut lutter contre les cellules mêmes du patient. Il s'agit de détruire les cellules tumorales sans endommager les cellules saines, ce qui est très complexe. La prise en charge des patients atteints du cancer a connu une meilleure maîtrise des protocoles thérapeutiques en allant de la chimiothérapie cytotoxique, la chirurgie et la radiothérapie de base vers la découverte innovante de l'hormonothérapie, de l'immunothérapie et de la mycothérapie.

Malencontreusement, des effets indésirables ont accompagné cette révolution thérapeutique. En plus de l'inefficacité de certaines chimiothérapies utilisées pour traiter certains cancers, l'accès limité à ces chimiothérapies anticancéreuses ainsi le coût élevé rend la recherche de nouvelles molécules naturelles intéressante et importante. À l'heure actuelle, les microorganismes qui sont à l'étude.

Parmi ces microorganismes, les champignons endophytes qui sont des microorganismes endosymbiotiques vivent à l'intérieur d'une plante hôte durant leur cycle de vie. Ont reçu un énorme intérêt et se sont révélés être une bonne source de molécules naturelles bioactives de diverses structures telles que, les polycétides, les terpénoïdes et les stéroïdes, possédant un large spectre d'activité biologique comprenant des composés antibiotiques, antifongiques et agents anticancéreux. Evoquons ici le cas du Taxol : il a été découvert que le Taxol, un agent antitumoral, depuis toujours extrait de l'arbre *Taxus* (If), est en réalité produit par des champignons endophytes : *Taxomyces andreanae* qui est isolé du bois de l'If *Taxus brevifolia*.

L'objectif de cette recherche bibliographique est de donner un aperçu sur les champignons endophytes afin de mieux cerner leurs potentialités remarquables à produire des molécules à activité anticancéreuses.

A cet effet, ce travail est structuré en 3 chapitres :

Le premier est consacré à une étude générale divisée en deux parties, la première partie mettra en valeur les mycètes et leur mode vie et la deuxième partie sera consacrée à étudier le cancer et leurs protocoles thérapeutiques.

Dans le second chapitre nous décrivons les caractéristiques générales des endophytes avec en particulier l'origine, la diversité et la classification, mode de transmission, et les conditions de développement des champignons endophytes et leur Interaction avec les plantes.

Le troisième chapitre, traite plus particulièrement la production de Taxol par le champignon endophyte *Taxomyces andreanae* associé à la plante hôte *Taxus brevifolia*, en présentant le protocole de production avec les techniques d'identification (spectroscopie, immunologie...) ainsi son mécanisme d'action et la mise en évidence de son activité biologique *in vitro* et *in vivo*, en démontrant les résultats déjà obtenus par les chercheurs scientifiques.

CHAPITRE 01

1 Généralités sur les mycètes

La mycologie caractérise l'étude des champignons. Un mycologue étudie la taxonomie, la systématique des champignons de façon à hiérarchiser la classe des espèces fongiques [1].

Le règne des champignons ou règne *Fungi* regroupe entre 3,5 et 5,1 millions d'espèces selon une estimation datant de (2005) [2]. Près de 100 000 espèces sont décrites, ce qui représente environ 2,5% de leur nombre total. Les champignons constituent un règne à part entière, au même titre que les animaux, les plantes, les protistes, les archéobactéries et les eubactéries [3].

1.1 Les mycètes

Les champignons, *Fungi* ou mycètes représentent l'un des plus importants groupes d'organisme sur terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes [4]. Ce sont des organismes eucaryotes uni cellulaire ou pluricellulaire [5], possèdent un appareil végétatif simple ou *thalle*. Ils se caractérisent par la présence d'une paroi cellulaire contenant de la chitine et des β -glucanes et par la faible différenciation de leurs cellules [3].

Contrairement aux végétaux, les champignons sont hétérotrophes. Ils n'ont pas la capacité de synthétiser la matière organique à partir de substances inorganiques. Donc ils sont obligés de recycler des composés organiques préexistants comme source d'énergie et de carbone. Cette caractéristique les a conduits à adopter plusieurs modes de vie : saprophytisme, parasitisme, symbiotisme et endophytismes [3].

1.2 Phylogénie

La nouvelle classification (2003) [6]. A considérablement simplifié le règne des champignons. Il ne contient désormais que des organismes dépourvus de phase amiboïde. Ainsi, le règne des champignons est subdivisé en cinq phyla : Microsporidia, Chytridiomycota, Glomeromycota, Zygomycota et Dikarya (Ascomycota et Basidiomycota) [3] (Figure 01) [7].

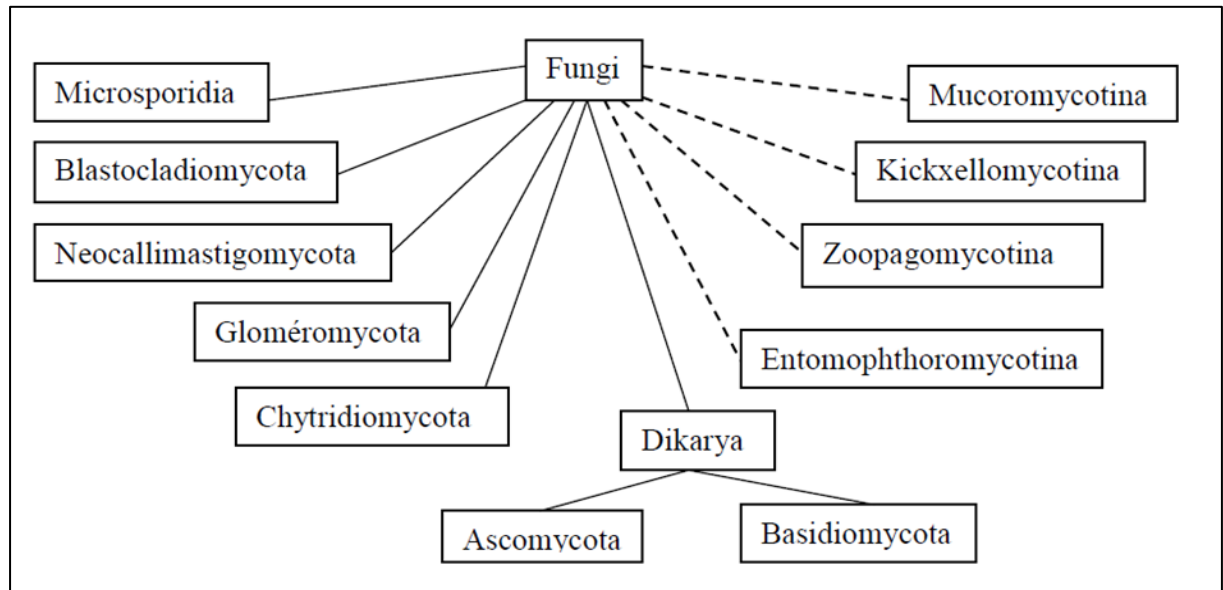


Figure 01 : Classification phylogénétique du règne *Fungi* [7].

1.2.1 Microsporidia

Ce phylum comprend approximativement 1300 espèces décrites [8]. Il regroupe des organismes unicellulaires, parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés et des invertébrés. Les microsporidies sont caractérisées par l'émission d'un « tube polaire » qui émerge de la spore pour infiltrer la cellule hôte. Chez l'humain, ils sont principalement responsables de maladies opportunistes dont la première a été décrite en (1985) [9].

1.2.2 Chytridiomycota

Ce phylum regroupe environ 1000 espèces décrites [10]. Ce sont champignons primitifs, caractérisés par un thalle unicellulaire coenocytique, peu développé ou filamenteux.

Ils produisent au cours de leur cycle des zoospores mobiles uniflagellées. Selon la nouvelle classification, ce phylum est considéré comme polyphylétique et comprend les Blastocladiomycota, les Neocallimastigomycota, les Monoblepharidomycota et les espèces qui étaient rangées dans les Chytridiomycota selon l'ancienne classification [11].

1.2.3 Glomeromycota

Initialement inclus dans les Zygomycota, ils constituent désormais un phylum à part entière. Les espèces le composant présentent un mode de vie symbiotique : elles établissent une association par mycorhize arbusculaire avec l'hôte. Contrairement aux Zygomycota, ils sont décrits comme exclusivement capables de reproduction asexuée [3], espèces à spores non flagellés [12], à structure coenocytique. Cependant, de récentes études mettent en lumière de nombreux gènes impliqués dans le mécanisme de la méiose et conservés dans leur génome, ce qui soutiendrait la persistance d'une reproduction sexuée cryptique [13].

Composés d'environ 200 espèces décrites [14]. Ils représentent une petite part de la diversité des champignons mais jouent un rôle écologique très important ; l'ordre des Glomerales par exemple établit une relation symbiotique par endomycorhize avec plus de 90% des espèces de plantes terrestres [15].

1.2.4 Zygomycota

Ce phylum regroupait approximativement 1065 espèces décrites [16], Produit des parois cellulaires contenant de la chitine. Ils se développent principalement sous forme de filaments (septé) de longue cellule et des spores dépourvues de flagelle. Ce phylum est désormais considéré comme polyphylétique et regroupe les Kickxellomycotina, les Zoopagomycotina, les Entomophthoromycotina et les Mucormycotina [11].

1.2.5 Dikarya

Les Dikarya sont constitués des Ascomycota et des Basidiomycota. Ils présentent une phase dicaryotique particulièrement longue dans leur cycle de vie.

1.2.5.1 Ascomycota

Les Ascomycota sont composés d'environ 64 000 espèces décrites. Ils possèdent des thalles unicellulaires ou pluricellulaires filamenteux cloisonnés. Ils forment en cas de reproduction sexuée des cellules différenciées appelées asques (sacs contenant des spores), qui, après caryogamie, puis méiose, produisent des spores (ascospores projetées à maturité à l'extérieure par ouverture de l'asque [16].

1.2.5.2 Basidiomycota

Les Basidiomycota, composés d'environ 31500 espèces décrites [16], regroupent des champignons possédant des thalles unicellulaires ou pluricellulaires filamenteux septé. Ils forment en cas de reproduction sexuée des cellules différenciées appelées basides, qui après caryogamie, puis méiose produisent des spores (basidiospores), ces spores sont formées par bourgeonnement et sont portées à l'extérieur de la baside par de petites pointes appelées stérigmates, de ce fait, les basidiospores présentent après libération [3].

Les Basidiomycota comprennent la majorité des champignons macroscopiques à sporophore, rencontrés notamment en forêt [3].

1.3 Modes de vie

Toutes les espèces de champignons sont absorbotrophes, l'alimentation se fait par absorption transmembranaire d'oligo-éléments, de sels ou de molécules organiques par transport actif ou par diffusion passive. Plusieurs modes de vie découlant de cette caractéristique sont ainsi observés.

1.3.1 Le saprophytisme

Le saprophytisme se caractérise par la capacité d'un être vivant de se nourrir à partir de matière organique morte, dont il absorbe les éléments nutritifs dégradés grâce à l'excrétion d'enzymes extracellulaires. Les champignons saprophytes, provoquent la décomposition de la matière organique (débris végétaux) et encore produisent l'humus (débris animaux) [17].

1.3.2 Le parasitisme

Le parasitisme par les champignons se caractérise par la capacité d'un individu issu du règne Fungi, d'obtenir des éléments nutritifs provenant d'un autre organisme.

Le parasitisme est nocif pour l'hôte et essentiel pour le parasite. Les champignons parasites peuvent être nécrotrophes ou biotrophes [17].

1.3.3 Le symbiotisme

Le symbiotisme est une association biologique, durable et réciproquement profitable, entre deux organismes vivants, voire indispensable à leur survie, appelés symbiotes. Un exemple de symbiotisme développé par les champignons est l'association mycorhizienne. Les champignons utilisent les éléments nutritifs carbonés provenant de la photosynthèse et en retour, participent à la nutrition hydrominérale de la plante (Figure 02). Le symbiotisme mycorhizien est présent chez environ 95% des plantes vasculaires. Il en existe deux principaux grands types :

- La symbiose ectomycorhizienne qui se caractérise par la formation du réseau de Hartig : Réseau hyphal permet l'échange entre la plante et le champignon.
- La symbiose endomycorhizienne, qui se caractérise par la formation de structures intracellulaires : les arbuscules qui sont des matrices d'échanges entre la plante hôte, le champignon et les vésicules qui sont des structures de stockage fongique [17].

1.3.4 L'endophytisme

L'endophytisme est un mode de vie pouvant être adopté par certains champignons, se caractérise par la colonisation des structures internes d'une plante de manière asymptomatique [17] (Figure 02).

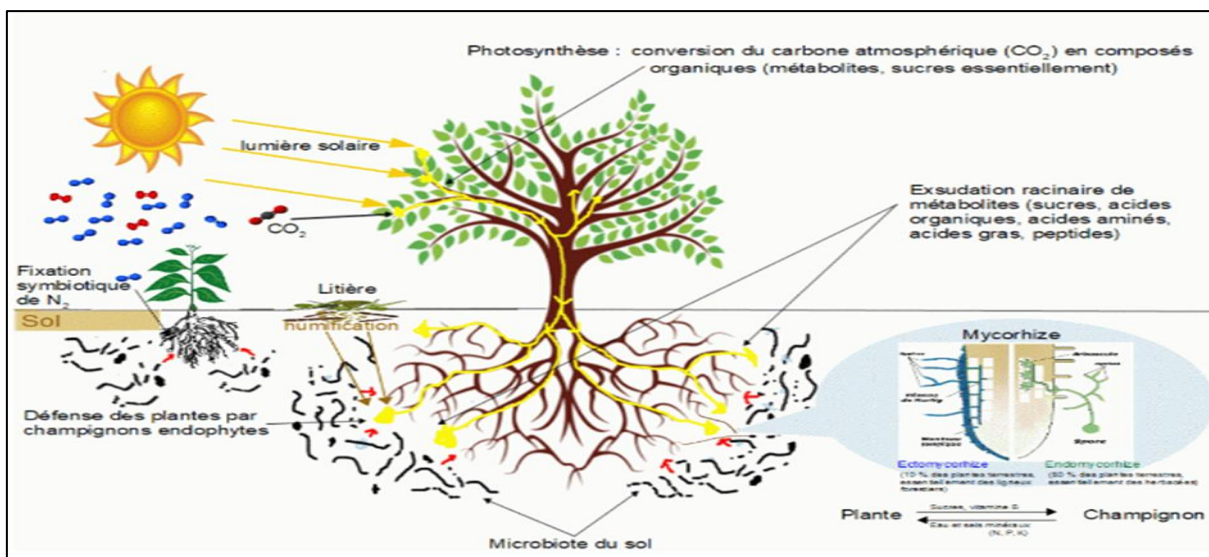


Figure 02 : Un schéma qui représente les symbiotismes et l'endophytismes des champignons endophytes [18].

2 Généralités sur le cancer

2.1 Définitions

Selon l'organisation mondiale de la santé en (2018), le cancer est un terme général appliqué à un groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de sa caractéristique est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent essaimer dans d'autres organismes ; formant ce qu'on appelle des métastases [19].

Les cellules cancéreuses se développent dans le corps à la suite d'une altération du patrimoine génétique des cellules, ces derniers se forment tout au long de notre vie, mais sont généralement mise en échec immédiatement par nos défenses immunitaires. Dans des cas particulier ces cellules anormales ne sont pas détruites, elles se multiplieront à une vitesse foudroyante et forment des tumeurs qui se trouve à un endroit déterminer du corps est rarement dangereuse [20].

Près de 90% des cancers se terminant par un décès sont dus aux métastases (la propagation des cellules cancéreuses dans d'autre organes et tissus). Les cellules cancéreuses sécrètent des enzymes qui digèrent le tissu conjonctif environnant et tracent ainsi le chemin des cellules cancéreuses dans les autres organes du corps [21].

Une tumeur correspond donc à une prolifération anarchique de cellules, elle peut être bénigne ; elle reste confinée a son point d'origine et incapable d'envahir dans les tissus voisins, ou elle peut être maligne capable d'envahir les tissue voisins par les vois sanguine et lymphatique [21] (Tableau 01).

Tableau 01 : Les différences entre les cellules malignes et les cellules bénignes [22].

Tumeurs Bénignes	Tumeurs Malignes
Bien limitée	Mal limitée
Encapsulée	Non capsulée
Histologiquement semblable aux tissus d'origine (bien différenciée)	Plus au moins semblable aux tissus d'origine
Cellules régulières	Cellules irrégulières (cellules cancéreuses)
Croissance lente	Croissance rapide
Refoulement sans destruction des tissus voisins	Envahissement des tissus voisins
Pas de récurrence locale après exérèse complète	Exérèse complète difficile, Récurrence possible après exérèse supposée complète
Pas de métastase	Métastase

2.2 Les traitements du cancer

Le choix des thérapeutiques dépend du type de cancer, en particulier au niveau moléculaire, de ses caractéristiques, de son degré d'invasion ou de métastases, et de l'état général du patient.

2.2.1 La chirurgie

La chirurgie est le traitement principal des cancers. Elle est très souvent réalisée tant que la tumeur ne s'est pas propagée aux organes plus éloignés sous forme de métastases et que l'état de santé général du patient le permet [23].

2.2.2 La radiothérapie

C'est un traitement qui consiste à utiliser des radiations électromagnétiques (rayon X ; rayon gamma) pour détruire les cellules cancéreuses par la rupture des chaînes d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) et d'ARN (Acide ribonucléique) [24], dans le but d'obtenir la mort de la cellule cancéreuse et de ces descendances en évitant de détruire les cellules des tissus sains environnants [25].

2.2.3 L'hormonothérapie

C'est un traitement qui inhibe l'action d'hormones susceptibles de stimuler la croissance des cellules cancéreuses [22].

2.2.4 L'immunothérapie

Avec les médicaments modifiant la réponse pour combattre le cancer afin d'offrir une protection à long terme contre la maladie à venir avec moins d'effets secondaires [22].

2.2.5 La chimiothérapie

La chimiothérapie (appelée aussi chimio) est un traitement du cancer, qui repose sur l'utilisation de médicaments. Elle vise à éliminer les cellules cancéreuses quel que soit l'endroit où elles se trouvent dans le corps [2], y compris celles qui n'ont pas été repérées par les examens d'imagerie soit en stoppant leur division, soit en modifiant leur matériel génétique en injectant des substances chimiques adéquates en (on les détruisant directement) [12].

2.2.6 La mycothérapie

Le mot mycothérapie ou traitement par les champignons remonte probablement en (1997) lorsque le mycologue allemand Jan Ivan Leleý décrit, pour la première fois, la mycothérapie comme la science de l'utilisation des champignons aux vertus médicinales [27]. La mycothérapie est un type de médecine non-conventionnelle employant des champignons médicinaux ou des extraits de ces derniers à des fins médicales notamment les propriétés

anticancéreuses. C'est une médecine douce, 100% naturelle, reconnue comme efficace depuis des milliers d'années en Asie [28].

2.3 Les organismes d'intérêt thérapeutique

Il existe certaines substances naturelles bioactives appartenant tout à la fois au domaine végétal et marin. De nombreux microorganismes vivent en symbiose avec les organismes marins et plantes et représente une source importante de molécules d'intérêt thérapeutique [29].

2.3.1 Les bactéries

Des chercheurs de l'Institut Pasteur en collaboration avec l'Institut Gustave-Roussy, ont montré que des bactéries pourraient jouer un rôle majeur dans la résistance de certaines tumeurs où elles potentialisent l'effet d'un traitement courant de chimiothérapie. Les scientifiques avaient déjà prouvé récemment le rôle des bactéries de notre intestin (microbiote) dans l'efficacité des chimiothérapies, qui franchissent la barrière de l'intestin et passent dans la circulation sanguine et les ganglions lymphatiques et aidaient à la destruction de la tumeur. Ils ont caractérisé des bactéries responsables de cette activité anticancéreuses tels que [30] :

- *Enterococcus hirae* : son rôle est de modifier l'environnement proche de la tumeur et rétablit une réponse adéquate des lymphocytes T contre la tumeur, et renforce la réponse immunitaire naturelle de l'organisme, par la production de la Cyclophosphamide qui est une molécule de chimiothérapie, couramment utilisée dans le traitement de plusieurs cancers du poumon, du sein, de l'ovaire, etc... [30].
- *Bacillus thuringiensis* : productrice des Parasporines (PS), qui représentent une nouvelle classe fonctionnelle des protéines cristallines Cry. Elles sont cytocides contre diverses lignées cellulaires de cancers humains tels que la leucémie et le cancer de la prostate et du sein [31].
- *Clostridium novyi-NT* (Non Toxinogène): sa stratégie thérapeutique consiste à injecter ces spores au patient, ensuite la germination des spores et le développement bactérien entraînent la production de protéases et de lipases capables de dégrader les

tissus tumoraux. Cette attaque associée à l'infection engendre une stimulation inflammatoire et immunitaire qui renforce l'action antitumorale notamment par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de cytokines (IL-6, G-CSF) (*Granulocyte-Colony-Stimulating Factor*). Cette souche possède un fort potentiel comme future agent anti tumoral [32].

- ***Salmonella Typhimurium*** : se réplique 1000 fois plus dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains. Une souche dont le métabolisme est dépendant des purines, qui sont assez fortement disponibles aux alentours et au sein des tumeurs et des métastases, en raison d'une lyse cellulaire qui peut être importante et qui entraîne un relargage de ces métabolites, cette bactérie peut sembler être un futur traitement ou vecteur de traitement intéressant dans la prise en charge antitumoral (précurseur de TNF α (*Tumor Necrosis Factor*)) [32].
- **Les bactéries magnétotactiques** : ce sont des véritables bactéries vivantes, dotées naturellement de capacités magnétotactiques. Elles sont capables d'accumuler le fer dissous dans l'eau de mer, à l'intérieur, se forment des cristaux d'oxyde de fer, sensibles à l'exposition d'un ou plusieurs champs magnétiques. Elles pourraient acheminer les médicaments de chimiothérapie directement au niveau de la tumeur, orientées par un jeu de différents champs magnétiques ce qui aboutit à réduire les effets secondaires des chimiothérapies anticancéreuses [33].
- **Les *Streptomyces*** : Ces actinobactéries synthétisent les anthracyclines, qui ont été une source d'inspiration en oncologie. Ces molécules sont utilisées dans le traitement néo-adjuvant du cancer du sein, où elles agissent en s'intercalant entre les paires de bases azotées de l'ADN de la cellule cancéreuse et inhibent l'activité de la topoisomérase II, elles pourraient ainsi perturber la division cellulaire et entraînent la mort de la cellule cancéreuse [34].

2.3.2 Les champignons macroscopiques

Or différents travaux menés en Asie, en Amérique, en Russie ont montré que certains champignons produisent des molécules ou des macromolécules efficaces notamment dans le traitement contre le cancer, elles agissent soit indirectement en stimulant le système immunitaire, soit directement en bloquant la multiplication de la cellule cancéreuse [35] (Tableau 02).

Tableau 02 : Présentation de quelques espèces de macro-champignons médicinaux et de leurs propriétés anti tumorale.

Les champignons	Leurs propriétés anti tumorale
<p><i>Kawarataké ; yun-zhi</i> (<i>Coriolus versicolor</i>) <i>Etreishi</i> (<i>Ganoderma lucidum</i>)</p>	<p>-Molécules d'intérêt : différents types de polysaccharides, PSK (<i>Polysaccharide Krestin</i>), PSP (<i>Polysaccharide Peptide</i>), l'ATSO (<i>Antitumor Polysaccharide Oral</i>) et le RPSP (<i>Refined Polysaccharide Peptide</i>) [12].</p> <p>-Antitumorales : des agents engendrant la mort des cellules cancéreuses [35].</p> <p>-<i>Coriolus versicolor</i> inhibe la mobilité des cellules tumorales empêchant leur migration par la voie sanguine [12].</p>
<p><i>Agaricus -blazei</i></p>	<p>-Molécules d'intérêt : l'agaritine, le blazeispirol et les fractions polysaccharidiques [12].</p> <p>-Capable de stimuler les globules blancs de l'organisme, notamment les lymphocytes T et de neutraliser les cellules tumorales (en particulier les cellules leucémiques) [35].</p>
<p><i>Antrodiacamphorata</i> ou <i>Niu-chang-chih</i></p>	<p>-Molécules d'intérêt : l'ACEE (Antigène carcino-embryonnaire), l'antroquinolol, le 4 ,7 diméthoxy 1-3 benzodioxole.</p> <p>- antitumorales sur les cancers du sein non répondeurs aux oestrogènes.</p> <p>-Un agent prometteur en chimiothérapie dans le cadre du cancer du poumon [12].</p>

<i>Ganoderma lucidum</i>	<p>-Molécules d'intérêt : des hydrates de carbone (sucres réduits et polysaccharides), des stéroïdes, des alcaloïdes, et de la riboflavine.</p> <p>-Un agent auxiliaire à la chimiothérapie qui supprime la prolifération du stress oxydatif dans les lignées du cancer de l'ovaire.</p> <p>-l'existence d'une substance contenue dans l'extrait soluble de <i>Ganoderma lucidum</i> qui supprime le développement des cancers colorectaux [12].</p>
--------------------------	---

2.3.3 Les champignons microscopiques

A la jonction de l'oncologie et de la mycologie, la découverte des pouvoirs anticancéreux des champignons microscopiques pourrait donner lieu à une prochaine génération des médicaments anticancéreux à faible toxicité, spécifiquement ciblés sur différents types de tumeurs [36].

De nombreux produits naturels à partir des champignons microscopiques endophytes tels que *Fusarium*, *Aspergillus*, *Guignardia sp.*, *Myrothecium roridum*, *Xylaria psidii*, *Taxomyces Andreanae* [37]. sont l'origine d'un grand nombre de métabolites secondaires très variées structurellement qui comprenant les terpénoïdes, les alcaloïdes, les quinones, les xanthones, les peptides, les stéroïdes, les flavonoïdes et les composés phénoliques ainsi que des nanoparticules. Ces différentes molécules ont été isolées et identifiées pour des activités biologiques très variées comprenant l'activité anticancéreuse [38]. C'est le cas du Taxol, le premier médicament au monde qui a été extrait de l'espèce *Taxus sp.* [39].

CHAPITRE 02

1 Définitions

DE BARRY [40] est le premier qui a introduit le terme endophyte en 1986. En traduction littérale, ce mot endophyte est dérivé du grec : « Endo » ou « Endon » c'est-à-dire « intérieur », et « phytes » ou « phyton » c'est-à-dire « plante ». Dans « the dictionary of the *fungi* 1866 », le mot « Endophyte » désigne le microorganisme (bactérie ou champignon) qui vit dans la plante [41].

En 1986 CARROLL [42], définit l'endophyte comme étant un organisme qui cause des infections asymptomatiques des tissus végétaux. Ainsi en 1991, PETRINI in WILSON développa cette définition en 1997 en incluant l'ensemble des microorganismes occupant les organes du végétal, et qui pour une période du cycle de vie peuvent coloniser les tissus internes de l'hôte sans apparition de symptômes [42].

2 Historique

Les premières descriptions de ces microorganismes remontent à la fin du 19^{ème} et 20^{ème} siècle [43]. Les chercheurs ont longtemps pensé que ces champignons n'avaient aucune fonction, ni aucun intérêt. Cependant dans les dernières décennies, les recherches ont commencé à s'intéresser aux endophytes [44], qu'on considère maintenant comme des sources de beaucoup de composés d'intérêt tels les composés antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux, insecticides [45].

En 1993, STIERLE découvre qu'un champignon endophyte colonisant l'if, *Taxomyces andreanae*, est producteur du Taxol (paclitaxel®); anticancéreux déjà naturellement produit par l'if, générant plus d'un milliard d'euros chaque année depuis sa mise sur le marché par Bristol-Myers-Squibb en 1992 [46].

3 La diversité

Des estimations récentes basées sur des méthodes de séquençage à haut débit suggèrent qu'il existe 5,1 millions d'espèces fongiques [47], Incluant au moins un million d'espèces endophytes dont leur relation avec les plantes date depuis plus de 400 millions d'années [48], ils sont ubiquistes [49], colonisant diverses plantes telles que les mousses, les plantes non vasculaires, les fougères, les conifères et les plantes à fleurs, des plantes qui poussent dans différents écosystèmes, incluant le désert, toundra arctique, mangroves, forêts tempérées et tropicales, prairies et savanes ainsi que les terres cultivées [50].

4 La classification

Ces champignons endophytes sont exceptionnellement divers avec une prédominance des Ascomycètes, cependant certains appartiennent à d'autres taxons tels que les Basidiomycota et Zygomycota [41].

La classification de ces microorganismes est essentiellement basée sur un éventail de caractéristiques : la colonisation des tissus [50], leur fonction écologique leur diversité in *planta*, les bénéfiques pour les plantes hôtes et le mode de transmission du champignon (transmission verticalement par la semence ou horizontalement par dissémination) [51] (Tableau 03).

Tableau 03 : Les critères symbiotiques qui caractérisent les classes des champignons Endophytes [52].

Critères	Clavicipitaceae	Non- Clavicipitaceae		
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Classe d'hôte	Limité	Vaste	Vaste	Vaste
Tissu(s) colonisé(s)	Pousses et rhizome	Pousses, racines et rhizome	Pousses	Racines
Colonisation dans la plante	Extensive	Extensive	Limité	Extensive

Biodiversité au niveau de la plante	Basse	Basse	Elevée	Inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Verticale et horizontale	Horizontale	Horizontale
Avantage sur la forme de la plante (Fitness)	NHA	NHA et HA	NHA	NHA

- *Habitat-adapted* (HA) : dépend de l'habitat, les avantages pour la plante résultent de la nature et la spécificité de l'habitat telles que le pH, température et salinité.

- *Non-habitat-adapted* (NHA) : les avantages tels que la tolérance à la sécheresse et l'augmentation de la croissance sont dues aux mycoendophytes indépendamment de l'habitat d'origine.

Les champignons endophytes sont classés en quatre classes (Figure 03), deux groupes majeurs, le groupe des Clavicipitaceae, qui colonisent les Graminées (Poacées) [53], et le groupe des mycoendophytes non-Clavicipitaceae qui colonisent toutes les plantes terrestres et aquatiques [54].

4.1 Classe 01

Inclue un petit nombre de champignons apparentés phylogénétiquement appartenant aux Ascomycota et Hypocreales, fastidieux en culture, tels que les *Balancia sp.*, *Neotyphodium sp.* et *Claviceps sp.* (espèces endophytismes) [50]. Ils se développent de façon systémique à l'intérieur des cellules des graminées et les carex, et se transmettent verticalement à travers les graines [52]. Selon l'espèce de l'hôte, et des conditions environnementales, ces champignons peuvent conférer à leurs hôtes une augmentation de la biomasse, une tolérance à la sécheresse, et peuvent également produire des molécules toxiques pour les animaux et les herbivores protégeant ainsi leurs plantes hôtes [55].

4.2 Classe 02

Les non-Clavicipitaceae représentent un groupe très diversifié. Ils forment un assemblage polyphylétique essentiellement d'Ascomycètes et représentent au moins trois groupes fonctionnels distincts selon leurs caractéristiques, leurs modes de vie et leurs importances écologique [52]. Ils se retrouvent asymptomatiquement chez tous les types de plantes [56], à savoir les tissus des plantes non vasculaires, des fougères, des conifères, des Angiospermes et chez les plantes de tous les écosystèmes terrestres [52].

Ces endophytes non-systémiques transmis horizontalement [57]. Ont été souvent signalés de manière abusive comme des mycoendophytes infectant exclusivement les non-Graminées, alors qu'ils peuvent se retrouver aussi chez les Graminées [56], et coloniser asymptomatiquement des parties de feuilles de ces dernières [58].

4.3 Classe 03

En particulier les Pezizomycota, on trouve également les Basidiomycota, plus souvent présents dans les tissus ligneux que dans les tissus foliaires, peuvent coloniser en grand nombre les parties aériennes [3]. (D'une large gamme de plantes hôtes englobant les plantes non vasculaires, vasculaires, les conifères, les angiospermes des régions tropicales, boréales, arctiques, antarctiques et principalement les tiges) [52]. Leur transmission est horizontale avec induction d'une infection localisée et non étendue [59].

4.4 Classe 04

Les endophytes de ce groupe sont des champignons bruns cloisonnés. Ils appartiennent généralement aux Ascomycota ; ils se transmettent horizontalement [52], associés à des arbustes ou arbres et colonisent uniquement les racines des plantes [50], et en plus de stimuler la croissance de leurs hôtes, les champignons de ce groupe peuvent aussi les protéger contre les microorganismes pathogènes en diminuant le taux de carbone dans la rhizosphère, ils peuvent aussi grâce aux taux élevés de mélanine, produire des métabolites secondaires toxiques pour les herbivores [59].

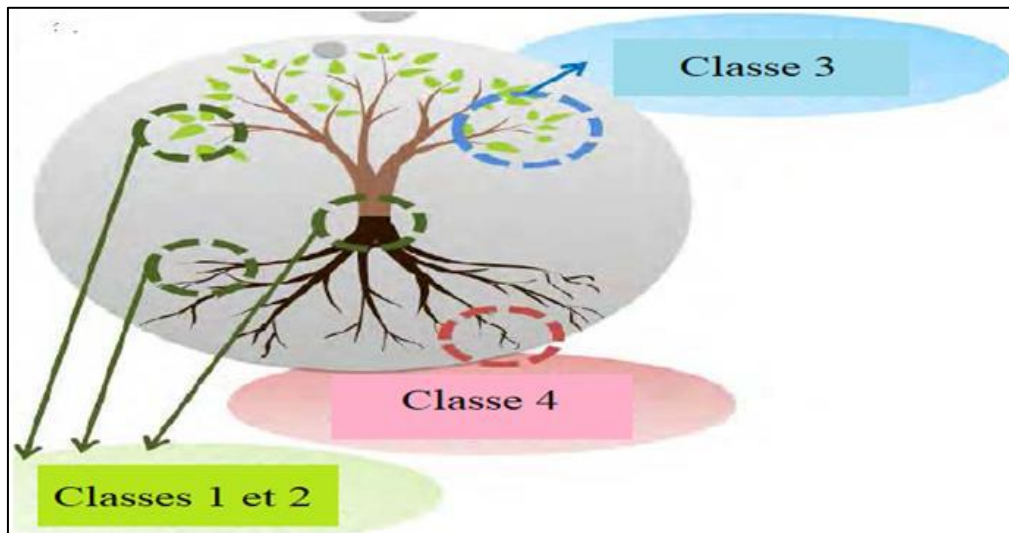


Figure 03 : Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisées [3].

5 Mode de reproduction et de transmission

Les endophytes possèdent deux modes de transmission :

5.1 Croissance végétative des hyphes

Elle est accompagnée par la transmission verticale, la croissance se fait complètement à l'intérieur des tissus de la plante hôte [60], ainsi les hyphes du champignon sont transmis de la plante infectée vers la descendance par l'intermédiaire des graines [61] (Figure 04), c'est le principal mode de transmission des champignons endophytes [62]. Ce mode est notamment connu chez les Graminées, leurs hyphes se développent dans les espaces intercellulaires des tissus des feuilles et des tiges, puis intègrent l'ovule puis l'embryon, ainsi infectent une nouvelle génération de graines [63].

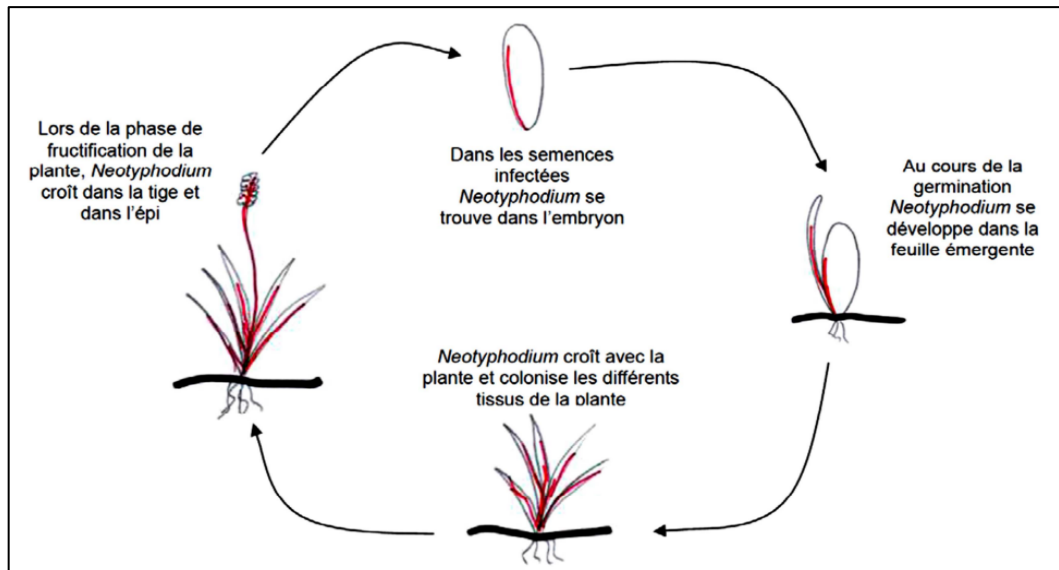


Figure 04 : Représentation schématique du cycle de vie des champignons endophytes du genre *Neotyphodium* [64].

5.2 Croissance par biais des spores

Elle s'effectue entre les plantes de la même espèce ou d'espèces différentes. Ce groupe de champignons se transmet horizontalement, c'est-à-dire le champignon peut être transmis soit par spores sexuées (ascospores) ou asexuées (conidies) pour infecter d'autres plantes [65] (Figure 05).

Ce mode de transmission nécessite la production des spores externes et leur dispersion aéroportée pour infecter d'autres plantes. Les insectes phytophages peuvent également participer à la propagation des endophytes, car les spores de certaines espèces de champignons sont résistantes à la digestion intestinale, et sont présentes dans leurs excréments. La transmission horizontale semble être le mécanisme prédominant de la dispersion des espèces endophytes [66].

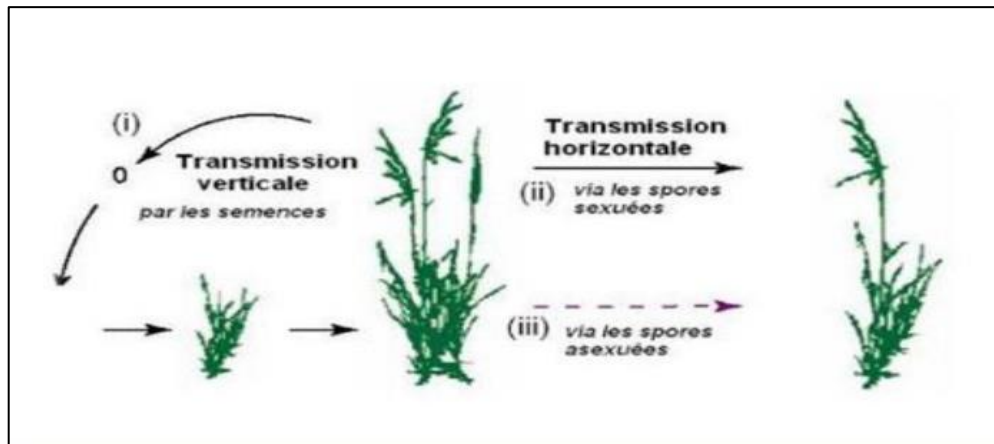


Figure 05 : Mode de transmission des champignons endophytes [67].

5.3 Mode de reproduction

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction, la reproduction sexuée et la reproduction asexuée.

En considérant que certains champignons peuvent produire soit des spores sexuées soit asexuées et que la reproduction sexuée nécessite des spores sexuées, elle est donc toujours horizontale, inversement à la reproduction asexuée qui peut se faire verticalement via les graines ou horizontalement par les spores ou éventuellement les hyphes [67].

6 Interaction plante – endophyte

6.1 Etape de formation de l'interaction

D'après Kusari et *al.* [68], l'interaction entre le champignon et la plante hôte est marquée par un équilibre entre la virulence fongique et les défenses de l'hôte. L'établissement de cette relation symbiotique s'effectue en plusieurs étapes [69] (Figure 06).

- **(a)** Germination des spores, la dominance apicale est abandonnée et le branchement d'hyphes est déclenché par le 5- désoxy-strigol.
- **(b)** Le champignon forme un appressorium qui paraît induire le mouvement du noyau de la plante vers le site du contact.

- (c) Les éléments cyto-squelettiques et le réticulum endoplasmique forment l'appareillage de la pré-pénétration le long de l'axe du mouvement nucléaire.
- (d) Quand le champignon atteint finalement le cortex intérieur, il pénètre la paroi cellulaire et forme une structure hyphale (comme un réseau filamenteux).
- (e) La colonisation des tissus commence. L'infection initiale est accompagnée par une induction équilibrée de gènes de la défense de la plante.

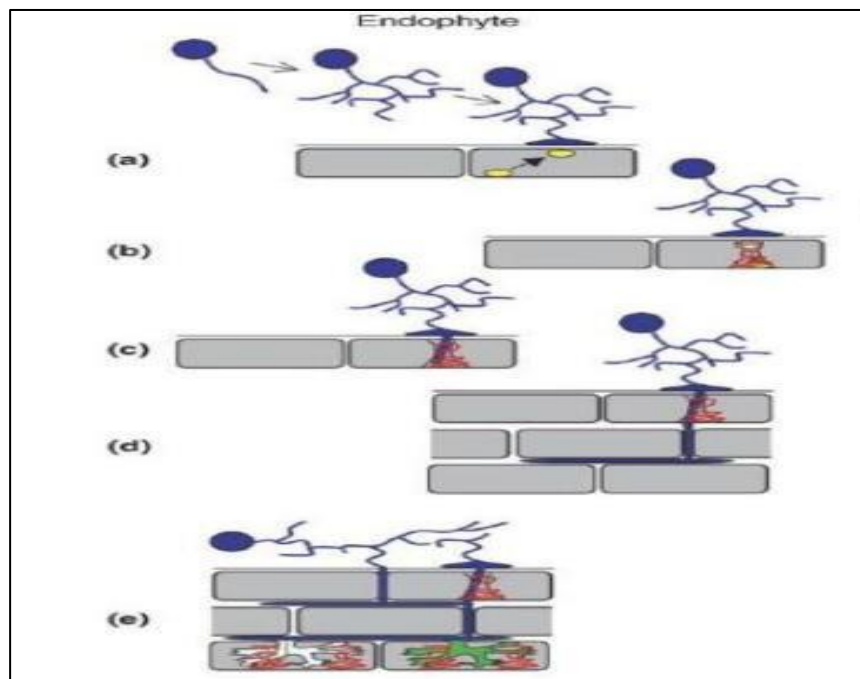


Figure 06 : Développement symbiotique d'endophytes fongiques [70].

6.2 La nature de l'interaction plante/champignons endophytes

Les associations plante-champignon sont assez stables tout au long de la vie de la plante. Elles sont souvent considérées comme mutualistes même si trois types d'interactions peuvent être constatés [64].

- **Type 1 : Antagoniste** : La phase de reproduction sexuée de la plante est éliminée par la formation de stromas épiphytes sur les inflorescences en développement. Ce qui permet la transmission horizontale du champignon endophyte et la libération d'ascospores. Quelques exemples de ce genre d'association sont *Epichloe typhina*, *Glyceria striata* [71].

- **Type 2 : Pleïotropique** : Les stromas se forment sur certains thalles, alors que sur d'autres le champignon se développe dans l'inflorescence qui produit des graines infectées. Cette association, intermédiaire entre les types I et III, est assez fréquente, c'est le cas de *Epichloe festucae*, *Festucarubra* et *Agrostis hiemalis* [71].
- **Type 3 : Mutualiste** : Le champignon endophyte croît dans l'ovule en développement au sein d'une inflorescence. Tout au long du développement de la plante, le mycélium est sous une forme strictement endophyte, sa reproduction est asexuée. Cette association peut conduire à la synthèse de mycotoxines. Par exemple, les endophytes *Epichloe* et *Neotyphodium* présents dans certaines graminées sont toxiques pour le bétail en pâturage et augmentent la résistance aux herbivores invertébrés et aux micro-organismes pathogènes [71].

7 L'importance des endophytes

- Les endophytes fongiques peuvent conférer à la plante la capacité de la protection contre les maladies [72], la résistance aux stress biotiques et abiotiques, l'amélioration de l'assimilation des nutriments nécessaires à la croissance [73], la production de métabolites secondaires efficaces contre les agents pathogènes de l'hôte et la protection contre des insectes ravageurs [74] [75].
- Production des substances à utilisation potentielle en médecine, en agriculture ou encore en industrie [76].
- Applications dans le domaine d'énergie ; les champignons endophytes ont été découverts comme des producteurs de composés organiques volatiles principalement des hydrocarbures et autres composés oxygénés qui peuvent être une bonne alternative aux composés fossiles [77].
- Biosynthèse d'enzymes ; ces enzymes peuvent avoir différentes applications dans les domaines de la santé, de la production alimentaire, de l'énergie et de l'environnement [78].
- Applications dans la bioremédiation de l'environnement afin d'éliminer des polluants [79].

8 Les métabolites secondaires

Un métabolite secondaire est généralement défini par opposition à un métabolite primaire qui intervient dans le fonctionnement vital d'un organisme [80].

Les métabolites secondaires des champignons endophytes sont très variés. Les classes chimiques les plus retrouvées sont les alcaloïdes, les peptides non ribosomiques, les polycétides et les terpènes [81].

8.1 Les alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose [82], représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures [83].

Les alcaloïdes donnent des réactions de précipitations avec certains réactifs dits réactifs généraux des alcaloïdes [84].

Les alcaloïdes ont une activité pharmacologique significative et sont majoritairement dérivés des acides aminés. Ils proviennent du métabolisme de l'ornithine, de la lysine, de la phénylalanine, de la tyrosine, du tryptophane, de l'arginine, de la proline, de l'acide anthranilique et de l'histidine [85].

On peut classer les alcaloïdes en 3 groupes [85] :

- Les alcaloïdes vrais : synthétisés à partir d'acides aminés, ils ont leur atome d'azote inclus dans un hétérocycle.
- Les pseudo-alcaloïdes : non dérivés d'acides aminés, généralement leur atome d'azote est inclus dans un hétérocycle.
- Les proto-alcaloïdes : amines simples synthétisées à partir d'acides aminés, dont l'atome d'azote n'est pas inclus dans un cycle.

L'une des voies de synthèses principales de métabolites secondaires des champignons est celle qui vise à produire des alcaloïdes indoliques (alcaloïdes vrais) [80]. Cette voie permet aux champignons endophytes, à partir du tryptophane, de produire les molécules d'intérêt thérapeutique majeur, on cite par exemple deux puissants anticancéreux ; la vinblastine (Figure 07), et la vincristine. Cependant, ils produisent des composés toxiques pour les animaux (dérivés de l'ergot, toxique pour le bétail) [86].

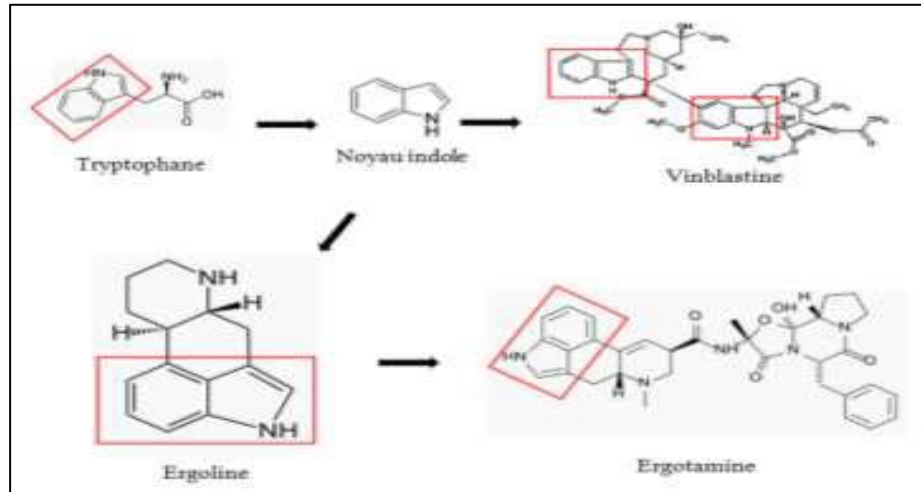


Figure 07 : Voie de biosynthèse simplifiée des alcaloïdes indoliques [3].

8.2 Les terpènes

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures produits à partir d'Isopentyl pyrophosphate (IPP) [87].

On retrouve parmi les terpénoïdes remarquables produits par des champignons endophytes les dérivés de l'acide gibbérellique, produit notamment par l'espèce *Aspergillus fumigatus* ; endophyte du soja Ces composés sont regroupés sous le terme de gibbérellines [87] (Annexe 01).

Ce sont des phytohormones qui provoquent une élongation cellulaire au niveau de l'entre-nœud, une croissance des tiges, des pousses et des fruits et induisent la germination ainsi que la floraison des plantes. On les utilise pour augmenter la taille des fruits et leur teneur en sucre [88].

Une équipe de recherche brésilienne a recensé chez des champignons endophytes 127 terpénoïdes possédant des activités pharmacologiques. D’après cette étude, les terpénoïdes isolés seraient majoritairement des ses qui terpénoïdes (Tableau 04) [89].

Tableau 04 : Répartition des terpénoïdes d’intérêt thérapeutique selon leur structure [89].

Type	Nombre	Pourcentage
Sesquiterpénoïdes (15 carbones)	65	51%
Diterpénoïdes (20 carbones)	45	35%
Mérotérpénides (structure partielle de terpénide)	5	4%
Autres terpénoïdes	12	9%

8.3 Les polycétides

Les polycétides sont les métabolites secondaires les plus fréquents chez les champignons, Dans ces organismes, ils sont synthétisés par des polycétides synthase de type I. Il s’agit d’une protéine multi-domaine. Leurs structures et leurs fonctions sont très diverses, beaucoup possèdent des activités pharmacologiques [90] (Tableau 05).

Tableau 05 : Exemples de polycétides d’intérêt thérapeutique [3].

Molécule	Classe thérapeutique	Champignon	Plante hôte
Lovastatine	Statine	<i>Aspergillus niger</i> PN2	<i>Taxus baccata</i>
Codinaeopsine	Anti-paludéen	<i>Codinaeopsis gonytrichoides</i>	<i>Vochysia guatemalensis</i>
Acide cytosporique	Anti-VIH, inhibiteur des intégrases	<i>Cytospora</i> sp.	<i>Ilex canariensis</i>

8.4 Le peptide non ribosomique

Les peptides non ribosomiques sont des métabolites secondaires que l'on retrouve chez les bactéries et les champignons. Ils sont synthétisés par des NRPS (*non ribosomal peptide synthase*) qui sont de grands complexes enzymatiques multi-domaines. Les NRPS sont composés de 2 à 20 modules environ, chaque module ayant pour fonction d'ajouter un monomère. Il y a trois types de modules : module d'initiation, d'élongation et de terminaison (Figure 08). Chacun de ces modules est composé par plusieurs domaines : adénylation, thiolation, condensation, le module de terminaison possède en plus un domaine thioestérase (libération du peptide) [91].

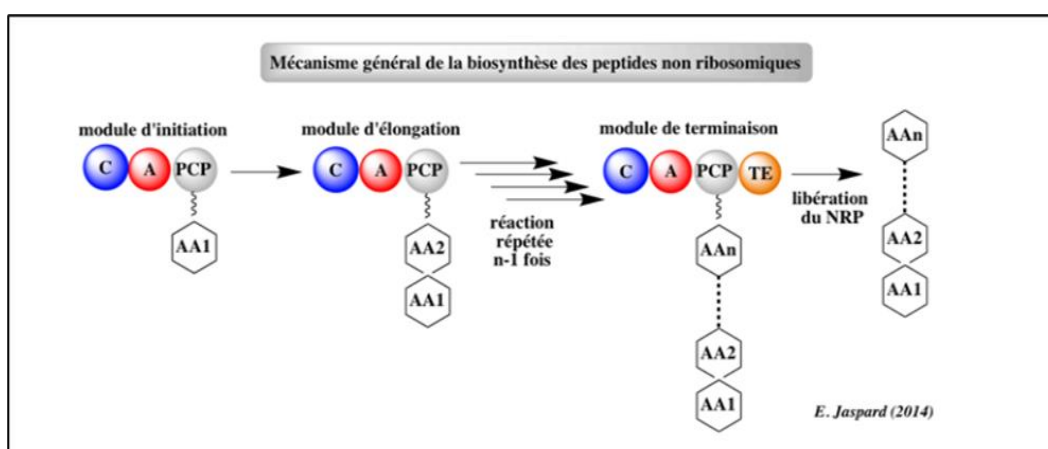


Figure 08 : Représentation schématique d'une NRPS [92].

9 Les activités biologiques des métabolites secondaires des endophytes

9.1 Activité antibactérienne

La fréquence croissante des souches pathogènes multi résistantes a limité l'effet d'un traitement antimicrobien traditionnel, ce qui implique le besoin de nouveaux agents thérapeutiques contre les maladies infectieuses [93].

Les antibiotiques sont définis comme substances chimiques et /ou organiques produites par des microorganismes. Les endophytes sont souvent une source de ces antibiotiques [94].

De nombreux composés antibactériens avaient été isolés et caractérisés à partir de ces champignons endophytes tels que, les Guanacastepenes (Figure 09). Ce sont des molécules

ayant une activité antimicrobienne, spécialement guanacastepene A, qui a une activité antibiotique contre *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, l'antibiotique periconicine A, et B contre *S. aureus* et aussi altersetine, purifié à partir de l'endophyte *Alternaria sp.* Qui montre une activité puissante contre des bactéries pathogènes à Gram positif [94].

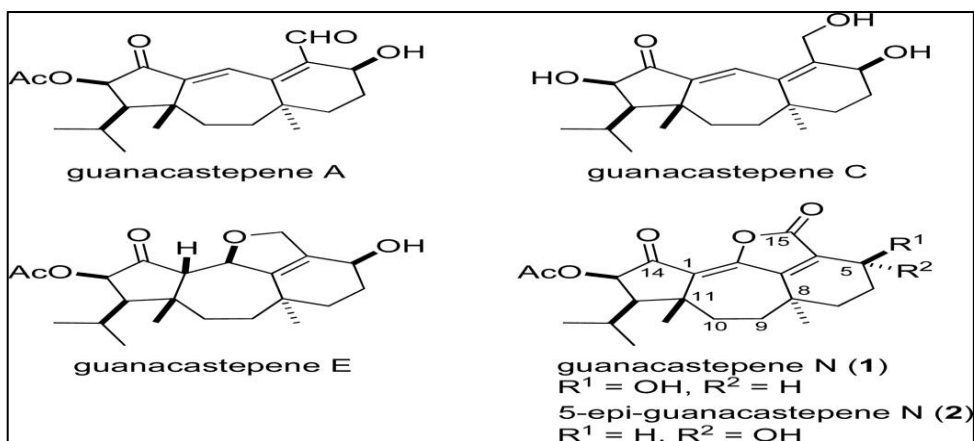


Figure 09 : Structure des substances antibactériennes produite par les champignons endophytes [95].

9.2 Activité antioxydante

Les antioxydants sont des molécules susceptibles de protéger les cellules contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ces dérivés des radicaux libres. Ces molécules instables sont l'origine de différents effets pathologiques, tels que la carcinogénèse, la dégénérescence cellulaire et les dommages au niveau de l'ADN [96].

Les champignons endophytes représentent une source abondante et fiable de nouveaux composés antioxydants naturels tels que, les phénols totaux et les flavonoïdes présents dans l'extrait éthanolique de *Phyllosticta sp.* qui est isolé à partir de la plante médicinale *Guazuma tomentosa*, se sont révélés être de puissants antioxydants et piègeurs de radicaux libres, tels que l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique et 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) [97], ainsi, deux cérébrosides (Figure 10) isolés à partir de l'endophyte *Fusarium sp.* ont démontré une activité inhibitrice de la xanthine oxydase [98]. *Aspergillus niger* un endophyte de *Cynodon dactylon* aussi produit également un inhibiteur ; la xanthine oxydase [99].

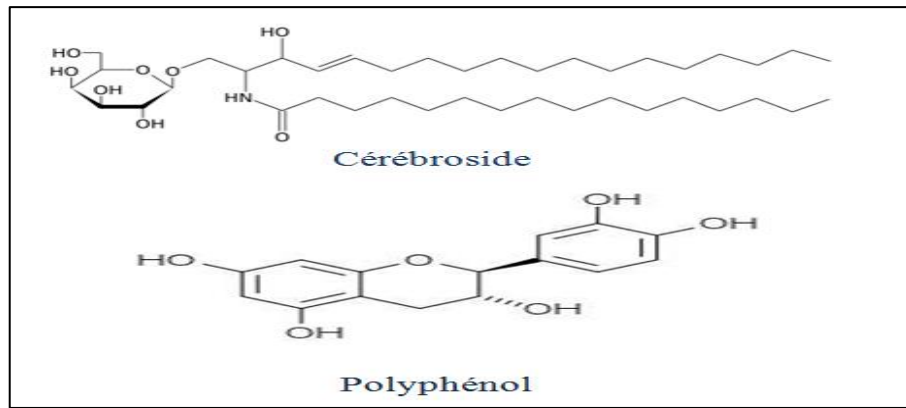


Figure 10 : Structure de certaines molécules antioxydants produites par les champignons endophyte [100].

9.3 Activité antivirale

Bien des recherches ont démontré l'importance des endophytes dans la production d'agents antiviraux, mais peu d'études ont été faites sur ce sujet car la découverte des molécules antivirales produites par les champignons endophytes n'est qu'à son début. Parmi ces études, on peut citer celle de Zhang et *al.* [101], où ils ont isolé et purifié deux nouvelles molécules, l'emerimidine A et B à partir de *Emericella sp.* [101].

Ainsi d'autres molécules inhibitrices de cytomégalo virus ; l'acide cétonique A et B (Figure 11), ont été isolés après fermentation solide du champignon endophyte *Cytonaema sp.* Isolé de la plante *Quercus sp.* il y a aussi xanthoviridicats E et F qui inhibent la réaction de clivage de l'intégrase du VIH (Virus de l'immunodéficience humaine), produite par l'endophyte *Penicilium chrysogenum sp.* [93].

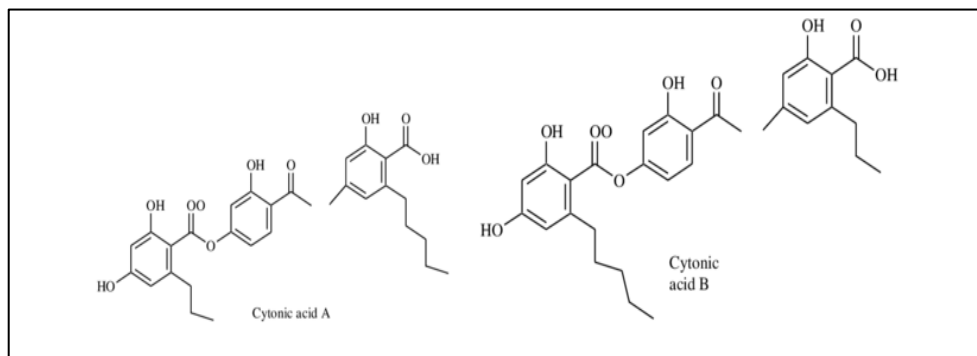


Figure 11 : Structure de l'acide cétonique A et B [102].

9.4 Activité antifongique

Une grande diversité de structures ayant une propriété antifongique, sont isolés à partir des champignons endophytes pour essayer de faire face à l'augmentation des infections fongiques retrouvées surtout chez les patients ayant subi des transplantations d'organes, ou étant sous chimiothérapie [103]. La cryptocandine (Figure 12) extraite de l'endophyte *Cryptosporiopsis quercina* a présenté des activités antifongiques contre des champignons pathogènes de l'homme comme : *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* [104].

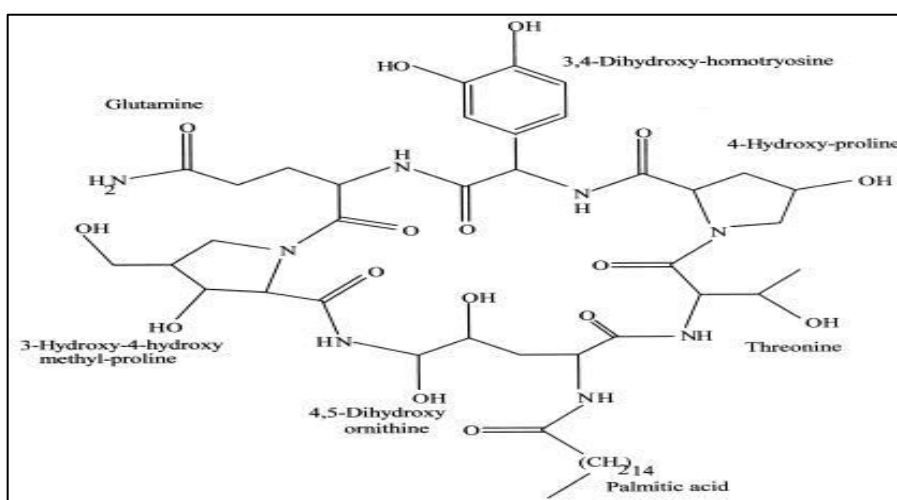
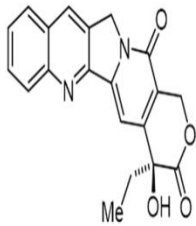
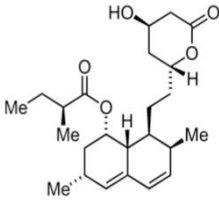
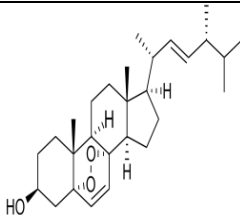
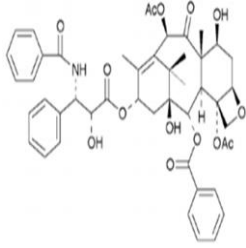


Figure12 : Structure de la cryptocandin A [105].

9.5 Activité anticancéreuse

Récemment les endophytes et leurs métabolites sont étudiés pour leurs propriétés anticancéreuses, où plus de 100 composés anticancéreux ont été isolés et identifiés. Ces composés bioactifs semblent être une nouvelle alternative prometteuse pour la découverte de nouveaux médicaments anticancéreux [104] (Tableau 06).

Tableau 06 : Quelques molécules d'origine endophytes à activité anticancéreuse.

La molécule	Champignons/ Plante hôte	Propriété pharmacologique et type de cancer	Structure chimique
La camptothécine	<i>Fusarium solani</i> / <i>Nothapodytes Nimmoniana</i> [106]	-Inhibiteur de la Topoisomérase I [107]. -Ces dérivés sont utilisés en chimiothérapie [108]. -L'irinotécan (CAMPTO®) (cancer colorectal) [108] -Letopotécan (HYCAMTIN®) (cancer bronchique, ovaire) [108].	 <p>[109]</p>
La Lovastatine	<i>Aspergillus niger</i> Souche PN2/ <i>Taxus baccata</i> [110]	-Effet sur la prolifération cellulaire et le cancer : inhiber la progression du cycle cellulaire en phase G1[111]. -Elle est commercialisée sous le nom de Mevacor® [112].	 <p>[113]</p>
L'ergostérol peroxide	<i>Guignardia sp.</i> <i>Untaria pinnatifida</i> [114]	-Ces dérivés ont une activité contre la lignée cellulaire KB (Ubiquitous KERATIN-forming tumor cell line HeLa) de la tumeur épidermoïde nasopharyngée humaine [115].	 <p>[116]</p>
Le paclitaxel	<i>Taxomyces andreanae</i> / <i>Taxus brevifolia</i> [117]	-Taxol(paclitaxel®) est un médicament très utilisé contre le cancer de l'ovaire, du sein et le cancer bronchique [118].	 <p>[119]</p>

CHAPITRE 03

1 Définitions du Taxol

Le Taxol ou paclitaxel est un métabolite secondaire de la classe des terpénoïdes, il s'agit plus précisément d'un diterpénoïde [120]. Il appartient au groupe de médicaments qui combattent le cancer et que l'on appelle des antinéoplasiques. Le paclitaxel s'emploie seul ou en association avec d'autres médicaments contre les cancers de l'ovaire, du sein ou du poumon. Il peut aussi s'utiliser pour soigner une autre forme de cancer appelée le *sarcome de Kaposi* ou maladie de *Kaposi* [121].

2 La structure chimique de Taxol

La formule chimique du Taxol est : 5 bêta, 20-époxy-1,2 alpha, 4,7 bêta, 13 alpha-hexahydroxytax-11-ene-9-one 4,10-diacétate benzoate de (2R, 3S) -N-benzoyl-3 phénylisosérine. Ce composé diterpène, appartenant à la classe des taxanes, comporte 11 centres asymétriques, sa formule brute est C₄₇H₅₁N₀O₁₄, et sa formule développée est illustrée par la Figure 13 [122].

La structure du paclitaxel repose sur la liaison d'un anneau complexe taxane à un anneau oxétanne en C-4 et C-5, estérifié en C-13. Leur masse moléculaire relative est de 853,9 daltons.

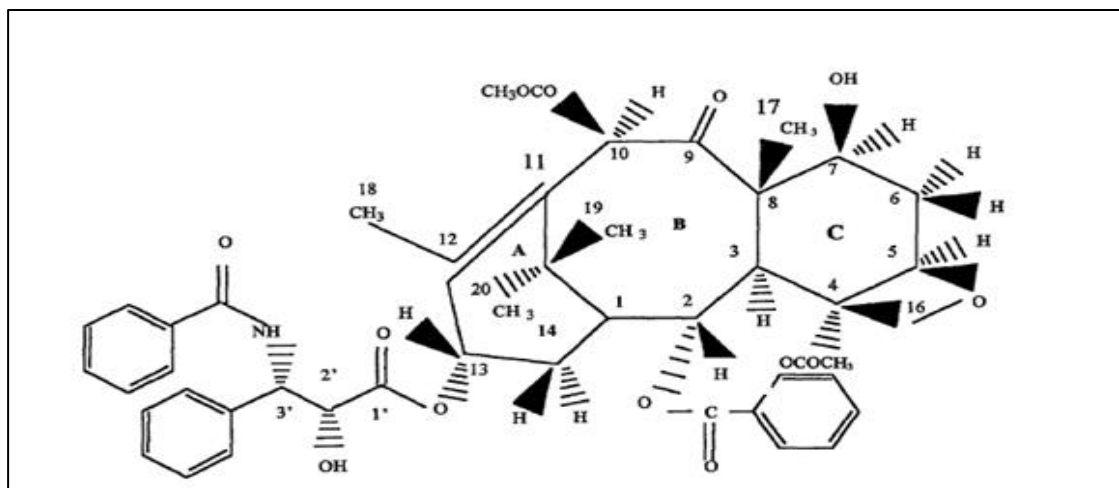


Figure 13 : Structure chimique du paclitaxel [123].

3 Mécanisme d'action

Selon Andéol et *al.*[124], le paclitaxel est une molécule anticancéreuse et plus particulièrement un poison du fuseau mitotique. Il va stimuler l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules et inhiber leur dépolymérisation [124] (Figure 14).

Les tubulines sont des protéines de structure, il en existe plusieurs types. Les tubulines alpha et bêta peuvent se dimériser pour former un dimère de tubuline [125].

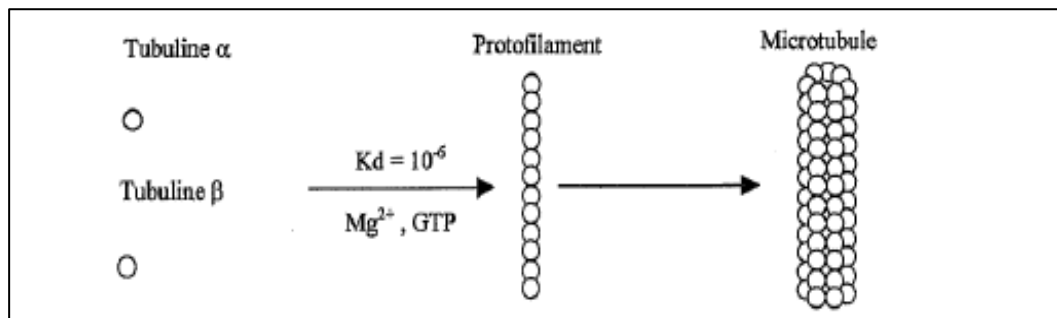


Figure 14 : Polymérisation d'un microtubule [126].

Les microtubules sont dans un état d'équilibre dynamique avec les dimères de tubulines. La présence de GTP (Guanosine triphosphate) et une température proche de 37°C favorisent la formation de la forme microtubule (polymérisée) au profit de la forme dimère de tubuline (dépolymérisée). A l'inverse la présence de calcium et une température faible va favoriser la dépolymérisation des microtubules. Le paclitaxel va rompre cet équilibre en le déplaçant vers la forme microtubule (polymérisée) au profit de la forme dimère de tubuline (dépolymérisée) (Figure 15). Il en résulte une baisse critique de la concentration en tubulines or ceux-ci sont nécessaires à la formation des microtubules [124].

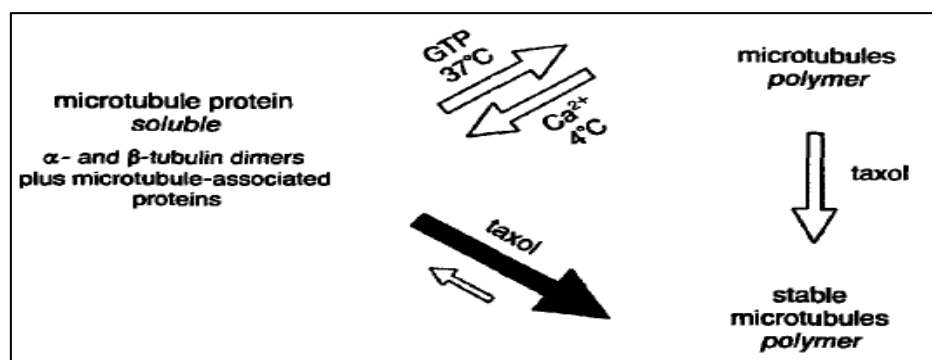


Figure 15 : Stabilisation de la formation des microtubules au profit de la forme tubuline par le paclitaxel [124].

Le paclitaxel est capable de polymériser des dimères de tubuline en microtubules en absence de GTP et des protéines associées aux microtubules normalement requises pour cet assemblage [124].

Les microtubules sont stables en présence de paclitaxel, même lors de l'ajout de CaCl_2 (4mmol/l) ou en cas de diminution de la température (+4 °C) et à la présence de calcium, deux paramètres qui d'ordinaire déstabilisent le polymère [127].

Les microtubules sont des composés jouant un rôle très important dans le fonctionnement d'une cellule. Ils sont un composant essentiel du fuseau mitotique (indispensable à la division cellulaire) et servent à maintenir la forme de la cellule et le transport des organites dans une cellule. Une modification de leur état d'équilibre dynamique va perturber la division cellulaire et l'activité de la cellule [124].

Le paclitaxel se lie spécifiquement et de manière réversible aux microtubules (Préférentiellement à la sous unité de tubuline béta, uniquement lorsque celle-ci est incorporée dans un microtubule) [125].

Le paclitaxel va ainsi bloquer la réplication des cellules eucaryotes à la fin de la phase G2 ou M du cycle mitotique. Il va induire un blocage de la mitose en activant le « *spindle assembly checkpoint* », un mécanisme de contrôle majeur de la mitose qui sert à prévenir la mauvaise séparation des chromosomes [127]. Le blocage de la mitose peut entraîner plusieurs réponses [125] (Figure16) :

- La cellule meurt directement en mitose.
- La cellule se divise inégalement et forme des cellules filles aneuploïdes.
- La cellule pourrait quitter la mitose sans division cellulaire et mourir en interphase ou y rester indéfiniment.

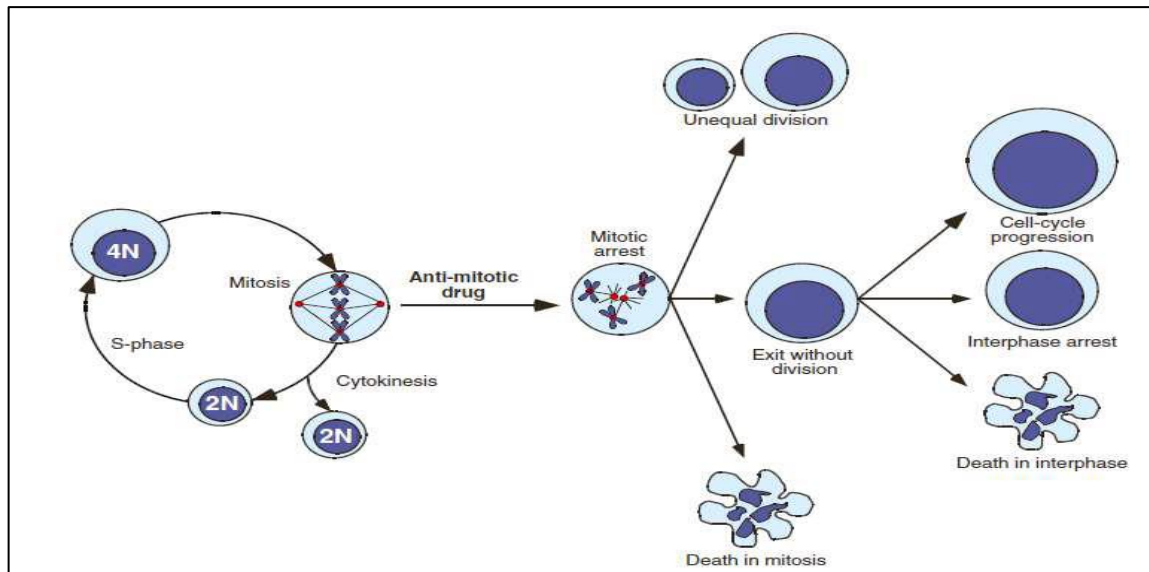


Figure 16 : Devenir d'une cellule en présence d'une molécule antimitotique comme le paclitaxel [125].

4 Production du Taxol par *Taxomyces andreanae*

4.1 Historique

Depuis quelques temps, les écologistes craignaient que les ifs puissent être exterminés au profit de vies humaines. Mais, d'après Bristol Myers Squibb [128], les laboratoires commercialisant le Taxol grâce aux autres sources de Taxol telle que la synthèse du produit à partir de précurseur trouvé dans les feuilles de l'if européen, l'arbre n'est plus en danger d'extinction. Cependant, ces nouvelles sources n'ont pas réduit le prix du paclitaxel.

A l'université du Montana, aux Etats-Unis, le pathologiste botaniste Gary Strobel, et la chimiste Andréa Stierle, ont découvert en 1991, niché dans les plis de l'écorce d'un if, un champignon qui produirait du Taxol.

Andréa Stierle avec son mari le chimiste Donald Stierle [129], du « *Montana College of Mineral Science and Technology* » ont donc commencé à enquêter dans les forêts du Montana, collectant des échantillons des champignons microscopiques à partir des plantes médicinales avec Strobel, elle a travaillé jour et nuit afin de découvrir le champignon produisant du Taxol et a prouvé que les traces de paclitaxel dans les cultures fongiques n'étaient pas causées par la contamination des arbres [129].

Le résultat de cette découverte permettrait d'imaginer d'énormes réservoirs de fermentation produisant de grandes quantités d'un Taxol à bas coût. Car à titre d'exemple, le marché du Taxol représente environ 50 000 patients américains, et une baisse du coût du traitement atteindra des milliards de dollars [128].

Ils apprennent que leur champignon lui-même est une nouvelle espèce à part entière, avec son propre génome. D'où l'appellation *Taxomyces andreanae* (Stierle., Strobel) pour rendre hommage au découvreur Andrea Stierle. Une autre question se pose alors : le champignon est-il capable de synthétiser du Taxol, une fois séparé de son plante hôte ? [129].

4.2 Définitions de l'espèce *Taxomyces andreanae*

Nous savons depuis longtemps que l'if des arbres produit un important composé anticancéreux ; le Taxol, d'où *Taxomyces andreanae* est le premier champignon microscopique isolé connu à produire spécifiquement ce composé à une concentration plus élevée que son hôte l'arbre lui-même [130].

Taxomyces andreanae est un champignon endophyte de la classe des Hyphomycètes. Il est exclusivement isolé à partir de la couche interne de l'écorce de petites branches d'un if particulier d'un arbre appelé : *Taxus brevifolia* [131].

Taxus brevifolia est un petit arbre à feuilles persistantes (Figure 17), de taille moyenne tolérant l'ombre, atteignant 10-5m, avec un tronc jusqu'à 50 cm de diamètre, ils poussent dans divers types d'environnements plus secs, généralement limité aux habitats au bord des cours d'eau [130].



Figure 17 : Photographie de la plante *Taxus brevifolia* [132].

4.3 Méthodes d'isolement

Selon Stierle et Strobel [129], pour pouvoir produire une molécule d'intérêt, il faut tout d'abord isoler le champignon endophyte de la plante :

- En effectuant en premier lieu un rinçage des organes végétaux à l'eau distillée.
- Puis stériliser le fragment de la plante avec de l'éthanol à 70% et de l'hypochlorite de sodium.
- Après rinçage à l'eau distillée stérile, les échantillons sont coupés en fragments de quelques millimètres, puis placés dans un milieu de culture gélosé « *Potatoes Dextrose Agar* » (PDA) préalablement passé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, et supplémenté en antibiotiques, (5 à 6 segments par boîte) (Figure 18).

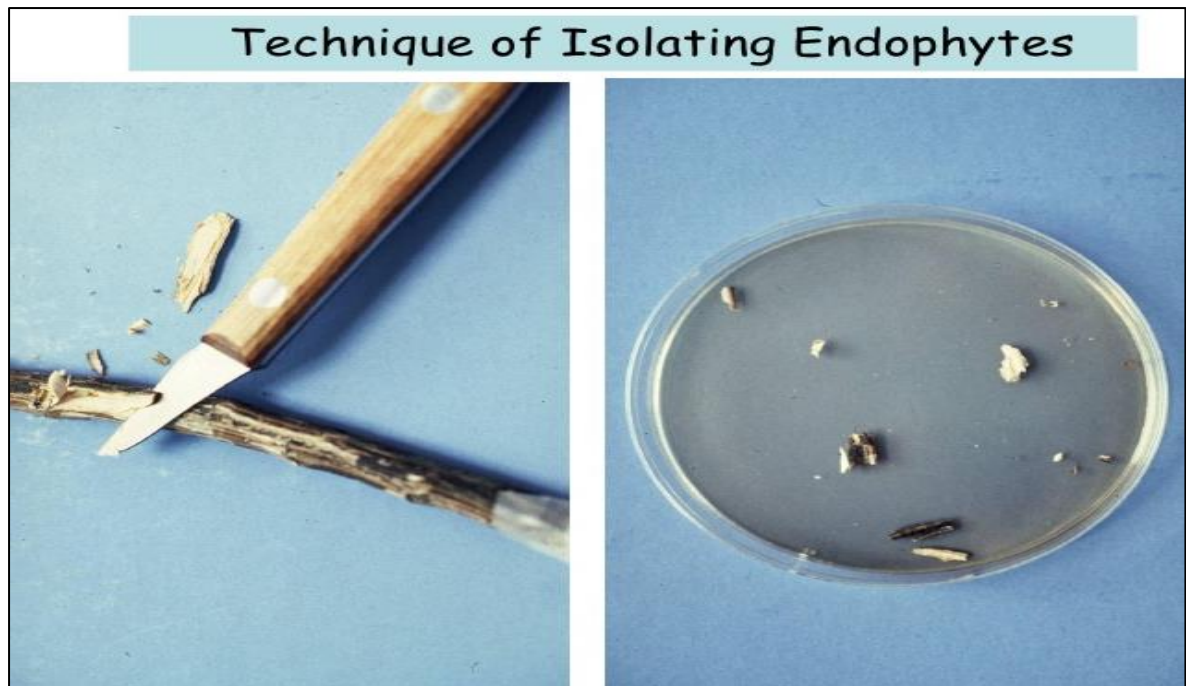


Figure 18 : Technique d'isolement des champignons endophytes [133].

L'incubation se fait à une température comprise entre une vingtaine de degrés Celsius (température ambiante) et 37°C.

Dès que les champignons commencent à se développer, il faut les repiquer séparément sur des milieux de culture adaptés. Il s'agit du milieu (PDA) composé de glucose, pomme de terre et agar, le milieu de Sabouraud (composé de di glucose, peptone et agar) mais surtout le milieu Malt « *Malt Extract Agar* » (composé d'extrait de malt, de peptone et d'agar), les milieux sont généralement supplémentés aseptiquement avec 150 mg/l de Gentamycine pour inhiber la croissance bactérienne [134].

Les blocs de gélose contenant les mycéliums et les structures identiques aux bulbilles sont fixés et déshydratés en vue de l'observation au microscope électronique. Le procédé de séchage entraîne des rétrécissements des structures biologiques, ce qui signifie qu'à l'état vivant, elles sont un peu plus grandes, et que les amas de cellules sont plus serrés. Les noyaux sont teintés par un réactif (le 4,6 diamino-2-phénylindole) et l'observation se fait sous UV(Ultraviolets) à 365 nm [134].

4.4 Méthodes d'identification

4.4.1 Observation des caractères cultureux macroscopiquement

L'observation d'une culture de *Taxomyces andreanae* montre :

- Des colonies à un aspect laineux.
- De couleur verdâtre.
- Une taille étendue et envahissante.
- Un mycélium aérien.
- Absence des gouttes d'exsudats.



Figure 19 : Culture dans une boîte pétrie du champignon *Taxomyces andreanae* [133].

4.4.2 Observation des caractères morphologiques microscopiquement

Chez *Taxomyces andreanae* le mycélium superficiel est composé d'un réseau ramifié, d'hyphes septaux, multinucléés, généralement hyalins et lisses, le diamètre des cellules de ces hyphes varie entre 1,25 et 3,75 μm .

Les cellules bourgeonnent à partir de fructifications des hyphes formant des groupes, et dont la forme varie énormément : de sphérique à ovoïde, à longiforme.

Quant à la taille, elle est de 5x5 μm de diamètre pour les cellules bulbilles sphériques et les bulbilles allongées ont une longueur variant de 16 à 30 μm , semblent être peu serrées

mais, néanmoins, sont reliées par du matériel fibreux restent incolores, elles sont ovoïdes (1,5 x 2,5 µm) et ne germent pas.

Elles sont remplies de structures cytoplasmiques (incluant des corps lipidiques). Elles possèdent aussi une membrane double. Néanmoins, elles diffèrent par un manque de pigmentation, des caractéristiques similaires à la sclérose (cellules externes arrondies et cellules internes gonflées) et dans leur mode de formation [134] (Figure 20).

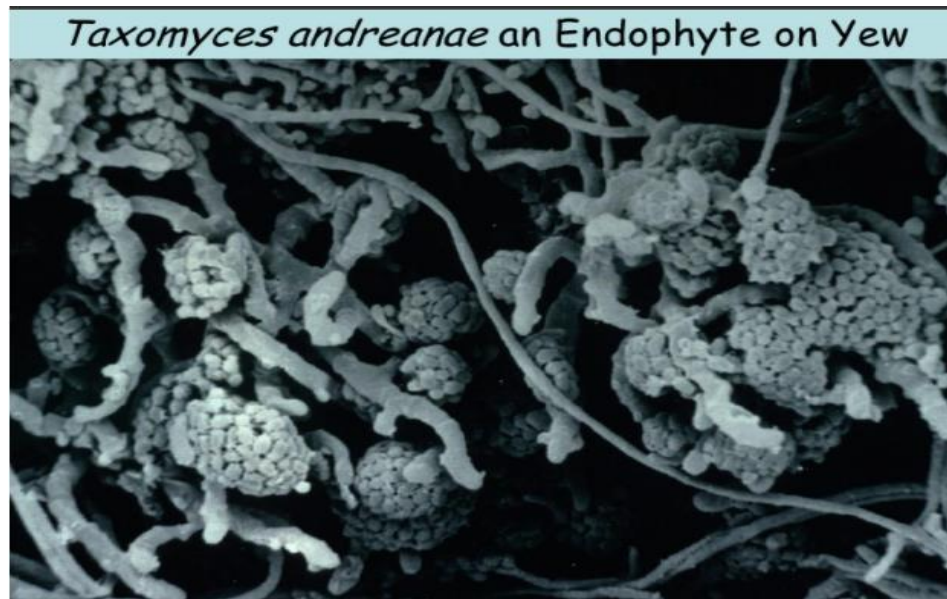


Figure 20 : Aspect microscopique de l'espèce *Taxomyces andreanae* sous microscope électronique [133].

Lorsqu'ils ont comparé les croissances mycéliales du champignon *Taxomyces andreanae* déposé sur des fragments de feuilles ou d'écorces pris sur des arbres localisés aux alentours de site de l'arbre *Taxus brevifolia*. Ils ont constaté que la meilleure croissance revient à *Taxus brevifolia*, tandis que sur certaines espèces rien ne pousse (cas de *Larbc occidentalis* : le mélèze). Ces observations suggèrent qu'il existe une préférence dans la nature pour l'hôte de *Taxomyces andreanae* et qu'il est peu probable de trouver un autre hôte que l'if [134].

De plus, des blocs de gélose colonisés par *Taxomyces andreanae* et placés sous l'écorce de l'if n'ont présenté aucune manifestation pathologique [134].

4.5 Culture de *Taxomyces andreanae* et production de Taxol

L'équipe de Strobel et Stierle [129], a collecté environ 300 champignons issus d'ifs européens provenant d'une vingtaine de sites différents. Parmi ces 300 champignons, un seul s'est révélé capable de produire du Taxol. Il s'agit de *Taxomyces andreanae*, champignon isolé à partir de l'écorce d'un if qui pousse dans une forêt de cèdre dans le Nord Montana [129] [135].

Taxomyces andreanae est cultivé par transfert des extrémités d'hyphes d'une gélose aqueuse sur laquelle les morceaux d'écorces ont été cultivés, à une gélose nutritive.

Le mycélium est ensuite plusieurs fois transféré afin d'éliminer toute trace de Taxol ou de dérivés taxoïdes qui proviendraient de l'arbre d'origine. Ces transferts de mycélium sur du bouillon de culture se font après 3 à 7 jours de croissance du mycélium. Après cette période, le mycélium semble passer à un stade quiescent [129] [135].

Le champignon est placé dans de l'eau à 4°C, et pousse sur un milieu de culture semi défini, les conidies ne germant pas dans ces conditions. De petits morceaux de gélose (0,5 x 0,5 cm) sont transférés sur un milieu S-7 (milieu préalablement défini comprenant, entre autres, un certain nombre de sucres) [129] [135].

Après 21 jours d'incubation, le milieu est filtré sur une gaze, le résidu est extrait et filtré à nouveau, les liquides sont extraits par du dichlorométhane, puis le solvant est séparé de la phase organique par évaporation rotative à 30°C, ne laissant ainsi que l'extrait organique. Une chromatographie sur couche mince révèle la présence d'un composé semblable au Taxol [129] [135].

4.5.1 Identification du Taxol

Une similitude entre le Taxol de l'if et le Taxol du champignon a été confirmée par spectroscopie, immunologie et différentes méthodes biologiques.

La Figure 21 représente le spectre de masse avec des pics caractéristiques du Taxol fongique. Ainsi la détection de la baccatine III dans le champignon.

➤ La réalisation sur 5 systèmes différents de chromatographie sur couche mince (CCM), a indiqué que le Taxol et la baccatine III isolés à partir de *Taxomyces andreanae* et ceux de l'if, ont les mêmes valeurs de Rapport Frontal (Rf). Ces composés réagissent positivement avec le réactif « acide vanilline sulfurique » en aérosol où il y a une production d'une tâche bleue, qui devient marron après 12 à 24 heures d'attente à 25°C.

Concernant le temps de rétention c'est le même pour le Taxol du champignon et celui du Taxol de l'if, en HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) sur gel de silice, avec un temps de rétention de 5 minutes. Le spectre ultraviolet du Taxol du champignon est aussi similaire à celui du Taxol de l'if, avec des maximums à 273 nm et 235 nm (Nanogramme). (Figure 21).

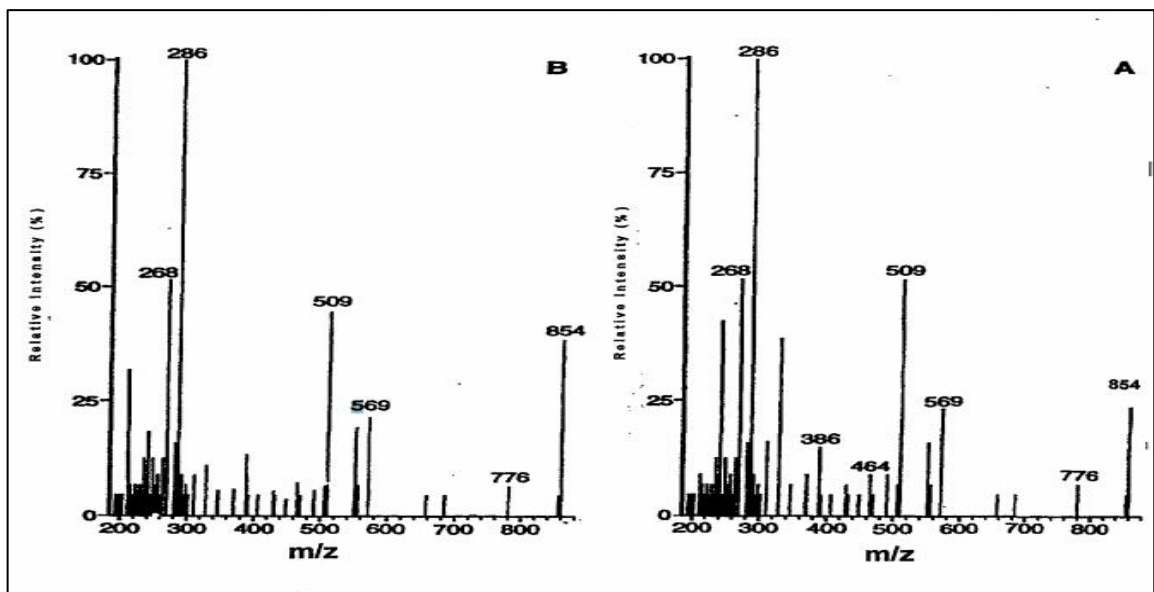


Figure 21 : Spectre de masse du Taxol de champignon (A) et du Taxol d'if (B) [129].

➤ La confirmation immunologique de la présence de Taxol et de ses analogues a pu être dévoilée en suivant le développement d'anticorps monoclonaux spécifiques du Taxol. Ces analyses immunologiques par inhibition enzymatique compétitive ont confirmé que les 2 Taxols (du champignon et de l'if) étaient similaires. D'autres analyses répétées utilisant ces anticorps, ont déterminé la présence de Taxol dans les préparations fongiques partiellement ou totalement purifiées [129].

4.5.2 Confirmation de l'origine de Taxol

Afin de démontrer que le Taxol trouvé dans *Taxomyces andreanae* est vraiment produit par lui, des précurseurs radiomarqués sont utilisés. Ces précurseurs sont ajoutés aux cultures de *Taxomyces andreanae* 20 jours après inoculation. Les cultures sont incubées pendant 4 jours à 25°C.

Le meilleur précurseur est la L- phénylalanine marquée au carbone 14 puisque la portion benzoyle du Taxol est dérivée de la phénylalanine. La confirmation de l'identité du Taxol marqué au carbone 14 est obtenue par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle.

On peut donc en conclure que le Taxol isolé à partir de *Taxomyces andreanae* est réellement un produit du métabolisme de l'organisme [129] [136].

4.5.3 Quantités de Taxol produites

Les quantités de Taxol produites par *Taxomyces andreanae* sont malheureusement faibles. Leur quantification par spectrométrie de masse indique 24 à 50 ng de Taxol par litre de culture [135].

5 La production à grande échelle

Afin d'obtenir la molécule d'intérêt, on fait l'extraction des plantes et cette dernière ne donne pas toujours de bon rendement ; de plus, le rendement dépend de l'environnement et des conditions climatiques [137].

Aussi la synthèse chimique de ces molécules est souvent compliquée et coûteuse pour les métabolites complexes. Il faut environ 20 étapes et une utilisation de solvant « dur » pour synthétiser entièrement le paclitaxel [137].

Par contre les champignons sont capables de synthétiser des molécules d'intérêt thérapeutique. Un certain nombre d'entre elles produit des molécules nouvelles, d'autres ont déjà été décrites auparavant chez les plantes. Certaines de ces molécules ont une forte valeur ajoutée, leur production à grande échelle est liée à de forts enjeux économiques [137] (Annexe 03).

Donc la production de ces molécules se fait par un simple principe avec simple méthodes qu'on a déjà cité (isolement, culture et identification de l'espèce). On déclenche ensuite la sporulation du champignon en le plaçant dans un milieu favorisant la production des spores (à base de mélasse et de sels) et les spores sont récupérées, pour ensuite inoculer des bioréacteurs afin produire les molécules d'intérêt [138].

5.1 Limites

Bien que beaucoup d'études montrent que les champignons endophytes sont capables de produire de nombreux métabolites d'intérêt, aucun d'entre eux n'a pour l'instant été exploité en production industrielle, car deux problèmes se posent [139] :

- Le rendement de production est trop faible. Pour le paclitaxel, il n'excède pas 1mg/L. Le rendement est très variable d'une souche à l'autre, *Aspergillus Niger var. Taxi* produit plus de 1000 fois plus de paclitaxel qu'*Alternaria sp.* Pour une même plante hôte [139]. (Tableau 07).
- La diminution du rendement de production après plusieurs repiquages en milieu de culture [140] (Annexe 04).

Ce mécanisme n'est pas encore élucidé, mais il peut s'expliquer par le fait que le champignon ait besoin de la plante hôte pour activer des voies métaboliques particulières, ou bien par le fait que certains gènes de biosynthèse soient extra-chromosomiques et s'épuisent au fur et à mesure des générations, ou encore que d'autres gènes deviennent silencieux [140].

Tableau 07 : Rendement de production du paclitaxel par des souches fongiques [141] [142].

Champignon endophyte	Souche fongique	Plante hôte	Rendement de paclitaxel (µg/L)
<i>Alternaria sp.</i>	Ja-69	<i>Taxus cuspidata</i>	0.16
<i>Alternaria sp.</i>	-	<i>Ginkgo biloba</i>	0.12-1.26
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EPTP-1	<i>Podocarpus sp.</i>	557.8

<i>Botryodiplodia theobromae</i>	BT115	<i>Taxus baccata</i>	280.5
<i>Botrytis sp.</i>	XT2	<i>Taxus chinensis var. mairai</i>	161.24
<i>Botrytis sp.</i>	HD181-23	<i>Taxus cuspidata</i>	206.34
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MD2	<i>Taxus media</i>	800
<i>Fusarium lateritimon</i>	Tbp-9	<i>Taxus baccata</i>	0.13
<i>Aspergillus niger var. Taxi</i>	HD86-9	<i>Taxus cuspidata</i>	206.34

D'après les résultats mentionnés dans Tableau 07, nous concluons qu'il y a une vaste gamme de souches fongiques qui sont capable de produire le Taxol avec une quantité très intéressante, et que cette quantité varie d'une espèce à une autre.

L'espèce *Alternaria sp.* est capable de produire de différentes quantités de Taxol selon la plante hôte qui est associée avec lui. Le rendement avec la plante *Ginkgo biloba* (0.12-1.26 µg/L) est plus élevé que celui avec *Taxus cuspidata* (0.16µg/L), et c'est le cas pour l'espèce *Botrytis sp.* où le rendement le plus élevé est indiqué avec la plante *Taxus cuspidata* (206.34µg/L).

Différemment pour les espèces *Fusarium lateritimon* et *Botryodiplodia theobromae* qui sont associées à la même plante hôte *Taxus baccata* avec un rendement mentionné respectivement : (280.5µg/L), (0.13µg/L).

Ces résultats montrent qu'il y a une relation réciproque entre la plante hôte, l'espèce de l'endophytes et le rendement de Taxol produit.

5.2 Améliorations

Deux types de stratégies sont décrits dans la littérature pour améliorer le rendement de production des champignons endophytes : celle qui vise à améliorer les conditions de culture et celle qui vise à améliorer directement la souche fongique [143] (Tableau 08) (Annexe 02).

Tableau 08 : Les stratégies utilisées pour améliorer le rendement.

AMELIORATION DES CONDITONS DE LA CULTURE	AMELIORATION DE LA SOUCHE FONGIQUE
<p>-Optimisation des paramètres de fermentation :</p> <p>-Amélioration des paramètres culturaux comme le pH, la température, l'agitation, le temps de fermentation, le milieu de culture, les sources de carbone et d'azote [144] (Annexe 06)</p>	<p>-Mutagenèse :</p> <p>- A l'aide d'agents chimiques (l'EMS (Méthane Sulfonâtes D'éthyle) ou physiques (des rayons X, gamma, Ultraviolets) (annexe 05)</p> <p>-Généralement on utilise une combinaison d'agents physiques et chimiques [143] [145].</p>
<p>-Co-culture :</p> <p>-Entre des cellules de la plante hôte et des cellules du champignon endophyte.</p> <p>Une étude de Li <i>et al.</i> [146] a permis d'augmenter 38 fois le rendement de production du paclitaxel (0,68mg/L en 15 jours de culture du champignon seul, contre 25,63mg/L en co-culture) [146].</p> <p>-Les cellules sont ajoutées dans un co-bioréacteur composé de deux compartiments, dont certains paramètres comme l'agitation ou le flux d'air peuvent être modulés indépendamment.</p> <p>-Les deux compartiments sont séparés par une membrane (filtre pyroxiline de 0,25µm) qui laisse passer les composés chimiques (mais les cellules ne peuvent pas passer au travers) [146] (Annexe 07).</p>	<p>-Ingénierie génétique :</p> <p>-En intégrant dans le génome de la souche un gène spécifique par exemple du gène TS (Thymidylate Synthase) qui code pour une enzyme nécessaire à la synthèse du paclitaxel [147].</p> <p>-Utilisation des précurseurs :</p> <p>-Consiste à apporter, de manière exogène, un intermédiaire qui doit être parfaitement ajusté d'une voie de biosynthèse [143].</p>

6 L'activité biologique du Taxol *in vitro*

Selon Andéol et *al.* [120], le paclitaxel, introduit dans un milieu de culture de cellules leucémiques murines à des concentrations qui peuvent être obtenues cliniquement, induit la formation de nombreuses zones de microtubules désorganisés, souvent alignés en amas parallèles et reliés entre eux par des ponts. Ces amas se forment quelle que soit la phase du cycle cellulaire [148] [149] [150]. Ces effets, concentration et temps dépendants, requièrent des cellules intactes avec des taux d'ATP (Adénosine Triphosphate) normaux [151]. En effet, l'observation du cytosquelette cellulaire isolé en présence de paclitaxel ne met pas en évidence d'amas de microtubules [149].

De plus, si le paclitaxel peut se lier à des cellules dont le taux d'ATP est en dessous de la normale, il n'induit pas la formation d'amas de microtubules. Il est donc probable qu'il existe des conditions cellulaires spécifiques pour la réorganisation du cytosquelette en présence de paclitaxel [149].

Selon Mahir [131], l'activité biologique du Taxol du champignon est évaluée par un test de cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB. La dose efficace à 50% ED50 (*Effective dose*) est de $7,8 \pm 1,5 \times 10^{-3}$ mg/ml pour le Taxol du champignon, et elle est de $4,3 \pm 3,2 \times 10^{-3}$ mg/ml pour le Taxol de référence. Ces résultats suggèrent que la configuration stéréochimique du Taxol du champignon serait suffisamment similaire à celle du Taxol de l'if pour avoir les mêmes activités immunologiques et cytotoxiques [129].

Selon Ismail et *al.* [152], cinq lignes de cellules cancéreuses différentes ont été utilisées pour évaluer l'activité anti-tumorale de Paclitaxel dérivée d'*A. fumigatus* et *A. Tenuissima*. Ces lignées cellulaires étaient hEPG-2 (cancer du foie humain), HEP-2 (Cancer de la Larynx humain), MCF-7 (cancer du sein humain), A-549 (cancer du poumon humain) et CHO-K1 (cancer du havre) [152].

Les résultats présentés dans le Tableau 09 ont indiqué que le Taxol (paclitaxel) fongique était actif contre toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées.

Tableau 09 : L'activité anticancéreuse de paclitaxel fongique contre divers lignées cellulaires cancéreuses [152].

Concentrat -ion du Taxol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Viabilité cellulaire %				
	HepG-2 du foie	HEp-2 la Larynx	MCF-7 du sein	A-549 du poumon	CHO-K1 du haver
0.00 (C)	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a	100±0.00a
0.39	98.38 ± 2.15a	100 ± 0.00a	98.09 ± 1.9a	96.72±1.92a	100 ±0.00a
0.78	93.22±3.62a	99.41±1.97a	91.46 ± 3.17b	90.48±2.59b	100±0.00a
1.56	86.17±1.85a	96.23±4.32a	82.3±8.11c	81.39±4.32c	98.72±1.13a
3.125	72.89±4.65d	88.06±1.79b	69.42±4.32d	48.27±6.21d	94.2±5.16b
6.25	45.93±3.17e	71.92±2.88c	43.68±6.19e	36.16±1.74e	72.95±2.65c
12.50	31.42±2.57f	52.69±6.17d	25.18±2.57f	26.54±2.65f	47.13±4.33d
25.00	20.56±1.65g	38. 5±5.21e	14.29±3.17g	19.48±4.19g	29.46±7.16e
50.00	12.47±1.09h	21.78±2.73f	9.16±1.65h	12.35±2.63h	16.72±2.5f
IC50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5.78	14.80	5.48	3.04	11.80

7 L'efficacité du Taxol (paclitaxel) *in vivo*

Une étude de Ding et *al.* [153] précise que, en plus de stabiliser la polymérisation de la tubuline, le paclitaxel est capable de stimuler la libération de cytokines : TNP (*Tumor Necrosis Factor*), et interleukines IL-1 et IL-2. Cette étude suggère qu'il pourrait avoir également un effet immunorégulateur [154] [155].

J. Evrard et *al.* [156], le traitement du cancer du sein métastatique en premier ligne par le protocole de chimiothérapie Taxol (paclitaxel®) 90 mg/m²-Avastin (bévacizumab) ne sera

plus pris en charge par l'assurance maladie. L'argumentaire apporté au déremboursement comprend : une augmentation des effets indésirables sous bévacizumab, une amélioration de la survie sans progression modeste, une amélioration de la survie globale non démontrée par rapport à un traitement par paclitaxel seul [156].

Donc le but est d'évaluer la tolérance et la survie sans progression en situation réelle de patientes traitées par le protocole de chimiothérapie Taxol®-Avastin® dans le cadre d'un cancer du sein métastatique [156].

7.1 Méthode d'analyse

L'équipe de Centre hospitalier Alpes-Léman ont fait une étude rétrospective sur 2 ans (2014 à 2016). Une population de patientes traitées par Taxol®-Avastin® pour un cancer du sein métastatique. L'Extraction de données est faite à partir du logiciel de prescription (Chimio®) et du logiciel d'information médicale (Orbis®) tels que l'âge, l'histologie, le nombre de cure, la tolérance a la chimiothérapie, la date et motif d'arrêt du traitement [156].

7.2 Résultats

Ils ont obtenu les résultats suivants :

Dix-neuf patientes incluses dans l'étude : 16 patientes en rechute d'un cancer localisé et 3 d'emblées métastatique. L'âge moyen est de 62 ans (min : 49 ans, max : 74 ans).

Les histologies rapportent en majorité : 72 % de carcinome infiltrant, 89 % de récepteurs hormonaux positif, 50 % de SBR2 et 28 % de SBR3 (*Sequencing Batch Reactor*) [156].

Les patientes ont reçu en moyenne 9 cures (min. 1 cure, max. 29 cures). Des effets indésirables sont rapportés chez 55 % des patientes pour le bévacizumab (épistaxis, gingivorragie, . . .) et 66 % pour le paclitaxel (neuropathie, toxicité unguéal). Les motifs d'arrêt sont : 52,9 % progression de la maladie, 23,5 % toxicité, 11,8 % refus du traitement/perdu de vue, 11,8 % décès [156].

Deux patientes sont encore sous traitement. La survie sans progression de la cohorte est de 9,1 mois. Dans les études du programme ESME et E2100, la survie sans progression est

comprise entre 8 et 11 mois dans le groupe paclitaxel + bévacicumab contre 6,4 à 5,8 mois pour le groupe Taxol® seul. Ces études rapportent une qualité de vie supérieure dans le groupe Avastin®. L'étude E2100 rapporte un taux d'arrêt de traitement de 23,7 % pour toxicité [156].

7.3 Conclusion des résultats

Les résultats obtenus par cette équipe concordent avec les études cliniques en termes de survie sans progression et de toxicité. L'association paclitaxel+ bévacicumab améliore la qualité de vie, donnée non négligeable en cancérologie bien que non prise en compte pour définir le déremboursement [156].

CONCLUSION

Vu la gravité du cancer et son évolution dramatique ces dernières années, ainsi que les différents problèmes de santé dû aux effets secondaire de la chimiothérapie, la recherche de nouvelles molécules naturelles bioactives a eu un énorme essor afin de lutter contre ces problèmes. C'est dans ce sens que s'inscrit notre travail, où on a présenté une source qui jusqu'à maintenant n'a pas été très explorée mais qui s'est révélée être une source inépuisable de métabolites secondaires bioactifs qui est les champignons endophytes. Pour cela, nous avons choisi d'exposer l'espèce *Taxomyces andreanae* associée à la plante hôte *Taxus brevifolia*, comme une source de molécule d'origine fongique à activité anticancéreuse « le Taxol® » ou paclitaxel, car la découverte de cette espèce a été la première démonstration qu'un organisme autre qu'une espèce d'un arbre (*Taxus brevifolia*) était capable de produire du Taxol.

Nous avons atteint notre objectif de rassembler quelques informations sur cette production, en se basant sur l'étude des protocoles de production et identification de Taxol réalisés par des chercheurs scientifiques où ils ont approuvé l'efficacité de Taxol contre divers types de cancer par une série de technique d'analyse biologiques. Ces dernières ont permis d'affirmer que le Taxol produit est d'origine fongique et non issu de l'if de l'arbre hôte, et également la similitude entre le Taxol de l'if et le Taxol du champignon. Ceci, par spectroscopie de masse et le test immunologie qui a aussi indiqué que le Taxol présent dans l'extrait organique de *Taxomyces andreanae* avec une quantité mesurée entre 24 et 50 ng/L, représentait entre 15 et 20% des taxanes totaux.

L'activité biologique du Taxol du champignon a été évaluée par un test de cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB, les résultats de ce test ont indiqué que le Taxol (paclitaxel®) fongique était actif contre toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées. Ces résultats ont permis aux scientifiques d'avancer dans la recherche et de réaliser d'autres tests *in vivo* sur des cellules leucémiques murines, et même sur une population de patientes traitées par le paclitaxel associé au bévacizumab pour un cancer du sein métastatique, où les résultats obtenus concordent avec les études cliniques en termes de survie sans progression et de toxicité.

Cependant, l'utilisation du Taxol n'est pas dénuée de problèmes, d'une part les quantités de Taxol produites par *Taxomyces andreanae* ou même par d'autres espèces où les quantités sont plus élevées que celle de *Taxomyces andreanae*, mais restent faibles. D'autre

part, le champignon a du mal à pousser sur les milieux de culture, ce qui a poussé les chercheurs à réfléchir à la stimulation de rendement de production des champignons endophytes par l'amélioration des conditions de culture ou améliorer directement la souche fongique, tant qu'il y a une relation réciproque entre la plante hôte, l'espèce et le rendement de Taxol produit. Mais ces différentes combinaisons de stimulation de culture n'ont pas encore abouti à une méthode applicable sur le plan industriel.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Groupe madel in Futura Mycologie (2001). [En ligne].https://www.futura-sciences.com/planete/definitions/champignon-mycologie-13525/?fbclid=IwAR0d-Xx4PttzzvlHEijXl0OXA W i j J J 7 M 3 i h u j a t _ T j E y 3 9 z g - E g e L 1 W A q s M (Consulté le : 15/05/2021).
2. O'Brien H.E., Parrent J.L., Jackson J.A., Moncalvo J., Vilgalys R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ Microbiol.* **71** (9): 5544–50.
3. Senequier-crozet A., Canard B. (2016). Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. Thèse de doctorat. Université Grenoble alpes .92p.
4. Ghourri S. Microorganisme eucaryotes. [En ligne]. Constantine : Université des Frères mentouri 1.2ème année. 45p. disponible sur. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=https%3A%2F%2Ffac.umc.edu.dz%2Fsnv%2Ffaculte%2Fbapp%2F2019%2Fmicroorganismes%2520eucaryotes.pdf&ved=2ahUKEwixhe2cxrjxAhXyB2MBHd1XAWAQFjABegQIERAC&usq=AOvVaw0yePdnQK5S1fuKFtpd9u63&fbclid=IwAR3ObmA74myWUFVzGiPyh865awqgYEQ345uVH4lcjvuCB0PWzY9vkTiGOO4> (consulté le : 19/05/2021).
5. Aissi A. (2019). Constat sur l'évolution des micromycètes tellurique dans deux stations de la région de Biskra (fontaine des gazelles et eloutaya) : agent causal des mycoses animales. Mémoire de mastère. Université Mohamed khider de Biskra. 33p.
6. Marc-André S., Guy D. (2004). Une classification mycologique phylogénétique francophone (en 2003), *Acta. Botanica Gallica.* **151**:1, 73-102.
7. Plourde P. (2016). Valorisation des champignons forestiers nordiques Par l'étude de leur activité biologique Pour des applications pharmaceutiques et cosméceutiques. Mémoire de master. Université du Québec à Chicoutimi. 125p.
8. Larsson R. (1999). Identification of Microsporidia. *Acta. Protozool.* **38**(3): 161–97.

9. Desportes I., Le Charpentier Y., Galian A., Bernard F., Cochand-Priollet B., Lavergne A. (1985). Occurrence of a new microsporidan: Enter *ocytozoonbieneusi* sp, in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.* **32(2)**: 250–4.

10. James TY., Letcher PM., Longcore JE., Mozley-Standridge SE., Porter D., Powell MJ., et al. (2006). A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia.* **98(6)**: 860–71.

11. Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol. Res.* **111(5)**: 509–47.

12. Blandeau E. (2012). Etat des lieux du potentiel anticancéreux de neuf champignons macroscopiques. Thèse de Doctorat. Université Angres. 114p.

13. Halary S., Malik S.B., Lildhar L., Slamovits C.H., Hijri M., Corradi N. (2011) Conserved meiotic machinery in *Glomus spp.*, a putatively ancient asexual fungal lineage. *Genome Biol. Evol.* **3(0)**: 950.

14. Redecker D., Raab P. (2006) Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia.* **98(6)**: 885–95.

15. Helgason T., Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H., Young J.P. (1998). Ploughing up the wood wide web. *Nature.* **394(6692)**: 431.

16. Ainsworth G.C., Hawksworth D.L., Bisby G.R. (2008). Ainsworth & Bisby’s dictionary of the fungi. (10ème edition), CAB International. 771 p.

17. Mesfek F. (2012). Etude écologique et taxonomique des champignons forestiers et morphologie des ectomycorhizes du chêne vert dans la wilaya de Relizane. Mémoire de magister. Université d’Oran ES SENIA. 160p.

18. Rv. (2019). Les mycorhizes, symbiose et résilience. [En ligne]. <https://autonomieresilience.fr/les-mycorhizes-symbiose-et-resilience> (Consulté le : 24 /05/2021).

19. Sahli A., Attafi M. (2018). Le cancer colorectal : Etude épidémiologique et dosage des marqueurs tumoraux ACE et CA19.9. Mémoire de master. Université des frères Mentouri Constantine. 54p.
20. Mermoune I., Hafdi K. (2016). Docking une nouvelle révolution pour combattre le cancer du sein. Mémoire de mastère. Université des frères Mentouri constantine.49p.
21. Oukkir H., Hadjazi N. (2020). Détermination du profil épidémiologique du cancer de l'over : résumé et comparaison de trois études en Algérie. Mémoire de mastère. Université des Frères Mentouri Constantine.57p.
22. Boukhadra A., Bousba O. (2015). L'hépatotoxicité induite par les anticancéreux. Mémoire de mastère. Université des frères Mentouri Constantine. 50p.
23. Rolling A. (2013). Les traitements du cancer de l'endomètre. Édité par l'Institut national du cancer.86p.
24. Yaker A. (1985). Cancérologie générale. Edition N° 1638.336p.
25. Bourbia H., Ayache G. (2012). Activité anticancéreuse des alcaloïdes. Mémoire de mastère. Université de Jijel.28p.
26. Guide Cancer info. (2019). Qu'est-ce que la chimiothérapie ? [En ligne].<https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Se-faire-soigner/Traitements/Chimiotherapie/Qu-est-ce-que-la-chimiotherapie> (Consulté1 le : 7/05/2021).
27. Poirier Antunes J. (2019). Mycothérapie : de son usage traditionnel à ses perspectives d'utilisation en pharmacie. Thèse de doctorat. Université de Caen Normandie. 200p.
28. Courio A. (2019). La mycothérapie. [En ligne]. <https://mycelab.fr/blogs/mycelab-le-blog/la-mycotherapie> (consulté le : 15/052021).
29. Geuritte F. Plantes, organismes marins, microorganismes : sources de médicaments anticancéreux. (2006). Paris :https://www.canal-u.tv/video/universite_de_tous_les_savoirs/plantes_organismes_marins_microorganismes_sources_de_medicaments_anticancereux.1478 6p.

30. Institut Pasteur. (2016). Efficacité des traitements contre le cancer : deux bactéries de notre microbiote identifiées. [En ligne]. <https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/actualites/efficacite-traitements-contre-cancer-deux-bacteries-notre-microbiote-identifiees> (Consulté le : 22 /5/ 2021).
31. Hadj Bouazza S. (2016). Production de Parasporines bactérienne à activité anticancéreuse dans des milieux de grade pharmaceutique. Mémoire de master. Université du Québec à Trois-Rivières. 64p.
32. Quentin A. (2017). Bactériologie et Cancers : vers de nouvelles stratégies thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université de Caen Normandie. 76p.
33. Estelle B. (2020). La chimiothérapie acheminée vers la tumeur par des bactéries magnétotactiques. [En ligne]. <https://www.sante-sur-le-net.com/chimiotherapie-tumeur-bacteries-magnetotactiques> (Consulté le : 23 /5/2021).
34. Ma Y. (2013). Anticancer Chemotherapy-Induced Intra tumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells. *A cell press*. **38(4)**: 729-41.
35. Saget I. (2019). Le magazine de la santé par les plantes. [Enligne].<https://www.plantes-et-sante.fr/articles/cancer/3174-lutter-contre-le-cancer> (Consulté le : 10/05/2021).
36. Equipe de rédaction Santé log. (2018). Mycothérapie : des champignons efficaces contre les tumeurs. [En ligne]. <https://www.santelog.com/actualites/mycotherapie-des-champignons-efficaces-contre-les-tumeurs> (Consulté le : 22/05/2021).
37. Karaoui S. (2017). Etude de l'activité antibactérienne de champignons endophytes foliaires de *Peganum harmala* de la région de Laghouat (Algérie). Mémoire de master. Université mouloud Mammeri de Tizi ousou.63p.
38. Samae A., Hiranrat A., O-thong S., Supaphon P., Intrasungkha N. (2019). Isolation and identification of endophytic fungi from seaweeds in Southern Thailand and their antibacterial activities against some antibiotic resistance bacteria. *Research Journal of Biotechnology* .**14**: 56–62

- 39.** Chirane A., Merzoud Y. (2019). Evaluation de l'activité antibactérienne des champignons endophytes isolés d'*Artemisia herba alba*. Mémoire de master. Université Mohamed Boudiaf M'sila. 30p.
- 40.** De Barry A. (1866). Morphologieend Physiologie der Pilze, Flechtenend Myxomyceten.
- 41.** Allal K., Hamma L. (2019). Activités biologiques d'un champignon endophyte *Penicillium* sp. Isolé à partir d'une plante médicinale de la région Bordj Bou Arreridj. Mémoire de mastère. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.38p.
- 42.** Carroll G C. (1986). The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. *Microbiology of the Phylosphere*. 205- 222.
- 43.** Zerroug A. (2011) Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk.). Mémoire de magister. Université Ferhat Abbas Sétif 1.71p.
- 44.** Moricca S., Ragazzi A. (2008). Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*. **98**: 380-386.
- 45.** Maheshwari R. (2006). What is an endophytic fungus? . *Current Science*. **90**: 1039.
- 46.** Stierle A., Strobel G., Stierle D. (1993). Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. **260(5105)**: 214–6.
- 47.** Blackwell M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million Species?. *American Journal of Botany*. **98(3)**: 426–438.
- 48.** Mane R.S., Paarakh P.M., Vedamurthy A.B. (2018). Brief Review on Fungal Endophytes. *Int. J. Second Metab*. **5**: 288–303.
- 49.** Fadhela M. (2017). Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L). Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach. 164p.
- 50.** Bennaim O., Daifallah F. (2020). Champignons endophytes : un puissant agent de lutte biologique et un réservoir de métabolites secondaires bioactifs. Mémoire de mastère. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.46 p.

51. Karaoui S. (2017). Etude de l'activité antibactérienne de champignons endophytes foliaires de *Peganum harmala* de la région de Laghouat (Algérie). Thèse de master. Université Mouloud Mammeri de Tizi ouzou.74p.
52. Rodriguez R.J., White J.F., Arnold A.E., Redman R.S., (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. **182** (2): 314-330.
53. Tintjer T., Leuchtman A., Clay K. (2008). Variation in horizontal and vertical transmission of the endophyte *Epichloëlymi* infecting the grass *Elymus hystrix*, *New Phytologist*.
54. Hyde K.D., Soyong K. (2008). In "The fungal endophyte dilemma". *Fungal Diversity*. **33**: 163-173.
55. Mishra Y., Singh A., Batra A., Sharma M.M. (2014). Understanding the biodiversity and biological applications of endophytic fungi: a review. *J.Microb.Biochem. Technol.* **S8**:004.
56. Saikkonen K., Mikola J., Helander M. (2015). Endophytic phyllosphere fungi and nutrient cycling in terrestrial ecosystems, fungal endophytes – biology and bioprospecting. *Current Science*.**109**: 1.
57. Hyde, K.D.; Soyong, K. (2008). In "The fungal endophyte dilemma". *Fungal Diversity*. **33**: 163-173.
58. Clay K. (1990). Fungal endophytes of grasses, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **21**:275-97.
59. Zerroug A. (2021). Champignons endophytes des plantes médicinales de la région de Sétif : Isolement, Identification et activités biologiques. Mémoire de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif 1.113 p.
60. Selosse M.A., Schardl C.L. (2007). Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *New Phytologist* .**173**: 452-458.
61. Dirihan S. (2016). Grass-endophyte coevolution and ploidy levels in fescues. Université Painosalama Oy - Turku, Finland. ISBN 978-951-29-6466-6.

62. Saikkonen K., Saari S., Helander M. (2010). Defensive mutualism between plants and endophytic fungi. *Fungal Diversity*. **41**:101-113.
63. Gimenez C., Cabrera R., Reina M., and González-Coloma A. (2007). Bentham Science Publishers Ltd. Fungal Endophytes and their Role in Plant Protection. *Current Organic Chemistry*. **11**:707-720.
64. Repussard C., Zbib N., Tardieu D., Guerre P. (2013). Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines : généralités et problématique française. *Revue Méd. Vét.* **164**: 12, 583-60.
65. Arnold A.E., Mejía L.C., Kyllö D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 15649-15654.
66. Zabalgogezcoa I. (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish journal of Agricultural Research*. **6**: p138-146.
67. Saikkonen K., Wälli P., Helander M., Faeth S.H. (2004). Evolution of endophyte-plant symbiosis. *Trends in Plant Science*. **9**: 275–280.
68. Kusari S., Singh S., Jayabaskaran C. (2014). Biotechnological potential of plant associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends in Biotechnology*. **32**: 297-303.
69. Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **435**: 824–827.
70. Selim K.A., Elbeih A., Abdel-Rahman T.M., El-diwany A.I. (2012). Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*. **2**:31-82.
71. Touseef A. (2006). Endophytic Fungi harbored in Nothapodytes Foetida Plants. Mémoire de master. Université Aligarh India. p135.
72. Redman R.S., Dunigan D.D., Rodrigues R.J. (2001). Fungal symbiosis from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader ?. *New Phytologists*. **151**: 705–716.

73. Miral A. (2018). *Helichrysum italicum* et ses micromycètes endophytes : Diversité et biotransformations. Thèse de doctorat. Université Toulouse III Paul Sabatier. 132 p.
74. Liu C.H., Zou W.X., Lu H., Tan R.X. (2001). Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*. **88**: 277-282.
75. Azevadeo J.L., Maccheroni W., Pereira J.O., Araujo W.L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB. Electronic Journal of Biotechnology*. **3**: 1-36.
76. Vijeshwar V., Pankaj S., Amardeep K. (2008). Endophytes: A Novel Source for Bioactive Molecules. *Proc. Indian Natn. Sci. Acd.* **74**: 73-86.
77. Yan L., Zhao H., Zhao X., Xu X., Di Y., Jiang C., Shi J., Shao D., Huang Q., Yang H., Jin M. (2018). Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **102**: 6279–6298.
78. Suryanarayanan., Trichur S., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu M.B., Gopalan V. (2012). Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity*. **54**: 19–30.
79. Soleimani M., Hajabbasi M.A., Afyuni M., Mirlohi A., Borggaard OK., Holm P.E. (2010). Effect of endophytic fungi on cadmium tolerance and bioaccumulation by *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. *Int J Phytoremediation*. **12**: 535–549.
80. Spatafora J.W., Bushley K.E. (2015). Phylogenomics and evolution of secondary metabolism in plant-associated fungi. *Curr Opin Plant Biol.* **26**: 37–44.
81. Spiteller P. (2015) Chemical ecology of fungi. *Natural product reports*. **32(7)**: 971–93.
82. Zenk M.H., Juenger M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry Review* .**68**: 2757 - 2772.
83. Roberts M.F., Wink M. (1999). Alkaloids- Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Book Reviews I Phytochemistry*. **52**: 1177 - 1180.

84. Jain S.C., Pillrohit M. (1986). Antitumor active pyrrolizidine alkaloids from *Hebolropillnmanio/llft* Retz Chem. *Pharm. Bull.* **14**: 5154-5156.
85. Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. (4^{ème} édition). Lavoisier. 915 p.
86. Zhanga Y. (2012). Alkaloids Produced by Endophytic Fungi: A Review. *Nat. Prod. Commun.* **7(7)**: 963-8.
87. Khan A.L., Hamayun M., Kim Y.H., Kang S.M., Lee J.H., Lee I.J. (2011). Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, iso flavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochem.* **46 (2)**: 440–7.
88. Morot-Gaudry J.F., Prat R. (2009). Biologie végétale : croissance et développement, (1^{ère} édition), Dunod. 256 p.
89. De Souza J.J., Vieira I.J.C., Rodrigues-Filho E., Braz-Filho R. (2011). Terpenoids from endophytic fungi *Molecules*. **16(12)** : 10604–18.
90. Keller N.P., Turner G., Bennett J.W. (2005). Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3(12)**: 937–47.
91. Tambadou F. (2014). Étude de la production de peptides non-ribosomiques chez des souches de *Paenibacillus*. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle. 202p.
92. Jasperd E. (2014). Les métabolites secondaires ou produits naturels - Le métabolisme secondaire. [En ligne]. <http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/2MetabolismeSecondaire/1MetabolismeSecondaire.htm> (Consulté le 28/05/2021).
93. Strobel G. et Daisy B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **67**: 491-502.
94. Hellwig V., Grothe T., Mayer B.A., Endermann R., Geschke F.U., Henkel T., 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)**: 881-892.
95. Limura S., Overman LE., Paulini R., Zakarian A. (2006). Enantioselective total synthesis of guanacastepene N using an uncommon 7-endo Heck cyclization as a pivotal step. *Journal of the American Chemical Society.* **128(40)**:13095-13101.
96. 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.
97. Srinivasan K., Jagadish L.K., Shenbhagaraman R., Muthumary J. (2010). Antioxidant Activity of Endophytic Fungus *Phyllosticta sp.* Guazuma Tomentosa. *Journal of Phytology* .**2**: 37–41.
98. 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.
99. Song Y.C., Li H., Ye Y.H., Shan C.Y., Yang Y.M., Tan R.X. (2004). Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS. Microbiology Letters.* **241**: 67-72.
100. Futura science. Polyphénol. [En ligne]. <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-polyphenol-6212> (Consulté le : 02/06/2021).
101. Zhang G, Sun S, Zhu T, Lin Z, Gu J, Li D, Gu Q. (2011). Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella sp.* *Aegicerascorniculatum*. *Phytochemistry.***72**:1436–1442.
102. Ahrawel R.P., Kumar S., Sandhu S. (2016). Endophytic mycoflora as a source of Biotherapeutic Compounds of Disease Treatment. [En ligne]. https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-some-Anti-viral-bioactive-compounds-from-endophytic-mycoflora_fig4_309713784 (Consulté le : 23/05/2021).

103. Rajamanikyam M., Vadlapudi V., Amanchy R., Upadhyayula S.M. (2017). Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. *Braz. Arch. Biol. Technol.***60**: e17160542.
104. Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products.***67**: 257-268.
105. Uvideilo C., Strobel G. (2007). Sourcing Natural Products from Endophytic Microbes .**10.1201/9781420006889**.
106. Verma V.C., Gange A.C. (2014). Advances in endophytic research. Springer India.460 p.
107. Dictionnaire Vidal. (2015). (91ème édition), Vidal.3648p
108. Caulin C., Vidal recos. (2015). (5ème édition), Broché.2559 p.
109. Acadpharm. (2020). Lovastatine. [En ligne]. https://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Lovastatine&mobileaction=toggle_view_mobile (Consulté le : 27/05/2021).
110. Raghunath R., Radhakrishna A., Angayarkanni J., Palaniswamy M., Nadu T. (2012) Production and cytotoxicity studies of lovastatin from *Aspergillus niger* PN2 an endophytic fungi isolated from *Taxus baccata*. *IJABPT.* **3(3)**: 342–51.
111. Janusz S. (1991). Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.***88**: 3628–32.
112. FDA. Monographie Tablets Mevacor®.
113. Acadpharm. (2016). Lovastatine. [En ligne]. https://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Lovastatine&mobileaction=toggle_view_mobile (Consulté le : 29/05/2021).
114. WANG F.W.U. (2012). Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. *Journal of Natural Medicines.* **10 (1)**: 0072-0076.

- 115.** Tang H.M., Hamblin M.R., Yow C.M.N. (2007). A comparative *in vitro* photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *Journal of Infection and Chemotherapy*. **13**: 87–91.
- 116.** Shaodan C., Tianqiao Y., Yifang Z., Jiyan S., Chunwei J., Yizhen X. (2017). Anti-tumor and Anti-angiogenic Ergosterols from *Ganderma lucidum*. *Frontiers in Chemistry*. **5**:85.
- 117.** Zhao J., Shan T., Mou Y., Zhou L. (2011) Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini Rev. Med. Chem.* **11(2)**: 159–68.
- 118.** Dictionnaire Vidal. (2015). (91ème édition), Vidal.3648p.
- 119.** Jalgaonwala R.E., Mohite B.V., Mahajan R.T. (2011). A review: natural products from plant associated Endophytic fungi. *Journal of microbiology biotechnology research*. **1(2)**:21-32.
- 120.** Senequier-crozet A., canard B. (2016). Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. Thèse de doctorat. Université Grenoble alpes .92 p.
- 121.** La propriété de Medi Resource Inc. (1996). Ressources santé. [EN ligne]. <https://ressourcessante.salutbonjour.ca/drug/getdrug/taxol> (consulté le : 27/052021).
- 122.** Mahier S. (1999). Le Taxol et ses nouvelles sources d'approvisionnement. Thèse de doctorat. Université joseph fourier.102p.
- 123.** Zu Y.G., Tang Z.H., Yu J.H., Liu S.G., Wang W., Guo X.R. (2003). Different responses of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin to heat shock in *Camptotheca acuminata* seedlings. *Acta. Bot. Sin.* **45 (7)**: 809–14.
- 124.** Horwitz S. (1992). Mechanism of action of Taxol. *TiPS*.**13**:134–5.
- 125.** Gascoigne K.E., Taylor S.S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.* **122(Pt 15)**: 2579–85.

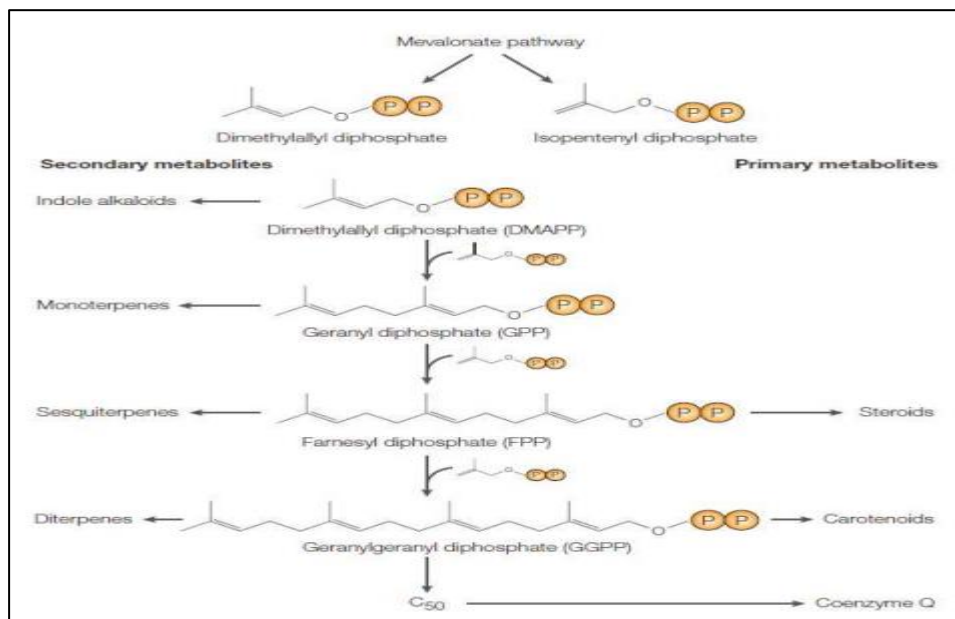
126. States UD of A. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. (2013). [En ligne]. <http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=5260&pf=1> (Consulté le 22/04/2021).
127. Weaver B.A. (2014). How Taxol/Paclitaxel kills cancer cells. *Mol. Biol. Cell.* **25(18)**: 2677–81.
128. Myers F. (1993). Surprise! A Fungus Factory for Taxol?. *Science.* **260**:154- 155.
129. Stierle A., Strobel G., Stierle D. (1993). Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **260**:214-216.
130. Prakash V., Shelly R., Anand S. (2016). *Taxomyces andreanae*: A source of anticancer drug. *International Journal of Botany Studies.* **1**: 43-46.
131. Mahier S. (1999). Le Taxol et ses nouvelles sources d’approvisionnement. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier. 102p.
132. Christopher J. Earle. (2009). *Taxus brevifolia*. [En ligne]. https://www.conifers.org/ta/Taxus_brevifolia.php (Consulté le : 28/05/2021).
133. Strobel G. (2009). Introduction to endophytes and their application to develop commercial products. [En ligne]. <https://www.slideshare.net/TFInnova/talk-1-gary-strobel> (Consulté le : 29/05/2021).
134. Strobel G., Stierle A., Stierle D., Hess W.H. (1993). *Taxomyces andreanae*, a proposed next taxon for a bulbiferous phomycete associated with Pacific Yew (*Taxus brevifolia*). *Mycotaxon.* **XLVII**: 71-80.
135. Stierle A., Strobel G., Stierle D., Grothaus P., Bignami G. (1995). The search for a Taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.* **58**:1315-1324.
136. Heald., Wolf F.A. (1911). *Cercosporacapsici*. *Mycologia.* **3(1)**: 15.

137. Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A.K.; Krohn K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* **106(9)**: 996–1004.
138. Khajuria R.K., Sinha R.V.P., Verma V., Qazi G.N et al. (2002). Novel composition for early and profuse sporulation in fungi and a method thereof. Brevet.
139. Priti V. (2009). How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites. *Curr. Sci.* **97(4)**: 477–8.
140. Sachin N. (2013). Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary métabolites?. *Curr. Sci.* **104(2)**: 178–82.
141. Verma V.C., Gange A.C. (2014). Advances in endophytic research. Springer India. 460 p.
142. Zhao J., Shan T., Mou Y., Zhou L. (2011). Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini Rev. Med. Chem.* **11(2)**: 159–68.
143. Venugopalan A., Srivastava S. (2015). Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **33(6)**: 873–87.
144. Kai Z., Zhugang L. (2011). Investigation of fermentation conditions and optimization of medium for Taxol production from Taxol-producing fungi. *J Med Plants Res.* **5(29)**: 6528–35.
145. Zhou X., Zhu H., Liu L., Lin J., Tang K. (2010). A review: Recent advances and future prospects of Taxol-producing endophytic fungi. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **86(6)**: 1707–17.
146. Li Y.C., Tao W.Y., Cheng L. (2009). Paclitaxel production using co-culture of Taxus suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **83 (2)**: 233–9.
147. Wei Y., Liu L., Zhou X., Lin J., Sun X., Tang K. (2012). Engineering Taxol biosynthetic pathway for improving Taxol yield in Taxol-producing endophytic fungus EFY-21 (*Ozoniumsp.*). *African J. Biotechnol.* **11 (37)**: 9094–101.

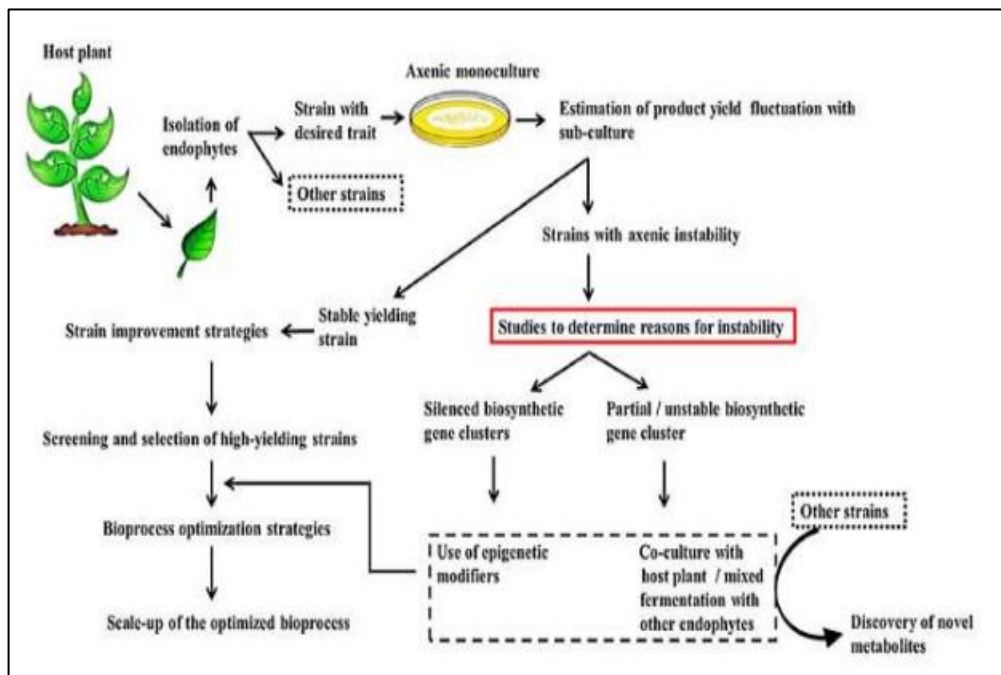
- 148.** Hodgson S., de Cates C., Hodgson J., Morley N.J., Sutton B.C., Gange A.C. (2014). Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecol. Evol.* **4(8)**: 1199–208.
- 149.** Duan X., Neuman D. (1996) Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *J. Exp. Bot.* **47(303)**: 1541–50.
- 150.** Deacon J.W. (2005). *Fungal Biology*, (4ème édition), Wiley-Blackwell. 384 p.
- 151.** Bruneton J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. (4ème édition) Lavoisier. 915 p.
- 152.** Ahmed A., Ismaiel., Ashraf S., Ahmed., Ismail A., Hassan., El-Sayed R., El-Sayed2., Al-Zahraa A., Karam El-Din. (2017). Production of paclitaxel with anticancer activity by two local fungal endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **253**:017-8354.
- 153.** Ding A.H., Porteu F., Sanchez E., Nathan C.F. (1990). Shared action of endotoxin and Taxol on TNF receptors and TNF release. *Science.* **22**:613-617.
- 154.** Evrard., Beau M., Gantz D., Assiaz C. (2017). Evaluation du protocole associant Avastin® (bévacizumab) et Taxol® (paclitaxel) dans le traitement du cancer du sein métastatique. *Elsevier. Masson. SAS.* **52** :29.

ANNEXES

Annexes 01 : Voie de synthèse des terpènes chez les champignons.



Annexes 02 : Approche rationnelle permettant d'optimiser la production de métabolites secondaires par les champignons endophytes.



Annexe 03 : Marché mondial des molécules d'intérêt produites par les endophytes.

Compound	Uses	Demand and supply statistics	Reference
Taxol	Antitumor	<ul style="list-style-type: none"> Annual sales in 2006 = 3.7 billion USD Annual demand = 600 kg Treatment per patient consumes about eight 60-year-old yew trees 10,000 kg of Taxus bark or 3000 yew trees = 1 kg of taxol 	Malik et al. (2011)
Camptothecin	Antitumor	<ul style="list-style-type: none"> Supplied from two plants – <i>Camptotheca acuminata</i> and <i>Nothapodytes foetida</i> – both critically endangered ~ 1000–1500 tons of wood chips = 1 ton of camptothecin Annual sales in 2003 = 1 billion USD Annual biomass demand in India in 2006 = 500–700 metric tons Annual biomass demand in Japan in 2006 = 1000 metric tons Global camptothecin demand in 2011 required 100 million trees 	Patwardhan (2006)
Vinca alkaloids	Antitumor	<ul style="list-style-type: none"> Very low yield from plant (0.0003% DW) Annual demand = 0.3 tons Annual sales = 200 million USD Production via plant cell cultures unsuccessful so far 	Hendrawati et al. (2012)
Digitalis glycosides	Cardiotonic	<ul style="list-style-type: none"> Annual demand = 1000 metric tons plant material Patients require 1 mg/day Worldwide drug demand = several thousand kilograms per year India – annual demand \pm 30 quintals 	Mangathayaru (2013)
Diosgenin	Progesterone precursor	<ul style="list-style-type: none"> Accounts for 2/3rds of the total world consumption of steroids Annual demand = 3000 tons India – annual demand = 150 tons India total production = 30 tons 	Dangi et al. (2014)
Podophyllotoxin	Antitumor	<ul style="list-style-type: none"> Only 2 plant sources known – <i>Podophyllum hexandrum</i> and <i>Podophyllum peltatum</i> – both endangered Annual demand \geq 100 metric tons Annual supply = 50–80 tons 	Alam et al. (2009)

Annexe 04 : Diminution de la production des métabolites secondaires par les champignons endophytes après plusieurs repiquages.

Compound	Fungus/bacterial strains	Host plant	Metabolite production over subculture generation					Reference
			1st	2nd	3rd	4th	5th	
Camptothecin	<i>Fusarium solani</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	600 μ g/100 g	570 μ g/100 g	60 μ g/100 g	100 μ g/100 g	50 μ g/100 g	Kusari and Spittler (2010)
	UAS023	<i>Nothapodytes nimmoniana</i>	–	3 μ g/100 g	1.7 μ g/100 g	1 μ g/100 g	–	Gurudatt et al. (2010)
	UAS015	<i>Nothapodytes nimmoniana</i>	–	2 μ g/100 g	1.4 μ g/100 g	0.8 μ g/100 g	–	
	UAS001	<i>Nothapodytes nimmoniana</i>	–	1.5 μ g/100 g	0.8 μ g/100 g	0.55 μ g/100 g	–	
	UAS013	<i>Nothapodytes nimmoniana</i>	–	0.5 μ g/100 g	0.40 μ g/100 g	0.50 μ g/100 g	–	
Taxol	<i>Periconia</i> sp.	<i>Torreya grandifolia</i>	350 ng/L	330 ng/L	280 ng/L	200 ng/L	118 ng/L	Li et al. (1998)
Rohitukine	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Dysoxylum binectariferum</i>	186 μ g/100 g	120 μ g/100 g	50 μ g/100 g	–	–	Mohana Kumara et al. (2012)

Annexe 05 : Impact de la mutagenèse sur le rendement de production.

Product	Wild-type strain	Mutant strain	Mutagen	Yield enhancement	Reference
Taxol	HD1-3	UN25-3	UV, NTC and UV + NTC	1.4 fold	Kai et al. (2008)
Taxol	HD1-3	UD (14-1)	UV + DES	1.34 fold	Zhao et al. (2011e)
Taxol	<i>Nodulisporium sylviforme</i> HQD33	<i>N. sylviforme</i> NCEU-1	UV, EMS, 60Co (60Co- γ -ray) and NTC	2.5 fold	Zhou et al. (2001)
Taxol	<i>Fusarium maire</i> strain Y1 117	<i>F. maire</i> K178	UV + DES	8.6 fold	Xu et al. (2006a)
Berberine	S6	S-NU-302	UV, X-rays and NaNO ₂	170%	Gao et al. (2008)
Tanshinone IIA	<i>Emericella foeniculicola</i> TR21	<i>E. foeniculicola</i> NU152	UV + NaNO ₂	1.46 fold	Ma et al. (2011)
Vincamine	XM-J2	XM-UL-7-5	UV-laser	2.1 fold (62.3% increase in biomass)	Yin and Sun (2011)

Product	Wild-type strain	Mutant strain	Mutagen	Yield enhancement	Reference
Taxol	HD1-3	UN25-3	UV, NTC and UV + NTC	1.4 fold	Kai et al. (2008)
Taxol	HD1-3	UD (14-1)	UV + DES	1.34 fold	Zhao et al. (2011e)
Taxol	<i>Nodulisporium sylviforme</i> HQD33	<i>N. sylviforme</i> NCEU-1	UV, EMS, 60Co (60Co- γ -ray) and NTC	2.5 fold	Zhou et al. (2001)
Taxol	<i>Fusarium maire</i> strain Y1 117	<i>F. maire</i> K178	UV + DES	8.6 fold	Xu et al. (2006a)
Berberine	S6	S-NU-302	UV, X-rays and NaNO ₂	170%	Gao et al. (2008)
Tanshinone IIA	<i>Emericella foeniculicola</i> TR21	<i>E. foeniculicola</i> NU152	UV + NaNO ₂	1.46 fold	Ma et al. (2011)
Vincamine	XM-J2	XM-UL-7-5	UV-laser	2.1 fold (62.3% increase in biomass)	Yin and Sun (2011)

Annexe 06 : Impact des paramètres de fermentation sur le rendement de production.

Product	Strain	Optimized parameters	Methodology	Yield enhancement	Reference
Taxol	<i>Fusarium mairei</i> UHQ3	Initial pH, inoculation volume, working volume, temperature, carbon and nitrogen source, fermentation period	Single factor	10.2%	Dai and Tao (2008)
Taxol	Mutant <i>F. mairei</i> K178	Nitrogen source and trace elements	Plackett Burman design and RSM	1.3 fold	Xu et al. (2006a)
Taxol	<i>Nodulisporium sylviforme</i> UV ₄₀₀₋₁₀	pH, temperature, agitation rate, fermentation period	Single factor	1.15 fold (including elicitors)	Zhao et al. (2011d)
Taxol	<i>Pestalotiopsis microspora</i> Ne32	Monobasic sodium phosphate	Single factor	2.2 fold (at 1 µg/mL)	Li et al. (1998b)
Palmarumycin C13	<i>Berkleasmius</i> sp. Dzf12	Metal ions	RSM	6 fold	Mou et al. (2013)
Palmarumycin C13	<i>Berkleasmius</i> sp. Dzf12	Carbon and nitrogen sources	Plackett Burman design and RSM	2.5 fold	Zhao et al. (2013a)
Exo polysaccharide (EPS)	<i>Berkleasmius</i> sp. Dzf12	Carbon and nitrogen sources, trace elements	Fractional factorial design and RSM	6.29 fold	Li et al. (2012a)
Zofimarin	<i>Xylaria</i> sp. Acra L38	Carbon and nitrogen sources	Orthogonal array design, Plackett Burman design and RSM	8 fold	Chaichanan et al. (2014)
Beauvericin	<i>Fusarium redolens</i> Dzf2	Carbon and nitrogen sources, initial pH	Plackett Burman design and RSM	1.27 fold	Xu et al. (2010)
Huperzine	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ES026	Temperature, pH, agitation rate, fermentation period	Single factor	28.58%	Zhao et al. (2013c)
Berberine	Mutant strain 5-NU-3-2	Carbon source	L16 (43) orthogonal design	51.89%	Hong and Yang (2010)
Berberine	Mutant strain 5-NU-3-2	Carbon and nitrogen sources, illumination condition, temperature	L16 (43) orthogonal design	47.2%	Hong and Yang (2010)
Mycocopolydiene	<i>Phomopsis</i> sp. Hant25	Complex media – Czapek yeast autolysate broth (CzYB), Malt Czapek broth (MCzB) and modified MID medium (MM1D); shaking/static period	Single factor	10.3 fold	Thammajarak et al. (2011)
Camptothecin	<i>Fusarium oxysporum</i> NFX06	Glucose, peptone and MgSO ₄	RSM	1.02 fold	Musavi et al. (2014)
Camptothecin	<i>Trichoderma atroviride</i> LY357	Medium composition, fermentation time, pH, temperature, agitation rate	Single factor	50 to 75 fold (including elicitor and adsorbent addition)	Pu et al. (2013)
Camptothecin	<i>Entrophospora infrequens</i> RJMEF01	Medium composition	Single factor	503 ± 25 µg/100 g dry cell mass (in Sabouraud broth)	Amna et al. (2012)
Vincamine	XM-J2	Medium composition and pH	L16 (43) orthogonal design	1.4 fold (1.5 fold increase in biomass)	Yin and Sun (2011)
Sipeimine	<i>Fritillaria ussuriensis</i> Fu7	Medium composition and temperature	L16 (44) orthogonal design	77% increase (155% increase in biomass)	Yin and Chen (2011)

Annexe 07 : Impact de la co-culture sur le rendement de production.

Composé	Co-culture/système de fermentation mixte		Résultat sur le rendement	Référence
Taxol	Champignon	<i>Fusarium mairei</i>	Augmenté 38 fois	Li et al. (2009)
	Plante	<i>Taxus chinensis</i> <i>var. mairei</i>		
Taxol	Champignon	<i>Fusarium mairei</i>	Augmenté 43 fois	Li and Tao (2009)
	Plante	<i>Taxus cuspidata</i>		

**Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master
En Mycologie et Biotechnologie Fongique**

Date de soutenance : Le : 18/07/2021

Présenté par : **BELHAMRA Esma**
BENBOUZID Nour El Houda

THÈME :

**Production de molécules à activité anti-cancéreuse
par le champignon endophyte *Taxomyces andreanea***

Résumé :

L'objectif de cette démarche est d'étudier la production des molécules d'origine fongique d'intérêt anticancéreux vu que le cancer est la principale cause de mortalité ainsi que leurs thérapeutiques ne sont pas dénuées d'effets secondaires, ce qui a orienté la recherche vers des molécules aux propriétés anticancéreuses issues de source naturelle, tel que le Taxol produit par le champignon endophyte : *Taxomyces andreanea* associé à la plante hôte *Taxus brevifolia*. A travers ce travail et en se basant sur les études précédentes des chercheurs scientifiques, nous avons traité théoriquement la production et l'identification du Taxol par techniques biologiques ; spectroscopiques, immunologiques et l'HPLC, qui ont confirmé la similitude entre le Taxol de la plante et celui du champignon. En outre, le test de l'activité biologique *in vitro* a montré l'efficacité de Taxol fongique contre toutes les cellules tumorales, malgré son faible rendement qui nécessite une amélioration de production. A la lumière de ces résultats nous affirmons la possibilité de la production des molécules d'origine fongique à activité anticancéreuse.

Mots clés :

Mots clés : Cancer, champignons endophytes, agent anticancéreux, Taxol, métabolites secondaires.

Jury d'évaluation :

Présidente du jury :	Melle. ABDELAZIZ O.	M. C. - UFM Constantine 1.
Promotrice :	Melle. BELMESSIKH A.	M. A. - UFM Constantine 1.
Examinatrice :	Mme. MERGOUD L.	M. A. - UFM Constantine 1.

Année universitaire : 2020/2021

