

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ
ET ENVIRONNEMENT

UNITÉ DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE

FACULTÉ DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

CENTRE FOR RESEARCH AND TRAINING
INGRATUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONNEMENTAL SCIENCES

UNIT FOR RESEARCH TRAINING IN LIFE
SCIENCES

FACULTY OF SCIENCES

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE
LABORATORY OF MICROBIOLOGY

**Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes isolés
de *Macaranga hurifolia* Beille et *Voacanga thouarsii* Roem. & Schult, sur quelques
bactéries responsables des infections respiratoires.**

Mémoire rédigé en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Option : Microbiologie Médicale

Présenté par :

FOFOU TANDZONG Carmel

Matricule : 19A2269

Licencié ès-biosciences

Sous la co-direction de:

MONI NDEDI Esther Del Florence
(Chargé de Cours/ UYI)

FOUOTSA Hugues
(Chargé de Cours/ UDla)



Année Académique 2024-2025

DÉDICACE

Je dédie ce travail à mes très chers parents :

TANDZONG Jacques et SILABEM Jeannette.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire n'aurait été possible sans la collaboration et le soutien de nombreuses personnes que j'ai l'honneur et le plaisir de remercier. Ma profonde gratitude va à l'endroit :

Du **Pr. ESSIA NGANG Jean Justin** pour son implication dans le bon fonctionnement du Département de Microbiologie ;

Du **Pr. ASSAM ASSAM Jean Paul** de nous avoir accueilli à bras ouverts dans son laboratoire pour la réalisation d'une grande partie de ce travail, merci Professeur ;

De mes directeurs de mémoire, **Dr. MONI NDEDI Esther Del Florence** et **Dr. FOUOTSA Hugues**. Merci à vous de m'avoir accepté comme étudiant et d'avoir cru en moi, de m'avoir accordé le privilège en dirigeant ce travail et pour la disponibilité et vos précieux conseils ;

Des **membres du jury** qui m'ont fait l'honneur de consacrer de leur précieux temps pour apporter des critiques constructives à ce travail ;

Du **Dr. BETOTE DIBOUE Patrick Hervé** pour son temps précieux accordé pour nous suivre sur la paillasse, et ce malgré vos diverses occupations, merci Docteur ;

De tous les **enseignants du département de Microbiologie** de l'Université de Yaoundé I, pour leur implication dans notre processus de formation et d'insertion dans le milieu scientifique et de la recherche ;

De mes aînés de laboratoire que j'affectionne particulièrement et dont les noms suivent : **Mme. DEMENI EMOH Paola Cynthia** et **Mme. MAKUÉ NGUIFFO Elsa** et les autres pour leurs conseils avisés, pour leur disponibilité et pour leurs soutiens techniques tant sur la paillasse que dans la rédaction de ce mémoire. **Mme. TEFANDJAM MBOMPIEZE Espérance Argentine** et **Mme. TOUKAM NAOUSSI Christelle** pour leur soutien, leurs idées et encouragements ;

De mes camarades de promotion, **MBARGA Opono Hermine Salomé**, **BEA DJON Grâce Henri**, **DIENGUE NGOMBA Marie-Ange**, **AZANJIO TIOGO Kevin** pour leur soutien, leur présence et leurs humeurs encourageantes ;

De toute ma familles : mes parents **TANDZONG Jacques** et **SILABEM Jeannette**, mes frères **TCHOFFO FOPA Serge Olivier**, **MOUAFO TANDZONG Ghislain**, **TCHINDA TANDZONG Arnaud**, **NOUBOSSE TANDZONG Roussel** et **DJUINE TANDZONG Sidonie** pour leurs encouragements et leur soutien moral, financier et spirituel ;

De tous ceux qui de près ou de loin m'ont soutenu durant ce travail et dont je n'ai pas pu citer les noms ici, je vous remercie.

TABLE DE MATIÈRES

DÉDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DE MATIÈRES	iv
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES LISTE DES FIGURES ET PHOTOS	x
LISTE DES ANNEXES	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I: REVUE DE LITTERATURE	2
I.1. GENERALITES SUR LES INFECTIONS RESPIRATOIRES.	3
I.1.1. LES INFECTIONS DES VOIES RESPIRATOIRES BASSES	3
I.1.1.1. LA TUBERCULOSE.....	3
I.1.1.1.1. Définition	3
I.1.1.1.2. Étiologie	4
I.1.1.1.3. Épidémiologie de la tuberculose	5
I.1.1.1.4. Caractéristiques structurales et culturelles des mycobactéries	6
I.1.1.1.5. Transmission et physiopathologie	7
I.1.1.1.6. Diagnostic et prévention	8
I.1.1.1.7. Traitements et effets secondaires des antituberculeux.....	10
I.1.1.2. LA PNEUMONIE.....	11
I.1.1.2.1. Définition	11

I.1.1.2.2. Épidémiologie de la pneumonie	11
I.1.1.2.3. Symptômes	12
I.1.1.2.4. Étiologie	12
I.1.1.2.5. Diagnostic	13
I.1.1.2.6. Prévention et traitement	14
I.1.1.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques	14
I.2. GÉNÉRALITÉS SUR LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES ET LEURS MÉTABOLITES SECONDAIRES	15
I.2.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES	15
I.2.1.1. Définition, biodiversité et classification des endophytes	15
I.2.1.1.1. Définition	15
I.2.1.1.2. Biodiversité et classification des endophytes	15
I.2.1.2. Relations plante hôte- champignons endophytes	17
I.2.1.3. Méthodes d'isolement des champignons endophytes	18
I.2.1.4. Intérêt des champignons endophytes	19
I.2.2. Les métabolites secondaires des champignons endophytes	20
I.2.2.1. Les alcaloïdes	21
I.2.2.2. Les terpènes et terpénoïdes	21
I.2.2.3. Les flavonoïdes	22
I.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES PLANTES D'INTÉRÊT	22
I.3.1. PRÉSENTATION DU GENRE <i>Macaranga</i>	22
I.3.1.1. <i>Macaranga hurifolia</i> Beille	23
I.3.1.1.1. Taxonomie et répartition géographique	23
I.3.1.1.2. Description botanique	23
I.3.1.1.3. Usages thérapeutiques de <i>Macaranga hurifolia</i> Beille	24

I.3.1.1.4. Travaux antérieurs réalisés sur <i>Macaranga hurifolia</i> Beille.....	24
I.3.2. Présentation genre <i>Voacanga</i>.....	25
I.3.2.1. <i>Voacanga thouarsii</i> Roem. & schult	25
I.3.2.1.1. Taxonomie et répartition géographique	25
I.3.2.1.2. Description botanique	26
I.3.2.1.3. Usages thérapeutiques de <i>Voacanga thouarsii</i> Roem. & schult.....	27
I.3.2.1.4. Travaux antérieurs réalisés sur <i>Voacanga thouarsii</i> Roem. & schult.....	27
I.4. LES MÉTHODES.....	28
I.4.1. Méthode d'isolement de champignons endophytes	28
I.4.2. Méthodes d'extractions des métabolites secondaires	28
I.4.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	29
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	30
II.1. MATÉRIEL	30
II.1.1. Matériel végétal	30
II.1.2. Matériel microbiologique	30
II.1.2.1. Souches microbiennes	30
II.1.2.2. Milieux de culture	31
II.1.2.3. Antimicrobiens	31
II.1.2.4. Réactifs chimiques.....	31
II.2. MÉTHODES.....	32
II.2.1. Caractérisation des champignons endophytes.....	32
II.2.1.1. Échantillonnage	32
II.2.1.2. Isolement des champignons endophytes.....	32
II.2.1.3. Caractérisation des champignons endophytes isolés	34

II.2.1.3.1. Caractérisation macroscopique	34
II.2.1.3.2. Caractérisation microscopique	34
II.2.2. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes	35
II.2.2.1. Extraction des métabolites des champignons endophytes dans un milieu à base du riz.....	35
II.2.2.2. Évaluation des activités antibactériennes des extraits.....	35
II.2.2.3. Préparation des solutions mères des extraits et de l'antibiotique.....	36
II.2.2.3.1. Préparation de solution mère des extraits.....	36
II.2.2.3.2. Préparation de la solution mère de l'antibiotique (Lévofoxacine)^R	36
II.2.2.4. Repiquage des souches et préparation de l'inoculum	36
II.2.2.5. Détermination des paramètres d'inhibition.....	37
II.2.2.5.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	37
II.2.2.5.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)	38
II.2.2.5.3. Profil antibactérien des extraits : rapport CMB/CMI.....	39
II.2.3. Screening phytochimique des extraits de champignons endophytes	39
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	42
III.1. RÉSULTATS	42
III.1.1. Caractérisation des endophytes isolés.....	42
III.1.1.1. Isolement des champignons endophytes	42
III.1.1.2. Caractérisation des champignons endophytes	43
III.1.1.3. Identification microscopique des champignons endophytes.....	45
III.1.2. Activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes.....	54
III.1.2.1. Extraction des métabolites secondaires	54

III.1.2.2. Détermination des paramètres d'inhibition des extraits de champignons endophytes (CMI et CMB).	54
III.1.5. Screening phytochimique des extraits d'endophytes actifs	59
III.2. DISCUSSION	61
CONCLUSION	65
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67
ANNEXES	A

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Taxonomie des mycobactéries.....	5
Tableau II : Classification des champignons endophytes.....	16
Tableau III : Quelques métabolites secondaires issus des champignons endophytes et leurs plantes hôtes.....	20
Tableau IV : Classification de <i>Macaranga hurifolia</i>	23
Tableau V : Classification de <i>Voacanga thouarsii</i>	25
Tableau VI: Répartition des différents fragments colonisés par partie de plante utilisée.....	39
Tableau VII : Nombre de champignons endophytes obtenus du regroupement dans les milieux SDA et CDA.....	43
Tableau VIII : Récapitulatif des endophytes regroupés par genre et par plante étudiée.....	44
Tableau IX : Classification phylogénique des genres fongiques obtenus de <i>M. hurifolia</i> et <i>V. thouarsii</i>	42
Tableau X : Caractéristiques des isolats fongiques obtenus	48
Tableau XI : Caractéristiques physiques des extraits de champignons endophytes.....	54
Tableau XII : Évaluation de la CMI et CMB des extraits de champignons endophytes.....	55
Tableau XIII : Résultats du screening phytochimique qualitatif exprimés selon les réactions de précipitation et/ou complexométrique mis en exergue dans le milieu réactionnel	60

LISTE DES LISTE DES FIGURES ET PHOTOS

1. LISTE DES LISTE DES FIGURES

Figure 1: Radiographie pulmonaire d'un tuberculeux .	4
Figure 2: Structure de la paroi des mycobactéries .	6
Figure 3: Photographie de <i>M.tuberculosis</i> coloré au Ziehl-Neelsen .	7
Figure 4: Colonies de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sur milieu de culture Lowenstein-Jensen.	7
Figure 5: Mesure du diamètre d'induration .	9
Figure 6: Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés .	17
Figure 7: Développement symbiotique d'endophytes fongiques .	18
Figure 8: Répartition de <i>Macaranga hurifolia</i> en Afrique .	23
Figure 9: Feuilles et tiges de <i>Macaranga hurifolia</i> .	24
Figure 10: Répartition de <i>Voacanga thouarsii</i> en Afrique.	26
Figure 11: Arbre de <i>Voacanga thouarsii</i> .	27
Figure 12: Photographies des feuilles, des écorces de tige et de tronc de (A : <i>M. hurifolia</i> et B : <i>V.thouarsii</i>) .	30
Figure 13: Mode opératoire de l'isolement des champignons endophytes .	33
Figure 14: Protocole du mode opératoire de l'extraction .	35
Figure 15: Mécanisme de réduction du Blue Alamar .	37
Figure 16: Taux de colonisation des endophytes .	43
Figure 17: Diagramme des Fréquence des champignons endophytes obtenus de M. hurifolia et V. thouarsii.	45

2. LISTE DES PHOTOS

Photo 1: photo illustrative d'une microplaque avec les résultats des CMI d'un extrait de champignon endophyte sur une souche bactérienne .	59
Photo 2: Photo des résultats du test de criblage phytochimique qualitatif des extraits testés.	59

LISTE DES ANNEXES

Annexe I: Équipements et milieux de culture utilisés	A
Annexe II: Préparation de quelques larmes pour la microscopie de champignons endophytes	B
Annexe III : Extraits de champignons endophytes (A : <i>M. hurifolia</i> , B : <i>V. thouarsii</i>).....	C
Annexe IV: Quelques photos du résultat des paramètres d'inhibition	C
Annexe V: Photos des manipulations	D
Annexe VI : Résultats du screening phytochimique qualitatif des molécules standards exprimés selon les réactions de précipitation et/ou complexométrique mis en exergue dans le milieu réactionnel.	D
Annexe VII: Fiches caractérisations des champignons endophytes.....	E

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATCC :	<i>American Type Culture Collection</i>
BAAR :	Bacille Acido-alcool Résistant
BCG :	Bacille de Calmette-Guerin
CDA :	<i>Czapek Dox Agar</i>
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. influenza</i> :	<i>Haemophilus influenza</i>
<i>K. pneumoniae</i> :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>M. hurifolia</i> :	<i>Macaranga hurifolia</i>
<i>M. tuberculosis</i> :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MBK :	<i>Middlebrook</i>
mg :	Milligramme
MHA :	<i>Mueller Hinton Agar</i>
MHB :	<i>Mueller Hinton Broth</i>
mL :	Millilitre
OADC :	<i>Oleic Acid Albumin Dextrose Catalase</i>
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P. aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PANTA :	<i>Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, and Azlocillin</i>
PDA :	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PNLT :	Programme National de Lutte contre la Tuberculose
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDA :	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
UNICEF :	Fonds des Nations Unies pour l'enfance
<i>V. thouarsii</i> :	<i>Voacanga thouarsii</i>

RÉSUMÉ

Les infections respiratoires sont classées parmi les premières causes de mortalité infantile, représentent ainsi un véritable problème de santé publique dans le monde. L'émergence des souches résistantes suite à un échec de l'antibiothérapie a orienté la recherche vers de nouvelles stratégies de traitement. C'est dans ce sens que s'inscrit l'objectif de ce travail qui porte sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits des champignons endophytes isolés de *M. hurifolia* et *V. thouarsii* sur quelques bactéries responsables des infections respiratoires. Pour cela, les feuilles, les écorces de tiges et de troncs de *M. hurifolia* et *V. thouarsii* ont été récoltées à Nkolbisson, dans la ville de Yaoundé, Région du Centre Cameroun et identifiées à l'Herbier National. Ce matériel végétal a subi ensuite une série de décontaminations de surface suivie d'un ensemencement sur milieu PDA pour l'obtention des cultures pures. Ces cultures ont été identifiées sur les milieux PDA, SDA et CDA grâce aux caractéristiques morphologiques. L'extraction des métabolites secondaires à l'acétate d'éthyle a été faite après culture de ces champignons dans un milieu à base du riz. Par la suite, les tests d'inhibition (CMI et CMB) ont été réalisés sur les souches de mycobactéries (BCG et H37RV ATCC 27294) et de bactéries Gram (*S. aureus* NCTC 12973, *H. influenzae* ATCC 49247, *K. pneumoniae* ATCC 17102, *P. aeruginosa* ATCC 76110, et *E. coli* ATCC 25922) en utilisant la méthode de microdilution en milieu liquide. En fin, les différentes classes de métabolites secondaires des extraits actifs ont été mises en évidence par les tests colorimétriques. Les résultats montrent que des vingt-huit (28) champignons caractérisés, vingt-quatre (24) sont identifiés comme appartenant aux genres : *Geotrichum* (05), *Neoscytalidium* (05), *Acremonium* (04), *Fusarium* (04), *Lasioidiplodia* (04), *Absidia* (01), *Penicillium* (01) et quatre (04) isolats non-identifiés. De ces isolats obtenus, huit (08) extraits de champignons endophytes ont été produits. L'extrait « E11 » a été le plus actif sur toutes les souches bactériennes testées avec des CMIs allant de 0,39 mg/mL sur les souches BCG et *P. aeruginosa* à 1,56 mg/mL sur les autres souches bactériennes. Le screening chimique a révélé la présence des flavonoïdes, phénols, polyphénols, des saponines et des anthraquinones dans tous les extraits.

Mots clés : Activité antibactérienne, Endophytes, Extraits de champignons endophytes, Isolement, *M. hurifolia*, *V. thouarsii*.

ABSTRACT

Respiratory infections are among the leading causes of infant mortality, representing a significant public health concern worldwide. The emergence of antibiotic-resistant strains in the context of unsuccessful treatment has prompted the development of novel therapeutic strategies. This study aims to assess the antibacterial activity of extracts from endophytic fungi of *M. hurifolia* and *V. thouarsii* against some respiratory tract pathogens. To this end, the leaves, bark, and wood of *M. hurifolia* and *V. thouarsii* were collected in Nkolbisson, Yaoundé, Cameroon, and identified at the National Herbarium. Subsequently, the plant material underwent a series of surface decontaminations, followed by inoculation into a PDA medium to obtain pure cultures. The cultures were identified on the PDA, SDA, and CDA media based on their morphological characteristics. The extraction of secondary metabolites was conducted using acetic ethyl acetate following the cultivation of the mushrooms in a rye-based medium. Subsequently, the inhibition tests (CMI and CMB) were conducted on the mycobacterial strains (BCG and H37RV ATCC 27294) and the Gram positive bacterial strains (*S. aureus* NCTC 12973, *H. influenzae* ATCC 49247, *K. pneumoniae* ATCC 17102, *P. aeruginosa* ATCC 76110, and *E. coli* ATCC 25922) using the microdilution method in liquid medium. The different classes of secondary metabolites present in the active extracts were identified through colorimetric tests. The results demonstrate that of the twenty-eight (28) characterized fungi, twenty-four (24) were identified as belonging to the following genera: *Geotrichum* (05), *Neoscytalidium* (05), *Acremonium* (04), *Fusarium* (04), *Lasiodiplodia* (04), *Absidia* (01), and *Penicillium* (01), with four (04) isolates remaining unidentified. Eight (08) fungal endophyte extracts were produced from these isolates. Extract "E11" demonstrated the greatest activity against all bacterial strains tested, with CMIs values ranging from 0.39 mg/mL against BCG and *Pseudomonas aeruginosa* strains to 1.56 mg/mL against the remaining bacterial strains. The chemical screening revealed the presence of flavonoids, phenols, polyphenols, saponins, and anthraquinones in all extracts.

Keywords: Antibacterial activity, Endophytes, Fungal extracts, Isolation, *M. hurifolia*, *V. thouarsii*.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les infectieuses respiratoires sont celles qui touchent les voies aériennes, y compris les voies nasales, et les poumons (OMS, 2024). Selon que le site infecté, soit en dessus ou sous la glotte, on distingue respectivement, les infections des voies respiratoires hautes et des infections des voies respiratoires basses. Parmi ces dernières, la tuberculose et la pneumonie représentent respectivement la première et la troisième cause de mortalité des maladies respiratoires dans le monde (OMS, 2024). La tuberculose est une maladie contagieuse et potentiellement mortelle, généralement causée par les bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et la pneumonie quant- à elle, est une inflammation des poumons provoquée le plus souvent par les bactéries telles que *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*. Ces affections se manifestent généralement par la toux, les difficultés respiratoires, les douleurs thoraciques, la fatigue et les amaigrissements (OMS, 2023).

On a estimé à 10,8 millions, le nombre de personnes ayant développé la tuberculose dans le monde en 2023, dont environ 25 milles cas enregistrés au Cameroun (OMS, 2024). Pour ce qui est de la Pneumonie, l'UNICEF estime à 158 millions le nombre de cas de pneumonie recensé chez les enfants chaque année dans le monde et à plus de 2 millions le nombre de décès (OMS-UNICEF, 2024).

La chimiothérapie reste pour le moment la stratégie thérapeutique recommandée par l'OMS pour guérir de ces infections. Bien qu'étant efficace, divers effets secondaires et échecs thérapeutiques favorisent l'apparition des souches multirésistantes, faisant de ces infections un véritable problème de santé publique (OMS, 2019). Il devient donc urgent d'entreprendre des recherches afin de trouver d'autres alternatives thérapeutiques de traitement (OMS, 2018).

Au cours des siècles, les plantes ont été utilisées comme sources de composés bioactifs contre de nombreuses pathologies dont les infections respiratoires. En effet, les plantes médicinales, comme *Macaranga hurifolia* Beille et *Voacanga thouarsii* Roem. & Schult, ont déjà fait l'objet de plusieurs études démontrant leurs propriétés antimicrobiennes (Nourdine, 2014 ; Kengne, 2016). Cependant, l'utilisation des plantes pour une production à l'échelle industrielle de composés bioactifs pour un usage clinique demeure un véritable défi car, nécessite d'énormes quantités de matériel végétal. Afin de promouvoir le développement

durable tout en protégeant la biodiversité, des organisations, des conventions et des programmes tels que le protocole de Nagoya, la convention sur la diversité biologique des Nations Unies (CBD) et l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) ont été établis pour assurer la protection de la biodiversité. L'une des idéologies dans la résolution de ce problème est l'utilisation des champignons endophytes, qui se sont révélés beaucoup plus promoteurs en produisant des composés bioactifs à fort potentiel thérapeutique (**Atanasov *et al.*, 2015**). En effet, les endophytes sont des micro-organismes qui, pendant toute ou une partie de leur cycle de vie, colonisent les tissus internes des plantes hôtes de manière asymptomatique (**Labane et Meziane, 2024**). Ils ont la capacité de mimer la production des métabolites secondaires de la plante hôte, dont certains doués de propriétés antimicrobienne, antioxydante, immunosuppressive, anticancéreuse et antiinflammatoire. (**Zhang *et al.* 2012**).

Face au problème de résistance microbienne et à l'exploitation abusive des plantes pour la production des composés bioactifs, l'utilisation des champignons endophytes pourrait représenter une alternative pour l'exploitation anarchique des plantes qui entraîne à la longue une perte progressive de la biodiversité végétale, d'où l'intérêt de notre travail.

Hypothèse de recherche : Les extraits de champignons endophytes issus de *M. hurifolia* et *V. thouarsii* contiennent les métabolites actifs capables d'inhiber la croissance de bactéries responsables des infections respiratoire.

Objectif général : Évaluer l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes isolés de *M. hurifolia* et *V. thouarsii* sur les bactéries responsables des infections respiratoires.

Objectifs spécifiques :

- Caractériser les champignons endophytes isolés de *M. hurifolia* et *V. thouarsii*.
- Évaluer l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes obtenus sur quelques bactéries responsables des infections respiratoire.
- Déterminer les classes de métabolites secondaires des extraits actifs.

CHAPITRE I : REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE I: REVUE DE LITTERATURE

I.1. GENERALITES SUR LES INFECTIONS RESPIRATOIRES.

Les infections respiratoires sont des maladies qui affectent les voies respiratoires, notamment le nez, la gorge, les bronches et les poumons (**OMS, 2023**). On estime que 235 millions de personnes souffrent d'asthme, plus de 200 millions de personnes souffrent de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), plus de 100 millions de personnes font l'expérience de troubles respiratoires du sommeil, 8,7 millions de personnes par an développent la tuberculose et des millions vivent avec de l'hypertension pulmonaire, totalisant plus de 1 milliard de personnes souffrant de maladies respiratoires chroniques dans le monde (**Darcy et al., 2013**). Elles sont généralement causées par des micro-organismes tels que les virus, les bactéries ou les champignons qui envahissent et se multiplient dans ces zones. Les symptômes peuvent varier, mais comprennent plus souvent une congestion nasale, de la toux, des maux de gorge, des difficultés respiratoires et de la fièvre (**Rebeca, 2023**). Il existe deux grandes catégories d'infections respiratoires : les infections respiratoires hautes ou supérieures et les infections respiratoires basses ou inférieures. Contrairement aux infections respiratoires hautes, les infections respiratoires basses peuvent généralement présenter les symptômes plus graves et par conséquent les plus mortelles (**OMS, 2023**).

I.1.1. LES INFECTIONS DES VOIES RESPIRATOIRES BASSES

Les infections respiratoires basses sont des infections aiguës qui touchent les voies respiratoires inférieures (la trachée, les bronches et les alvéoles pulmonaires). Elles regroupent diverses pathologies, affectant les voies respiratoires allant de la trachée aux alvéoles pulmonaires, en passant par les bronches et bronchioles (**OMS, 2018**). Parmi les infections respiratoires basses, la tuberculose et la pneumonie occupent une place primordiale et sont souvent connues comme causes principales de mortalité et de morbidité chez les enfants et adultes (**OMS, 2018**).

I.1.1.1. LA TUBERCULOSE

I.1.1.1.1. Définition

La tuberculose est une maladie infectieuse qui affecte le plus souvent les poumons. Généralement, elle se présente sous deux formes dont la plus contagieuse est la tuberculose

pulmonaire avec 70 à 75% de cas contre environ 30 % de cas de la forme extrapulmonaire (OMS, 2015).



Figure 1: Radiographie pulmonaire d'un tuberculeux (Imad, 2023).

I.1.1.1.2. Étiologie

Chez l'homme, les bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.bovis*, *M.microti*, *M.caprae*, *M.pinnipedii*, *M.canetti*) sont généralement responsables de la tuberculose. En effet, *Mycobacterium tuberculosis*, également connue sous le nom de bacille de Koch, est la cause la plus importante de la maladie (PNLT Tunisie, 2011). Il s'agit d'une bactérie très résistante dans l'air, pouvant se transmettre d'un individu à l'autre lorsque celui-ci inhale des aérosols chargés de bacilles provenant d'une personne infectée. Plusieurs paramètres peuvent intervenir pour favoriser cette transmission à savoir :

- Une mauvaise habitude et hygiène de vie du malade (lorsqu'il tousse, éternue ou crache à l'air libre) ;
- Une déficience du système immunitaire dans le cas de prise d'immunosuppresseurs au cours d'une infection à VIH-SIDA (OMS, 2018).

Le tableau I ci-dessous présente la taxonomie définissant les trois groupes constitutifs des mycobactéries à savoir : mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*, mycobactéries atypiques et mycobactéries non cultivables (OMS, 2019).

Tableau I : Taxonomie des mycobactéries

Domaine	Bacteria		
Règne	Procaryotae		
Embranchement	ASctinomycetota		
Classe	Actinobacteria		
Ordre	Actinomycetales		
Famille	Mycobacteriaceae		
Genre	<i>Mycobacterium</i>		
Espèce	Complexe <i>M. tuberculosis</i>	Mycobactéries atypiques	Mycobactérie non cultivable
	(Mycobactéries tuberculeuses): <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.africanum</i> , <i>M.bovis</i> , <i>M.microti</i> , <i>M.caprae</i> , <i>M.pinnipedii</i> , <i>M.canetti</i>	(Mycobactéries non tuberculeuses): <i>M.marinum</i> , <i>M.kansasii</i> , <i>M.xenopi</i>	<i>M. leprae</i> , <i>M. lepraemurium</i>

I.1.1.1.3. Épidémiologie de la tuberculose

➤ Dans le monde :

La tuberculose (TB) représente l'une des menaces les plus graves pour la santé humaine mondiale. En moyenne 10 millions de personnes développent une forme active de la maladie chaque année selon l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 2019**). En 2017, le nombre de décès dus à la tuberculose chez les patients VIH négatifs et positifs a été évalué à 1,3 millions et 300 000 respectivement (**OMS, 2018**). Selon les estimations de 2023, environ 10,8 millions de personnes ont développé la tuberculose dans le monde, dont 6 millions d'hommes, 3,5 millions de femmes et 1,3 millions d'enfants (**OMS, 2024**).

➤ En Afrique :

En Afrique, l'incidence de cette maladie a été estimée à environ 2,48 millions de cas dont 941 000 femmes et 1 540 000 hommes en 2017. Parmi ceux-ci, on estimait à 413 000 le nombre de décès et à 90 000, le nombre de cas multirésistant (**OMS, 2018**). Par ailleurs, 2,5 millions de cas ont été enregistré en 2019 et près de 500 000 décès (**OMS, 2019**). En 2023, l'incidence de la tuberculose a chuté à environ 35% en Afrique (**OMS, 2024**).

➤ Au Cameroun :

Au Cameroun, l'incidence de la maladie ne cesse d'augmenter. Entre 2002 et 2006, la prévalence de la tuberculose a doublé pour se stabiliser autour de 25 000 cas par an. Alors que la population ne comptait que 18 millions d'habitant, cette croissance a entraîné une augmentation du taux d'incidence de 77/100 000 contre 91/100 000 en 2000 et 2004

respectivement (Assam, 2012). En 2022, on a enregistré 25 286 cas de tuberculoses (contre 22 866 cas en 2021) dont 174 cas de TB-MR dans les 327 centres de diagnostic et traitements que comptant le pays. Malgré divers stratégies de riposte, ce taux d'incidence est monté à 25 702 cas en 2023 (OMS, 2024).

I.1.1.1.4. Caractéristiques structurales et culturelles des mycobactéries

Les mycobactéries sont les bacilles droits ou légèrement incurvés de 1 à 10 μm de long sur 0,2 à 0,6 μm de large, aérobies strictes, immobiles et asporulées (Biomnis, 2012). Leur capacité à résister au système immunitaire (par la production des glycolipides antagonistes du récepteur TLR2) est essentiellement due à leur paroi et leur enveloppe cellulaire qui est riche en lipides (60 %) en particulier en acides mycoliques et en arabino-galactane (acides gras à longue chaîne) (Pfyffer *et al.*, 2008). La figure 2 ci-dessous présente la structure de la paroi des mycobactéries avec ses différents constituants.

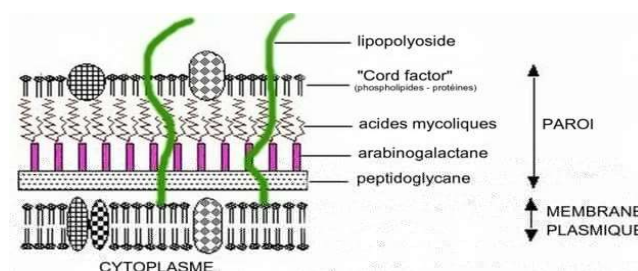


Figure 2: Structure de la paroi des mycobactéries (Pascal et Marielle, 2016)

Lorsqu'elles sont colorées au Ziehl-Neelsen, on observe au microscope les bacilles roses sur fond bleu. C'est une méthode dont le principe repose sur la mise en évidence du caractère acido-alcool-résistance des mycobactéries (OMS, 2018).



Figure 3: Photographie de *M.tuberculosis* colorées au Ziehl-Neelsen et observées au microscope électronique (Tankeshwar, 2018).

En culture sur milieu solide, *Mycobacterium tuberculosis* se multiplie très lentement et le temps de génération se situe autour de 20 heures. Les colonies n'apparaissent qu'après 2 à 3 semaines et sont rugueuses, verruqueuses et de couleur beige (Mathys, 2010).



Figure 4: Colonies de *Mycobacterium tuberculosis* sur milieu de culture Lowenstein-Jensen (Kenneth, 2020).

I.1.1.1.5. Transmission et physiopathologie

a) Transmission

La transmission de la tuberculose se faisant par aéroportée, les personnes infectées transmettent des aérosols chargés de mycobactéries lorsqu'elles toussent, éternuent ou crachent (OMS, 2023). En effet la contamination se fait généralement par voie indirecte, ceci par inhalation de l'agent infectieux dans l'air environnant le malade. Par contre, dans certains cas (tuberculose extrapulmonaire, bactériémie), la transmission des mycobactéries peut se faire directement par contact du liquide biologique du patient (sang, sueur, urine) ceci lorsque la personne possède une ouverture (plaie, brûlure, écorchure) (OMS, 2023).

b) Physiopathologie

Chez les tuberculeux, la physiopathologie varie en fonction du stade de la maladie. La primo infection débute par la pénétration de quelques bacilles tuberculeux virulents dans les alvéoles pulmonaire. Après cette pénétration, la période d'incubation qui passe souvent inaperçue peut aller de 1 à 3 mois (**Souba *et al.*, 2013**). Au cours de cette période, les macrophages alvéolaires phagocytent les bacilles qui, à l'intérieur du quelle se multiplient pour ainsi constituer le foyer infectieux initial. Les bacilles et les antigènes libérés par les macrophages sont drainés par ce dernier vers le ganglion lymphatique satellite. À l'intérieur du ganglion, la croissance des bacilles phagocytés est inhibée par les macrophages activés suite à la libération de lymphokines sous l'action des lymphocytes T ayant identifié les antigènes de *M.tuberculosis*. Quelques bacilles peuvent persister plusieurs mois ou années, constituant dont les « bacilles quiescents » (**PNLT Tunisie, 2011**).

En effet, lorsque les conditions deviennent favorables (une immunodépression par exemple), les bacilles quiescents provenant du foyer infectieux initial ou du ganglion satellite seront disséminés dans tout l'organisme par voie lymphatique puis sanguine afin de reconstituer ainsi des foyers infectieux secondaires (dans les ganglions, les séreuses, les méninges, les os, le foie, le rein et le poumon) qui seront d'une part responsables de la tuberculose extra-pulmonaire et pulmonaires d'autre part. (**PNLT Tunisie, 2011**).

I.1.1.1.6. Diagnostic et prévention

I.1.1.1.6.1. Diagnostic

Le diagnostic de la tuberculose repose sur la recherche directe (recherche de l'agent infectieux ou ses particules au microscope) ou indirecte (PCR par exemple) de l'agent infectieux dans le produit pathologique (crachat, urine, produit de la biopsie, les expectorations) (**Brändli *et al.*, 2003**).

❖ Examen microscopique

Les mycobactéries étant les bacilles acido-alcool-résistantes (BAAR), leurs parois sont insolubles aux acides et aux alcools ; ce qui rend difficile leurs indentifications par la méthode de Gram. En outre, d'autres méthodes que la coloration de Gram seront utilisées afin de bien visualiser les mycobactéries au microscope. Les colorations à l'Auramine ou au Ziehl-

Neelsen sont les méthodes couramment utilisées. Ainsi, les mycobactéries vont apparaître sous forme de bacilles verts fluorescents sur fond rouge lorsque les frottis sont colorés à l'Auramine et rosés sur fond bleu lorsqu'ils sont colorés au Ziehl-Neelsen (PNLT Burkina Faso, 2008).

❖ Culture en milieu solide ou liquide

La culture de certains prélèvements pathologiques (crachat ou expectoration par exemple) nécessite un certain nombre de traitements pour éliminer la flore indésirable associée. L'apparition des colonies sur milieu solide (Lowenstein-Jensen) ou de la turbidité sur milieu liquide (Middlebrook) ne se fait qu'après un mois et une semaine de culture respectivement à 37°C (Mathys, 2010).

❖ Intradermo-réaction à la tuberculine (IDR)

Cette méthode se fait par une injection intradermique de 0,1 ml de tuberculine purifiée au niveau de la face palmaire de l'avant-bras gauche, sur la ligne médiane, à l'union du tiers supérieur et des deux tiers inférieurs. Mettant en évidence la présence d'une réaction (cutanée) d'hypersensibilité retardée induite par les antigènes mycobactériens. Le diamètre d'induration (en mm) se mesure après 72 h (Billy et Lévy-Bruhl, 2007).

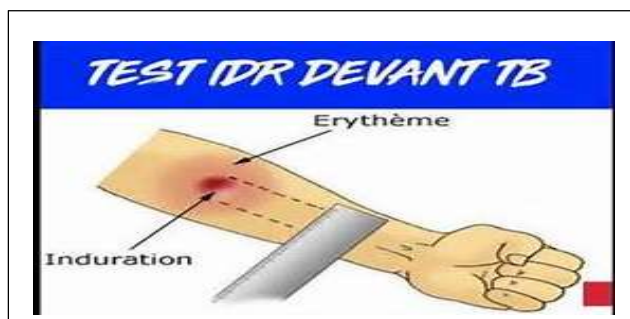


Figure 5: Mesure du diamètre d'induration (Pascal et Marielle, 2016)

I.1.1.1.6.2. Mesure préventive

Entre les années 1908 et 1921, l'Institut Pasteur de Lille a mis au point le vaccin antituberculeux préparé à partir du Bacille de Calmette-Guérin (BCG), qui est administré par voie intradermique (Ait-Khaled *et al.*, 1999). Ce dernier a la capacité de stimuler une réaction immunitaire à médiation cellulaire et humorale du sujet sans provoquer de pathologie et conférant une protection chez les enfants contre les formes graves de TB extra pulmonaire ou

méningée, par contre il est moins efficace pour les formes pulmonaires qui sont les plus fréquentes (Colditz *et al.*, 1994).

En plus de la vaccination, la prévention peut aussi se faire en respectant une bonne hygiène de vie, en faisant un test de dépistage de tuberculose si vous êtes une personne à risque (porteur de VIH, être à proximité d'un tuberculeux) (OMS, 2023).

I.1.1.1.7. Traitements et effets secondaires des antituberculeux

I.1.1.7.1. Traitement aux antituberculeux

Les principaux antituberculeux de référence utilisés pour traiter la tuberculose sont dits antituberculeux de première ligne, notamment la Rifampicine® (RMP), l'Isoniazide® (INH), la Pyrazinamide® (PZA), l'Ethambutol® (EMB) et la Streptomycine® (SM), et de deuxième ligne, l'Amikacine® (AC), la Kanamycine® (KM) et les Fluoroquinolones® (FQ) comme l'Ofloxacine®. Ce traitement a permis d'éviter 49 millions de décès dans le monde entre 2000 et 2015 (OMS, 2016). Pour les souches multirésistantes, leur traitement nécessite jusqu'à 2 ans de prise médicamenteuse d'une combinaison d'antituberculeux de 1ère et de 2nde ligne, le plus souvent génératrice d'effets secondaires (OMS, 2023).

I.1.1.7.2. Effets secondaires des antituberculeux

La durée du traitement de la tuberculose (4 à 6 mois et 2 ans pour les formes multirésistantes) est à l'origine de la création de divers troubles, généralement liés au métabolisme du patient. On peut noter :

- * Une hépatite grave, qui peut survenir lorsqu'on administre de l'Isoniazide après de nombreux mois de traitement;

- * Des troubles de l'appareil reproducteur et des seins lors du traitement de la tuberculose génitale fécale.

- * Des troubles du système immunitaires dû aux réactions d'hypersensibilités, telles que fièvre, éruptions cutanées, acné, dermatite spoliatrice, syndrome de Stevens-Johnson (OMS, 2009).

I.1.1.2. LA PNEUMONIE

I.1.1.2.1. Définition

Généralement connue sous le nom de Pneumopathie, la pneumonie est une infection aiguë des voies respiratoires basses, marquée par une inflammation non suppurée, non tuberculeuse du parenchyme pulmonaire en rapport avec la présence de germes pathogènes dans les alvéoles pulmonaires (**Hirschman et al., 1987**). En fonction de l'environnement de contact de l'agent infectieux, on en distingue deux formes de pneumonie: la pneumonie communautaire qui survient chez des patients au cours de leur premier 48 heures d'hospitalisation et celle dite nosocomiale, qui survient à plus de 48 heures au cours d'une hospitalisation (**Savado, 2012**).

I.1.1.2.2. Épidémiologie de la pneumonie

La pneumonie est, et a toujours été un problème majeur de la santé publique. Connue comme première cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans, elle est la troisième maladie infectieuse la plus mortelle dans le monde après la tuberculose et a représenté respectivement 922 136 et 808 694 décès d'enfants de moins de cinq ans en 2015 et 2017, dont 15% de tous les décès d'enfants de moins de cinq ans dans le monde (**OMS, 2019**). Actuellement, l'UNICEF estime à 158 millions le nombre de cas de pneumonie recensé chez les enfants chaque année dans le monde et à plus de 2 millions le nombre de décès (**OMS-UNICEF, 2024**).

Déjà qualifié d'une «épidémie oubliée», le continent Africain n'est pas tout de même épargné de cette maladie respiratoire. En effet, parmi le nombre de décès mondial enregistré en 2019 (800 000 morts), l'Éthiopie, le Tchad, le Mali, la République Démocratique du Congo (RDC), le Nigeria étaient les pays les plus touchés (**John et al., 2024**). Actuellement en Afrique subsaharienne, la pneumonie fait près de 2 800 victimes par an (**OMS, 2024**).

Au Cameroun en 2017, 16,5% de décès des enfants de moins de 5 ans enregistré sur le territoire national étaient dû à la pneumonie (**Aubry et Gaüzère, 2019**). En 2019, elle a été à l'origine de 6 500 morts des enfants de moins de 5 ans, ce qui fait toujours de cette maladie l'une des premières causes de mortalité infantiles au Cameroun (**Marie, 2021**).

I.1.1.2.3. Symptômes

Les symptômes de la pneumonie peuvent varier suivant l'étendue de l'infection et du micro-organisme responsable. Le symptôme le plus fréquent est généralement une toux produisant des expectorations (mucus épais ou décoloré). Cependant, les autres symptômes de la pneumonie sont entre autre: une douleur thoracique, les frissons, la fièvre et l'essoufflement. Les personnes atteintes de la pneumonie présentent parfois les symptômes digestifs tels que les nausées, la diarrhée, les pertes d'appétit ou anorexie. Ces symptômes varient souvent en fonction de l'âge du patient (enfants et personnes âgées), parfois une confusion soudaine peut être le seul signe de la pneumonie chez les personnes âgées (**Sanjay, 2024**).

I.1.1.2.4. Étiologie

La pneumonie peut avoir une origine virale, fongique, ou bactérienne. La pneumonie bactérienne étant la plus fréquente, et faite intervenir plusieurs bactéries dont l'incrimination dépend du type de pneumonie. La cause la plus fréquente de pneumonie nosocomiale est la micro-aspiration d'agents étiologiques qui comprend généralement 50 à 80 % des bactéries Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa* (17,4 %), *Escherichia coli* (6,6%), *Klebsiella pneumoniae* (18,1 %), *Haemophilus influenzae* (4,9 %) et des bactéries Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* (18 %) (**Akono, 2019**). La pneumonie communautaire quant à elle, est celle contractée en milieu extrahospitalier. Elle est généralement causée par *Streptococcus pneumoniae* (90 %) par contre, les bactéries telles que *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* peuvent aussi en être la cause (**Savado, 2012**).

❖ *Haemophilus influenza*

C'est une bactérie de la famille des pasteurellaceae qui se présente sous forme de petit bâtonnet immobile à Gram négatif, aéro-anaérobie facultative et généralement isolée à partir des voies respiratoires chez l'homme (**OMS, 2018**). La fréquence d'*H. influenza* de type b varie de 5 à 20 % selon les pays. Étant plus marquée chez les enfants de moins de 12 mois, la fréquence de la maladie à *H. influenza* tend à diminuer dans les pays où la vaccination est courante. (**Chirifi et Zenagui, 2015**)

❖ *Streptococcus pneumoniae*

Ce germe est l'agent responsable des pneumonies aiguës graves communautaires et doit être envisagé en premier intention (**Cousson et al, 2007**). Il s'agit d'un microorganisme de la

flore commensale de l'homme, Cocci Gram + et aéro-anaérobie. Sa fragilité (sensible aux variations de pH et de température) rend sa culture difficile (Larabi et Louadj, 2015).

❖ ***Klebsiella pneumonia***

Encore appelé bacille de Friedlander, *K. pneumoniae* est une entérobactérie à Gram négatif qui atteint le plus souvent les malades fragiles (éthyliques et/ou tabagiques, immunodéprimés ou malnutris et diabétiques) (Savado, 2012). *K. pneumoniae* est la cause majeure des infections respiratoires nosocomiales et responsables de 20 à 50 % de décès voir 100 % chez les personnes fragilisées (Baudrand et al., 2009).

❖ ***Pseudomonas aeruginosa***

C'est un bacille Gram- aérobie stricte, très mobile, qui se déplace en ligne droite par ciliature (Larabi et Louadj, 2015). La mortalité et la morbidité des maladies à *P. aeruginosa* reste relativement élevée (30 %) malgré l'utilisation de molécules actives (Guery et al., 2009).

❖ ***Escherichia coli***

Connue comme l'une des causes principales des maladies d'origine alimentaire, *E. coli* est une entérobactérie à Gram- commensale de l'intestin des mammifères (OMS, 2018). Elle peut aussi être incriminée dans de nombreuses infections parmi lesquelles la pneumonie où elle cause environ 7 % de pneumonie nosocomiale (Louar et Rouha, 2014)

I.1.1.2.5. Diagnostic

Le diagnostic chez les personnes atteintes de la pneumonie est souvent orienté en fonction des différents symptômes et signes cliniques. Pour cela, on va donc distinguer deux grands examens mis en place lors du diagnostic de la pneumonie à savoir :

- ✓ **L'examen d'orientation** (la radiographie du thorax et le scanner thoracique) qui consiste à visualiser ou examiner les lésions causées par la maladie;
- ✓ **L'examen à visé étiologique** (l'examen cytbactériologique des crachats «ECBC», hémoculture, la fibroscopie bronchique et les sérologies) qui consiste à isoler le ou les agents infectieux responsables de la maladie (Braunwald et al., 2002).

I.1.1.2.6. Prévention et traitement

I.1.1.2.6.1. Prévention

Plusieurs mesures préventives peuvent être mises en place afin de limiter l'apparition de la pneumonie à savoir:

- La vaccination (vaccin anti-pneumococcique et vaccin à *H. influenzae*) des sujets à risque comme les enfants de moins de 15 ans;
- La lutte contre tabagisme, l'alcoolisme et autres facteurs de risques;
- L'équilibre des tares et traitements des personnes atteintes du VIH, diabète, malnutrition et bien d'autres maladies pouvant fragiliser le système immunitaire (Braunwald *et al.*, 2002).

I.1.1.2.6.2. Traitement

Le traitement de la pneumonie bactérienne dépend de son origine (communautaire ou nosocomiale). Il a pour objectifs d'inhiber ou de tuer l'agent pathogène dans les foyers infectieux et d'éviter toutes récurrences. À cet effet, plusieurs moyennes peuvent être mises en œuvre pour soulager les patients atteints de la pneumonie (Amongue, 2020). Elles reposent essentiellement sur l'utilisation des antibiotiques suite à la réalisation d'un antibiogramme. Les molécules les plus utilisées sont généralement l'Amoxicilline-Acide clavulanique, la Lévoﬂoxacine (inhibitrice de l'ADN gyrase et la topoisomérase IV) et Chloramphénicol. Devant une infection potentiellement grave, des associations peuvent se faire pour obtenir un spectre plus large afin de diminuer les risques de sélection des germes et intensifier un effet bactéricide (Gerard, 2014).

I.1.1.3. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un phénomène qui survient lorsqu'une bactérie acquiert une certaine capacité à résister aux effets des médicaments antibiotiques utilisés pour l'éliminer ou inhiber sa croissance (OMS, 2024). L'antibiothérapie liée aux traitements de la tuberculose et de la pneumonie bactérienne implique les antibiotiques appartenant à différentes familles telles que : les inhibiteurs de la synthèse protéique (Streptomycine, Kanamycine, Chloramphénicol), les inhibiteurs de la synthèse des acides aminés (Rifampicine, Fluoroquinolones, Lévoﬂoxacine), les inhibiteurs de la synthèse de la paroi et de la membrane

bactérienne (Isoniazide, Pyrazinamide, Amoxicilline-Acide Clavulanique) (Archambaud, 2009). Les bactéries responsables de ces maladies présentent de plus en plus des résistances aux antibiotiques surtout dans le traitement de la tuberculose pulmonaire et des pneumonies nosocomiales. Cette résistance est généralement liée aux mécanismes biochimiques de résistance acquise notamment la diminution de la perméabilité, la modification de la cible des antibiotiques et la production d'enzymes inactivant les antibiotiques (Lozniewski *et al.*, 2010).

Pour faire face à ce problème de résistance, les chercheurs se sont tournés vers les sources de molécules plus fiables, moins toxiques et surtout respectant l'Homme et son environnement que sont les molécules biovégétales (Hafez *et al.*, 2022).

I.2. GÉNÉRALITÉS SUR LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES ET LEURS MÉTABOLITES SECONDAIRES

I.2.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES

I.2.1.1. Définition, biodiversité et classification des endophytes

I.2.1.1.1. Définition

Littéralement, le terme « endophyte » dérive de deux mots grecs, « *endon* » : à l'intérieur et « *phyte* » : plante. De Babys l'introduit pour la première fois en 1866, en le définissant comme étant tous micro-organismes qui se développent et colonisent les tissus internes de la plante hôte sans lui causer un dommage. Cette définition sera restreinte par Carroll en 1986 qui va le définir comme les organismes qui causent des infections asymptomatiques au niveau des tissus végétaux en excluant les champignons pathogènes (Patil *et al.*, 2016).

La définition appropriée est celle de Pertini en 1991, qui définit les endophytes comme les organismes qui, pendant toute ou une partie de leur cycle de vie, colonisent les tissus internes de la plante hôte de manière asymptomatique (Labane et Meziane, 2024).

I.2.1.1.2. Biodiversité et classification des endophytes

✓ Biodiversité

Les endophytes représentent un groupe de microorganismes très diversifié, englobant aussi bien les bactéries, les archées, les protistes ainsi que les champignons (Patil *et al.*, 2016). Les plus répandus sont les champignons avec une estimation de 1,5million d'espèces et une moyenne d'environ 50 espèces par espèce de plante étudiée (Fernandes *et al.*, 2009). Ils sont

ubiquitaires et peuvent être transmis d'une plante à une autre à travers les spores (transmission horizontale) ou d'une plante à sa descendance via les graines (transmission verticale) (**Zérroung et al., 2011**). Selon les critères phénotypiques, le règne des champignons (Eumycota) comprend actuellement 1 sous-règne, 5 embranchements. La plus part des champignons endophytes appartiennent à l'embranchement des Ascomycota. Par contre, d'autres appartiennent aux taxons tels que les Basidiomycota, Glomeromycota, les Chytridiomycota et les Zygomycota (**Derkaoui, 2015**).

✓ classification

En se basant sur la phylogénie et des stratégies du cycle de vie, les champignons endophytes ont été divisés en deux principaux groupes et subdivisés en quatre classes respectives : les Clavicipitacées (classe 1) et les non Clavicipitacées (classes 2, 3 et 4) (**Jha, 2019**). Dans le passé, ces 4 classes ont été mise en place en fonction de six propriétés à savoir : le ou les tissus colonisé(s), le modèle de colonisation des plantes, la gamme d'hôtes à coloniser, les niveaux de biodiversité végétale, les fonctions écologiques et le mécanisme de transmission entre les générations d'hôtes (**Rodriguez, 2009**).

Tableau II: Classification des champignons endophytes (**Rodriguez, 2009**)

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

Légende :

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

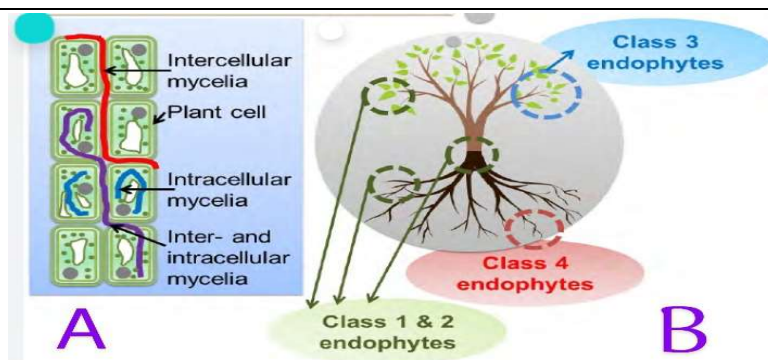


Figure 6: Les classes d'endophytes selon la localisation des tissus colonisés (Kusari et Spiteller, 2012).

Légende :

(A) différentes localisation des champignons endophytes dans les tissus végétaux ; (B) localisation de différentes classes d'endophytes.

Actuellement, les champignons endophytes restent un nouveau domaine d'étude et leur relation avec la plante hôte varie en fonction de plusieurs facteurs.

I.2.1.2. Relations plante hôte- champignons endophytes

Diverses relations (mutualistes, symbiotiques, antagonistes et même pathogènes) peuvent exister entre les champignons endophytes et leurs hôtes (Strobel, 2002). Ces relations plantes-endophytes pour la plus part, peuvent présenter une certaine complexité. Les plantes d'une part, peuvent fournir aux endophytes des nutriments, une protection contre la dessiccation, ainsi que favorisées la transmission via la dissémination des graines à la prochaine génération d'hôtes (Guo *et al.*, 2008). D'autre part, elles peuvent aussi fournir des composés chimiques importants qui sont essentiels pour la croissance et l'autodéfense des endophytes (Strobel, 2002). En retour, les endophytes apportent des avantages significatifs à leurs plantes hôtes en produisant de nombreuses substances bioactives nécessaires pour s'adapter aux conditions abiotiques (tolérance croissante à la sécheresse ou au stress hydrique, température élevée, pH faible, salinité et présence de métaux lourds) et biotiques (agents pathogènes bactériens et fongiques, des attaques d'insectes, nématodes et mammifères herbivores) (Guo *et al.*, 2008).

La mise en place d'une relation symbiotique entre la plante et ces champignons endophytes s'effectue en plusieurs étapes (Figure 7) :

- a) La germination des spores et déclenchement du branchement d'hyphes par le 5désoxy-strigol ;
- b) La formation d'un appressorium par le champignon qui paraît induire le mouvement du noyau de la plante vers le site du premier contact physique ;
- c) La formation de l'appareillage de la pré-pénétration par les éléments du cytosquelette et le réticulum endoplasmique à l'axe du mouvement nucléaire ;
- d) La pénétration dans la paroi cellulaire et formation d'une structure hyphale (comme un réseau filamenteux) après atteinte du cortex intérieur;
- e) La colonisation des tissus commence et une infection initiale est accompagnée par une induction équilibrée de gènes de la défense de la plante.

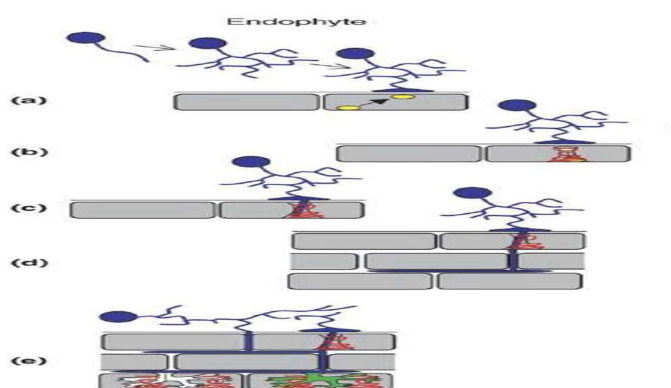


Figure 7: Développement symbiotique d'endophytes fongiques (Selim *et al.*, 2012).

Les endophytes et les microbes pathogènes possèdent tous des facteurs virulents qui sont contrés par des mécanismes de défense de la plante. Si la virulence fongique et la défense par la plante sont équilibrées, alors la relation reste apparemment asymptomatique et non virulente ce qui est le cas des endophytes. Par contre, si les mécanismes de défense de la plante contrecarrent complètement les facteurs de virulences du champignon, ce dernier sera vaincu et réciproquement, si la plante fléchit à la virulence fongique, cette relation conduira à une maladie de plante (Kusari, 2012).

I.2.1.3. Méthodes d'isolement des champignons endophytes

Il repose sur la mise en culture du matériel végétal qui, après croissance et purification, permettrons la caractérisation et l'identification du ou des champignons obtenus. Pour cela, 5 à 6 fragments du matériel végétal ayant préalablement subi les étapes de désinfections sont déposés sur le milieu PDA additionné au chloramphénicol. Les boîtes sont mises à l'étuve à

28°C pendant une semaine et après l'incubation chaque champignon poussé sera repiqué plusieurs fois jusqu'à l'obtention des cultures pures (**Pimentel et al., 2006**).

I.2.1.4. Intérêt des champignons endophytes

➤ Dans le domaine industriel et alimentaire

Les champignons endophytes jouent un rôle important dans le processus de biodégradation et d'hydrolyse enzymatique (**Fouda et al., 2015**). Ils ont une grande capacité à produire divers enzymes, qui pourraient être utilisées dans diverses applications biotechnologiques. C'est le cas *Aspergillus niger*, isolé de *Taxus cuspidata*, qui produit d'intéressantes enzymes telles que les protéases, des lipases et des estérases utilisées dans différentes applications alimentaires. En effet, les protéases jouent un rôle en boulangerie tandis que les lipases sont utilisées dans la production des huiles (**Compaore et al., 2016**).

➤ Dans le domaine agricole

Dans les pays en développement, la majorité de la population utilise l'agriculture comme principale activité économique et moyen de subsistance. Les champignons endophytes jouent ici un rôle important dans la stimulation de la croissance des plantes, protection contre les stress biotiques et abiotiques et les ravageurs via la modulation de la signalisation de l'hormone de croissance et une augmentation du rendement des graines (**Miliute et al., 2015**).

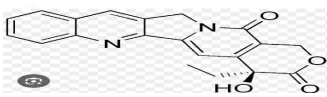
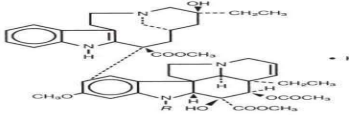
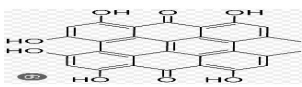
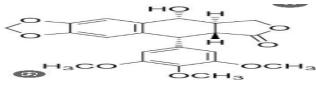
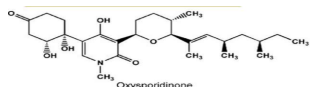
➤ Dans le domaine médical

Les champignons endophytes produisent des métabolites secondaires doués de nombreuses propriétés thérapeutiques. Ces composés naturels bioactifs produits par les endophytes présentent une utilité potentielle prometteuse dans les domaines de la sécurité et de la santé humaine (**Pimentel et al., 2011**). C'est le cas de *Fusarium solani* isolé d'*Apodytes dimidiata*, producteur de métabolites de métabolites tel que la camptothécine (**Zhang et al., 2012**). Bien qu'il existe encore une demande importante de l'industrie pharmaceutique pour des produits synthétiques pour des raisons économiques, les problèmes liés à la santé humaine, tels que le développement de la résistance aux médicaments chez les micro-organismes pathogènes humaines, une réclamation concernant de nouveaux agents thérapeutiques pour les traitements efficaces chez l'homme, les plantes et les animaux qui ne sont actuellement pas satisfaites (**Pimentel et al., 2011**).

I.2.2. Les métabolites secondaires des champignons endophytes

Les métabolites secondaires encore appelés produits naturels, sont des produits de métabolismes qui ne sont pas essentiels à la croissance, au développement ou à la reproduction normale d'un organisme. Ils ont des structures et des activités biologiques très diverses, généralement semblables à ceux de la plante (**Kusari et Spiteller, 2012**). Ces composés sont regroupés en plusieurs classes chimiques dont les plus retrouvées sont les alcaloïdes, les peptides non ribosomiques, les polycétides, les terpènes, les stérols, les saponines, les coumarines, les anthocyanines, les tannins, les flavonoïdes, les polyphénols et les phénols (tableau III) (**Spatafora et al, 2015**).

Tableau III : Quelques métabolites secondaires issus des champignons endophytes et leurs plantes hôtes (**Kamou, 2016**).

Structure et Nom(s)	Source et /ou champignon	References
 Camptotécine; <u>14</u>	<i>Nothapodytes foetida</i> et <i>Entrophosphora infrequens</i>	Arora et al., 2010
 R=CH ₃ Vinblastine; <u>15</u> R=CHO Vincristine; <u>16</u>	<i>Catharanthus roseus</i> et <i>Alternaria</i> sp	Strobel et al., 2004
 Hypéricine; <u>17</u>	<i>Hypericum perforatum</i> et <i>Chetomium globosum</i>	Abu-Darwish et al., 2008 et Wilson, 1966
 Podophyllotoxine <u>18</u>	<i>Dyosma Veitchii</i> et <i>Penicillium implication</i>	Nai-Yun et al., 2013
 Oxysporidinone <u>19</u>	Ecorces <i>Cinnamomum Kanehirae</i> et <i>Fusarium oxysporum</i>	Nai-Yun et al., 2013
 Taxol <u>20</u>	<i>Morinda Citrifolia</i> et <i>Lasiodiplodia Theobromae</i>	Zhang et al., 2010

I.2.2.1. Les alcaloïdes

I.2.2.1.1. définition

Les alcaloïdes sont d'une classe hétérogène caractérisée par la présence d'une fonction basique azotée souvent incluse dans un hétérocycle. Ils sont majoritairement dérivés des acides aminés et ont une activité pharmacologique significative. On peut classer les alcaloïdes en 3 groupes à savoir : les alcaloïdes vrais (synthétisés à partir d'acides aminés et leur atome d'azote inclus dans un hétérocycle), les pseudo-alcaloïdes (non dérivés d'acides aminés et leur atome d'azote inclus dans un hétérocycle) et en fin les proto-alcaloïdes qui sont des amines simples synthétisées à partir d'acides aminés, dont l'atome d'azote n'est pas inclus dans un cycle (Bruneton, 2009).

I.2.2.1.2. Activités biologiques

Les alcaloïdes sont des molécules qui, par leurs fonctions chimiques, possèdent plusieurs propriétés biologiques à travers des activités antifongique, anticancéreuse, et antivirale (Zhang *et al.*, 2012). c'est le cas d'Asperfumolide d'*Aspergillus fumigatus*, qui est un alcaloïde isolé de *Cynodon dactylon*, et qui a montré une activité contre *Candida albicans* (Liu *et al.*, 2004). Également, la phomoénamide des champignons endophytes du genre *Phomopsis* spp isolé des feuilles de *Garcinia dulcis* a montré une activité sur *Mycobacterium tuberculosis* (Rukachaisirikul *et al.*, 2008).

I.2.2.2. Les terpènes et terpénoïdes

I.2.2.2.1. définition

Les terpènes sont des composés organiques produits par une variété de plantes, en particulier les conifères, et par certains insectes. Leur premier rôle est avant tout de produire des arômes distinctifs. Ce sont les hydrocarbures produits à partir d'isopentyl pyrophosphate et classés selon leur nombre d'unités pentacarbonées. Les terpénoïdes ne sont pas des hydrocarbures mais, ont des structures analogues aux terpènes (structure isoprène multiple de 5 carbones) (Khan *et al.*, 2011).

I.2.2.2.2. Activités biologiques

Parmi les terpénoïdes, on retrouve remarquables produits issus des champignons endophytes, les phytohormones tels que les dérivés de l'acide gibbéréllique encore appelés gibbéréllines, produit notamment par l'espèce *Aspergillus fumigatus*, endophyte issu du soja et la sphaeropsidine produit par le genre *Tubercularia sp* isolé de *Taxus mairei* qui a déjà démontré une activité anticancéreuse (**Jucimar et al., 2011**).

I.2.2.3. Les flavonoïdes

I.2.2.3.1. Définition

Les flavonoïdes sont des molécules naturelles appartenant à la grande famille de polyphénols. Elle se trouve dans différentes parties de la plante telles que : les fruits, les feuilles et les fleurs. Les flavonoïdes peuvent être regroupés en quatre groupes à savoir : la quercétine, les flavonols, les catéchines et les anthocyanines (**Nutri et Co, 2024**).

I.2.2.3.2. Activités biologique

Les flavonoïdes sont excellents pour notre organisme grâce à leurs puissantes propriétés antioxydantes. En effet, ils ont la capacité de neutraliser les radicaux libres capable de provoquer les stress oxydatifs, endommager nos cellules et accélérer leurs vieillissements. Son action antiinflammatoire est également reconnue (**Nutri et Co, 2024**).

I.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES PLANTES D'INTÉRÊT

I.3.1. PRÉSENTATION DU GENRE *Macaranga*

De la famille des Euphorbiaceae, les plantes du genre *Macaranga* sont constituées d'arbustes ou d'arbres dioïques, et repartis sur 280 espèces tropicales africaines, malgache, indo- malgache, australienne (**Kengne, 2016**).

Plusieurs plantes genre *Macaranga* ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour soulager ou traiter diverses maladies humaines (**Peter et al., 2019**).

I.3.1.1. *Macaranga hurifolia* Beille

I.3.1.1.1. Taxonomie et répartition géographique

✓ Taxonomie

Le tableau IV résume la position systématique de *Macaranga hurifolia* Beille.

Tableau IV : Classification de *Macaranga hurifolia* (Kengne, 2016 modifié)

Domaine	Eucaryota
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Euphorbiales
Famille	Euphorbiaceae
Sous-famille	Acalyphoideae
Genre	<i>Macaranga</i>
Espèce	<i>Macaranga hurifolia</i>

✓ répartition géographique

Parmi les plantes du genre *Macaranga*, 30 sont originaire de l'Afrique tropicale continentale et environ 15 de Madagascar et des îles de l'Océan Indien. Au Cameroun, *Macaranga hurifolia* Beille se trouve principalement à Yaoundé, dans la région du centre (Nyom II, Nkolbisson, ...) et à Buéa dans la région du Sud-ouest (Mamfé), (kamou, 2016).



Figure 8: Répartition de *Macaranga hurifolia* Beille en Afrique (SANBI, 2022)

Légende : les points rouges indiquent les positions géographiques de la plante

I.3.1.1.2. Description botanique

Macaranga hurifolia Beille est plante possédant une foliation distinctement dentée, largement ovée de 9 à 18 cm de long sur 6 d 15 cm de large. Sa face inférieure est densément

couverte de glandes à stipule d'un cm de long et à bractée de 3 à 5 mm de long. Elle est constituée de petites branches armées d'épines, de pétioles et une nervation à la face inférieure de la feuille couverts de poils blancs. C'est un buisson ou un arbre de forêt pouvant atteindre 12 m de haut. L'inflorescence est verdâtre et souvent sur les branches sans feuilles, donnant de fruits globuleux de 3 mm de diamètre (Stäuble, 1983).



Figure 9: Feuilles et tiges de *Macaranga hurifolia* Beille (Gnagbo, 2022).

I.3.1.1.3. Usages thérapeutiques de *Macaranga hurifolia* Beille

Plusieurs parties de cette plantes sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter ou soulager les symptômes de diverses maladies humaines. En effet, la décoction de racines de *Macaranga hurifolia* est utilisée pour soigner les œdèmes chez les femmes enceintes, l'écorce qui est quelques fois utilisée contre les affections gastro-intestinales, et peut aussi être mâchée ou la poudre de la tige délayée dans du vin de palme et avalée pour soulager les symptômes de la tuberculose (Kerharo et Bouquet, 1950).

I.3.1.1.4. Travaux antérieurs réalisés sur *Macaranga hurifolia* Beille

Les travaux antérieurs effectués au niveau des fruits de cette plante ont permis d'isoler et de caractériser différents métabolites secondaires appartenant à plusieurs classes de composés naturels parmi lesquelles : les stéroïdes (stigma stérol et β -sitostérol) et les flavonoïdes (épicatechine) qui sont les métabolites dominant chez *Macaranga hurifolia* (Kengne, 2016).

L'importance des flavonoïdes dans le règne végétal et leur abondance chez les plantes vasculaires laisse penser qu'ils jouent un rôle prépondérant dans de nombreux processus biologiques. En effet, ils agissent comme hormone de reproduction, facteur de croissance, intermédiaire régulateur ou témoin des phénomènes d'oxydoréduction. De plus, beaucoup de

ces composés sont doués d'activités biologiques : antioxydante (Harbone, 1981), anti-inflammatoire (Sharma et Deshwal, 2011), insecticide, ostrogénique (Zamora-Ros, 2013) antibactérienne, anti fongique (Lim *et al.*, 2007).

I.3.2. Présentation genre *Voacanga*

Le genre *Voacanga* est l'un des genres le plus répandu de la famille des Apocynaceae. Cette famille est représentée par 5000 espèces, regroupées en 375 genres environ. Pour la plus part, ce sont des lianes, des plantes herbacées et quelques arbres ou arbustes à latex et à feuilles persistantes (Endress *et al.*, 2007).

I.3.2.1. *Voacanga thouarsii* Roem. & schult

I.3.2.1.1. Taxonomie et répartition géographique

✓ Taxonomie

En se basant des caractères morphologiques de la plante et de sa composition chimique, l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) a validé la classification taxonomique de *V.thouarsii* Roem et schult consignée dans le tableau V suivant.

Tableau V : Classification de *Voacanga thouarsii* (MBG, 2012)

Domaine	Eucaryota
Règne	plantae
Embranchement	Spermatophyta
Classe	Equisetopsida
Sous-classe	Magnoliidae
Super-ordre	Asteraae
Ordre	gentianales
Famille	Apocynaceae
Genre	<i>Voacanga</i>
Espèce	<i>Voacanga thouarsii</i>

✓ Répartition géographique

L'étude débute Vers 1985, où Leeuwenberg a fait des investigations en Afrique et avait trouvé *V.thouarsii* dans vingt-quatre pays tels que :Angola, Burundi, Cameroun, République Centre Africaine, Congo, Gabon, Ghana, Guinée, Guinée Bissau, Côte d'Ivoire, Kenya, Madagascar, Malawi, Mali, Mozambique, Nigéria, Sénégal, Sierra Léone, Afrique du Sud, Soudan, Tanzanie, Ouganda, Zaïre et Zambie. Ainsi, *V.thouarsii* se rencontre généralement

dans la forêt semi-décidue et dans les savanes, souvent dans des localités humides (du niveau de la mer jusqu'à 600 m d'altitude) et colonise facilement les milieux perturbés, ainsi que le long des rivières (Nourdine, 2014).

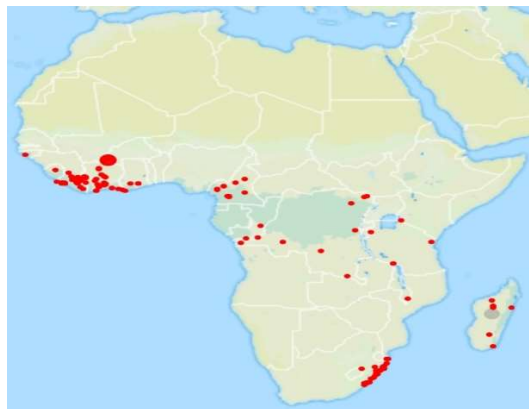


Figure 10: Répartition de *Voacanga thouarsii* Roem. & schult en Afrique (SANBI, 2022)

Légende : les points rouges indiquent les positions géographiques de la plante

I.3.2.1.2. Description botanique

Appartenant à la famille des Apocynaceae, *V.thouarsii* est un arbre pouvant atteindre 15 mètres de haut et 30 cm de diamètre environ. Elle produit un latex blanc, caustique, toxique et nauséux sur toutes ses parties, avec une abondance au niveau du péricarpe des fruits et du pédoncule des fleurs (Nourdine, 2014). En effet, *Voacanga thouarsii* a les caractéristiques suivant :

- Les feuilles sont grandes, épaisses, entières, simples et opposées deux à deux avec un limbe oblong ou obovale, spatulé de 6 à 24 cm de long et de 6 à 8 cm dans sa plus grande largeur.
- La fleur est généralement présente toute l'année et possèdent une corolle jaune avec un tube long de 1.5 cm, tordu de gauche à droite sous la gorge.
- Le fruit est constitué de 2 follicules globuleux généralement séparés de 4 à 10 cm de diamètre, tachetés de vert pâle et foncé, à 2 valves, contenant de nombreuses graines qui, comme *Voacanga africana*, procède une substance : la tabersonine.
- Le tronc est généralement ramifié à la base et peut atteindre 4 à 5 mètres de hauteur, tandis que sa racine est moyennement charnue (Nourdine, 2014).

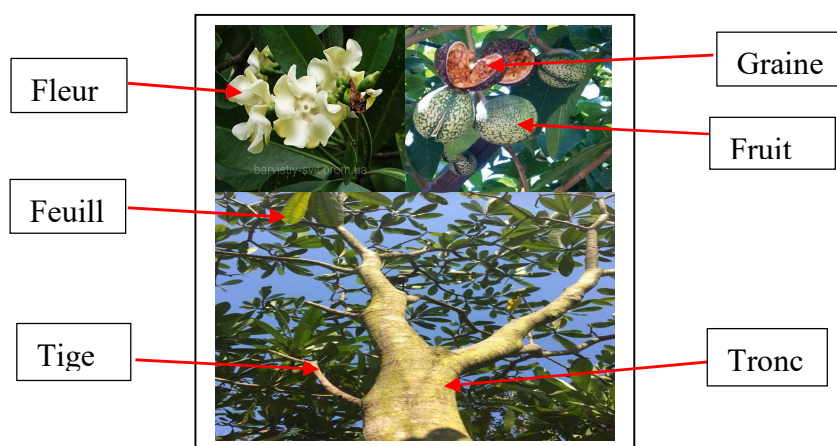


Figure 11: Arbre de *Voacanga thouarsii* Roem. & schult (Kerryn, 2018)

I.3.2.1.3. Usages thérapeutiques de *Voacanga thouarsii* Roem. & schult

En médecine traditionnelle, plusieurs parties de cette plante sont utilisées dans le but de traiter ou soulager les symptômes de diverses maladies humaines.

Les blessures, les furoncles et les plaies sont traités en appliquant du latex, ou une décoction, ou infusion de l'écorce de la tige, des feuilles et des racines (Bruneton, 1999). Cette plante est aussi utilisée pour les soins de l'appareil génital (évacuation de placenta, syphilis), contre les affections de la peau (mycose, plaie), la régularisation de l'appareil circulatoire (hypertension artérielle, problème cardiaque) et les infections rhumatismales. De plus, une décoction de feuilles est également utilisée pour soigner l'appareil digestif des ulcères d'estomac et on les emploie aussi pour traiter la blennorragie, l'eczéma, les infections cryptogamiques et la gale. Particulièrement en Afrique, la glue de *V. Thouarsii* est utilisée comme plombage provisoire de dents cariées (Schmelzer, 2008).

I.3.2.1.4. Travaux antérieurs réalisés sur *Voacanga thouarsii* Roem. & schult

Les travaux antérieurs sur cette plante soulignent qu'elle est connue comme plante à alcaloïde de diverses vertus en matière pharmacologique selon les organes considérés (feuille, écorces de tronc, écorces de racine et graine), dont l'emploi de ces organes est basé sur les types d'alcaloïdes qui les constituent. Dans les feuilles, a été découvert des alcaloïdes indoliques (l'ibogaïne, la voacangine et la vincristine). La vincamine, la voacangine et la vobtusine ont été isolées des écorces de tronc et des racines, et la tabersonine au niveau des graines (Nourdine, 2014).

Malgré le fait que les plantes soient utilisées pour de nombreuses fins thérapeutiques, nous faisons face un problème de la menace de la biodiversité. Selon les récentes études menées en 2020, 723 espèces de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle sont menacées d'extinction (Camille, 2020).

I.4. LES MÉTHODES

I.4.1. Méthode d'isolement de champignons endophytes

Cette méthode a pour but d'isoler les champignons endophytes sur un milieu de culture synthétique à partir des tissus végétaux ayant préalablement subi une désinfection superficielle. Pour cela, le matériel végétal récolté doit d'abord être rincé à l'eau du robinet avant de subir une étape de désinfection superficielle. Par la suite, il doit être découpé en petits morceaux dans des conditions aseptiques puis déposé dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA supplémenté au chloramphénicol et incubées à 27 °C pendant 04 à 06 jour. Enfin, chaque champignons poussé est repiqué plusieurs fois jusqu'à l'obtention de culture pure (Pimentel *et al.*, 2006 ; Demeni, 2019).

I.4.2. Méthodes d'extractions des métabolites secondaires

❖ Extraction sur milieu de culture PDB

L'extraction sur milieu PDB permet d'obtenir les métabolites secondaires des champignons endophytes en utilisant une source de carbone émanant du milieu de culture PDB pour la croissance fongique. Pour ce fait, les cultures jeunes de champignons endophytes sont repiquées dans un erlenmeyers de 500 ml contenant 250 ml de PDB en y plaçant deux à trois pièces de chaque champignon et incubés avec une agitation périodique pendant 14 jours à 25 °C. Après incubation, la culture est filtrée sur un gaz stérile, le filtrat centrifugé à 5000 tours/min pendant 15 minutes et le surnagent est récupéré et extrait avec le même volume (v/v) de l'éthanol puis on le met sous agitation pendant deux heures. La solution est ensuite mise au repos dans des ampoules à décompté pour séparer les deux phases et la phase organique est récupéré puis concentré en utilisant un évaporateur rotatif afin d'obtenir le métabolite secondaire pure (Pimentel *et al.*, 2006).

❖ **Extraction sur milieu de culture Riz**

Cette méthode a pour but d'extraire les métabolites secondaires des champignons endophytes en utilisant le riz comme source de carbone pour la croissance fongique. Ainsi, les de champignons endophytes en croissances actives sont repiqués dans des bocaux en verres de 1 L contenant le riz (150g) stérilisé à l'autoclave, en y plaçant quatre fragments de chaque champignon en surface. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 2 semaines et une vérification d'éventuelle contamination est faite au quotidien. Après ces étapes, 500 mL de l'acétate d'éthyle est ajouté et homogénéisé, puis on laisse l'ensemble se macérer sous agitateur périodique pendant 48h. Enfin, le mélange est filtré et le filtrat concentré par évaporation sous pression réduite à 90°C (**Demeni, 2019**).

I.4.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

❖ **Évaluation en milieu liquide**

Le but des méthodes de dilution en milieu liquide est de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antimicrobien testé. Celles-ci consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé (0,5 McFarland) au contact de concentrations croissantes d'extraits selon une progression géométrique de raison 2. Cette méthode de microdilution est généralement effectuée sur les microplaques. Après incubation, la CMI est révélée par ajout du Blue Alamar et sera le premier puit où il n'y aura pas de virage du Blue Alamar au rose (**CA-SFM / EUCAST, 2024**).

❖ **Évaluation en milieu solide**

Cette méthode permet une estimation qualitative de l'extrait, réalisé par dépôt de l'extrait à l'aide de disques de cellulose imprégnés d'une quantité connue d'extrait ou de puits creusés dans la gélose et remplis par l'extrait. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues sur géloseensemencée (**CA-SFM / EUCAST, 2024**).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATÉRIEL

II.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal a été sélectionné sous la base de certains critères dont les plus importants sont l'usage en médecine traditionnelle et l'aspect saint d'apparence.

Les échantillons de *Macaranga hurifolia* Beille et *Voacanga thouarsii* Roem. & schult (feuilles, écorces de tige et de tronc) ont été collectés en décembre 2023 aux environs de 7 heures à Nkolbisson (3° 51' 21. 7'' N, 11° 27' 01. 8'' E et 3° 52' 11. 7'' N, 11° 27' 09. 5'' E respectivement), situé dans la ville de Yaoundé, région du centre Cameroun. Par la suite, identifiés à l'Herbier National sous le numéro d'identification N° 37267/HNC pour *Macaranga Hurifolia* Beille et N° 2150/SRFK pour *Voacanga thouarsii* Roem. & schult par comparaison aux échantillons de référence.



Figure 12: Photographies des feuilles, des écorces de tige et de tronc de (A : *M. hurifolia* et B : *V.thouarsii*)

II.1.2. Matériel microbiologique

II.1.2.1. Souches microbiennes

Le matériel microbien comprenait sept bactéries dont deux Bacilles Acido-alcoolo résistants (BAAR), notamment des souches de référence du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (BCG et H37RV ATCC 27294), une bactérie Gram positif (*Staphylococcus aureus* NCTC 12973) et quatre bactéries Gram négatif (*Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 76110, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 17102 et *Escherichia coli* ATCC 25922). Les souches de mycobactéries ont été repiquées et conservées au

Laboratoire de Recherche sur la Tuberculose du Centre de Biotechnologie de l'Université de Yaoundé I, tandis que celles des bactéries Gram ont été conservées au Laboratoire de Microbiologie de la même institution universitaire.

II.1.2.2. Milieux de culture

Suivant les méthodes employées, les milieux de culture étaient:

- Potato dextrose agar (PDA), Himedia GMH096-500G India pour l'isolement des champignons endophytes ;
- Sabouraud dextrose agar (SDA), 610203 Liofilchem Italy et Czapek dextrose agar (CDA), Cond. Prix HT. C443-500G pour la caractérisation macroscopique des champignons endophytes ;
- Le riz (Bijou) pour la culture des endophytes isolés et l'extraction de leurs métabolites secondaires ;
- La Gélose Mueller Hinton (MHA), BHIWADI-301019 Rajasthan India pour le repiquage des bactéries gram et Bouillon Mueller Hinton (MHB), 610034 Liofilchem Italy pour la réalisation des tests d'inhibitions ;
- Le milieu liquide Middlebrook 7H9 (MBK 7H9), supplémenté de 2 % de glycérol, 7 % v/v de tween 80, de 10 % d'OADC et de PANTA, pour les tests d'inhibition des BAAR.

II.1.2.3. Antimicrobiens

Ils étaient constitués de :

- Chloramphénicol^R : utilisé comme supplément du milieu PDA afin de limiter la contamination bactérienne au cours de l'isolement des champignons endophytes ;
- Lévofoxacine^R : utilisée comme antibiotique de référence pour les tests d'inhibitions des bactéries gram.

II.1.2.4. Réactifs chimiques

Pour la réalisation de ce travail nous avons utilisé :

- L'éthanol 70% et l'hypochlorite de sodium 2,4% (NaOCl) pour la désinfection du matériel végétal ainsi que de la paille ;
- L'acétate d'éthyle pour l'extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes ;

- Une solution de Blue Alamar, pour la révélation de la croissance bactérienne ;
- Le Diméthylsulfoxyde (DMSO) à 7 % et le tween 80 à 7 % ont servi à la dissolution des extraits de champignons endophytes ;
- L'OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Catalase) a été utilisé comme supplément nutritif des mycobactéries : Becton Dickinson ;
- Le PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, and Azlocillin) : c'est un mélange lyophilisé d'antibiotiques, utilisé pour assurer le non contamination lors de la culture des mycobactéries: Becton Dickinson ;
- Les réactifs chimiques des tests colorimétriques : méthanol, copeaux de magnésium, acide chlorhydrique, chlorure ferrique, ferrocyanure de potassium, chloroforme, éther de pétrole, chlorure de méthylène, anhydride acétique, acide sulfurique.

II.2. MÉTHODES

II.2.1. Caractérisation des champignons endophytes

II.2.1.1. Échantillonnage

Pour assurer un bon isolement des champignons endophytes, nous avons choisi un matériel végétal frais et sans symptômes apparents de pathologie. Ainsi, les feuilles, les écorces de tige et de tronc des plantes de *M.hurifolia* et *V.thouarsii* ont été collectées et mises dans des sacs en plastiques stériles pour le transport jusqu'au laboratoire afin d'être utilisées dans un délai ne dépassant pas 24 heures (Zerroug *et al.*, 2018).

II.2.1.2. Isolement des champignons endophytes

Principe :

Il repose sur la mise en culture du matériel végétal ayant subi au préalable une désinfection qui, après incubation, croissance et purification du ou des champignons endophytes isolés, permettrons leurs caractérisations et identifications (Pimentel *et al.*, 2006 ; Demeni *et al.*, 2021).

Mode opératoire :

Le matériel végétal a été rincé avec l'eau du robinet pour se débarrasser des impuretés et les débris de surface. Par la suite, les micro-organismes de surface (épiphytes) ont été

éliminés suivant le processus de désinfection ci-contre. Après le rinçage, les échantillons de plantes (feuilles, écorces de tige et de tronc) ont été transférés dans de l'éthanol 70% pendant 2, 4 et 6 minutes respectivement par partie de plante, puis dans de l'hypochlorite de sodium (NaOCl 2,4%) pendant 4, 5 et 5 minutes respectivement, et encore dans l'éthanol 70% durant 2 minutes et enfin rincés dans trois pots avec de l'eau distillée stérile pendant 5 minutes et séchés sur du papier filtre stérile. Après cette étape, les échantillons sont coupés en fragments de quelques millimètres (5 à 6 mm) à l'aide d'un ciseau tranchant et stérile, placés aseptiquement dans des boîtes de pétri contenant de la gélose PDA supplémenté au Chloramphénicol (250 mg/l) afin d'inhiber la croissance bactérienne. Les boîtes sont mises à l'incubateur à température ambiante pendant une semaine et après l'incubation chaque champignon ayant poussé a été repiqué plusieurs fois jusqu'à l'obtention des cultures pures. Le pourcentage de colonisation (PC) est calculé selon **Pimentel *et al.*, (2006)** en utilisant la formule suivante :

$$\text{PC (\%)} = \frac{\text{nombre de fragments colonisés}}{\text{nombre total de fragments}} \times 100$$

En effet, l'efficacité de la désinfection du matériel végétal était confirmée par l'absence de champignons endophytes sur milieu PDA de la troisième eau de rinçage incubée à 28°C pendant une semaine. La figure présentée ci-après résume les différentes étapes du protocole d'isolement des champignons endophytes.

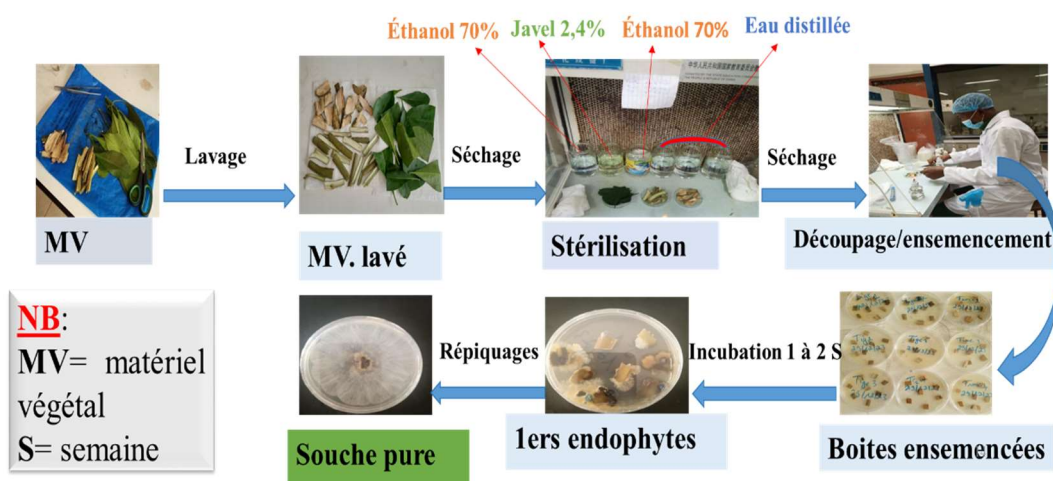


Figure 13: Mode opératoire de l'isolement des champignons endophytes (**Pimentel *et al.*, 2006 ; Demeni, 2019**).

II.2.1.3. Caractérisation des champignons endophytes isolés

L'identification des genres des isolats fongiques a été faite sur la base des caractéristiques macroscopiques (l'observation de l'envers et du revers de la boîte de Petri) et microscopiques, utilisant les clés d'identification (**Leslie et Summerell., 2006 ; Dufresne, 2018**).

II.2.1.3.1. Caractérisation macroscopique

Les caractéristiques suivantes ont été observées : la vitesse de croissance (lente, rapide), la texture (laineuse, crémeuse, granuleuse), la couleur du thalle (blanche, beige, verte, marron, noir), la présence et l'odeur de l'exsudat, la taille de colonies (petite, grande, envahissante), le relief (régulier, ondulé, dentelé) et la présence ou l'absence d'un pigment diffusible (**Chabasse et al., 2002**).

II.2.1.3.2. Caractérisation microscopique

Au cours de la caractérisation microscopique, un fragment mycélien avec un peu de gélose (7 à 14 jours) est prélevé et déposé sur une lame puis quelques gouttes de colorant (bleue de méthylène et Rouge Congo) y sont été ajoutées afin d'augmenter la visibilité de la paroi. L'ensemble est recouvert d'une lamelle en écrasant légèrement la suspension. L'observation au microscope (objectif 40x) a permis de décrire les caractéristiques suivantes :

- ❖ Le thalle végétatif : septé ou siphonné, paroi pigmentée (mélanisée) ou non (hyaline) ;
- ❖ Les organes de fructifications : présence ou non d'organes protecteurs des conidies, modes de formation et de regroupement des conidies qui peuvent être issues directement du thalle, solitaires (aleuriospores) ou en chaînes (arthrospores), ou produites par bourgeonnement et regroupées soit en masse ou en têtes ;
- ❖ Les spores : elles peuvent être endogènes (endospores) ou exogènes (conidiospores ou conidies), avec un aspect amérospores (unicellulaires et de petite taille), didymospores (bicellulaires), phragmospores (pluricellulaires à cloisons transversales), dictyospores (pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales), scolécospores (étroites et effilées)] et présence ou non de chlamydospores (**Dufresne, 2018**).

II.2.2. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes

II.2.2.1. Extraction des métabolites des champignons endophytes dans un milieu à base du riz

Principe :

Cette méthode repose sur le transfert des composés d'une phase à une autre sous l'effet d'un solvant d'extraction et d'une condensation de la phase liquide obtenue à l'évaporateur rotatif.

Mode opératoire :

Les isolats purs de champignons endophytes en croissances actives (7 à 14 jours) ont été repiqués dans des bocaux en verres de 1 L contenant le riz stérilisé (150g) à l'autoclave, en y plaçant quatre fragments (5 mm de diamètre) de chaque champignon dans du riz en surface. L'ensemble a été incubé à température ambiante pendant 2 semaines et une vérification d'éventuelle contamination se faisait au quotidien. Après ces étapes, nous avons ajouté 500 mL de l'acétate d'éthyle et homogénéiser puis laisser l'ensemble se macérer sous agitateur périodique pendant 48h. En fin, le mélange a été filtré et le filtrat concentré par évaporation sous pression réduite à 90°C (Pimentel *et al.*, 2006 ; Demeni, 2019). La figure ci-après illustre ces différentes étapes.

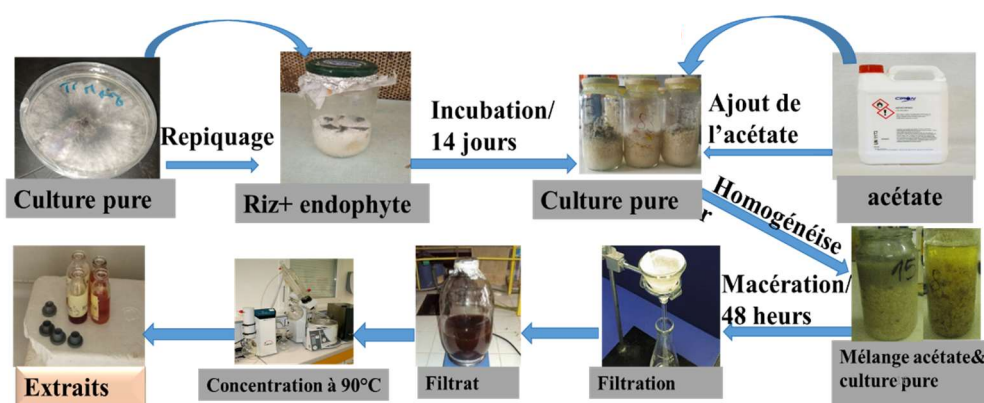


Figure 14: Protocole de culture et d'extraction des métabolites secondaires des champignons endophytes (Pimentel *et al.*, 2006 ; Demeni, 2019).

II.2.2.2. Évaluation des activités antibactériennes des extraits.

L'activité antibactérienne a été évaluée dans le but de déterminer les paramètres d'inhibitions CMI (concentration minimale inhibitrice) et CMB (concentration minimale

bactéricide) des extraits sur deux souches de Mycobactéries notamment (BCG et H37RV ATCC 27294), une souche de bactérie Gram positif (*Staphylococcus aureus* NCTC 12973) et quatre souches de bactéries Gram négatif (*Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Pseudomonas aeruginosa* Cip 76110, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 17102 et *Escherichia coli* ATCC 25922).

II.2.2.3. Préparation des solutions mères des extraits et de l'antibiotique

II.2.2.3.1. Préparation de solution mère des extraits

Les solutions mères des extraits de chaque champignon endophytes ont été préparées à une concentration de 100 mg/mL. Pour cela, dans un pot stérile en plastique, 500 mg d'extraits ont été solubilisés dans un mélange tween-DMSO constitué d'une solution de tween 80, et d'une solution de DMSO, puis on a ajouté de l'eau distillée stérile pour compléter le volume à 5mL (tween + DMSO à 7 %). Le mélange a été homogénéisé et conservé à 4 °C.

II.2.2.3.2. Préparation de la solution mère de l'antibiotique (Lévofoxacine)^R

La Lévofoxacine^R est un antibiotique de synthèse à large spectre de la famille des Fluoroquinolones (inhibitrice de la synthèse des acides aminés), utilisé en dernière intention pour le traitement de plusieurs infections respiratoires parmi lesquelles la pneumonie (ANSM, 2024).

Pour ce fait, la solution mère de la Lévofoxacine^R a été préparée à une concentration de 1mg/mL. Ainsi, 10 mg de la Lévofoxacine^R ont été pesées puis dissouts dans 8 mL d'eau distillée stérile et le volume a été ajusté avec de l'eau distillée stérile à 10 mL. Le mélange a été homogénéisé jusqu'à l'obtention de la solution mère (ISO 20776-1, 2019).

II.2.2.4. Repiquage des souches et préparation de l'inoculum

II.2.2.4.1. Repiquage des souches ou réactivation

Pour chacune de nos souches bactériennes, les boîtes de Petri contenant la gélose MHA ont été utilisés pour la culture des bactéries Gram et les tubes contenant le milieu MBK 7H9 supplémenté de 2 % de glycérol, 7 % v/v de tween 80, de 10 % d'OADC et de PANTA, pour la culture des mycobactéries. Les cellules préalablement conservées dans un milieu liquide à - 22 °C sont retirées du congélateur et homogénéisées. L'ensemencement a été fait par la méthode des stries à l'aide d'une anse de platine (pour les bactéries Gram) et par immersion à l'aide d'une micropipette (pour les mycobactéries) pour une réactivation. L'incubation a été faite à

37°C pendant 24 heures pour les bactéries Gram et une semaine pour les mycobactéries puis l'ensemble est dilué au 1/10 avant utilisation (ISO 20776-1, 2019).

II.2.2.4.1. Préparation de l'inoculum.

- **Préparation de l'inoculum des mycobactéries** : l'inoculum de mycobactérie a été obtenu en observant la turbidité de croissance et en mesurant sa densité optique (DO) à 625 nm. Ceux-ci comprise entre 0,08 et 0,13, permettant de standardiser l'inoculum bactérien à une concentration de 5×10^5 UFC/mL correspondant au 0,5 McFarland ;

- **Préparation des inocula des bactéries Gram** : quelques jeunes colonies d'une culture de 18 à 24 h sur milieu MHA ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur dans des boîtes de Pétri, et homogénéisées dans de l'eau distillée stérile. La densité optique (DO) a été lue à 625 nm, permettant de standardiser l'inoculum bactérien concentré à 5×10^5 UFC/mL qui correspond au 0,5 McFarland. L'inoculum a été par la suite homogénéisé au vortex et prêt à l'emploi (ISO 20776-1, 2019).

II.2.2.5. Détermination des paramètres d'inhibition

II.2.2.5.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

➤ Principe

Il repose sur la mise en contact d'un inoculum bactérien standardisé des concentrations décroissantes d'extrait selon une progression géométrique de raison 2 sur une microplaque. Par la suite, le dosage colorimétrique des métabolites issus du métabolisme des bactéries au cours de leur croissance. En effet, cette méthode colorimétrique est basée sur la capacité qu'ont les cellules viables à métaboliser le Blue Alamar, par réduction la résazurine (forme oxydée du Blue Alamar) en résorufine (forme réduite du Blue Alamar) selon le mécanisme suivant (CA-SFM / EUCAST, 2024).

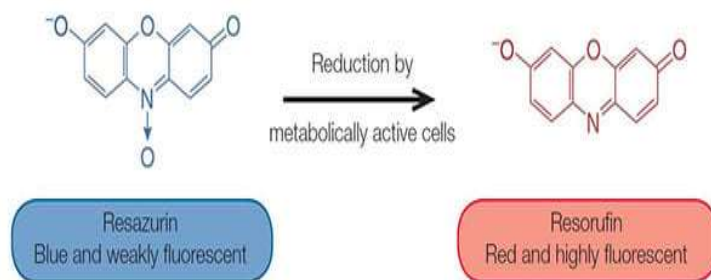


Figure: Mécanisme de réduction du Blue Alamar (Julien, 2014).

➤ Mode opératoire

Dans chaque puits d'une microplaque (de 96 puits), 100 µL de bouillon BMH (pour les bactéries Gram) ou MBK 7H9 supplémenté à 10 % OADC et PANTA (pour les mycobactéries) ont été introduits. Par la suite, les 3 premiers puits de la ligne 1 (Puits 1A, 1B, 1C et 1D), 100 µL d'extraits ont été introduits et dans les lignes 1 à 11, des dilutions successives suivant une progression géométrique de raison 1/2 ont été réalisées (à partir des puits 1A, 1B, 1C et 1D) jusqu'au onzième puits. Enfin, 100 µL d'inoculum bactérien ont été introduits dans chaque puit et tous les essais ont été effectués en triplicata. La quatrième colonne (D) de la microplaque a été utilisée comme témoin négatif de l'activité des extraits (Bouillon + extrait). Les puits de la ligne 12 ont été utilisés comme témoins positifs de croissance bactérienne (Bouillon + inoculum). La microplaque a été par la suite scellée avec son couvercle et recouverte d'un papier para film puis incubées à 37 °C pendant six jours pour les mycobactéries, et 18 à 24 h pour les bactéries Gram.

Après incubation, la croissance bactérienne a été mise en évidence par ajout de 50 µL d'une solution de Blue Alamar dans deux (02) des trois (3) puits des colonnes tests, les puits de la troisième colonne ont servis pour la détermination de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide). L'ensemble a été réincubé pendant un jour (pour les mycobactéries), et 1 h (pour les bactéries Gram), à 37 °C. La CMI a été définie comme la plus petite concentration en extrait, pour laquelle il n'y pas eu de croissance bactérienne visible à l'œil nu (1^{er} puit où le Blue Alamar n'a pas viré) (CA-SFM / EUCAST, 2024).

II.2.2.5.2. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

Pour la détermination des CMBs, 50 µL des puits de la troisième colonne test dont les concentrations sont supérieures ou égales à la CMI ont été repiqués dans 150 µL de bouillon (même milieu utilisé pour la CMI), contenus dans les puits d'une microplaque et incubé à 37 °C (pendant 6 jours pour les mycobactéries, et 18 à 24 h pour les bactéries Gram). La croissance bactérienne a été mise en évidence par ajout de 50 µL de Blue Alamar dans chaque puit des deux lignes tests. L'ensemble est incubé à 37 °C pendant la même durée qu'à la CMI. La CMB a été définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle au moins 99,99% de germes ont été tués (1^{er} puit où le Blue Alamar n'a pas viré) (CA-SFM / EUCAST, 2024).

II.2.2.5.3. Profil antibactérien des extraits : rapport CMB/CMI

Le rapport CMB/CMI nous a permis de déterminer l'activité antimicrobienne des extraits testés afin de les classer. Pour un rapport :

- < 4 , les extraits sont dits bactéricides.
- $4 \leq \text{CMB/CMI} \leq 16$, ils sont dits bactériostatiques.
- > 16 , ils sont dits tolérants vis-à-vis du microorganisme (Fauchère et Avril, 2002)

II.2.3. Screening phytochimique des extraits de champignons endophytes

L'étude chimique qualitative nous a permis de mettre en évidence les métabolites secondaires présents dans nos extraits de champignons endophytes.

Principe :

Le principe général du screening repose sur la formation de complexes insolubles et colorés, utilisant respectivement les réactions de précipitation et de coloration, dues à la formation d'une insaturation ou d'une conjugaison dans une molécule. L'intensité de coloration ou degré de turbidité sera proportionnelle à la quantité de composés formés (Harborne, 1998).

II.2.3.1. Test des alcaloïdes

Dans 1 mL d'eau distillée stérile, nous avons dissout 0,5 g de chaque extrait. Par la suite, quelques gouttes de réactif de Mayer ont été ajoutées. Ainsi, l'obtention d'un précipité blanc ou d'une turbidité indique la présence des alcaloïdes. Un précipité ou une coloration orangée est provoqué en additionnant deux gouttes du réactif de Dragendorff. L'ajout de 2 gouttes du réactif de Bouchardat à la solution d'alcaloïde provoque un précipité de couleur brun rougeâtre indiquant une réaction positive (Harborne, 1998).

II.2.3.2. Test des flavonoïdes

Dans un tube à essai, ont été introduit 5,5 g d'extrait dans 5 mL de méthanol. Ensuite, on a ajouté quelques copeaux de magnésium et de l'acide chlorhydrique, goutte à goutte. Un changement avec effervescente pouvant être violette ou rouge brique indiquait la présence des flavonoïdes (Harborne, 1998).

II.2.3.3. Test des phénols et polyphénols

Nous avons introduit 0,5 g d'extrait dans 2 mL d'eau distillée stériles, puis on a ajouté 3 mL de chlorure ferrique 5 %. Après homogénéisation, quelques gouttes de ferrocyanure de potassium ont été ajoutées. L'observation d'un précipité vert (phénol) ou bleu (polyphénol) indiquait la présence de ces groupes de composés (**Harborne, 1998**).

II.2.4.4. Test des anthocyanines

0,5 g d'extrait a été pesé puis on les mélangé à 15 mL de HCl 1 % et l'ensemble porté à l'ébullition. La variation de coloration du rouge orangé au bleu orangé caractérisait la présence des anthocyanines (**Harborne, 1998**).

II.2.5.5. Test des tanins

Dans 5 mL d'eau distillée stériles, a été introduit 0,5 g d'extrait. Le mélange a été porté au bain-marie puis filtré. Au filtrat obtenu, a été ajouté quelques gouttes de chlorure ferrique 3 % et l'apparition d'une couleur sombre ou verte sombre indiquait la présence des tanins (**Harborne, 1998**).

II.2.3.6. Test des anthraquinones

50 mg d'extrait ont été dilués dans 4 mL d'un mélange de chloroforme et d'éther de pétrole (v/v). L'ensemble a été homogénéisé puis filtré et 1 mL du filtrat a été ajouté à égale volume au NaOH 10 %. La formation d'une coloration rouge a permis de caractériser les anthraquinones (**Harborne, 1998**).

II.2.3.7. Test des saponines

Dans 5 mL d'eau distillée stériles, nous avons introduit 0,5 g d'extrait et l'ensemble a été homogénéisé vigoureusement puis chauffé jusqu'à l'ébullition. L'apparition d'une mousse persistante pendant 20 min indiquait un test positif et révélait la présence des saponines (**Harborne, 1998**).

II.2.3.8. Test des stérols et terpènes

Nous avons dissout dans 20 mL de chlorure de méthylène 0,5 g d'extrait. À cette solution, a été ajouté successivement 4 gouttes d'anhydride acétique et de l'acide sulfurique.

La présence des stérols se manifeste par l'apparition d'une couleur bleue verdâtre alors que la couleur rouge violacée est caractéristique des terpènes. Les résultats de test positif sont notés (+) et (-) lorsqu'il est négatif (**Cowan, 1999**).

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. RÉSULTATS

III.1.1. Caractérisation des endophytes isolés

III.1.1.1. Isolement des champignons endophytes

Nous avons eu une absence de croissance fongique avec la dernière eau de rinçage du matériel végétal après une semaine de culture sur le milieu PDA additionné au chloramphénicol, utilisés pour le contrôle de l'efficacité de la désinfection de surface. Ceci nous a conduit à déduire que les étapes utilisées dans le processus de désinfection étaient suffisantes pour se débarrasser des épiphytes (microorganismes de surface) et que les isolats obtenus peuvent être considérés comme étant des champignons endophytes pour les plantes étudiées.

Toutes les parties de la plante utilisée ont été colonisées par des champignons endophytes avec des proportions variables d'une partie de la plante à une autre. En effet, un total de quatre-vingt-seize (96) fragments de matériel végétal a été déposé dans les boîtes de Petri (soient 48 fragments par plante étudiée). Trente (30) fragments sur quarante-huit (48) ont été colonisés chez *M. hurifolia* et quarante (40) sur quarante-huit (48) chez *V. thouarsii*, soit un pourcentage de colonisation de 62,5 % et 83,33 % respectivement pour *M.hurifolia* et *V.thouarsii*. Le tableau VI suivant récapitule le nombre de fragment colonisé par les champignons endophytes par partie de plante utilisée.

Tableau VI : Répartition des différents fragments colonisés par partie de plante utilisée

Plantes étudiées		Tige	Tronc	Feuille	Nervure	Total
M. hurifolia	Nombre de fragments initial	12	12	12	12	48
	Nombre de fragments colonisé	6	6	10	8	30
V. thouarsii	Nombre de fragments initial	12	12	12	12	48
	Nombre de fragments colonisé	12	11	10	7	40

La figure 9 suivante montre le pourcentage de colonisation reparti dans chaque partie de la plante utilisée (tige, tronc, feuille, nervure). Il en ressort de cette figure que, la feuille (33 %) de *M. hurifolia* est plus colonisée en endophytes, tandis que chez *V. thouarsii*, la tige a été la plus colonisée avec un taux de 30 %.

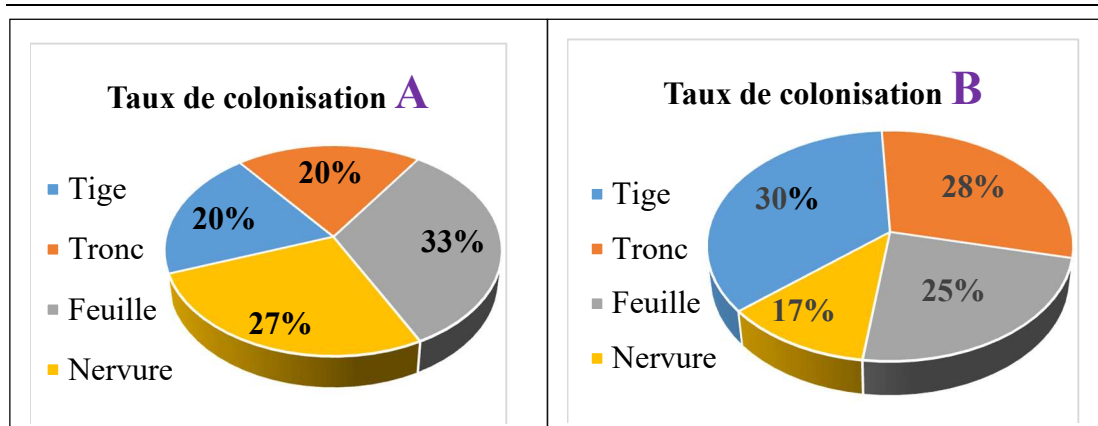


Figure 16 : Taux de colonisation des endophytes (A : *M. hurifolia*, B : *V. thouarsii*)

Après le repiquage et purification de ces champignons endophytes sur milieu PDA, nous avons obtenu un total de cinquante-un (51) isolats fongiques dont vingt-sept (27) issus de *M. hurifolia* et vingt-quatre (24) de *V. thouarsii*.

Par la suite, les cinquante-un (51) champignons endophytes obtenus sur le milieu PDA ont été repiqués dans les milieux SDA et CDA. Le résultat de ce repiquage nous a permis de les regrouper sur la base de leurs caractéristiques morphologiques en vingt-huit (28) isolats fongiques (tableau VII). De ce tableau, il en ressort que quinze (15) champignons endophytes ont été retenus de la plante *M. hurifolia* et treize (13) de *V. thouarsii* avec une diversité fongique dominante au niveau de la tige de chaque plantes.

Tableau VII. Nombre de champignons endophytes obtenus après avoir purifié et regroupé dans les milieux SDA et CDA

Plantes/parties de la plante	Nombre de champignons endophytes isolés				
	Écorces tige	Écorces tronc	Feuilles	Nervures	Total
<i>M. hurifolia</i>	5	2	4	4	15
<i>V. thouarsii</i>	8	1	2	2	13

III.1.1.2. Caractérisation des champignons endophytes

Les caractérisations macroscopiques et microscopiques ont été faites avec les vingt-huit (28) champignons endophytes retenus. À l'issu de ces caractérisations, vingt-quatre (24) champignons endophytes ont été identifiés comme appartenant à sept (07) genres (*Penicillium*, *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Geotrichum*, *Absidia*, *Acremonium* et *Lasiodiplodia*). Les quatre (04) Champignons restants n'ont pas pu être identifiés à cause de l'absence des organes de fructification (spores, conidiospores). Le tableau VIII ci-dessous récapitule le nombre de

champignons obtenus et regroupé par partie des plantes étudiées et par genres. Il ressort que, six (06) sur sept (07) genres fongiques ont été identifiés de la plante *M. hurifolia* avec une prédominance en des morphotypes du genre *Geotrichum* qui représente cinq (05) espèces parmi les quatorze (14) identifiées chez cette plante. Par contre, quatre (04) genres sur sept (07) ont été identifiés de la plante *V. thouarsii* avec une prédominance+* des morphotypes du genre *Neoscytalidium*, représentant quatre (04) espèces parmi les dix (10) identifiés chez cette plante.

Tableau VIII : Récapitulatif des endophytes regroupés par genre et par plante étudiée

No :	Isolats	Sources	Plantes hôtes	Noms du genre
1	F V2	Feuille	<i>V. thouarsii</i>	<i>Penicillium sp</i>
2	Fe M2	Feuille	<i>M. hurifolia</i>	<i>Fusarium sp1</i>
3	Fe M4	Feuille	<i>M. hurifolia</i>	<i>Fusarium sp2</i>
4	Tig V12	Écorce de tige	<i>V. thouarsii</i>	<i>Fusarium sp3</i>
5	F V1	Feuille	<i>V. thouarsii</i>	<i>Fusarium sp4</i>
6	Tr M4	Écorce de tronc	<i>M. hurifolia</i>	<i>Geotrichum sp1</i>
7	Ner M1	Nervure	<i>M. hurifolia</i>	<i>Geotrichum sp2</i>
8	Ner M4	Nervure	<i>M. hurifolia</i>	<i>Geotrichum sp3</i>
9	Tig M3	Écorce de tige	<i>M. hurifolia</i>	<i>Geotrichum sp4</i>
10	Tig M4	Écorce de tige	<i>M. hurifolia</i>	<i>Geotrichum sp5</i>
11	Ner M	Nervure	<i>M. hurifolia</i>	<i>Acremonium sp1</i>
12	Ner M5	Nervure	<i>M. hurifolia</i>	<i>Acremonium sp2</i>
13	Fe M3	Feuille	<i>M. hurifolia</i>	<i>Acremonium sp3</i>
14	Tig M2	Écorce de tige	<i>M. hurifolia</i>	<i>Acremonium sp4</i>
15	Tig M	Écorce de tige	<i>M. hurifolia</i>	<i>Absidia sp</i>
16	Tr M	Écorce de tronc	<i>M. hurifolia</i>	<i>Neoscytalidium sp1</i>
17	Tig V13	Écorce de tige	<i>V. thouarsii</i>	<i>Neoscytalidium sp2</i>
18	Tig V8	Écorce de tige	<i>V. thouarsii</i>	<i>Neoscytalidium sp3</i>
19	Ner V	Nervure	<i>V. thouarsii</i>	<i>Neoscytalidium sp4</i>
20	Tig V10	Écorce de tige	<i>V. thouarsii</i>	<i>Neoscytalidium sp5</i>
21	Tig M1	Écorce de tige	<i>M. hurifolia</i>	<i>Lasiodiplodia sp1</i>
22	Tig V6	Écorce de tige	<i>V. thouarsii</i>	<i>Lasiodiplodia sp2</i>
23	Tig V14	Écorce de tige	<i>V. thouarsii</i>	<i>Lasiodiplodia sp3</i>
24	Tr V	Écorce de tronc	<i>V. thouarsii</i>	<i>Lasiodiplodia sp4</i>
25	Ner M6	Nervure	<i>M. hurifolia</i>	Non-identifié 1
26	Ner V6	Nervure	<i>V. thouarsii</i>	Non-identifié 2
27	Tig V5	Écorce de tige	<i>V. thouarsii</i>	Non-identifié 3
28	Tig V7	Écorce de tige	<i>V. thouarsii</i>	Non-identifié 4

Légende : Fe : feuille, Ner : nervure, Tig : tige, Tr : tronc, M : *Macaranga*, V : *Voacanga*, No : numéro.

La figure 16 ci-après représente les fréquences des champignons endophytes obtenues et regroupées par genre et par plante. De ces diagrammes, il en ressort que les groupes d'isolats des genres *Geotrichum* et *Neoscytalidium* sont les plus représentés avec une fréquence de 33% et 31% respectivement chez *M. hurifolia* (A) et *V. thouarsii* (B). De plus, la fréquence des champignons non identifiés représente respectivement 7% (1 isolat sur 15) et 23% (3 isolats sur 13) pour *M. hurifolia* et *V. thouarsii*.

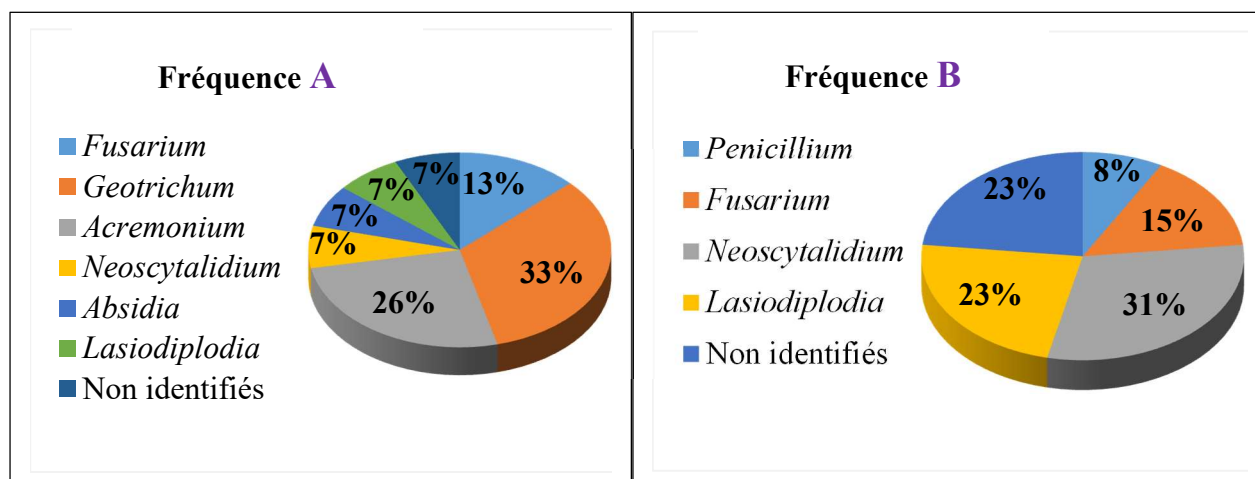


Figure 16: Diagramme des fréquences des champignons endophytes obtenus de (A : *M. hurifolia* et B : *V. thouarsii*).

III.1.1.3. Identification microscopique des champignons endophytes

L'identification des champignons repose sur des critères macroscopiques et microscopiques. Parmi les vingt-huit (28) isolats fongiques obtenus après caractérisation, vingt-quatre (24) appartiennent à sept (07) genres différents. Le tableau IX ci-dessous représente la classification phylogénique des genres fongiques obtenus. Il en ressort que, à part le morphotype du genre *Absidia* qui appartient à l'embranchement des zygomycota, tous les autres genres fongiques appartiennent aux Ascomycota.

Tableau IX : Classification phylogénique des genres fongiques obtenus de *M. hurifolia* et *V. thouarsii*.

Domaine	Eucaryota						
Règne	Fungi						
Embranchement	Ascomycota						Zygomycota
Classe	Euascomycetes			Dothideomycetes		Saccharomycetes	Zygomycetes
Ordre	Eurotiales	Hypocreales		Botryosphaeriales		Saccharomycetales	Mucorales
Famille	Trichocomaceae	Hypocreaceae		Botryosphaeriaceae		Dipodascaceae	Mucoraceae
Genre	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Neoscytalidium</i>	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Absidia</i>

❖ Le genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* présente des colonies de couleur beiges avec une texture poudreuse sur milieu PDA et SDA mais vertes sur le CDA à vitesse de croissance modérée. Il montre des conidiophores non cloisonnés, lisses et ramifiés, d'une forme de pinceau tri-verticillé à la microscopie. Les conidiospores sont arrondis et de taille moyenne.

❖ Le genre *Fusarium*

Le genre *Fusarium* est marqué par sa vitesse de croissance rapide, montrant des colonies blanches à fond jaunâtre (*Fusarium sp1*, *Fusarium sp2*) sur les trois milieux utilisés ou beiges à fond vert (*Fusarium sp3*) avec une texture duveteuse et des stries radiales. En microscopie, il présente des conidiophores courts et ramifiés avec les phialides courtes, solitaires, d'une forme ovale et à hyphe septe. On note également la présence des macroconidies fusiformes et à cloison transversale.

❖ Le genre *Geotrichum*

Le genre *Geotrichum* est un genre caractérisé par sa vitesse croissance rapide avec une couleur blanchâtre sur le PDA, SDA et CDA (*Geotrichum sp2*, *3*, *4*, *5*), mais de fois marron sur le PDA (*Geotrichum sp1*) et de forte odeur présentée par certaines espèces. En microscopie simple, on observe des chaînes de spores incolores, visqueuses, obtenues par segmentation de filaments végétatifs.

❖ Le genre *Acremonium*

Le genre *Acremonium* présente des colonies de couleur allant de la blanche (PDA, CDA) au beige (SDA généralement), avec une vitesse de croissance moyenne, ou lente pour certaines espèces. L'observation microscopie montre un thalle végétatif constitué de filaments septés,

des phialides fines et cylindriques à leur extrémité et des conidies cylindriques regroupées en amas au sommet du conidiophore.

❖ Le genre *Neoscytalidium*

Le genre *Neoscytalidium* produit les colonies duveteuses de couleur blanche laiteuse ou brune à texture laineuse ou glabre pour certains espèces sur le PDA, SDA et CDA (*Neoscytalidium sp1*). Mais, il peut arriver qu'on observe une couleur verdâtre sur le milieu PDA (*Neoscytalidium sp2*). En microscopie, on observe des hyphes septés et hyalins, avec certains plus larges qui se dissocient en arthroconidies.

❖ Le genre *Absidia*

L'isolat fongique du genre *Absidia* a présenté une croissance rapide à texture floconneuse et de couleur grise en surface (PDA, CDA) et à fond jaunâtre sur le milieu SDA. Il présente généralement un relief surélevé sur PDA et Plat sur le SDA et CDA. La microscopie montre des filaments larges, peu ou pas septés, avec des sporocystophores isolés ou groupés et portant en son extrémité un sporocyste d'aspect piriforme à columelle hémisphérique.

❖ Le genre *Lasiodiplodia*

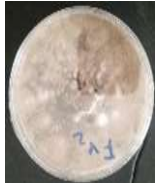
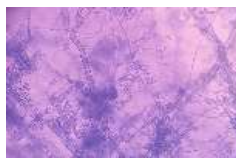
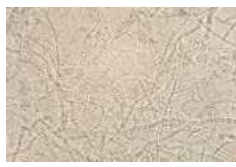
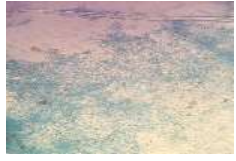
Le genre *Lasiodiplodia* a une croissance rapide avec des colonies de couleur noire sur le PDA, SDA et CDA pour certaines espèces et grise (SDA et CDA) pour d'autres. De nombreuses souches produisent des sclérotés noirs analogues à de petites pierres. En microscopie, on observe rarement des conidiophores grossiers, bruns, avec des sommets ramifiés.

❖ Les champignons non-identifiés

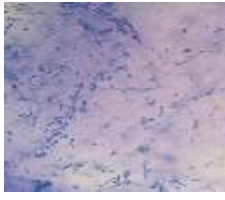
Les champignons non-identifiés présentent sur le milieu PDA des colonies mycéliennes de couleurs blanche (25), brune (26) et grise (27, 28). Tous présentent une couleur blanc laiteux et beige dans les milieux CDA et grise (27, 28) à brune (26) sur le milieu SDA. Les textures observées ont été essentiellement laineuses pour certaines et granuleuse pour d'autres. La microscopie montre des thalles septés chez ces champignons mais les informations quant au mode de formation des spores et des spores elles-mêmes n'ont pas pu être clairement définies.

Le tableau X ci-dessous présente les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des champignons endophytes isolés, regroupés.

Tableau X : Caractéristiques des isolats fongiques obtenus

Code des isolats	Milieu PDA		Milieu SDA		Milieu CDA		Microscopie 1 (bleue de méthylène)	Microscopie 2 (rouge Congo)
	Envers	Revers	Envers	Revers	Envers	Revers		
1 (F V2) <i>Penicillium sp</i>								
2 (Fe M2) <i>Fusarium sp1</i>								
3 (Fe M4) <i>Fusarium sp2</i>								
4 (Tig V12) <i>Fusarium sp3</i>								
5 (F V1) <i>Fusarium sp4</i>								

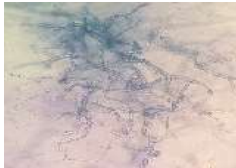
Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes isolés de *Macaranga hurifolia* Beille et *Voacanga thouarsii* Roem. & schult sur les bactéries responsables des infections respiratoires

Code des isolats	Milieu PDA		Milieu SDA		Milieu CDA		Microscopie 1 (bleue de méthylène)	Microscopie 2 (rouge Congo)
	Envers	Revers	Envers	Revers	Envers	Revers		
6 (Tr M4) <i>Geotrichum sp1</i>								
7 (Ner M1) <i>Geotrichum sp2</i>								
8 (Ner M4) <i>Geotrichum sp3</i>								
9 (Tig M3) <i>Geotrichum sp4</i>								
10 (Tig M4) <i>Geotrichum sp5</i>								

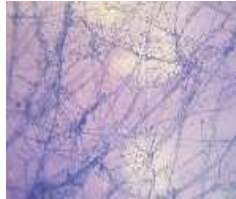
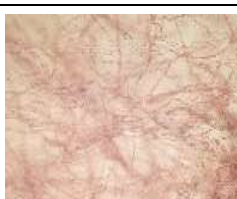
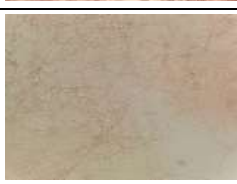
Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes isolés de *Macaranga hurifolia* Beille et *Voacanga thouarsii* Roem. & schult sur les bactéries responsables des infections respiratoires

Code des isolats	Milieu PDA		Milieu SDA		Milieu CDA		Microscopie 1 (bleue de méthylène)	Microscopie 2 (rouge Congo)
	Envers	Revers	Envers	Revers	Envers	Revers		
11 (Ner M) <i>Acremonium sp1</i>								
12 (Ner M5) <i>Acremonium sp2</i>								
13 (Fe M3) <i>Acremonium sp3</i>								
14 (Tig M2) <i>Acremonium sp4</i>								
15 (Tig M) <i>Absidia sp</i>								

Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes isolés de *Macaranga hurifolia* Beille et *Voacanga thouarsii* Roem. & schult sur les bactéries responsables des infections respiratoires

Code des isolats	Milieu PDA		Milieu SDA		Milieu CDA		Microscopie 1 (bleue de méthylène)	Microscopie 2 (rouge Congo)
	Envers	Revers	Envers	Revers	Envers	Revers		
16 (Tr M) <i>Neoscytalidium sp1</i>								
17 (Tig V13) <i>Neoscytalidium sp2</i>								
18 (Tig V8) <i>Neoscytalidium sp3</i>								
19 (Ner V) <i>Neoscytalidium sp4</i>								
20 (Tig V10) <i>Neoscytalidium sp5</i>								

Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes isolés de *Macaranga hurifolia* Beille et *Voacanga thouarsii* Roem. & schult sur les bactéries responsables des infections respiratoires

Code des isolats	Milieu PDA		Milieu SDA		Milieu CDA		Microscopie 1 (bleue de méthylène)	Microscopie 2 (rouge Congo)
	Envers	Revers	Envers	Revers	Envers	Revers		
21 (Tig M1) <i>Lasiodiplodia sp1</i>								
22 (Tig V6) <i>Lasiodiplodia sp2</i>								
23 (Tig V14) <i>Lasiodiplodia sp3</i>								
24 (Tr V) <i>Lasiodiplodia sp4</i>								
25 (Ner M6) Non-identifié 1								

Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes isolés de *Macaranga hurifolia* Beille et *Voacanga thouarsii* Roem. & schult sur les bactéries responsables des infections respiratoires

Code des isolats	Milieu PDA		Milieu SDA		Milieu CDA		Microscopie 1 (bleue méthylène)	Microscopie 2 (rouge Congo)
	Envers	Revers	Envers	Revers	Envers	Revers		
26 (Ner 6) Non-identifié 2								
27 (Tig V5) Non-identifié 3								
28 (Tig V7) Non-identifié 4								

Légende : Tig : Tige, Tr : Tronc, Ner : Nervure, Fe : Feuille, M : *Macaranga*, V : *Voacanga*, Tig M : endophyte issue de la Tige *Macaranga*, TigV : endophyte issu de la Tige *Voacanga*.

III.1.2. Activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes

III.1.2.1. Extraction des métabolites secondaires

Après purification, huit champignons ont été choisis sur la base de leurs grandes capacités à se développer sans contamination pour l'extraction à l'acétate d'éthyle de leurs métabolites secondaires (4 isolats issus de *M. hurifolia* et 4 isolats de *V. thouarsii*). Les extraits « E15, E16, E3, E11, E23, E24, E5, E9 » issus respectivement des endophytes des écorces de tiges, des écorces de troncs, des feuilles et des nervures de *M. hurifolia* et de *V. thouarsii* ont été obtenus et ont présentés différentes caractéristiques physicochimiques récapitulées dans le tableau XI ci-dessous. Ce tableau montre que les extraits obtenus de l'extraction des champignons sélectionnés des deux plantes ont tous eu une texture pâteuse, avec des couleurs variantes de marron ou noire. Il en ressort aussi que, les extraits issus des nervures des deux plantes ont les rendements d'extraction plus importantes (E11 : 8,23% et E19 : 5,87%) que ceux issus de troncs (E16 : 1,1% et E24 : 0,5%) de *M. hurifolia* et *V. thouarsii* respectivement.

Tableau XI : Caractéristiques physiques des extraits de champignons endophytes

Plantes	<i>M. hurifolia</i>				<i>V. thouarsii</i>			
Codes des extraits	E11	E16	E3	E15	E19	E24	E5	E23
Couleur	M f	M c	M f	M f	N	M c	M f	M f
Texture	P	P	P	P	P	P	P	P
Masse de riz (g)	300	300	300	300	300	300	300	300
Masse obtenue (g)	24,7	3,16	4,22	11,82	17,7	1,51	5,58	7,33
Rendements (%)	8,23	1,10	1,41	3,94	5,87	0,50	1,86	2,44

Légende : E : extrait d'endophyte, 11 : numéro du champignon auquel appartient l'extrait, Mf : Marron foncé, Mc : Marron clair, N : noire, P : pâteuse, E11 : extrait d'endophyte issu du champignon numéro 11.

III.1.2.2. Détermination des paramètres d'inhibition des extraits de champignons endophytes (CMI et CMB).

Les huit extraits précédemment obtenus ont été utilisés pour l'évaluation de l'activité antibactérienne. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) de ces extraits sur les bactéries sélectionnées par microdilution en milieu liquide ainsi que leurs effets sur ces bactéries ont été reportés dans le tableau ci-après.

De ce tableau, il en ressort que, chez les mycobactéries on a enregistré les CMI allant de 12,50 mg/mL pour les extraits « E5 et E15 » respectivement sur H37RV et *K. pneumoniae* à 0,19 mg/mL pour l'extrait « E19 » sur la souche BCG, tandis que la Lévofoxacine qui est un antibiotique de référence n'a eu aucune activité.

En effet, l'extrait « **E19** » est le plus actif sur les souches de mycobactéries avec des CMI allant de 0,19 mg/mL sur la souche BCG à 3,12 mg/mL sur H37RV, tandis que chez les bactéries Gram, c'est plutôt l'extrait « **E11** » avec des CMI allant de 0,39 mg/mL sur la souche *P aeruginosa* à 1,56 mg/mL sur les autres souches. En général, l'extrait « **E11** » est le plus actif sur l'ensemble de souches bactériennes testées avec les CMI les plus basses (0,39 à 1,56 mg/mL).

Dans l'ensemble, la souche la plus sensible aux extraits est BCG dont la croissance est inhibée à partir de 0,19 mg/ml par « E19 » et jusqu'à 6,25 mg/ml pour l'extrait « E15 ». La moins sensible est celle de H37RV dont la croissance est inhibée par l'extrait le plus actif « e19 » avec les CMI variant entre 0,19 mg/mL sur BCG et 3,12 mg/ml sur *S. aureus*.

Tableau XII : Évaluation de la CMI et CMB des extraits de champignons endophytes

Codes des extraits	Souches bactériennes	Paramètres d'inhibition (mg/mL)			Activité de l'extrait
		CMI	CMB	CMB/CMI	
E5 (<i>Fusarium sp4</i>)	BCG	0,78	1,56	2	Bactéricide
	H37RV	12,50	25,00	2	Bactéricide
	<i>S. aureus</i>	3,12	12,50	4	Bactériostatique
	<i>P. aeruginosa</i>	3,12	6,25	2	Bactéricide
	<i>E. coli</i>	3,12	12,50	4	Bactériostatique
	<i>H. influenzae</i>	3,12	6,25	2	Bactéricide
	<i>K. pneumoniae</i>	6,25	25,00	4	Bactériostatique
E16 (<i>Neoscytalidium sp1</i>)	BCG	3,12	12,50	4	Bactériostatique
	H37RV	3,12	12,50	4	Bactériostatique
	<i>S. aureus</i>	6,25	12,50	2	Bactéricide
	<i>P. aeruginosa</i>	3,12	12,50	4	Bactériostatique
	<i>E. coli</i>	6,25	12,50	4	Bactériostatique
	<i>H. influenzae</i>	6,25	25,00	4	Bactériostatique
	<i>K. pneumoniae</i>	6,25	25,00	4	Bactériostatique
E19 (<i>Neoscytalidium sp4</i>)	BCG	0,19	0,78	4	Bactériostatique
	H37RV	3,12	6,25	2	Bactéricide
	<i>S. aureus</i>	0,78	3,12	4	Bactériostatique
	<i>P. aeruginosa</i>	0,78	0,78	1	Bactéricide
	<i>E. coli</i>	3,12	12,50	4	Bactériostatique
	<i>H. influenzae</i>	0,78	3,12	4	Bactériostatique
	<i>K. pneumoniae</i>	1,56	6,25	4	Bactériostatique

Codes des extraits	Souches bactériennes	Paramètres d'inhibition (mg/mL)			Activité de l'extrait
		CMI	CMB	CMB/CMI	
E3 (<i>Fusarium sp2</i>)	BCG	1,56	12,50	8	Bactériostatique
	H37RV	6,25	12,50	2	Bactéricide
	<i>S. aureus</i>	6,25	12,50	2	Bactéricide
	<i>P. aeruginosa</i>	3,12	6,25	2	Bactéricide
	<i>E. coli</i>	6,25	12,50	2	Bactéricide
	<i>H. influenzae</i>	6,25	25,000	4	Bactériostatique
	<i>K. pneumoniae</i>	6,25	25,00	4	Bactériostatique
E11 (<i>Acremonium sp1</i>)	BCG	0,39	3,12	8	Bactériostatique
	H37RV	1,56	3,12	2	Bactéricide
	<i>S. aureus</i>	1,56	1,56	1	Bactéricide
	<i>P. aeruginosa</i>	0,39	3,12	8	Bactériostatique
	<i>E. coli</i>	1,56	6,25	4	Bactériostatique
	<i>H. influenzae</i>	1,56	12,50	8	Bactériostatique
	<i>K. pneumoniae</i>	1,56	12,50	8	Bactériostatique
E23 (<i>Lasioidiplodia sp3</i>)	BCG	0,39	3,12	8	Bactériostatique
	H37RV	6,25	12,50	2	Bactéricide
	<i>S. aureus</i>	3,12	6,25	2	Bactéricide
	<i>P. aeruginosa</i>	1,56	3,125	2	Bactéricide
	<i>E. coli</i>	3,12	12,50	4	Bactériostatique
	<i>H. influenzae</i>	3,12	12,50	4	Bactériostatique
	<i>K. pneumoniae</i>	6,25	12,50	2	Bactéricide

Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes isolés de *Macaranga hurifolia* Beille et *Voacanga thouarsii* Roem. & schult sur les bactéries responsables des infections respiratoires

Codes des extraits	Souches bactériennes	Paramètres d'inhibition (mg/mL)			Activité de l'extrait
		CMI	CMB	CMB/CMI	
E24 (<i>Lasiodiplodia sp4</i>)	BCG	0,39	1,56	4	Bactériostatique
	H37RV	6,25	12,50	2	Bactéricide
	<i>S. aureus</i>	1,56	6,25	4	Bactériostatique
	<i>P. aeruginosa</i>	1,56	3,12	2	Bactéricide
	<i>E. coli</i>	1,56	6,25	4	Bactériostatique
	<i>H. influenzae</i>	1,56	3,12	2	Bactéricide
	<i>K. pneumoniae</i>	1,56	12,50	8	Bactériostatique
E15 (<i>Absidia sp</i>)	BCG	6,25	25,00	4	Bactériostatique
	H37RV	6,25	12,50	2	Bactéricide
	<i>S. aureus</i>	12,50	25,00	2	Bactéricide
	<i>P. aeruginosa</i>	12,50	25,00	2	Bactéricide
	<i>E. coli</i>	6,25	25,00	4	Bactériostatique
	<i>H. influenzae</i>	6,25	/	/	ND
	<i>K. pneumoniae</i>	12,50	/	/	ND
Lévofloxacine (Lev)	<i>S. aureus</i>	/	/	/	ND
	<i>P. aeruginosa</i>	25,00	/	/	ND
	<i>E. coli</i>	12,50	/	/	ND
	<i>H. influenzae</i>	/	/	/	ND
	<i>K. pneumoniae</i>	/	/	/	ND

Légende : E : Extrait ; 15 : numéro de champignon endophyte ; E15 : Extrait issue du champignon numéro 15 ; CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide ; ND : Non Déterminé ; (/) : Indéterminé.

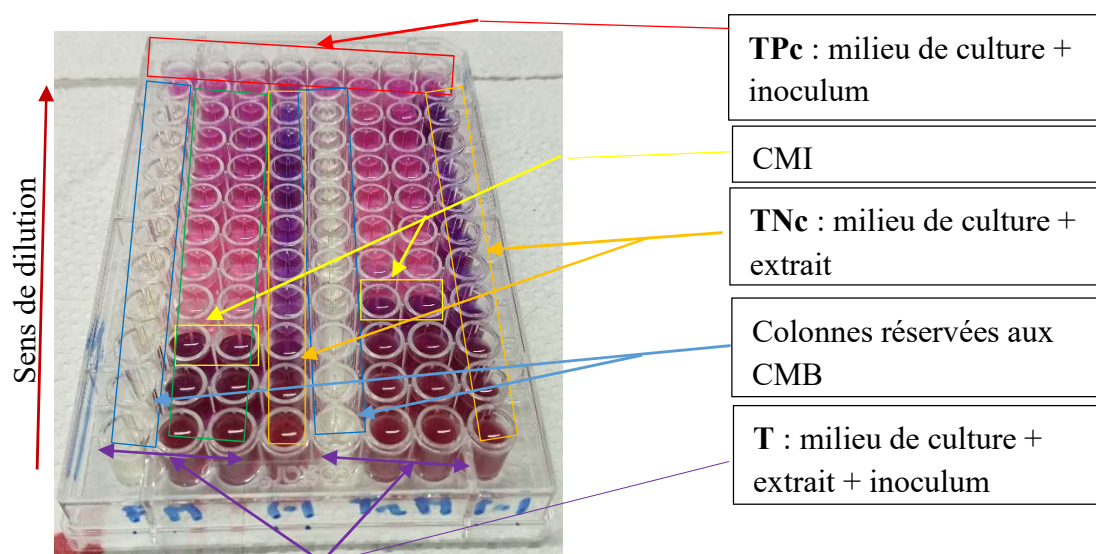


Photo 1: photo illustrative d'une microplaque avec les résultats des CMI d'un extrait de champignon endophyte sur une souche bactérienne

Légende : TPc : Temoin Positif de croissance ; TNc : Témoin Négatif de croissance ; T : Test ; CMI : Concentration Minimale Inhibitrice ; CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

III.1.5. Screening phytochimique des extraits d'endophytes actifs

Le screening phytochimique a été réalisé sur les huit extraits ayant servi pour l'évaluation de l'activité antibactérienne (E15, E16, E3, E11, E23, E24, E5, E19). Ils ont fait l'objet de plusieurs tests phytochimiques caractéristiques de différentes familles de substances bioactives afin de déterminer leur composition en métabolites secondaires (Photo 3).

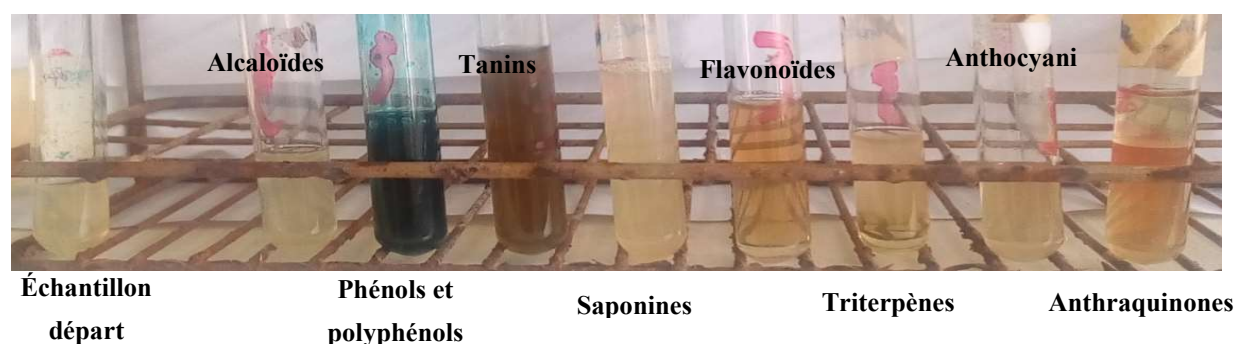


Photo 2: Photo des résultats du test de criblage phytochimique qualitatif des extraits testés.

Les tests de screening phytochimique qualitatif réalisés ont été interprétés et les résultats présentés dans le tableau XIII ci-dessous. À l'issue de ce test, nous avons mis en évidence dix

familles de métabolites secondaires, à savoir : alcaloïdes, phénols, polyphénols, tanins, saponines, flavonoïdes, anthocyanines, anthraquinones, triterpènes et stéroïdes. Le tableau XIII montre que les huit extraits contiennent tous les flavonoïdes, les phénols, les polyphénols, les saponines et les anthraquinones et que seul l'extrait « **E19** » possède moins de familles (5) de métabolites secondaires que les autres. Par contre, les extraits « **E5, E16, E23, E24** » possèdent toutes les dix familles de métabolites secondaires recherchées.

Tableau XIII : Résultats du screening chimique des extraits d'endophytes testés.

Métabolites secondaires	E15 <i>Absidia</i> <i>sp</i>	E16 <i>Neoscytalidium</i> <i>sp1</i>	E3 <i>Fusarium</i> <i>sp2</i>	E11 <i>Acremonium</i> <i>sp1</i>	E23 <i>Lasiodiplodia</i> <i>sp3</i>	E24 <i>Lasiodiplodia</i> <i>sp4</i>	E5 <i>Fusarium</i> <i>sp4</i>	E19 <i>Neoscytalidium</i> <i>sp4</i>
Alcaloïdes	+	+	-	+	+	+	+	-
Phénols	++	±	++	++	±	±	++	++
Polyphénols	+++	++	+	++	++	++	++	+
Flavonoïdes	++	++	++	++	++	++	++	+
Tannins	+	++	-	-	+	++	+	-
Triterpènes	-	+	+	+	+	+	+	-
Saponines	++	+	++	++	++	+++	+	+
Stéroïdes	-	+	+	+	+	+	+	-
Anthocyanines	+	+	+	-	+	+	+	-
Anthraquinones	+	+	+	+	+	+	+	+

Légende : - : absence de métabolites secondaires; ± : présence des traces de métabolites secondaires, + : présence modérée, ++ : présence abondante ; +++ : présence très abondante.

III.2. DISCUSSION

Au cours de ce travail, il a été question pour nous tout d'abord de caractériser les champignons endophytes isolés de *Macaranga hurifolia* et *Voacanga thouarsii*, ensuite d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes obtenus sur quelques bactéries responsables des infections respiratoire et enfin, déterminer la composition chimique des extraits de champignons endophytes actifs. Il ressort que :

Le pourcentage de colonisation de *M.hurifolia* et *V.thouarsii* était respectivement de 62,5 % et 83,33 %, un résultat confirmant qu'une plante peut être colonisée par les champignons endophytes. De plus, le taux de colonisation des feuilles (33 %) et de tiges (30 %) respectivement de *M.hurifolia* et *V.thouarsii* était plus élevé par rapport à d'autres parties de la plante. Cela reflète le fait que ces parties sont les plus impliquées dans la nutrition des plantes et donc des endophytes. En effet, selon les études de **Perraudin, (2019)**, elles sont constituées de plusieurs tissus conducteurs ,dont le xylème, qui transporte la sève brute, essentiellement composée d'eau et de sels minéraux, de la racine aux feuilles et le phloème, transporteur de la sève élaborée, constitué de composés organiques et d'autres substances complexes essentielles à la croissance des plantes. Ce qui est en rapport avec les études de **Kang et Buchenauer (2002)** qui décrivent les parois des feuilles et de l'écorce de la tige comme les parties de plantes moins rugueuses et très riches en nutriments et par conséquent sont plus accessibles aux micro-organismes.

Au départ, un total de cinquante-un (51) champignons endophytes ont été isolés de *M. hurifolia* et *V. thouarsii* et regroupés en vingt-huit (28) isolats sur la base de leurs caractéristiques macroscopiques sur les milieux PDA, SDA et CDA, ce qui est inférieur à la moyenne de cinquante (50) isolats par espèce végétale fournie par les travaux d'**Oses et al. (2008)**. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, *M. hurifolia* et *V. thouarsii* pourraient porter des champignons endophytes non cultivables, décrits comme des champignons pour lesquels l'outil d'identification est uniquement moléculaire (**Oses et al., 2008**).

La caractérisation microscopique nous a permis d'identifier vingt-quatre (24) isolats qui ont été regroupés en sept (07) genres : *Penicillium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Acremonium*,

Neoscytalidium, *Absidia* et *Lasiodiplodia*. Ceci confirme que les endophytes qui colonisent les plantes appartiennent probablement le plus souvent aux dykaria et dans certain cas, aux autres familles parmi lesquelles les zygomycètes (**Derkaoui, 2015**). Chez *M. hurifolia*, les genres *Fusarium*, *Geotrichum*, *Acremonium*, *Neoscytalidium* et *Absidia* ont été isolés. Une étude menée par **Dai et al. (2013)** sur *M. bancana* (plante du même genre) montre qu'ils avaient aussi isolés le genre *Fusarium* au cours de leurs travaux. Ceci justifierait l'hypothèse selon laquelle, les plantes du même genre peuvent être colonisées par les champignons du même genre. En ce qui concerne les champignons endophytes isolés de *V. thouarsii*, quatre (04) genres ont été identifiés (*Penicillium*, *Fusarium*, *Neoscytalidium* et *Lasiodiplodia*). Une étude menée par **Demeni et al. (2021)** portant sur l'isolement des champignons endophytes d'*Alstonia boonei*, plante de la famille des Apocynaceae, avait montré qu'elle était aussi colonisée par quatre (04) genres fongique parmi lesquels *Neoscytalidium*, et *Fusarium*. Ainsi, comme plante du même genre, celles de même famille peuvent être colonisé par les champignons du même genre. Les genres *Geotrichum* et *Neoscytalidium* ont montré une biodiversité plus intéressante respectivement chez *M. hurifolia* et *V. thouarsii*. Ceci pourrait être justifié par les facteurs climatiques et la position géographique car ces facteurs abiotiques influencent significativement sur le micro-biote des plantes. Les morphotypes des genres *Fusarium*, *Geotrichum* et *Lasiodiplodia* ont été isolés sur les deux plantes. Ceci pourrait confirmer le caractère ubiquitaire de ces champignons. En effet, selon les études de **Lecellier (2016)**, *Lasiodiplodia* est considéré comme l'un des plus anciens genres fongiques à avoir cohabité avec des plantes, notamment des plantes supérieures, ce qui justifie leur présence dans plusieurs niches écologiques.

Les résultats des paramètres d'inhibitions (CMI et CMB) ont montré que tous les huit extraits de champignons endophytes ont présenté en général de bonnes activités (bactéricide ou bactériostatique sur presque toutes les souches bactériennes utilisées), contrairement à la Lévofoxacine qui est restée sans action sur les souches de bactéries gram. Selon les études d'**Andria et al., (2016)**, cela pourrait s'expliquer par la présence d'un cocktail de composés dans ces extraits n'ayant pas tous le même effet contrairement à la Lévofoxacine qui constitue

une molécule pure. L'extrait « E19 » a présenté des CMI allant de 0,19 mg/ml sur BCG à 3,12 mg/mL sur H37RV, ce qui fait de lui l'extrait le plus actif sur les souches de mycobactéries. Cette activité pourrait être liée à un effet synergique ou additif des composés présents dans cet extrait. En effet, son screening montre la présence des phénols, polyphénols, flavonoïdes, saponine, et anthraquinone. Ces composés sont connus par leurs fortes propriétés antioxydant, anti-inflammatoires et même antimicrobiennes. Ceci est en rapport avec les études de **Jamila (2018)** qui montre la capacité des composés phénoliques à stimuler une cascade de réactions, aboutissant à une résistance exprimée de la plante hôte lors d'une attaque des pathogènes. L'extrait «E16» issue de l'endophyte isolé de l'écorce de tronc de *M. hurifolia* présente une CMI de 3,12 mg/mL sur les souches de mycobactéries (BCG et H37RV). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que, ce champignon endophyte a mimé la production des métabolites secondaire de la plante hôte car, selon les études menées par **Kerharo et Bouquet (1950)**, l'écorce de tronc et la poudre de tige de *M. hurifolia* sont utilisées pour soulager les symptômes de la tuberculose. L'extrait « E11 », en plus d'être l'extrait le plus actif sur les bactéries Gram, est également le plus actif sur toutes les souches bactériennes testées avec des CMI allant de 0,39 à 1,56 mg/mL. Ceci montre que cet extrait est constitué en majorité de métabolites secondaires actifs. En effet, en plus des cinq (05) familles de métabolites secondaires que constituent l'extrait «E19», l'extrait «E11» contient également les Stéroïdes, les Anthocyanines et les Alcaloïdes qui pourraient agir en synergie. Les Alcaloïdes sont connus comme des métabolites secondaires à spectre d'activité large (propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses, antibactériennes). Selon les études de **Jacques (2024)**, la morphine est une molécule issue des Alcaloïdes, dont son dérivé est la codéine, utilisée pour calmer la tuberculose, d'où la forte activité de l'extrait «E11» sur les bactéries responsables des infections respiratoires. L'extrait «E5» issu *Fusarium* a présenté des activités meilleures sur les souches bactériennes responsables de la pneumonie par rapport à l'extrait «E24» issu du *Fusarium* isolé d'*Alstonia boonei* dans les études de **Demeni et al., (2021)**. Ceci pourrait être justifié par le fait qu'*Alstonia boonei* (plante de la même famille) ne produit pas assez de métabolites secondaires actifs sur les bactéries responsables de la pneumonie, en rapport avec

les études de **Kusari et spiteller (2012)** qui expliquent que la production des métabolites secondaires par les champignons endophytes est stimulée par celle de leurs plantes hôtes. Dans l'ensemble, la souche BCG est la plus sensible sur tous les extraits testés. Ceci pourrait être dû au fait que, la souche vaccinale BCG provient d'une souche sauvage (*Mycobacterium bovis*) n'ayant pas subi en avance des mutations.

Le screening phytochimique des extraits de champignons issus de *M. hurifolia* et de *V. thouarsii* a montré que tous ces extraits contiennent les flavonoïdes, les phénols, les polyphénols, les saponines et les anthraquinones. Ce résultat confirme que les champignons endophytes produisent belle et bien les métabolites secondaires. En effet, l'extrait « E19» (endophyte isolé de la nervure) procède moins de familles (05) de métabolites secondaires par rapport aux extraits « E5, E16, E23, E24» qui procèdent toutes les dix familles de métabolites secondaires recherchées. Ceci peut être justifié par la durée de cohabitation du champignon endophyte avec la plantes hôtes car, quand cette durée est longue, l'endophyte a la capacité de produire plus d'avantage de métabolites secondaires (**Antoine, 2018**). En effet, les résultats du screening phytochimique obtenus par **Peter et al., (2019)** sur les extraits de *M. hurifolia* ont montré la présence des Alcaloïdes, des Flavonoïdes, des Saponines et des Tannins. Il en est de même pour les études effectuées par **Nourdine (2014)** sur les extraits issus des feuilles, des graines, des écorces de troncs et de racines de *V. thouarsii*. Les résultats du screening phytochimique de leurs extraits avaient montré la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des stéroïdes, des tanins, des saponines, des coumarines et des leuco anthocyanes. Ceci confirme dont les études de **Kusari et Spiteller (2012)** qui expliquent que les champignons endophytes ont la capacité de mimer la production des métabolites secondaires de la plante hôte. Ainsi, la présence de ces familles de métabolites secondaires actifs dans nos extraits peut justifier le fait que, les extraits de champignons endophytes pourraient constituer un outil de traitement de qualité pour lutter contre la tuberculose et la pneumonie.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Parvenus au terme de notre travail, il a été question pour nous d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes isolés de *M. hurifolia* et *V. thouarsii* sur quelques bactéries responsables des infections respiratoires. Il ressort que :

- L'isolement des champignons endophytes de la feuille et des écorces de la tige et du tronc de *M. hurifolia* et de *V. thouarsii* a permis d'obtenir cinquante-un (51) champignons endophytes et regroupés en vingt-huit (28) isolats à l'issue de la caractérisation macroscopique et microscopique sur les milieux PDA, SDA et CDA. De ces vingt-huit (28) champignons, vingt-quatre (24) ont été identifiés comme appartenant aux genres *Penicillium*, *Fusarium*, *Neoscytalidium*, *Geotrichum*, *Absidia*, *Acremonium* et *Lasiodiplodia* avec une dominance en genre *Geotrichum* (17,86%) et *Neoscytalidium* (17,86 %).
- L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits par la méthode de microdilution en milieu liquide a montré que l'extrait « **E19** » est le plus actif sur les souches de mycobactéries avec des CMI allant de 0,19 à 3,12 mg/mL tandis que chez les bactéries Gram, c'est plutôt l'extrait « **E11** » avec des CMI allant de 0,39 à 1,56mg/mL. De plus, l'extrait « **E11** » est le plus actif sur l'ensemble de souches bactériennes testées avec les CMI les plus basses (0,39 à 1,56 mg/mL).
- Le screening phytochimique des extraits de champignons endophytes a montré la présence de plusieurs familles de métabolites secondaires à savoir les flavonoïdes, les phénols, les polyphénols, les saponines et les anthraquinones dans les deux plantes mais à des proportions différentes et seul l'extrait « **E19** » contient moins de familles de métabolites secondaires.

Ceci dit, les métabolites secondaires des champignons endophytes isolés des plantes médicinales constituent une source de composés bioactifs à explorer. Pour cela, les chercheurs devraient de plus en plus s'intéresser aux champignons endophytes dans le but de produire de nouvelles molécules thérapeutiques afin de résoudre le problème de résistance au antimicrobienne qui sévit dans le monde.

PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude montrent que les extraits de champignons endophytes pourraient constituer des preuves d'un possible alternatif notamment en cas d'échec thérapeutique et ou de résistance aux antibiotiques de référence. En effet, vu que ces extraits ont montré une activité antibactérienne effective, Il serait intéressant de poursuivre des investigations sur ces champignons pour une meilleure compréhension de leurs mécanismes biologiques. Nous envisageons par la suite :

- ❖ Confirmer les genres fongiques obtenus par des méthodes usuelles autres que moléculaire.
- ❖ Effectuer une caractérisation moléculaire des isolats fongiques obtenus afin de se fixer sur les genres et les espèces obtenues ;
- ❖ Évaluer la cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* des extraits actifs ;
- ❖ Isoler les composés des extraits actifs et évaluer leurs mécanismes d'action.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ait-Khaled N., Enarson D. (1999). Stop Tuberculose : manuel pour les étudiants en médecine https://tbrieder.org/publications/books_french/students_fr.pdf. Consulté le 17 Mai 2019 à 9h 16.

Akono A. (2019). Evaluation de l'activité anti-pneumonique *in vivo* des extraits d'écorce de *Greenwayodendron suaveolens* (annonaceae) induite par *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat à la Faculté de médecine et des sciences pharmaceutiques de l'université de Douala ; 92 p.

Amongue G. (2020). Effet de quatre huiles essentielles et de leurs combinaisons sur quelques bactéries responsables des infections respiratoires : relation entre létalité et libération de biomolécules. Mémoire, Université de Yaoundé I, 63p.

Andria P., Kartika P., Ahmad F., Dewi W and Muhammad I. (2016). Evaluation of antibacterial and antioxidant activity of extracts of endophytic fungi isolated from Indonesian Zingiberaceous plants. *nusantara bioscience*; 8: 306-311.

Antoine P. (2018). Étude des mécanismes de régulation du métabolisme secondaire chez *Botrytis cinerea*.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), Français. NNT: 2016SACLS480. tel-01756394v2.

ANSM (Agence Nationale de Sécurité de médicament et produits de santé). (2024). LEVOFLOXACINE ACCORD HEALTHCARE 500 mg, comprimé pelliculé sécable-Résumé des caractéristiques du produit. medicament.gouv.fr.

Archambaud M. (2009). Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse, France; p 7-9.

Assam A. (2012). Etude de la résistance et de la diversité génomique dans le cas de la tuberculose pulmonaire au Cameroun : Région du centre, Ouest, Sud, et Est. Thèse de Doctorat Ph.D en Biochimie ; Université de Yaoundé I. 264 p.

Atanasov A., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Temml V., Wang L., Schwaiger S., Heiss E., Rollinger J., Schuster D., Breuss J., Bochkov V., Mihovilovic M., Kopp B., Bauer R., Dirsch V. et Stuppner H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614.

Aubry P. et Gauzère B. (2018). Infection respiratoire aiguës. Médecine tropicale. Actualité 2017, mise à jour le 23/01/2018. www.medicinetropicale.com.

Baudrand H., Mbatchou H., Marcu M., Freymond N., Pacheco Y. et Devouassoux G. (2009). Pneumonie communautaire abcédée à *Klebsiella pneumoniae*. Revue Maladie Respiratoire; 26 : 773-8.

Billy C., Lévy-Bruhl D. (2007). Vaccin BCG et place de l'intradermoréaction en 2006. La Revue de médecine interne 28 151–160.

Biomins (Biologie Médicale spécialisée). (2012). Mycobactéries. Précis de biopathologie analyses médicales spécialisées. 4 p.

Brändli O., Rochat T., Zellweger J-P. (2003). Clinique et diagnostic de la tuberculose. Forum Médecine Suisse; 21:492–7.

Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson. (2002). Principes de Médecine interne Flammarion, Paris, 15ème édition. 168 p.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4ème Edition, Lavoisier, 915 p.

Bruneton.J. (1999). Élément de pharmacognosie et de phytochimie Éditions Technique et Documentaire, Paris. 1120 p.

Burkill H. (1985). The useful plants of west tropical Africa, Royal botanic Garden, Kew. 2.

CA-SFM / EUCAST (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie / European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2024). Licence d'utilisation et précautions d'usage. 177 p.

Camille L. (2020). Artemisia, baobab- Ces plantes africaines qui pourraient aider à lutter contre le coronavirus. *Jeune Afrique*.

Chabasse D. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale ; 25-27.

Chirifi Z., et Zenagui N. (2014). Les Pneumopathies bactériennes de l'enfant Durant l'année 2014. Mémoire de fin d'études à la Faculté de médecine de l'université Abou bekr Belkaid-Tlemcen ; 75 p.

Colditz G., Brewer T., Berkey C., Wilson M., Burdick E., Fineberg H., Mosteller F. (1994). Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. JAMA 271: 698-702.

Compaoré M., Roland N., Sahabi B., Laurian V., Martin. (2016). Antioxydative, anti-inflammatory potentials and phytochemical profile of *commiphora africana* (A. Rich) Engl. (Burceraceae) and *Loeseneriella africana* (willd). Asian pacific journal of tropical biomedicine 6 (8) 665-670.

Cousson J., Bankole E., Floch T., Duval V., Leon A., De Champs C. et Vernet-Garnier V. (2007). Evaluation de l'antigenurie *streptococcus pneumoniae* dans le diagnostic précoce de 333 pneumonies en réanimation. Université de Reims Champagne-Ardenne. 10 p.

Cowan M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews; 12: 564-582.

Dai H., Shoko S., Takoa I. and Takachi O. (2013). Microfungi associated with a myrmecorphyte *Macaranga bancana*. Doi: 103759/TROPICS. Vol 22 (1) 19-25.

Darcy M., Arth N., Klaus R., Heather Z., Tom F., Maria M., Nils B., (2013). Les maladies respiratoires dans le monde : Les réalités d'aujourd'hui - Les perspectives pour l'avenir. ISBN: 978-1-84984-056-9; e-ISBN: 978-1-84984-057-6.

De Bary A. (1866). Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten. 328 p.

Demeni C. (2019). Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de champignons endophytes sur la croissance de quelques bactéries responsables de pneumonie. Mémoire, Université de Yaoundé I, 65p.

Demeni C., Betote P., Kom C., Tchamgoue E., Moni F., Maniepi J., Agbor G. and Nyegue M. (2021). Endophytic Fungi from *Alstonia boonei* De Wild and *Greenwayodendron suaveolens* (Engl. and Diels) Verdc. Subsp. *Suaveolens* Possess Inhibitory Activity against Pneumonia Causing Bacteria. 10 p.

Derkaoui I. (2015). Etude des champignons endophytes halotolérants et producteurs de métabolites secondaires. Mémoire, Université de Blida 1. 63p.

Dufresne P. (2018). Identification des champignons d'importance médicale. Institut national de santé publique du Québec. P 3-51.

Endress M., Liede-Schumann S. and Meve U. (2007). Advances in Apocynaceae: the enlightenment, an introduction 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 94 (2), 259-267.

Fauchère L et Avril L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Edition Ellipses; 365p

Fernandes V., Costa E., Silva A., Pfenning H., Costa M., Heinrich A., Alencar M., Lima A. and Kegaki M. (2009). Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*; 45: 678-685.

Fouda H., Saad H., Ahmed E. and Emad E. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (BIOSS). *Annals of Agricultural Science*; 60: 95-104.

Gerard S. (2014). Pneumopathies du sujet âgé. Capacité de gériatrie ; P 1-16.

Gnagbo A. (2022). Osservazione: *Macaranga hurifolia* Beille. Plant Net.

Guery B., Eric K., Guillaume B. et Karine F. (2009). Pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* : aspects thérapeutiques. *Mapar 2009- Pathologies infectueuses* ; p 207-211.

Guo B., Wang Y., Sun X., Tang K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied biochemistry and microbiology*, 44 (2):136-142.

Hafez O., Koffi K., Komlavi E., Tchadjobo T., Komlan B., Majesté I. W., Essowé O. et Messanvi G. (2022). Étude ethno pharmacologique des plantes utilisées dans la préparation des phytomédicaments extemporanés à Tomety-Kondji, canton riverain au Parc National de Togodo-Sud du Togo. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 16(3): 967-991.

Harbone J. (1980). Flavonoids advances research. Chapmanand Hall, London.1981:152-204.

Harbone J. (1998). Phytochemical method: a guide to modern technique of plants. Third edition. ISBN: 0412-57260-5.

Hassan A., Abdessanmad D., Peter P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbial Biotech.* 90, 1829–1845.

Hirschman J., Murray J. (1987). Pneumonia and Lung abscess. In Harrison's principles of internal medicine. New York 1987: 1082p.

Imad (2023). Maladies des poumons/ tuberculose symptômes traitement. ELSAN.care.

ISO 20776-1. (2019). Sensibilité *in vitro* des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes. 19 p.

Jacques E. (2024). Alcaloïdes ; intérêt thérapeutique- Médicaments. Encyclopædia Universalis.

Jamila H. (2018). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, Français. ffNNT: 2009INPL057Nff. fftel-01748769ff.

John N.N., Reuter, AFP. (2024). Pneumonies infantiles : trois pays africains dans le top cinq mondial. Africanews.

Jucimar J., Ivo J., Edson R. and Raimundo B. (2011). Review of Terpenoids from endophytic Fungi. Molecules ISSN 1420-3049 www.mdpi.com/journal/molecules.15p.

Julien B. (2014). Revêtements surfaciques à base de polymères et de composants naturels : applications à la mise au point de surfaces mécano-sensibles et de substrats cellulaires nourriciers. These. Université de Strasbourg. 236 p.

Kamou N. (2016). Contribution à l'étude chimique d'un champignon endophyte isolé d'une plante médicinale camerounaise *allanblackia floribunda* (clusiaceae) ; isolement, caractérisation et test de sensibilité. Mémoire. Université de Yaoundé I. 54P.

Kang Z and Buchenauer H. (2002). « Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue ». European Journal of Plant Pathology; 108: 653-660.

Kengne K. (2016). Métabolites secondaires des fruits de *Macaranga hurifolia* (Euphorbiaceae) : isolement et structure. Mémoire. Université de Yaoundé I. 54p.

Kenneth (2020). Colonies de *Mycobacterium tuberculosis* sur milieu de culture Lowenstein-Jensen. 12 p.

Kerharo J. et Bouquet A. (1950). Plantes médicinales et toxiques de la Cote d'Ivoire et de la Haute-Volta, Vigot, Paris. 301 p.

Kerryn (2018). *Voacanga thouarsii*. CJM Tree Growers. <https://cjmgtowers.co.za>.

Khan L., Hamayun M., Kim H., Kang M., Lee H. and Lee J. (2011). Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus*. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. Process Biochemical; Jha. Endophytes and Secondary Metabolites. Springer International Publishing. 46:440–7.

Kusari S. and Spiteller M. (2012). Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites progress, challenges and opportunities. Metabolomics, Roessner, U., ed. Rijeka, Croatia: In Tech, 241–266.

Labane K. et Meziane C. (2024). Inventaire des champignons endophytes des semences de deux variétés du blé dur (*Triticum durum* : Oued Bared et Simeto) et celle de l'orge (*Hordeum vulgare* : Rihane). Mémoire, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. 84p.

Larabi et Louadj Z. (2015). Pneumonies bactériennes chez l'enfant. Mémoire de fin d'études à la Faculté de médecine de l'université Abou bekr Belkaid-Tlemcen ; 95 p

Lecellier A. (2016). Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle, Thèse de doctorat en pharmacie de l'université de Reims Champagne-Ardenne, 196 p.

Leslie J. and Summerell B. (2006). The Fusarium laboratory manual. First edition. 387.

Lim H., Kim H., Seo J. (2007). In vitro activity of Kaempferol isolated from *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against (propionibacterium aines). Journal of Natural Product of Microbiology. 45: 473-477.

Liu Y., Song C., Zhang Z., Wang L., Guo J., Zou X. and Tan X. (2004). *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*; 114: 279-287.

Louar F. et Rouha N. (2014). Les pneumopathies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique. Thèse de Doctorat en Médecine à l'université Abderrahmane Mira de Bejaia ; 68 p.

Lozniewski A., Rabaud C., Nancy B. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins: p4-5. Pharmaceutiques de l'université de Douala. *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat à la Faculté de médecine et des sciences; 92 p.

Marie C. (2021). Pneumonie : le danger méconnu. *Cameroun-tribune.com*.

Mathys V. (2010). Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents anti-tuberculeux. Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles, Belgique. ID : 83915155

MBG (2012). Distribution de *Voacanga thouarsii*; <http://www.tropicos.org/Name>

Miliute I., Buzaitė O., Baniulis D. et Stanys V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(4), 465-478.

Nouridine R. (2014). Etude comparative des alcaloïdes dans différentes parties d'une plante (Feuille, écorce de tronc, écorce de racine, graine) cas de : *Voacanga thouarsii*. Mémoire. Université d'Antananarivo. 106p.

Nutri et Co (2024). Les flavonoides : définition, bienfaits, danger et aliments. *occidentalis. IJAL*; 2: 1-7.

OMS (2009). Treatment of tuberculosis guidelines 4th ed: antitubercular agents, administration and dosage, tuberculosis, pulmonary, drug therapy, national health programs, patient compliance and Guidelines. ISBN 978 92 4 154783 3.

OMS (2016). Rapport sur la lutte contre la tuberculose dans le monde. www.who.int/global_report. Vol 6.

OMS (2018). Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. academyjournals.org.

OMS (2019). Les maladies infectieuses. Santé publique Ontario.

OMS (2019). Pneumonie. Aide-mémoire n° 331. Novembre 2016. (Consulté le 4 Avril 2019).

OMS (2022). Pneumonie de l'enfant/ détail/ principaux repères. Centre des médias.

OMS (2023). Infections respiratoires: causes, symptômes et préventions. info@clinicaelgeadi.com.

- OMS (2024).** Tuberculose /détail/ principaux repères. Centre des médias.
- OMS-UNICEF (2024).** Nombre de cas de pneumonie dans le monde. Globometer.com.
- Oses R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E. and Rodriguez J. (2008).** Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay, *Fungal Diversity*. 33: 77-86.
- Pascal F. et Marielle M. (2016).** Diagnostic indirect de la tuberculose: le test tuberculinique ou intradermo-réaction à la tuberculine (IDR). WordPress with Inkblot.
- Perraudin F. (2019).** Structure fonctionnelle des végétaux supérieurs : de la cellule aux tissus. Edito, Plantes et microbiote : Troubles digestifs fonctionnels. Numéro 3.
- Peter S., Catherine O., Modupe A. et Adediwura F. (2019).** Investigation of the anti-inflammatory and hypoglycaemic effects of macaranga hurifolia beille (eurphorbiaceae) extract on wistar albino rats. DOI: 10.23893/1307-2080.APS.05726.
- Petrini O. (1991).** Fungal endophytes of trees leaves In: Andrews J, Hirano S (eds). *Microbial ecology of leaves*. Springer, New York Berlin Heidelberg. PP. 179-197.
- Pfyffer G., Brown-Elliott B., Wallace J., Richard J. (2008).** *Mycobacterium*: general characteristics, isolation and staining procedures. In *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed, 1: 532– 559.
- Pimentel C., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Stuart M. and Azevedo L. (2006).** Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian Arch Biology and Technology*; 49: 705– 11.
- Pimentel R., Molina G., Dionisio P., Marostica R. and Pastore M. (2011).** The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology Research International*; 2011: 11 p
- PNLT Tunisie (2011).** Guide de prise en charge de la tuberculose. *Pseudomonas aeruginosa* by the action of polymixin. *J. Gen. Microbiol.* 9: 54-64.
- Ptail R. H., Patil M. P., Maheshwari V. L. (2016).** Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi: a review of biotechnological production and their potential applications. *Studies in natural products chemistry*, 49:189-205.

Rebeca D. (2023). Présentation des symptômes des maladies respiratoires : Le manuel MSD, John Hopkins university.

Rodriguez J., White F., Arnold E. and Redman S. (2009). Fungi endophytes: diversity and functional roles. *New Phytology*; 182: 314–30

Rukachaisirikul V., Sommart U., Phongpaichit S., Sakayaroj J. and Kirtikara K. (2008). Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry*; 69: 783-787.

SANBI (South African National Biodiversity Institute) (2022). Conservatoire et jardin Botaniques : *Macaranga hurifolia* Beille. *African Plant Database*.

SANBI (South African National Biodiversity Institute) (2022). Conservatoire et jardin Botaniques : *Voacanga thouarsii*. *African Plant Database*.

Sanjay S. (2024). Présentation de la pneumonie. University at Buffalo, Jacobs School of Medicine and Biomedical Science.

Savadogo B. (2012). Pneumopathies aiguës communautaires bactériennes aux urgences du CHU du point g : profil épidémiologique, clinique et pronostic. Thèse de doctorat à la faculté de médecine et d'odontostomatologie à l'université des sciences, des techniques et de technologie de Bamako ; 88 p.

Schmelzer G. (2008). Ressources végétales de l'Afrique tropicale Tome 11.

Selim K., El-Beih A., Abd El-Rahman T., El-Diwany A. (2012). Biology of endophytic fungi. *Curr Res Environ Appl Mycol* 2 (1): 31–82.

Sharma A. et Deshwal (2011). An overview: on phytochemical and pharmacological studies of *Butea mospermo*. *International Journal of Pharm Tech Research*. 3: 864-871.

Souba D., Arend H., Isidore M., Eric Z., Adama O., Arnaud K., Léon T., Lassana S. (2013). The Use of Broncho-Alveolar or Gastric Lavage for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Ouagadougou, Burkina Faso. *Journal of US-China Medical Science*, ISSN 1548-6648, USA: Volume 10, No. 1-2 (Serial No. 90), pp. 45–51.

Spatafora W., Bushley E. (2015). Phylogenomics and evolution of secondary metabolism in plant-associated fungi. *Curr Opin Plant Biology*; 26: 37–44.

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

Subbulakshmi K., Thalavaipandian R., Bagyalakshmi V. and Rajendran A. (2012). Bioactive Endophytic fungal isolates of *Biota orientalis*, *Pinus excels* and *Thuja*

Tankeshwar A. (2018). Ziehl-Neelsen technique-AFB Staining.

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

Zamora-Ros R. (2013). Dietary flavonoid and lignan intake and breast cancer risk according to menopause and hormone receptor status in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. Breast cancer research and treatment. 2357-2295.

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

Zerroung A. (2011). Métabolites secondaires bioactifs des champignons isolés de *Retama raetam* (Forsk). Université de Ferhat Abbas-Setif. 1–89.

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

ANNEXES

ANNEXES

Annexe I: Équipements et milieux de culture utilisés

Annexe I. 1 : Équipements



Microscope binoculaire



Évaporateur rotatif



HOTTE à FLUX de sécurité II



Autoclave «SANO Clav»



Incubateur



Frigo à - 4°C

Annexe I. 2 : Milieux de cultures

Sabouraud dextrose agar (SDA)

Dextrose.....40 g
Peptone.....10 g
Agar.....15 g
Eau distillée.....1000 ml
pH = 5.6



Potato dextrose agar (PDA)

Pomme de terre épluchées et coupées...200 g
Glucose.....20 g
Agar.....15 g
Eau distillée.....1000 ml
pH = 5.6



Czapek dox agar (CDA)

Sucrose.....30g
 Nitrate de sodium.....2g
 Phosphate de di potassium.....1g
 Sulfate de magnésium.....0,5g
 Chlorite de potassium.....0,5g
 Sulfate ferreux.....0,01g
 Agar.....15g
 Eau distillée.....1000 ml
 pH = 7.3



Middlebrook 7H9 (MBK 7H9)

Common components		Variable components	
Na ₂ HPO ₄	2.5 mg	Glycerol	2 mg/ml (0.2%)
KH ₂ PO ₄	1.0 mg	Oleic acid	50 µg/ml
NH ₄ SO ₄	0.5 mg	Palmitic acid	5.6 µg/ml
Na glutamate	0.5 mg	Albumin, Bovine	5 mg/ml (0.5%)
Na citrate	0.5 mg	Dextrose	2 mg/ml (0.2%)
Ferric NH ₄ citrate	40 µg	Catalase	3 µg/ml
MgSO ₄	50 µg	Casitone	0.1 mg/ml
CuSO ₄	1.0 µg	Tween 80	0.5 mg/ml (0.05%)
ZnSO ₄	1.0 µg	WR1339	0.25 mg/ml
CaCl ₂	0.5 µg	NaCl	0.85 mg/ml
Pyridoxine	1 µg	pH 6.6 ± 0.2	
Biotin	0.5 µg		

*Handbook of Microbiological Media, 2nd Edition, Atlas and Parks (Eds.), CRC Press.²⁵⁷

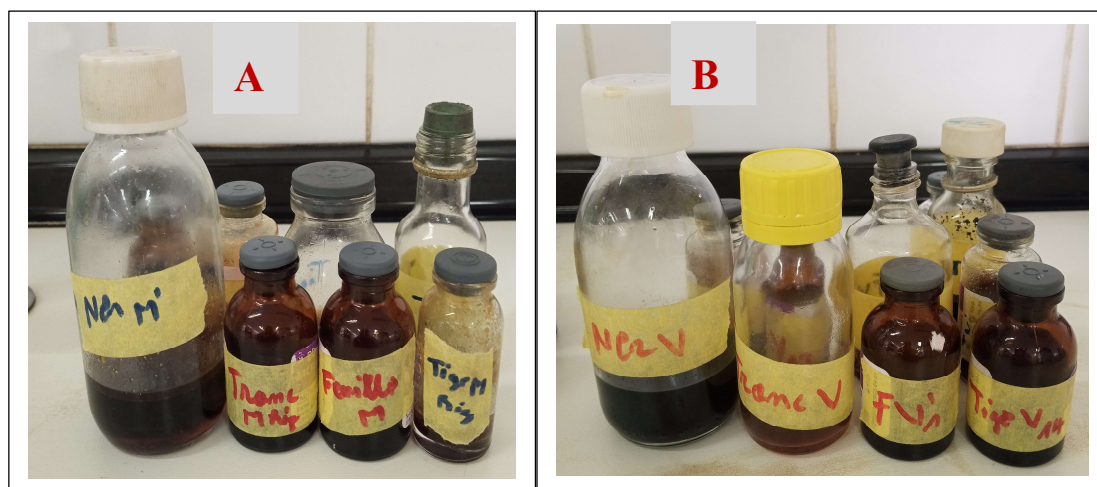


Annexe II: Préparation de quelques larmes pour la microscopie de champignons endophytes

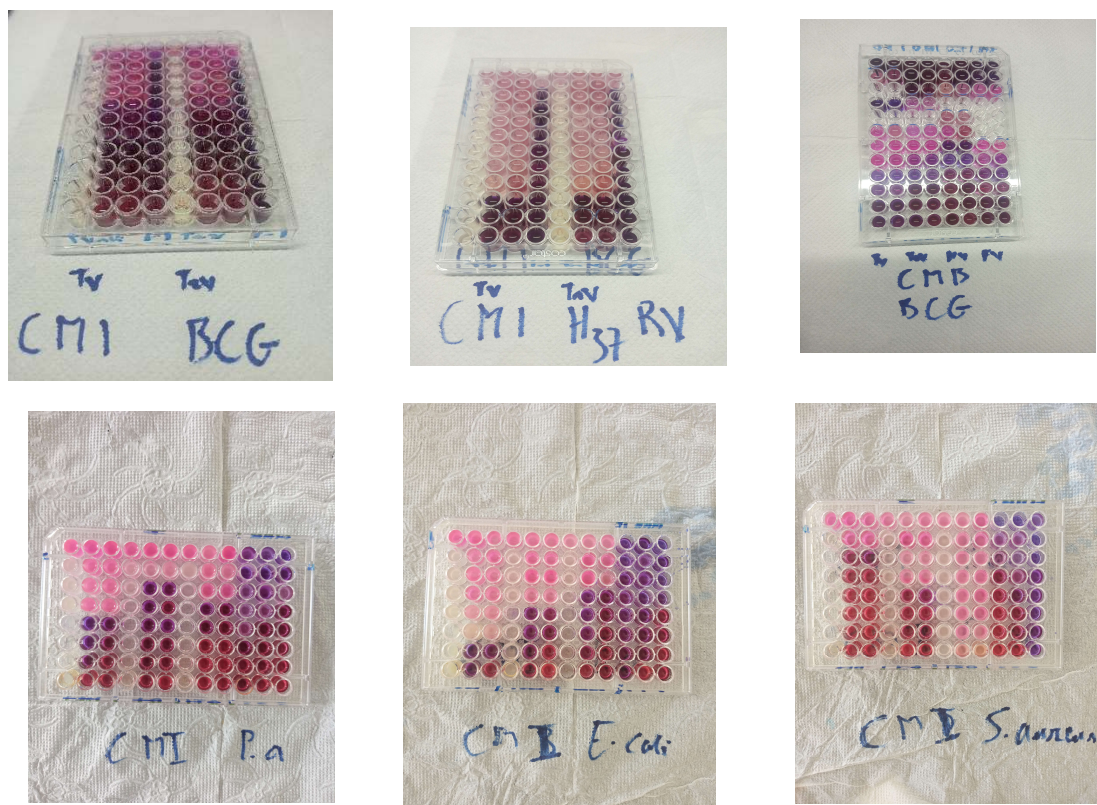


Quelques larmes colorées au bleu de méthylène et au rouge Congo.

ANNEXE III : Extraits de champignons endophytes (A : *M. hurifolia*, B : *V. thouarsii*)



ANNEXE IV : Quelques photos du résultat des paramètres d'inhibition



ANNAXE V : Photos des manipulations



ANNEXE VI; Résultats du screening phytochimique qualitatif des molécules standards exprimés selon les réactions de précipitation et/ou complexométrique mis en exergue dans le milieu réactionnel.

Métabolites secondaires	Positivité de la réaction
Alcaloïdes (Papavérine)	+++
Phénols (Acide caféique)	+++
Polyphénols (Catéchine)	+++
Tannins (Acide tannique)	+++
Saponines (Saponine)	+++
Flavonoïdes (Rutine)	+++
Terpénoïdes (lutéine)	+++
Stéroïdes (Stéarate de cholestérol)	+++

Légende : (+++) : présence surabondante.

N.B. : Les molécules standards ont été préparées à 50 µg/mL.

ANNEXE VI: Fiches caractérisations des champignons endophytes

CARACTERISATION MACROSCOPIQUE DANS LE PDA

CODES	ASPECT	RELIEF	TAILLE	COULEUR DE LA COLONIE	VITESSE DE CROISSANCE	BORDURE	FORME	COULEUR DE LA GELOSE	EXSUDAT
15	Poudreux	Plissé	Envahissante	Noire	Rapide	Irrégulière	Indéterminée	Incolore	Absent
58	Laineux	Plissé	Envahissante	Blanche	Rapide	Régulière	Ronde	Noire	Absent
81	Poudreux	Plissé	Envahissante	Verte	Rapide	Irrégulière	Indéterminée	Verte	Absent
24	Glabe	Plissé	Etendu	Rose	Lente	Irrégulière	Indéterminée	Rose	Absent
17	Duveteux	Plissé	Etendu	Blanche	Lente	Irrégulière	Indéterminée	Incolore	Absent
34	Laineux	Plissé	Envahissante	Noire	Rapide	Irrégulière	Etoile	Noire	Absent
46	Laineux	Plissé	Envahissante	Blanche	Rapide	Régulière	Ronde	Blanc-orange	Présent
50	Cotonneux	Plissé	Etendu	Blanche	Lente	Irrégulière	Ronde	Blanc-noire	Absent
59	Laineux	Plissé	Etendu	Beige	Lente	Irrégulière	Etoile	Blanche	Absent
57	Glabe	Plissé	Etendu	Blanc laiteux	Lente	Irrégulière	Indéterminée	Incolore	Absent
80	Glabe	Plissé	Petite	Rose	Très lente	Irrégulière	Trèfle	Blanc-rose	Présent
47	Duveteux	Plissé	Envahissante	Blanche	Lente	Régulière	Ronde	Blanc-noire	Absent
77	Glabe	Plissé	Etendu	Blanche	Lente	Régulière	Ronde	Blanche	Absent
83	Glabe	Plissé	Etendu	Blanchâtre	Lente	Régulière	Ronde	Blanche	Absent
45	Duveteux	Plissé	Envahissante	Blanche/noire	Rapide	Irrégulière	Indéterminée	Blanc-noir	Présent
38	Duveteux	Plissé	Envahissante	Blanc laiteux	Rapide	Régulière	Ronde	Blanche	Absent
72	Cotonneux	Plissé	Envahissante	Blanche	Rapide	Régulière	Ronde	Blanche	Absent
21	Laineux	Plissé	Envahissante	Blanche/noire	Rapide	Régulière	Ronde	Noire	Absent
33	Laineux	Plissé	Envahissante	Noire	Rapide	Régulière	Ronde	Noire	Absent
36	Granuleux	Plissé	Etendue	Blanche/rose	Lente	Irrégulière	Etoile	Orange	Présent
65	Granuleux	Plissé	Etendu	Verdâtre	Lente	Irrégulière	Cérébriforme	Noire	Absent
23	Poudreux	Plissé	Envahissante	Beige	Rapide	Régulière	Ronde	Noire	Absent
69	Laineux	Plissé	Envahissante	Noire	Rapide	Régulière	Etoile	Noir-blanche	Absent
78	Laineux	Plissé	Envahissante	Noire	Rapide	Irrégulière	Etoile	Noire	Absent

(Leslie et Summerell ; 2006)

CARACTERISATION MICROSCOPIQUE

CODES	NATURE DU THALLE	ORIGINE DES SPORES	ASPECT DES SPORES	MODE DE FORMATION DES CONIDIES	PRESENCE DE CHLAMYDOSPORES	TYPE DE CONIDIES	MODE DE REGROUPEMENT DE CONIDIES	STRUCTURE DE PROTECTION COMPACTE
15	Septé	Exogène	Amérospores	Phialidique	Absent	Phialique	Chaîne basipète	Absent
58	Septé	Exogène	Amérospores	Phialidique	Absent	Phialique	Chaîne basipète	Absent
81	Septé	Exogène	Amérospores	Phialidique	Absent	Phialique	Chaîne basipète	Absent
24	Septé	Exogène	Scolécospores	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
17	Septé	Exogène	Scolécospores	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
34	Septé	Exogène	Scolécospores	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
46	Septé	Exogène	Didyomospore	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
50	Septé	Exogène	Didyomospore	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
59	Septé	Exogène	Didyomospore	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
57	Septé	Exogène	Didyomospore	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
80	Septé	Exogène	Scolécospores	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
47	Septé	Exogène	Didyomospore	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
77	Septé	Exogène	Didyomospore	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
83	Septé	Exogène	Didyomospore	Phialidique	Présent	Phialique	Tête	Absent
45	Septé	Exogène	Phragmospores	Arthrique	Absent	Arthrosporique	Chaîne acropète	Absent
38	Septé	Exogène	Phragmospores	Arthrique	Absent	Arthrosporique	Chaîne acropète	Absent
72	Septé	Endogène	Amérospores	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Balle	Présent
21	Septé	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Absent
33	Septé	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Absent
36	Septé	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Absent
65	Septé	Exogène	Phragmospore	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Absent
23	Septé	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Phialique	Indéterminée	Absent
69	Septé	Exogène	Phragmospores	Indéterminée	Présent	Phialique	Indéterminée	Absent
78	Septé	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Indéterminée	Phialique	Indéterminée	Absent

(Leslie et Summerell ; 2006)