

ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES CHAMPIGNONS ENDOPHYTES ET DE L'HUILE ESSENTIELLE DE LA PLANTE MÉDICINALE *LAVANDULA OFFICINALIS* : ÉTUDE COMPARATIVE

NACEF Houda Sara^{1*}, FERDJIOUI Siham², CHAIBI Safa³ et RAMLA Khawla³

1. Laboratoire de Microbiologie appliquée- Université Farhat abbas Sétif 1- Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie-Département de Microbiologie- Sétif- Algérie
2. Laboratoire de Microbiologie appliquée- Université Farhat abbas Sétif 1- Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie-Département de Biochimie- Sétif- Algérie
3. Laboratoire de Microbiologie- Université Salah Boubnider-Constantine 03- Faculté de Génie des Procédés-Constantine- Algérie.

Reçu le 04/11/2022, Révisé le 06/12/2022, Accepté le 09/12/2022

Résumé

Description du sujet : La plante médicinale *Lavandula officinilis* est intéressante de connaître sa vertu thérapeutique, afin de remplacer les produits synthétiques par des molécules bioactives qui sont à base de plantes.

Objectifs : L'objectif de cette étude est l'isolement et l'identification des champignons endophytes plus l'extraction de l'huile essentielle de la plante médicinale *L. officinilis*, collectée de la région de Constantine (Algérie). Puis d'évaluer et comparer l'activité antibactérienne et antifongique de ces champignons et l'huile essentielle contre trois bactéries pathogènes : deux à Gram positif ; *Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, et une à Gram négatif ; *Pseudomonas fluorescens*, ainsi que le champignon pathogène *Fusarium oxysporum*.

Méthodes : L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro distillation. La méthode de diffusion sur milieu gélosé et la méthode de la double culture ont permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique, respectivement, de l'huile essentielle et des champignons endophytes, vis-à-vis les souches bactériennes testées par déterminer les diamètres des zones d'inhibition.

Résultats : Le pourcentage de colonisation était 40,55%. La purification et l'étude microscopique des souches isolées ont donné la possibilité d'identifier 5 genres de moisissures à savoir *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* ainsi qu'un Mycélium stérile. L'extraction de l'huile essentielle de la plante a été réalisée par hydro distillation, où le rendement a été estimé à 1,5%. En utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide, il a été constaté que certains champignons endophytes ont une activité antimicrobienne sur au moins un microorganisme pathogène, où les zones d'inhibition variaient entre 0-39,5 mm, cette dernière a été obtenue par l'isolat Mycélium stérile, et *Aspergillus niger* avec 28,5mm, contre *Bacillus sp.*. Toutefois, l'huile essentielle avait une activité contre toutes les bactéries pathogènes testées. Quant au test d'activité antifongique par la méthode de la double culture, il a été constaté que les deux champignons endophytes *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* ont un effet inhibiteur sur le champignon pathogène testé, où le pourcentage d'inhibition a été estimé à 61,55% , 41% respectivement. Alors que l'huile essentielle était moins efficace 12 mm.

Conclusion : Les champignons endophytes ont une activité antifongique plus élevée par rapport à l'huile essentielle qui a une meilleure activité antibactérienne. Par conséquent, la plante médicinale et les champignons endophytes pourraient être une source prometteuse de composés bioactifs. L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche des molécules d'origine naturelle biologiquement actives

Mots clés : *Lavandula officinilis* ; champignons endophytes ; huile essentielle ; activité antibactérienne ; activité antifongique.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGI AND ESSENTIELLE OIL OF THE MEDICINAL PLANT *LAVANDULA OFFICINALIS*: COMPARATIVE STUDY

Abstract

Description of the subject: The medicinal plant *Lavandula officinilis* is interesting to know its therapeutic virtues, to replace the synthetic products by bioactive substances, which are with plants.

Objective: Isolation and identification of endophytic fungi, and the extraction of essentielle oil from the medicinal plant *L. officinilis*, collected from the region of Constantine (Algeria). Then to evaluate and compare their antibacterial and antifungal activities against three pathogenic bacteria: two Gram-positive; *Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, and one Gram-negative; *Pseudomonas fluorescens*, as well as the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*.

Methods: The extraction of the essential oil was carried out by hydro distillation. The method of diffusion on agar medium and the method of double culture allowed highlighting the antibacterial and antifungal activities, respectively, of the essential oil and the endophytic fungi against the bacterial strains tested by determining the diameters of the inhibition zones.

Results: The percentage of colonization was 40.55%. The purification and microscopic study of the isolated strains gave the possibility of identifying five genera, which are *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* as well as a sterile Mycelium. The extraction of the essential oil from the plant was carried out by hydro distillation, where the yield was estimated at 1.5%. It was found that some endophytic fungi have antimicrobial activity on at least one pathogenic microorganism, where the zones of inhibition ranged between 0-39.5 mm, the latter was obtained by the sterile Mycelium isolate, and *Aspergillus niger* with 28.5mm, against *Bacillus sp.*, however, the essential oil had activity against all pathogenic bacteria tested. As for the antifungal activity test by the double culture method, it was found that the two endophytic fungi *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* have an inhibitory effect on the tested pathogenic fungus, where the percentage of inhibition was estimated at 61.55%, 41% respectively. While essential oil was less effective (12 mm).

Conclusion: Endophytic fungi have higher antifungal activity compared to essential oil, which has better antibacterial activity. Therefore, the medicinal plant and endophytic fungi could be a promising source of bioactive compounds. All of these results obtained constitute only a first step in the research for biologically active molecules of natural origin.

Keywords : *Lavandula officinilis*; Endophytic fungi; Essential oil; Antibacterial activity; Antifungal activity.

* Auteur correspondant: Nacef Houda Sara, E-mail: Houda.Nacef@univ-constantine3.dz

INTRODUCTION

Le développement de plusieurs microbes résistants aux médicaments a soulevé la nécessité de recherche de nouveaux agents antimicrobiens pour le traitement des maladies humaines. Une recherche intensive d'agents nouveaux et plus efficaces pour traiter ces problèmes de maladie est actuellement en cours, et les endophytes sont considérés comme une nouvelle source de composés médicinaux potentiellement utiles. Les micro-organismes ont la capacité d'utiliser divers substrats en raison de la diversité de leur évolution biologique et biochimique. Les substrats solides qu'ils utilisent comprennent, entre autres, les plantes vivantes. Les bactéries et les champignons sont connus pour coopérer avec de nombreuses plantes pour former des associations mutuellement bénéfiques. Les actinomycètes et les champignons, de tous les micro-organismes étudiés, se sont révélés être les producteurs les plus prolifiques de métabolites secondaires [1]. Parmi les différents groupes de champignons les plus importants sont les champignons endophytes. Comme ces derniers représentent des sources biologiques nouvelles inexplorées et utiles dans de nombreux secteurs, dont les plus importants sont les secteurs pharmaceutique, industriel et agricole [2]. L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est liée au développement des civilisations. Ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et des préparations culinaires. L'évaluation de ces ressources végétales naturelles ne se limite pas aux seuls champignons d'intérieur, car leur importance réside également dans l'extraction de ses huiles essentielles. Ces derniers sont des produits à forte valeur ajoutée et sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire [3]. Le domaine d'application des huiles essentielles est diversifié malgré l'arrivée sur le marché des composés de synthèse ; C'est ainsi qu'elles trouvent de nombreuses applications dans l'industrie chimique et dans le domaine de l'agroalimentaire (condiments, épices, aromatisants,) et l'aromathérapie (parfumerie, cosmétique et savonnerie) [4].

Lavandula officinalis ou Lavande vraie, est une plante à feuilles étroites. Son nom latin est *Lavandula angustifolia* ou *L. officinalis*. Elle connue en arabe sous le nom de «*huzâma* » [5]. *Lavandula officinalis* est un arbuste dense pouvant atteindre une hauteur de 50 cm à 1 mètre. Les feuilles, linéaires et gris-vert quand elles sont jeunes et plus vertes avec l'âge, varient en longueur entre 3 et 5 cm et sont à la

fois amères et aromatiques. Le tronc est en bois. La tige florale est généralement non ramifiée et les fleurs sont bleues, regroupées en bractées ovales à l'aisselle, le sommet des branches luxuriantes forme des épines un peu lâches qui sont très aromatiques, les racines peuvent pousser jusqu'à une profondeur de 4 m [6, 7]. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre présent travail dans l'objectif consiste en l'étude d'activité antimicrobienne des champignons endophytes isolés à partir de la plante médicinale *Lavandula officinalis*, récoltée à partir de l'université de Constantine 3, ainsi que l'extraction de l'huile essentielle de cette plante et l'étude de son activité antimicrobienne.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

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

2. Souches microbiennes

Trois souches bactériennes ont été utilisées : *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus sp.* Et le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*. Les souches microbiennes provenant de laboratoire de microbiologie de l'université Ferhat Abbas de Sétif, Algérie.

3. Echantillonnage

Des échantillons de la plante de lavande ont été collectés au hasard à partir des feuilles, des tiges et de racines de 5 places différentes dans la même zone, les échantillons doivent être exempts de symptômes pathologiques. Les échantillons ont été stockés séparément dans des sacs stériles et ramenés au laboratoire pour être utilisé dans un délai ne dépassant pas 24 heures [8].

4. Méthodes

4.1. Isolement et purification des champignons endophytes

Les échantillons de la plante ont été lavés sous l'eau du robinet pour éliminer les résidus qui y sont collés, puis exécution du processus désinfection des échantillons dans le but d'éliminer les organismes qui vivent à la surface. Les échantillons ont été coupés pour subir des bains successifs d'éthanol à 96% pendant une minute, d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 3 minutes, d'éthanol à 96% pendant 30 secondes et enfin un lavage avec l'eau distillée stérile.

Les échantillons traités ont été coupés avec un outil pointu et stérile en petits morceaux (0,5 cm × 0,5 cm), et laisser sécher sur du papier filtre stérile. Cinq morceaux de chaque échantillon ont été cultivés dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Fig. 1) [9].

Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 5 jours. Après incubation, chaque champignon ayant poussé sera repiquée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Le pourcentage de colonisation est calculé selon la méthode de Sandloui *et al.* [10] en utilisant la formule suivante :

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

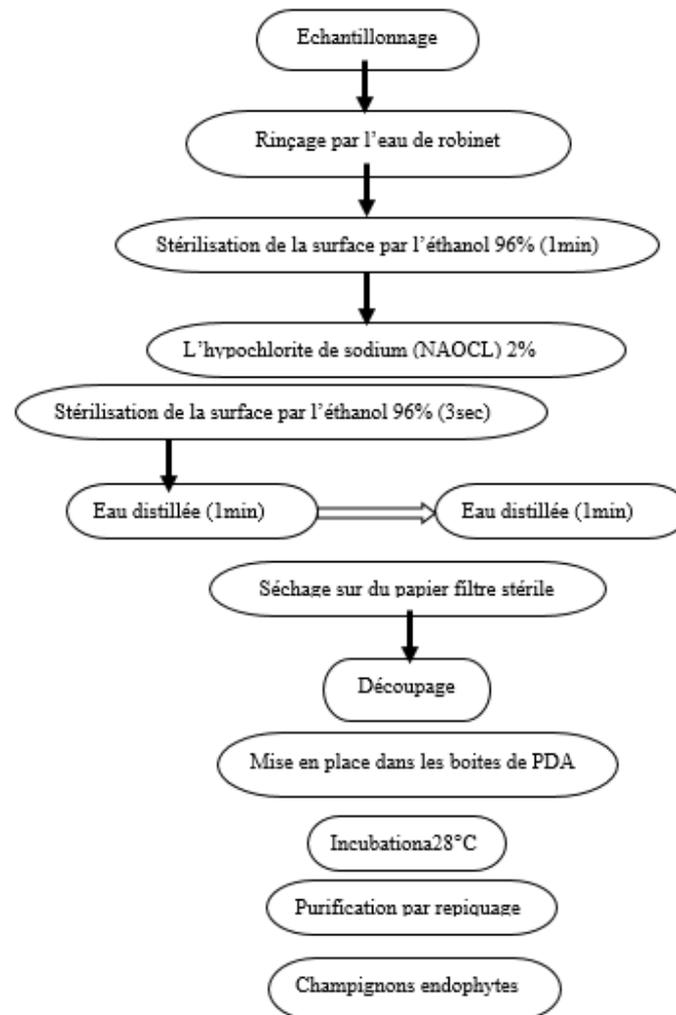


Figure 1 : Isolement et purification des champignons endophytes [9]

4.2. Identification des champignons endophytes

Les isolats ont été identifiés en se basant sur les caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques utilisant les clés d'identification [11]. Les caractéristiques suivantes ont été retenues : (i) La morphologie du mycélium, sa couleur. Ainsi que la production des fructifications, sclérotés, (ii) La forme et la couleur des spores.

4.3. Activité antibactérienne des champignons endophytes

Les isolats fongiques ont été testés à l'égard des bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.* et *Pseudomonas fluorescens*. Ces

dernières ont été ensemencées dans des boîtes contenues du GN et incubées à 37 °C pendant 24 heures. Après l'incubation, les colonies sont grattées en utilisant l'anse de platine puis mélangées à l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne doit être bien homogène, la turbidité a été ajustée à 0,5 mcFarland ce qui correspond à l'absorbance impliquée entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde de 620 nm. À l'aide d'un écouvillon stérile, nous avons procédé un ensemencement des différentes bactéries dans des boîtes contiennent le PDA [12]. L'activité antibactérienne a été réalisée suivant la technique de culture par diffusion.

Cette technique consiste à prélever des cylindres d'agar où les champignons ont préalablement culture sur PDA et incubé à 28 °C pendant 7 jours. À partir de ces cultures, des disques de 6 mm ont été découpés et placés sur la surface des boîtes déjàensemencée par les bactéries à tester. Après incubation à 28°C pendant 5 jours, les zones d'inhibition autour les disques fongiques ont été mesurés [12].

4.4. Activité antifongique des champignons endophytes

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

pathogène seul a été préparée (Fig. 2). Toutes les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 7 jours. Le rayon de la colonie du champignon pathogène dans les boîtes contrôle et en double culture a été mesuré. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule de Ting et al. [13].

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times$$

100 ... (2). Avec : **R1** : le rayon de la colonie du champignon pathogène dans la boîte à témoin. **R2** : le rayon de la colonie du champignon pathogène en double culture.

Le pourcentage d'inhibition a été classé en quatre catégories : (i) Pourcentage d'inhibition <30% (faible activité), (ii) 30% < pourcentage d'inhibition < 50% (activité modérée), (iii) 50% < pourcentage d'inhibition < 70% (activité élevée), (iv) Pourcentage d'inhibition > 70% (activité très importante).

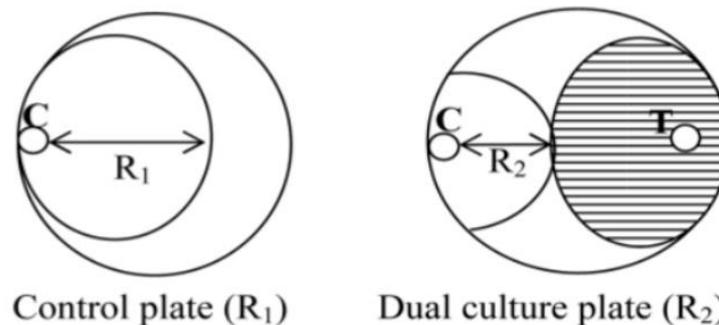


Figure 2 : Mesure de la croissance radiale des mycéliums de champignons pathogènes par méthode de plaque de culture double. C : champignon pathogène, T : champignon testé [14].

4.5. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. 100g de matière végétale sèche sont placés dans un ballon de 1 litre, et mélangés avec 600 ml d'eau distillée. Faites bouillir pendant une heure et demie, température fixée à 70 degrés. Les huiles essentielles sont de la vapeur d'eau qui monte dans le condensat et après condensation et allumage, l'eau huileuse excessive est séparée de l'eau. Après avoir extrait l'huile végétale puis mesurer le volume d'huile essentielle que nous avons obtenu, elle est conservée dans du verre scellé, emballé dans une feuille d'aluminium et conservé au réfrigérateur à 4 °C afin de la préserver de la lumière et de la chaleur, jusqu'à ce qu'elle soit utilisée pour des tests biologiques [15 ; 16].

5. Calcul de rendement

Le rendement (R%) exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante [17].

$$R\% = \frac{M_{hs}}{M_{vg}} \times 100 \dots (3).$$

Avec : **R%** : Rendement de l'extraction d'huile essentielle en pourcentage (%), **M_{hs}** : masse de l'huile essentielle en gramme (g), **M_{vg}** : masse d'essai de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g)

6. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle

L'aromatogramme consiste à déposer des disques de papier Wattman de 6mm de diamètre, préalablement stérilisés, à la surface de la géloseensemencée par la suspension bactérienne après avoir été chargée de 10 µl de l'huile essentielle à concentration 0,15mg/ml. D'autres disques vides sont utilisés comme témoins négatifs en plus du disque de l'antibiotique Gentamycine comme témoin positif. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré. Concernant l'activité antifongique de l'HE, une suspension de spores a été préparée à partir de culture pure et jeune de champignon pathogène *F. oxysporum*, dans l'eau physiologique stérile.

Cette suspension servira pour ensemencer la gélose PDA. L'incubation a été réalisée à 28°C pendant 3-5 jours. La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égal à 20 mm le germe est très sensible. Une boîte à témoin positif a été préparée en utilisant des disques imprégnés par l'antibiotique Clotrimazole [18 ; 19].

7. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel SPSS 20. Les résultats ont été soumis à une analyse de la variance (ANOVA) à un niveau de probabilité de 5%. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm écart type.

RESULTATS

1. Isolement et purification des champignons endophytes

Aucune croissance de champignons ou de bactéries n'a été enregistrée sur les milieux de

culture utilisés pour le contrôle de l'efficacité de la stérilisation de surface. Ceci nous conduit à déduire que les étapes utilisées dans le processus de stérilisation étaient suffisantes pour se débarrasser des microorganismes de surface (Epiphytes) et de leurs spores, et que les isolats obtenus peuvent être considérés comme étant des champignons internes (Endophytes) pour les plantes étudiées. Toutes les parties de la plante utilisée ont été colonisées par des champignons endophytes, des levures et des actinomycètes avec des proportions variables. Le pourcentage de colonisation est 40,55%, distribué comme suit : 2 isolats des actinomycètes, 4 isolats des levures et 15 isolats des moisissures avec des taux : 9,5% ; 19% et 71 % respectivement (Fig. 3). Les résultats obtenus ont montré que la colonisation de la plante par les champignons était plus élevée dans les racines (99%), suivi par les tiges (12,5%), tandis que les feuilles étaient les plus faibles à 5,02%.

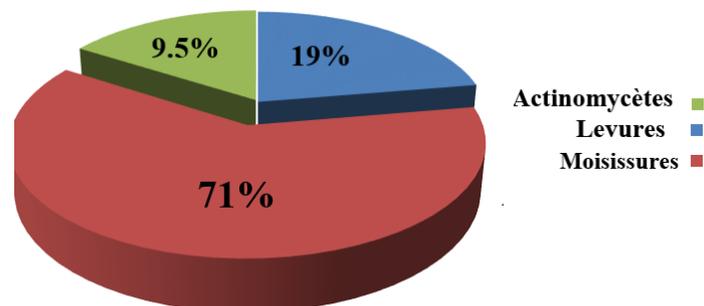


Figure 3 : Taux de colonisation des endophytes de *Lavandula officinalis*

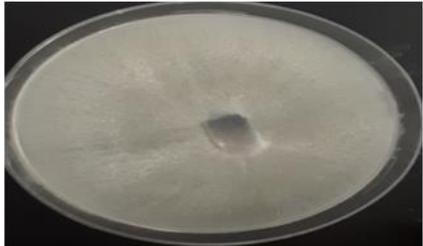
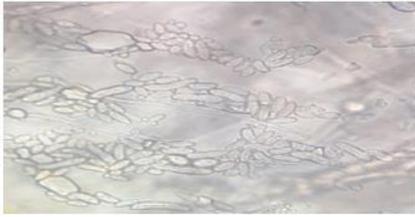
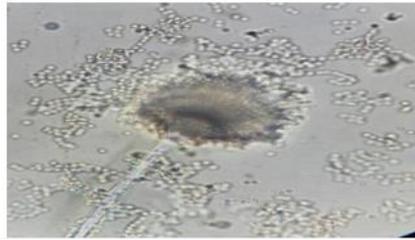
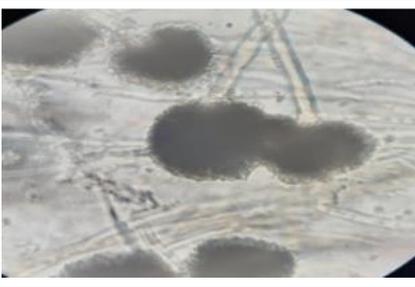
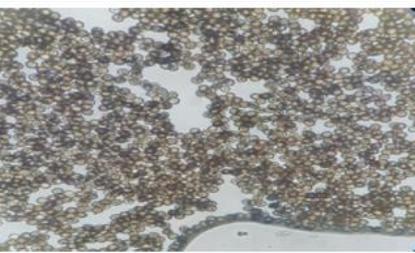
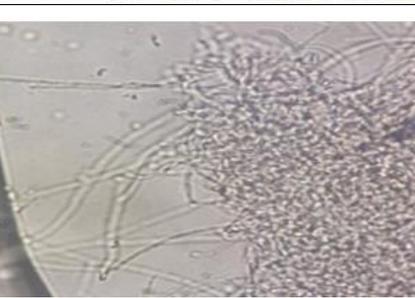
2. Identification des champignons endophytes

L'identification des champignons repose sur des critères macroscopique et microscopique.

Quinze isolats fongiques ont été obtenus appartenant à Cinq genres différents (Tableau 1).

Tableau 1 : Photographie d'aspect macroscopique et microscopique des isolats fongiques

Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Nom scientifique de l'isolat fongique
		<i>Penicillium sp.</i>

		<p><i>Fusarium sp.</i></p>
		<p><i>Aspergillus terreus</i> <i>sp1.</i></p>
		<p><i>Aspergillus terreus</i> <i>sp 2.</i></p>
		<p><i>Aspergillus niger</i></p>
		<p><i>Alternaria</i> <i>altarnata.</i></p>
		<p><i>Mycélium stérile</i></p>
		<p>N.I</p>



3. Calcul du rendement en huile essentielle

Nous rappelons que l’huile essentielle a été extraite de la lavande par un hydrodistillateur de type Clevenger. Nous avons obtenu une huile de couleur jaune pâle avec une odeur âcre. Nous

avons récupéré une quantité huileuse importante, le rendement obtenu avoisine un taux de 1,5%. L’extraction a montré que la quasi-totalité du volume de l’huile essentielle obtenu est extraite au bout des 90 premières minutes.

4. Activité antibactérienne

4.1. Activité antibactérienne des champignons endophytes

L’activité antibactérienne des isolats des champignons endophytes sur la croissance des 3 souches bactérienne dont deux espèces à gram positif (*S. aureus* et *Bacillus sp*) et une espèce à Gram négatif (*P. fluorescens*). Le diamètre des zones claires autour des disques fongiques a été

mesuré après 5 jours d’incubation. Parmi les 9 champignons, 66,7% des champignons ont montré un pouvoir inhibiteur pour certaines des bactéries pathogènes testés avec une zone d’inhibition comprise entre [24,5-39,5 mm] pour *Bacillus sp.* et [15,5 – 16,5mm] pour *S. aureus*, mais aucune activité n’a été observée pour *P. fluorescens* (Tableau 2).

Tableau 2 : Activité antibactérienne des champignons endophytes isolés (n=3)

	Diamètre des zones d’inhibition (mm) (Moyenne±écart type)		
	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Penicillium sp.</i>	27,5±1,50	16,5±0,5	00±0,00
<i>Fusarium sp</i>	25±0,00	00±0,00	00±0,00
<i>Aspergillus terreus sp.1</i>	00±0,00	15,5±0,5	00±0,00
<i>Aspergillus niger</i>	28,5±0,50	00±0,00	00±0,00
<i>Alternaria alternata</i>	24,5±0,50	00±0,00	00±0,00
<i>Mycélium stérile</i>	39,5±0,50	15,5±2,5	00±0,00
<i>Aspergillus terreus sp. 2</i>	00±0,00	00±0,00	00±0,00
NI	00±0,00	00±0,00	00±0,00
NI	00±0,00	00±0,00	00±0,00

4.2. Activité antibactérienne de l’huile essentiel (HE)

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

une indication précise de l’activité antibactérienne de l’HE utilisée. Les résultats montrent que toutes les souches bactériennes apparaissent presque sensibles à des degrés divers pour notre HE, où *S. aureus* et *Bacillus sp.* étaient plus sensibles que *P. fluorescens* (Tableau 3 ; Fig. 4).

Tableau 3: Activité antibactérienne de l’huile essentielle de *L. officinalis* (n=3)

	Diamètre des zones d’inhibition (mm) (Moyenne ± écart type)
<i>Bacillus sp</i>	23±0,42
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	11,5±0,14
<i>Staphylococcus aureus</i>	23,25±0,55

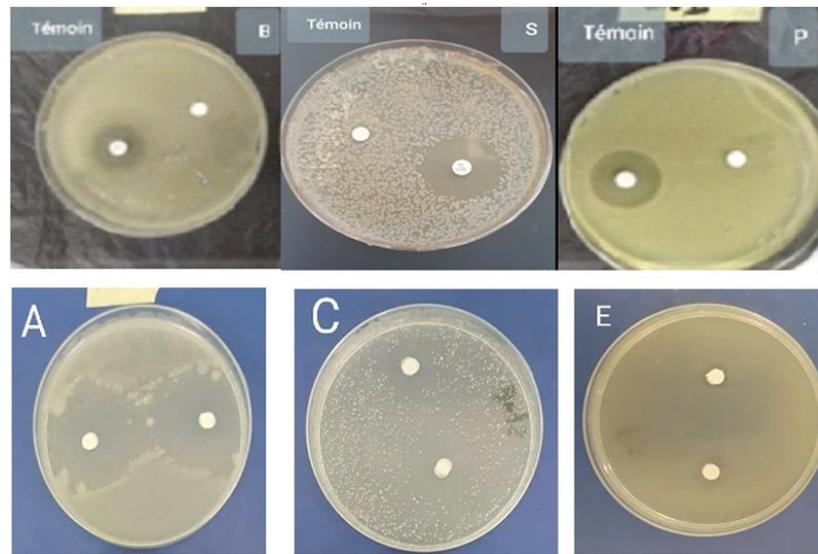


Figure 4: Activité antibactérienne de l'HE (A, B) : *Bacillus sp.*, (C, S) : *S. aureus*, (E, P) : *P. fluorescens*

4.3. Comparaison de l'activité antimicrobienne entre les champignons endophytes et l'huile essentielle

On a constaté que l'activité antimicrobienne des champignons endophytes et de l'huile essentielle diffère d'une bactérie à l'autre, selon les résultats obtenus, on a montré que les champignons endophytes avaient une activité antibactérienne plus importante sur la bactérie pathogène *Bacillus sp.* par rapport à l'huile

essentielle ($p < 5\%$), alors que chez *Staphylococcus aureus*, l'huile essentielle présente une activité antibactérienne importante par rapport aux champignons endophytes ($p < 1\%$). Tandis que la bactérie *Pseudomonas fluorescens* était plus sensible à l'huile essentielle ($p < 5\%$), alors que nous n'avons enregistré aucune activité pour les champignons endophytes (Fig. 5).

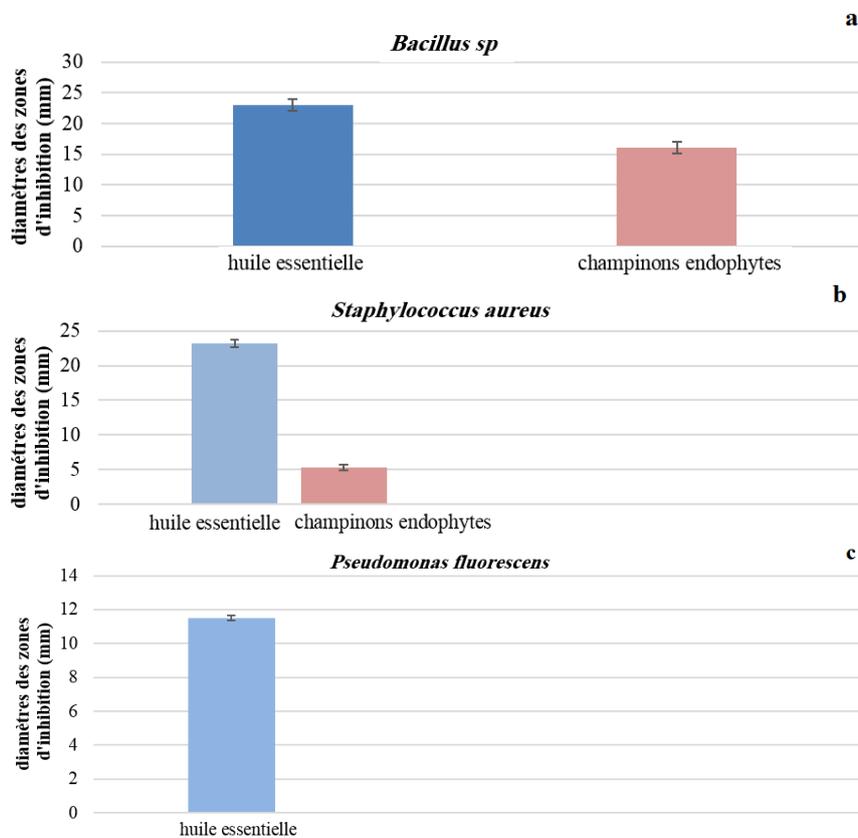


Figure 5 : Comparaison de l'effet antibactérien entre les champignons endophytes et l'huile essentielle. a : *Bacillus sp.*, b : *S. aureus*, c : *P. fluorescens*

5. Activités antifongique

5.1. Activités antifongique des champignons endophytes

Pour évaluer le potentiel antagoniste des champignons endophytes isolés, la méthode de la double culture a été utilisée contre le champignon pathogène *F. oxysporum*. Les

pourcentages d'inhibition ont été calculés après 7 jours d'incubation. Parmi les 9 isolats fongiques, seulement *Aspergillus niger* et *Penicillium sp.* ont exprimés une activité antifongique, où le pourcentage d'inhibition était respectivement de 41% et 61 % (Fig. 6) ($p < 5\%$).

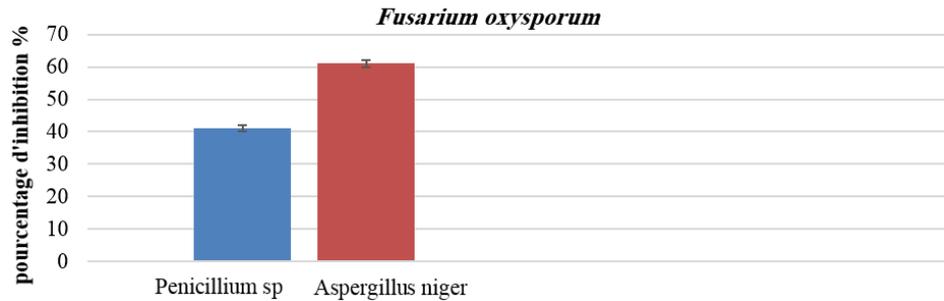


Figure 6 : Activité antifongique des champignons endophytes isolée contre *F. oxysporum*.

5.2. Activité antifongique de l'huile essentielle

Les résultats du test de l'activité antifongique de l'HE étaient relativement faibles, car le

diamètre de la zone d'inhibition était de 12,5 mm (Fig. 7).

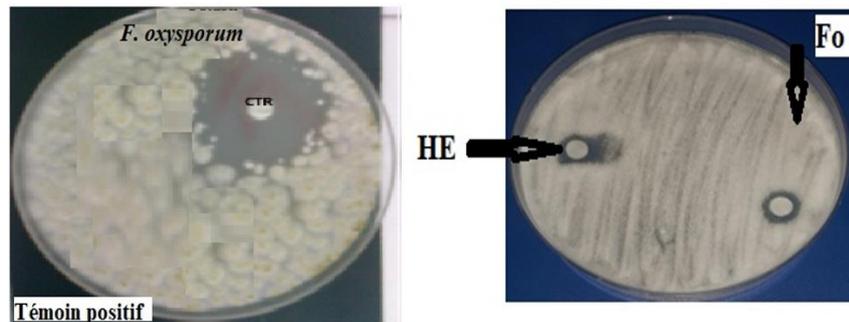


Figure 7 : Zone d'inhibition obtenue par l'huile essentielle contre *F. oxysporum* FO : *F.oxysporum*, HE : disque contenant l'HE, CTR : Clotrimazole.

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

Dans l'esprit de mettre en évidence l'effet comparé de l'activité antifongique des champignons endophytes et de l'huile

essentielle de la lavande à l'égard du champignon pathogène *F. oxysporum*, les résultats ont montré que l'activité antifongique des champignons endophytes isolés est plus forte que celle de l'huile essentielle de la même plante ($p < 1\%$). (Fig. 8).



Figure 8 : Comparaison de l'effet antifongique contre *F. oxysporum* entre les champignons endophytes et l'huile essentielle.

DISCUSSION

Les résultats obtenus ont montré que la colonisation de la plante par les champignons était plus élevée dans les racines (99%), suivi par les tiges (12,5%), tandis que les feuilles étaient les plus faibles à 5,02%.

Cette différence de diversité est due à l'état physiologique de la plante hôte en étant affectée par la saison (en raison de facteurs tels que l'eau, la période d'éclairage, la température, etc.), l'emplacement et l'âge [20]. Cette variation a été également constatée par Li et al. [21], qui ont récupéré 1046 isolats de champignons endophytes à partir de dix espèces de plantes halophytes et ont trouvé que les taux de colonisation des champignons endophytes variaient entre $7,5 \pm 3,33\%$ et $83,75 \pm 8,95\%$ dans les tiges et entre $33,75 \pm 11,19\%$ et $97,5 \pm 1,67\%$ dans les racines. Du et al. [22], ont isolé 420 isolats fongiques endophytes à partir de *Securinega suffruticosa*, 170 provenaient des racines, 143 des tiges et 107 des feuilles. Dans leur étude sur *Mukia maderasapatana*, Houali et al. [23], ont trouvé que les segments racinaires étaient plus densément colonisés par les champignons endophytes, comme en témoigne la colonisation totale des feuilles, tiges et racines qui s'est avérée être de 86, 64 et 92% respectivement. Cela prouve que les champignons affectent la plante hôte et les tissus.

Selon les résultats obtenus, certains champignons isolés ont une activité antibactérienne contre au moins une bactérie pathogène, les bactéries à Gram-positif étaient plus sensibles aux champignons endophytes que les bactéries à Gram-négatif, Sadrati et al. [24], ont prouvé que les champignons endophytes montrent une activité stabilisatrice sur au moins une des bactéries à Gram-positif, où les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, étaient actifs contre toutes les bactéries à Gram positif testées (*Bacillus sp.*, *S. aureus* et *Enterococcus faecalis*). Les bactéries à Gram-négatif (*Citrobacter freundii*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas sp*) n'étaient pas sensibles à la plupart des champignons endophytes. Mane et al. [25], ont également confirmé qu'en plus de *Penicillium* et *Aspergillus*, le *Fusarium* a également une forte activité antimicrobienne. L'activité inhibitrice des champignons endophytes isolés confirme la possibilité que ces isolats produisent des composés ayant une activité biologique inhibant la croissance des organismes pathogènes, ces différents métabolites secondaires pouvant être utilisés dans le domaine de la science des Médicaments

et également comme source potentielle de médicaments précieux [1].

Les résultats montrent que toutes les souches bactériennes apparaissent presque sensibles à des degrés divers pour notre HE, où *S. aureus* et *Bacillus sp.* étaient plus sensibles que *P. fluorescens*, ces résultats sont identiques avec l'étude de Dragoljun et al. [26], qui ont confirmé l'utilisation de l'huile de lavande comme un agent antibactérien car elle contient des composés oxydants terpènes oxygénés qui ont une activité antimicrobienne, et il a été également prouvé dans la même étude que l'effet des huiles sur les bactéries Gram-positifs diffère de son effet sur les bactéries à Gram négatif.

Les huiles essentielles sont trouvées pour affecter les propriétés structurales et fonctionnelles de membranes artificielles. Les composants des huiles essentielles ont été montrés pour perméabiliser les membranes, les faisant gonfler, les bactéries à Gram négatif sont généralement plus résistantes aux antiseptiques et désinfectants que les bactéries à Gram-positif. La membrane externe des bactéries à Gram négatif agit comme une barrière qui limite l'entrée de nombreux types d'agents antibactériens sans rapport chimique [26]. Bachiri et al. [27], ont avancé quant au mode d'action des HEs sur les cellules bactériennes, il semble plus probable que l'activité antimicrobienne résulte de l'association conjointe de plusieurs mécanismes sur différentes cibles cellulaires. Ainsi, les composés phénoliques auraient pour cible la membrane plasmique et la paroi. D'autres agents compromettent plutôt l'intégrité structurale de la membrane plasmique en induisant une perte du matériel cytoplasmique au moment où la cible pour d'autres est probablement l'ADN bactérien suite à diffusion à travers les membranes bactériennes. Outre les propriétés de l'HE, la sensibilité d'un microorganisme dépend du microorganisme lui-même ; les bactéries à Gram (+) sont plus sensibles aux HEs que les bactéries à Gram (-), ceci revient en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces dernières qui contient une double membrane, contrairement à la structure simple de la paroi des bactéries Gram (+). Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des HEs confirment ce phénomène. Benyagoub et al. [28], confirment également dans leur étude sur l'activité antibactérienne de certains extraits d'huile de lavande sur six souches de bactéries responsables d'intoxications alimentaires ; *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*,

Salmonella typhimurium, *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens*, il apparaît que le pouvoir antibactérien contre les bactéries à Gram positifs est plus important que les bactéries à Gram négatifs, et dans ce contexte, il est remarquable que l'huile extraite présente une activité importante contre *S. typhimurium*. Ces résultats sont confirmés par Vieira et al. [29], où ils ont signalé un effet faible à moyen vis-à-vis les souches bactériennes *E. coli* et *S. aureus*, présentant un diamètre de 11,5 et 9mm, correspondant à un pourcentage d'inhibition de 12,77 et 10% respectivement. Les bactéries à Gram négatifs apparaissent plus résistantes comparées à celle de Gram positifs, cela est dû principalement à la différence de structure de leur paroi externe, qui est plus riche en lipopolysaccharides et en protéine par rapport de celles à Gram positifs qui rendent ces bactéries plus hydrophiles.

Concernant l'activité antifongique des endophytes, il a été constaté que les champignons internes isolés de la plante médicinale *Taraxacum coreanum nakia* ont une activité antifongique contre *F. oxysporum*. La différence dans l'activité antifongique des champignons endophytes peut être due par la différence dans l'état physiologique de la plante hôte, qui varie selon les saisons en raison de facteurs tels que l'eau, la période d'éclairage, la température ...etc. Ces différences peuvent être responsables de la différence dans les activités biologiques des communautés fongiques [29]. Cette différence peut aussi s'expliquer par la spécificité des champignons endophytes vis-à-vis des champignons phytopathogènes, c'est à dire les métabolites secondaires produites par les endophytes sont spécifiques au niveau de l'espèce. Plusieurs études ont été menées sur l'efficacité de l'huile de lavande contre les champignons pathogènes, en particulier sur les *Aspergillus* et *Fusarium*. Où ils ont trouvé que l'huile de lavande a la même activité antibactérienne, mais une activité antifongique différente et cela suggère que les différents composants de l'huile peuvent être responsables à une activité spécifique par rapport les endophytes.

Laib [30], explique aussi la faiblesse de l'activité fongique de l'huile de lavande par sa composition chimique, ainsi que la proportion de biomolécules joue un rôle déterminant. La différence de la sensibilité des genres à l'huile essentielle peut être due à certains facteurs, à savoir la dose appliquée et l'espèce ciblée. Ainsi, les résultats obtenus dans notre travail peuvent être interprétés par la qualité des molécules bioactives contenant dans la plante

étudiée qui n'ait pas efficace contre *F. oxysporum*, cependant, elle peut être efficace contre d'autres champignons pathogènes.

CONCLUSION

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude de l'activité antimicrobienne des champignons endophytes ainsi que de l'huile essentielle de la plante médicinale *L. officinalis*. Les résultats obtenus indiquent que les champignons endophytes ont un pouvoir antagoniste contre les bactéries pathogènes ainsi que le champignon phytopathogène testé. Cette efficacité laisse entrevoir la possibilité d'utiliser ces microorganismes dans la lutte contre les maladies humaines, ainsi que dans la lutte biologique contre les microorganismes phytopathogènes surtout les champignons. L'huile essentielle a présenté une activité antimicrobienne mais moins efficace par comparaison aux champignons endophytes. Donc on peut conclure que l'importance de la plante médicinale *Lavandula officinalis* est due à une relation complémentaire entre la composition chimique de la plante et sa flore microbienne. Pour une étude beaucoup plus approfondie, on pourra envisager d'autres investigations telles que : (i) L'application de l'huile essentielle de *L. officinalis* directement dans la lutte biologique durant le stockage, (ii) Une identification moléculaire des espèces fongiques isolées, (iii) Une étude quantitative et qualitative de l'huile essentielle et l'extrait actif des champignons endophytes isolés, (iv) La détermination des fractions les plus actives et éventuellement de caractériser les molécules responsables de ces activités.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Sharma D., Pramanik A., Agrawal P. K. (2016). Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosad*. Don. 3 *Biotech*.6 (2).(2016), 1-14.
- [2] Zheng Y., Qiao X., Miao C., Liu K., Chen Y., Xu L., Zhao L. (2016). Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Annals of Microbiology*. 66(2),(2016):529-542.
- [3] Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., Chaabouni M. M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10 :119-125.
- [4] Tardugno R., Serio A., Pellati F., D'Amato S., Chaves López C., Bellardi M. G., Benvenuti S. (2018). *Lavandula x intermedia* and *Lavandula angustifolia* essential oils: phytochemical composition and antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Natural product research*, 33(22): 3330-3335.

- [5] Elharas K., Daagare A., Mesifioui A., Ouhssine M. (2013). Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *LaurusNobilis* et *Lavandula Angustifolia*. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 9(2): 134-141.
- [6] Lis-Balchin M. (2002). Lavender genus *Lavandula*. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles. 1st edition. London. pp 296. <https://doi.org/10.1201/9780203216521>
- [7] Benabdelkader T. (2012). Biodiversité bioactivités et biosynthèse des composés terpéniques volatils des *Lavande stoechassensu lato*, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Biologie végétale. Université Jean Monnet - Saint-Etienne; Ecole normale supérieure de Kouba (Alger). Français. fNNT : 2012STET4007ff. ffile-00952695
- [8] Zerroug, A., Sadrati, N., Demirel, R., Bakli, S., & 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.
- [9] Orole O. O. Adejumo T. O. (2009). Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research* .3(12):969-973
- [10] Sandhi S. S., Kuman S., Ravindr R., Ahrwal P. (2014). Isolation and identification of endophytic fungi from *Ricinus Communis* Linn. And their antibacterial activity » *Journal .of Researchi in Pharmacy and Chemistry Research*. 4.(3) : 611-618.
- [11] Dufresne, P.H. (2018). Identification des champignons d'une portance médicale. Laboratoire de Santé Publique du Québec. 7-52.
- [12] Devaraju R., Satish S. (2011). Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian Journal of Experimental Sciences*.2.(1) : 75-79.
- [13] Ting A. S. Y., Mah S. W., Tee C. S. (2009). Prevalence of Endophytes Antagonistic Towards *Fusarium Oxysporum* F.Sp. Cubense race 4 in Various Plants. *Am-Eurasian J Sustain Agric*.3(3): 399-406.
- [14] Nacef H. S., Belhattab R., Larous L. (2020). Chemical Composition, Antimicrobial Study Against Human and Plant Pathogenic Microorganisms and Optimization of Bioactive Metabolites Produced by the New Strain *Aspergillus oryzae* 18HG80 Isolated from Saline Soil (El-Baida Marsh, Algeria), *Journal of Microbiology Research*, 10(1): 11-21 DOI: 10.5923/j.microbiology.20201001.03
- [15] El Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amari F., Aberchane M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre » *. Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 12(4) : 345-351.
- [16] El Amri J., Elbadaoui K., Zair T., Bouharb H., Chakir S., Alaoui T.I. (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *siléne vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*. 82:7481–7492.
- [17] Selvakumar P., Edhaya Naveena B., Prakash D. S. (2012). Studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleusamboinicus* and eucalyptus globules. *Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine*.715-719.
- [18] Duraffourd C., D'hervicourt L. Lapraz J. C. (1990). Cahiers de phytothérapie clinique. 2^{ème} édition. Paris: Masson.
- [19] Kalembe et D., Kunicka A. (2003). Antibacterianand antifungal. Properties of essential oils. *Curent Medicinal chemistry*.10.(2003):813-829.
- [20] 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*. 46: 85-91 <https://www.tandfonline.com/loi/tmyb20>.
- [21] Li J.L., Sun X., Zheng Y., Lü P.P., Wang Y.L., Guo L.D. (2020). Diversity and community of culturable endophytic fungi from stems and roots of desert halophytes in northwest China. *mycoKeys*.62:75–95
- [22] Du W., Yao Z., Li J., Sun C., Xia J., Wang B., Shi D., Ren L. (2020). Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Securinega suffruticosa* in the Yellow River Delta. *PLoS One*. 15: e0229589: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0229589>.
- [23] Houali K., Ouzid Y., Saadoun N. S. (2019). Antimitotic and antiproliferative activities of crude fungal extracts of endophytic foliar fungi of peganum harmala l .from dayateaiat (Laghout, Algeria). *Journal of Fundametal and Applied Sciences*. 11.(2): 587-604.
- [24] Sadrati N., Zerroug A., Demirel R., Bakli S., Harzallah D. 2020. Antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Aspergillus neobridgeri* isolated from *Pistacia lentiscus* against multi-drug resistant bacteria. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 15(3): 82–95. <https://doi.org/10.3329/bjpp.v15i3.40923>
- [25] Mane R. S., Paarakh P. M., Vendamurthy A. B. (2018). Brief Review on Fungal Endophytes. *International Journal of Secondary Metabolite*, 5(4):288-303.
- [26] Dragoljub L., Miladinović, Budimir S., Ilić Tatjana M., Mihajilov-Krstev, Nikola D. Nikolić, Ljiljana C. Miladinović, Olga G., Cvetković . (2012). Investigation of the chemical composition—antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Anal Bioanal Chem*. 403 : 1007–1018.
- [27] Bachiri L., Bammou M., Echchegadda G., Ibjibjen J., El Rhaffari L., Haloui Z., Nassiri L. (2017). Composition Chimique Et Activité Antimicrobienne Des Huiles Essentielles De Deux Espèces De Lavande: *Lavandula Dentata* Spp. *Dentata* Et *Lavandula Pedunculata* Spp. *Pedunculata*. *European Scientific Journal*. 13(21), 293. <https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n21p293> .
- [28] Benyagoub E., Nabbou N., Sirat M., Dahlis Z. (2014). Propriétés antibactériennes et constituants photochimiques des extraits de la *lavande* de la région de Tlemcen et leur effet sur quelques espèces bactériennes responsables d'infection alimentaire. *Revue des bio Ressources*. 4:18-28.
- [29] Vieira M., Hughes A., Gil V., Vaz A., Alves T., Zani C., Rosa C., Rosa L. (2011). Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology*. 58(1): 54–66.
- [30] Laïb I. (2011). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Thèse de Magister, Université Mentouri, Constantine. p.169 .